Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Alteração da composição dos polissacarídeos da parede celular de
Nicotiana tabacum, pela modulação da expressão do gene *uxs* que
codifica a enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35)**

Ana Letícia Ferreira Bertolo

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
2007

Ana Letícia Ferreira Bertolo
Engenheira agrônoma

Alteração da composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, pela modulação da expressão do gene *uxs* que codifica a enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35)

Orientador:

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Bertolo, Ana Letícia Ferreira

Alteração da composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, pela modulação da expressão do gene *uxs* que codifica a enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35) / Ana Letícia Ferreira Bertolo. - - Piracicaba, 2007.
142 p.; il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Açúcar 2. Expressão gênica 3. Fumo 4. Nucleotídeos 5. Parede celular vegetal 6. Plantas transgênicas 7. Polissacarídeos I. Título

CDD 633.71

DEDICO

**Aos Meus Pais, Bertolo e Sônia,
pelo incondicional apoio e
incentivo para essa importante
conquista.**

OFEREÇO

**Ao Meu Companheiro Raphael por
todos os momentos de paciência,
dedicação e carinho, que muito
contribuíram nessa longa jornada.**

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, e em particular:

Ao Dr. Carlos Alberto Labate, pelas oportunidades e confiança constante, assim como, pela orientação e amizade.

A Dra. Mônica T. V. Labate pela amizade, sugestões e auxílio irrestrito na execução deste trabalho.

Ao Dr. Nick Carpita (Purdue University – USA) por me receber de “braços abertos”, pela confiança e grande contribuição na realização das análises de GC-MS e Real Time PCR.

A Dra. Maureen McCann (Purdue University – USA) pelas sugestões e por ter permitido utilizar o seu laboratório para realizar as análises de FTIR.

Ao Químico Juliano Bragatto, por toda ajuda e principalmente pelas análises em HPLC.

Ao meu grupo de trabalho (Mônica, Daniela e Gunta) pela cooperação na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas pela agradável convivência durante todos esses anos, e também, aos colegas da Purdue University pelo incondicional apoio que recebi nos meses que lá estive.

Ao Departamento de Genética da ESALQ-USP, bem como a todos os professores e funcionários pelo apoio na realização deste trabalho.

A FAPESP e a CAPES pela concessão das bolsas de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 A parede celular vegetal	23
2.2 Composição da parede celular vegetal	24
2.2.1 Parede Primária	24
2.2.2 Parede Secundária	27
2.3 Biossíntese da parede celular vegetal.....	28
2.4 A enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Clonagem do cDNA do gene <i>uxs</i> codificador da enzima UDP-glucuronato descarboxilase	37
3.1.1 Extração de RNA total.....	37
3.1.2 Purificação do mRNA a partir do RNA total	39
3.1.3 Reação de RT-PCR.....	40
3.1.4 Clonagem do cDNA do gene <i>uxs</i> de ervilha no vetor de entrada TOPO® e transformação química de células competentes de <i>E. coli</i>	41
3.1.5 Análise da transformação das células competentes por PCR.....	41
3.1.6 Extração de DNA plasmidial.....	42
3.1.7 Sequenciamento do vetor TOPO® recombinante	42
3.2 Expressão da enzima UDP-glucuronato descarboxilase de ervilha em <i>E. coli</i>	43
3.2.1 Clonagem do gene <i>uxs</i> no vetor pDEST™17	44
3.2.2 Transformação da linhagem BL21-AI™ de <i>E. coli</i>	45
3.2.3 Seleção do clone de maior expressão da enzima UDP-glucuronato descarboxilase	45
3.2.4 Sequenciamento da proteína UDPGlcADC por espectrometria de massas ...	46
3.2.5 Purificação da UDPGlcADC.....	48
3.2.6 Análise da atividade enzimática.....	49

3.3 Clonagem do cDNA do gene <i>uxs</i> de ervilha no vetor binário <i>Gateway</i> de transformação de plantas	50
3.4 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com o vetor binário <i>Gateway</i> recombinante	52
3.5 Transformação genética do tabaco	53
3.6 Análise das plantas de tabaco transformadas via PCR	54
3.7 Análise das progênes das plantas transformadas	55
3.8 <i>Southern blot</i>	56
3.9 <i>Northern blot</i>	59
3.10 Análise do nível de expressão dos transgenes por PCR Semi-Quantitativo (SQ-PCR) e PCR em Tempo Real	61
3.11 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por FTIR (<i>Fourier Transform Infrared microspectroscopy</i>).....	64
3.12 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por GC-MS (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)	68
3.13 Determinação de celulose por método colorimétrico	71
3.14 Análise da esterificação dos ácidos urônicos das plantas transgênicas de tabaco	72
3.15 Determinação do grupo O-Acetil pelo método de Hestrin	74
3.16 Análise da composição da parede celular secundária das plantas	74
3.17 Ferramentas de bioinformática	76
3.17.1 BLAST – Basic Local Alignment Search Tool	76
3.17.2 NEBcutter V 1.0.....	77
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	79
4.1 Clonagem do cDNA do gene <i>uxs</i> codificador da enzima UDP-glucuronato descarboxilase.....	79
4.2 Expressão da enzima UDP-glucuronato descarboxilase de ervilha em <i>E. coli</i>	82
4.3 Clonagem do cDNA do gene <i>uxs</i> de ervilha no vetor binário <i>Gateway</i> de transformação de plantas	90
4.4 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com o vetor binário <i>Gateway</i> recombinante	91
4.5 Transformação genética do tabaco	91
4.6 Análise das plantas de tabaco transformadas via PCR	92
4.7 Análise das progênes das plantas transformadas	93

4.8 Southern blot.....	97
4.9 Northern blot.....	98
4.10 Análise do nível de expressão dos transgenes por PCR Semi-Quantitativo (SQ-PCR) e PCR em Tempo Real	99
4.11 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por FTIR (<i>Fourier Transform Infrared microspectroscopy</i>)	102
4.12 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por GC-MS (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)	106
4.13 Determinação de celulose por método colorimétrico	109
4.14 Análise da esterificação dos ácidos urônicos das plantas transgênicas de tabaco.....	110
4.15 Determinação do grupo O-Acetil pelo método de Hestrin.....	112
4.16 Análise da composição da parede celular secundária	113
5 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXO	129

RESUMO

Alteração da composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, pela modulação da expressão do gene *uxs* que codifica a enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35)

A parede celular vegetal, estrutura essencial para as plantas, é extremamente importante para a economia humana, já que apresenta diversas utilidades, como por exemplo, fabricação de papel, fibras de vestuário, construção civil, entre outras. A maior parte da parede celular vegetal primária (aproximadamente 90%), é formada por polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas. Os monossacarídeos, unidades formadoras dos polissacarídeos, são sintetizados, nas plantas, a partir de diferentes açúcares nucleotídeos, sendo que, o suprimento desses, pode afetar a biossíntese dos polissacarídeos da parede celular. Visando analisar o impacto da alteração do fluxo metabólico do carbono na composição da parede celular, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo alterar a composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, através da modulação da expressão do gene *uxs*, responsável pela codificação da enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (UDPGlcADC, EC 4.1.1.35) que converte UDP-D-glucuronato em UDP-D-xilose, importante açúcar nucleotídeo, precursor do monossacarídeo xilose. Para isso, após a clonagem do gene *uxs* de ervilha, foram obtidas plantas transgênicas de tabaco superexpressando esse gene. Diversas análises foram realizadas para determinação da composição química da parede celular primária e secundária dessas plantas. Pela análise de FTIR da parede celular primária, verificou-se que três linhagens transgênicas apresentaram espectrotipos consistentes, indicando uma redução na quantidade de pectinas e ligações ésteres carboxílica nessas linhagens transgênicas. Apesar de não terem sido detectadas alterações na proporção dos monossacarídeos ramnose, xilose, arabinose, manose e galactose, e na quantidade de celulose, na parede celular primária das plantas transgênicas, foram observadas diferenças na proporção de galactose não esterificada, nas linhagens que apresentaram espectrotipo. Com relação à parede celular secundária, observou-se que algumas linhagens transgênicas apresentaram maior concentração de lignina solúvel relacionada a uma redução no conteúdo de lignina insolúvel.

Palavras-chave: Parede celular vegetal; UDP-D-glucuronato descarboxilase; UDP-D-xilose; Açúcar nucleotídeo; Tabaco

ABSTRACT

Alteration in the composition of cell wall polysaccharides in *Nicotina tabacum* by modulating the expression of the *uxs* gene, coding for UDP-D-glucuronic acid decarboxylase enzyme (EC 4.1.1.35)

The plant cell wall is not only an essential structure for plants, but also an extremely important raw material in human economy. The plant cell wall has diverse utilities, for example, papermaking, textile fiber, civil construction. Polysaccharides, such as cellulose, hemicelluloses and pectins, are the major components of the primary plant cell wall (approximately 90%). These polysaccharides are formed by monosaccharides, which are synthesized in the plant from different nucleotide sugars. The supplement of the nucleotide sugars can affect plant cell wall polysaccharides biosynthesis. Aiming at analyzing the impact of the alteration in the metabolic carbon flux on cell wall composition, the objective of this research project was to alterate the plant cell wall polysaccharides composition by the modulation of the *uxs* gene. This gene encodes the UDP-D-glucuronic acid decarboxylase enzyme (UDPGlcADC, EC 4.1.1.35) that promotes the conversion of UDP-D-glucuronic acid to UDP-D-xylose, an important sugar nucleotide precursor of xylose monosaccharide. To achieve this goal, the pea *uxs* gene was cloned and transgenic tobacco plants overexpressing this gene were obtained. Several analyses were performed to determinate the primary and secondary cell wall composition of those transgenic plants. The primary cell wall analysis by FTIR identified three transgenic lines that show different spectrotypes compared to wild type and those transgenic spectrotypes had the same features. The results indicate a reduction of pectin and ester carbonyl binding in the transgenic plants. No alterations were detected in the monosaccharide (rhamnose, xylose, arabinose, manose and galactose) proportions and the amount of cellulose in the primary cell wall of the transgenic plants. Nevertheless, differences in the proportion of unesterified galactose were observed in the same transgenic lines that showed spectrotypes. With regard to secondary cell wall, some transgenic lines showed an increase in soluble lignin which is related to a reduction in insoluble lignin.

Keywords: Plant cell wall; UDP-D-glucuronic acid decarboxylase; UDP-D-xylose; Sugar nucleotide; Tobacco

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A₂₆₀ ou A₂₈₀ - absorbância a 260 ou 280 nm de comprimento de onda

ACN - acetonitrila

AMBIC - bicarbonato de amônio

atm - atmosfera

att - sítio específico de recombinação do bacteriófago *lambda* (Landy, 1989)

BAP - bensilaminopurina

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA - albumina sérica bovina

°C - grau centígrado

cDNA - DNA complementar ao RNA

CG - Controle *Gateway*, planta de tabaco transformada com o vetor *Gateway* desprovido do cDNA do gene de interesse *uxs*

CH₂Cl₂ - diclorometano

CIA - solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico

CMC - 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbiimida (metil-*p*-tolueno sulfonato)

CO₂ - dióxido de carbono

CTAB - detergente brometo de cetiltrimetilamônio

DEPC - dietilpirocarbonato

DMSO - dimetil sulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

D.O._{600 nm} - densidade ótica a 600 nm

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato

DTT - ditioneitol

EC - código enzimático

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

FeCl₃ - cloreto férrico

g - grama

GalA - galacturonato ou ácido galacturônico

x g - força centrífuga relativa à aceleração padrão de gravidade

HCl - ácido clorídrico

H₂O - molécula de água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HPAE-PAD - *High Performance Anion Exchange - Pulsed Amperometric Detection*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Precisão

IAA - iodoacetamida

IBA - ácido indol-butírico

IUB - *International Union of Biochemistry and molecular biology*

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

kb - quilobase

kDa - quilo Dáltons

L - litro

LB - meio de cultura Luria-Bertani

LiCl - cloreto de lítio

M - molar

mg - miligrama

MilliQ - água destilada deionizada e filtrada a 0,2µm

mL - mililitro

mM - milimolar

MOPS - ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico

mRNA - RNA mensageiro

ms - milisegundos

MS - Meio formulado por Murashige e Skoog (1962)

NAA - ácido naftalenoacético

NaCl - cloreto de sódio

NaBD₄ - borodeutereto de sódio

NaBH₄ - borohidreto de sódio

NAD⁺ - *nicotinic adenine dinucleotide*

NaOH - hidróxido de sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ng - nanograma (10^{-6} grama)

NH₄OH - hidróxido de amônio

nm - nanômetro

nptII - gene nopalina fosfotransferase II, de resistência à canamicina (Bevan et al., 1983)

Oligo (dT) - Oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli-T)

ORF - *open reading frame* ou fase aberta de leitura

PAD - *Pulsed Amperometric Detection*

pb - pares de bases

PCR - reação em cadeia da polimerase

pmoles - picomoles

PMSF - *phenylmethylsulphonyl fluoride*

primer - oligonucleotídeo iniciador

psi - libra por polegada quadrada, unidade de pressão no sistema inglês/americano

p/v - peso por volume

PVP - polivinil pirrolidona

q.s.p. - quantidade suficiente para

RNA - ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

RT-PCR - síntese de cDNA por uma transcriptase reversa, seguida de PCR

SDS - dodecil sulfato de sódio

TAPPI - *Technical Association for the worldwide Pulp, Paper, and converting Industry*

Taq - DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

TFA - ácido trifluoroacético

Tris - Tris-hidroximetil-aminometano

Tween - *polyxyethylene sorbitan monolaurate*

U - unidades de enzima

UDP - uridinodifosfato

UDP-GlcA - UDP-D-glucuronato ou UDP-D-ácido glucurônico

UDP-GalA - UDP-D-galacturonato ou UDP-D-ácido galacturônico

UDPGlcADC - UDP-D-glucuronato descarboxilase

UGD - UDP-D-glicose desidrogenase

uxs - gene codificador da enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase

UXS - proteína UDP-D-glucuronato descarboxilase

v/v - volume por volume

WT - espécie selvagem (não transformada)

β -(1-4) D-glicose - cadeia linear de monômeros D-glicose unidos por ligações β -(1-4)

μ g - micrograma

μ L - microlitro

μ M - micromolar

λ - DNA do fago lambda (marcador de peso molecular)

1 INTRODUÇÃO

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica envolvida na manutenção da forma e rigidez das plantas, formada em grande parte por polissacarídeos, consiste de uma complexa rede formada entre celulose e hemiceluloses, embebida em uma matriz de pectina. A parede celular sofre mudanças na sua composição durante o crescimento e diferenciação das células, e também, em resposta a estresse ambiental e ataque de patógenos (BLEE et al., 2001).

A maior parte do carbono fixado pela fotossíntese das plantas é incorporado nos polissacarídeos da parede celular. Os monossacarídeos, unidades formadoras dos polissacarídeos, são bastante diversos e sua biossíntese requer um controle quantitativo sutil durante o crescimento e desenvolvimento (SEIFERT, 2004). Os monossacarídeos são sintetizados, nas plantas, a partir de diferentes açúcares nucleotídeos, sendo que, o suprimento desses, pode afetar a biossíntese dos polissacarídeos da parede celular.

O monossacarídeo xilose é o principal componente das hemiceluloses da parede celular, que incluem os xiloglucanos na parede primária e os xilanos na parede secundária das dicotiledôneas, assim como, os arabinoxilanos na parede primária dos cereais (BINDSCHEDLER et al., 2005). Esse monossacarídeo é sintetizado, nas plantas, a partir do açúcar nucleotídeo UDP-D-xilose, que tem grande importância biológica pois, além de ser precursor de xilose, esse açúcar nucleotídeo exerce papel regulatório no controle do fluxo de vários outros açúcares nucleotídeos. O suprimento de açúcares nucleotídeos pode afetar o balanço geral da biossíntese dos polissacarídeos da parede celular. O principal mecanismo de controle da biossíntese dos polissacarídeos parece ser a presença ou ausência das enzimas que promovem a síntese dos polissacarídeos (polissacarídeo sintases), o que está fortemente relacionado ao metabolismo do açúcar nucleotídeo requerido. Esse tipo de regulação da biossíntese de polissacarídeos torna sua manipulação ao nível do fluxo de monossacarídeos e sua incorporação qualitativa altamente viável. A manipulação do tamanho do conjunto de açúcares nucleotídeos pode ter efeitos tanto quantitativos, quanto qualitativos na matriz de polissacarídeos (BOLWELL, 2000).

A biossíntese dos polissacarídeos formadores da parede celular vegetal tem grande importância econômica em diversas áreas, como por exemplo, indústria alimentícia, produção de papel e celulose, construção civil, indústria têxtil, produção de combustível, entre outros, despertando dessa maneira, o interesse no estudo dos mecanismos moleculares e genéticos envolvidos na sua formação. Na indústria alimentícia, por exemplo, vários aspectos da parede celular são de fundamental importância, uma vez que interferem na qualidade dos alimentos derivados de plantas. O amadurecimento de frutas e vegetais está associado com mudanças na estrutura e composição da parede celular, da mesma forma, bebidas derivadas de plantas contêm frequentemente grandes quantidades dos polissacarídeos presentes na parede celular.

Para a indústria de papel e celulose, a composição da parede celular é extremamente importante, pois pode afetar diretamente o processamento da madeira na produção de papel e pastas de celulose, assim como, influenciar o rendimento da indústria na extração de celulose. Por exemplo, estudos desenvolvidos pela Cia Suzano de Papel e Celulose sobre a influência da composição da parede celular na produção da pasta celulósica, indicaram que as concentrações das hemiceluloses e dos ácidos urônicos afetam algumas propriedades físico-químicas do papel produzido. Uma maior concentração de hemiceluloses diminui a energia consumida no refino de polpas pela inserção de moléculas de água nas regiões cristalinas das fibras (GIERTZ, 1948), devido a alta capacidade higroscópica das hemiceluloses (BUCKERIDGE, 2000), permitindo assim, benefícios econômicos. Além disso, o aumento na concentração de hemiceluloses pode representar ganhos na qualidade do papel, como maior resistência ao rasgo e melhores propriedades físicas e ópticas do produto, uma vez que os índices que medem a qualidade do papel, como índices de estouro e rasgo, estão provavelmente relacionados com a força de ligação entre as fibras (LIMA et al., 2003).

Visando analisar o impacto da alteração do fluxo metabólico do carbono na composição da parede celular, e aumentar a concentração de hemiceluloses, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo alterar a composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, através da modulação da expressão do gene *uxs*, responsável pela codificação da enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (UDPGlcADC, EC 4.1.1.35) que converte UDP-D-glucuronato em UDP-D-xilose. Com

isso, espera-se obter um aumento na produção de xilose, principal componente das hemiceluloses da parede celular.

Plantas de tabaco foram utilizadas como modelo na análise da modulação da biossíntese de polissacarídeos da parede celular através da superexpressão do gene *uxs*. Isso porque o tabaco possui um sistema de transformação genética bem estabelecido e eficiente, é uma planta de ciclo curto, o que permite avançar rapidamente nas gerações e também é o sistema modelo adotado, por exemplo, em estudos referentes à análise da parede celular secundária (BOUDET, 1998; BLEE et al., 2001). Uma vez que as alterações promovidas pela modulação da expressão do gene *uxs* apresentem resultados promissores nas plantas transgênicas de tabaco, essa estratégia poderá ser transferida para plantas de eucalipto tendo em vista a obtenção de árvores com madeira de qualidade superior.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A parede celular vegetal

A parede celular vegetal é uma estrutura altamente organizada e formada por diferentes compostos como polissacarídeos, proteínas e substâncias aromáticas. Os polissacarídeos, por sua vez, podem ser divididos em três categorias: pectinas, hemiceluloses e celulose. Na formação da parede celular vegetal, algumas dessas moléculas estruturais funcionam como fibras, enquanto outras funcionam como uma matriz interligada (CARPITA; McCANN, 2000).

Além das funções estruturais, a parede celular vegetal é essencial para muitos processos relacionados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas. Em decorrência dessa diversidade de funções, a estrutura, assim como a composição das paredes celulares vegetais, são bastante complexas e variáveis (TAIZ; ZEIGER, 2004). A composição molecular e estrutural dos polissacarídeos da parede celular difere entre espécies, tecidos de uma mesma espécie, entre células de um mesmo indivíduo e até mesmo entre regiões de uma única célula (CARPITA; McCANN, 2000).

A importância da parede celular vegetal pode ser revelada pelo número de genes que provavelmente estão envolvidos na sua biogênese, organização e modificação. Por exemplo, em *Arabidopsis*, cerca de 17% dos seus 25.498 genes apresentam um peptídeo sinal para a parede celular e mais de 400 proteínas identificadas residem na parede (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Considerando que apenas metade das proteínas contendo o peptídeo sinal participem da biogênese, organização e modificação da parede celular, então aproximadamente 2.000 genes estão envolvidos nesses processos. Esse número ainda aumenta consideravelmente quando são incluídas todas as proteínas citossólicas que participam da geração de substratos. Dessa maneira, é provável que 15% do genoma de *Arabidopsis* esteja dedicado a formação e modificação da parede celular (CARPITA et al., 2001).

Além das funções biológicas, a parede celular vegetal é importante em atividades humanas ligadas à economia. A parede celular é utilizada comercialmente para a fabricação de papel, manufaturas têxteis, fibras (algodão, linho e cânhamo, entre outros),

carvão vegetal, construção civil e distintos produtos madeireiros. Um outro uso importante das paredes celulares vegetais é sob a forma de polissacarídeos, que são extraídos e modificados para a produção de plásticos, tintas, filmes, adesivos, géis e espessadores em uma ampla variedade de produtos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Por essas razões, o estudo da biossíntese da parede celular é considerado extremamente interessante tanto do ponto de vista básico, como aplicado (REITER, 2002).

2.2 Composição da parede celular vegetal

A parede celular vegetal é dinâmica e sofre mudanças ao longo da vida da célula. Apesar da diversidade morfológica, as paredes celulares vegetais podem ser classificadas em dois tipos principais: primárias e secundárias. A parede celular primária se origina durante a divisão celular e aumenta sua área superficial rapidamente durante a expansão da célula (CARPITA; McCANN, 2000). A interface entre as paredes primárias de células vizinhas é denominada de lamela média, cuja composição difere do restante da parede, por ser rica em pectina e conter proteínas diferentes (TAIZ; ZEIGER, 2004). A parede secundária, por sua vez, forma-se depois de cessado o crescimento da célula, e pode se tornar altamente especializada em estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.2.1 Parede Primária

A parede celular primária é composta basicamente pela interação de três constituintes estruturalmente independentes (CARPITA; GIBEAUT, 1993), os polissacarídeos. A estrutura da parede celular é formada por uma rede de celulose e hemicelulose embebida em uma matriz de polissacarídeos pécticos, o que fornece ao mesmo tempo, resistência e flexibilidade (TAIZ; ZEIGER, 2004). A proporção de cada constituinte, em uma parede celular primária típica, é: 9-25% de celulose, 25-50% de hemiceluloses, 10-35% de pectinas e 10% de proteínas (BIDLACK et al., 1992).

As microfibrilas de celulose são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da célula. Essas microfibrilas são

formadas por várias (aproximadamente 36) cadeias lineares de β -(1 $\rightarrow$ 4) D-glicose, unidas umas as outras, ao longo de seu comprimento, por pontes de hidrogênio. Dentro da microfibrila, cada cadeia de β -(1 $\rightarrow$ 4) D-glicose de aproximadamente 2-3 μ m de comprimento começa e termina em diferentes pontos, permitindo que essa alcance um comprimento de centenas de micrômetros. As microfibrilas têm de 5 a 15 nm de largura e estão 20-40 nm espaçadas entre si (CARPITA; McCANN, 2000; CARPITA; GIBEAUT, 1993; McCANN et al., 1990).

As hemiceluloses¹ são polissacarídeos flexíveis que caracteristicamente ligam-se à superfície da celulose. Diversos tipos de hemiceluloses são encontrados em paredes celulares entretanto, na parede primária das dicotiledôneas, a hemicelulose mais abundante é o xiloglucano, que na maioria das vezes, está presente na mesma quantidade que a celulose. Este polímero possui uma estrutura básica de resíduos de β -(1 $\rightarrow$ 4) D-glicose, com cadeias laterais de xilose. Esses resíduos de xilose podem ser substituídos por arabinose e galactose, sendo que, dependendo da espécie, a galactose pode ainda ser substituída por fucose. Os xiloglucanos são longos o suficiente (cerca de 50 a 500 nm) para se estenderem entre a distância de 2 microfibrilas, unido-as e formando assim, uma rede coesa com a celulose (Figura 1) e promovendo um arranjo espacial adequado. A formação dessa rede envolve interações físico-químicas importantes entre os polissacarídeos e determina a maioria das propriedades físicas da parede celular. De acordo com o desenvolvimento e com a espécie vegetal, a fração de hemiceluloses da parede celular pode conter também grandes quantidades de outros polissacarídeos, como, por exemplo, glucuronoarabinosilanos e glucomanos (TAIZ; ZEIGER, 2004; CARPITA; McCANN, 2000; FRY, 2004; COSGROVE, 2005).

As pectinas incluem vários tipos diferentes de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico (GalA). Alguns polissacarídeos pectícos possuem uma estrutura primária relativamente simples, como o homogalacturonano (HG), uma cadeia linear de resíduos de GalA (200 unidades) de aproximadamente 100 nm de comprimento. As cadeias de HG podem se unir através de ligações cruzadas com o íon cálcio (Ca^{2+}) formando assim uma rede entre as cadeias. O ramnogalacturonano I (RG I), uma das pectinas mais abundantes, consiste de resíduos alternados de GalA e ramnose com cadeias laterais de arabinano, galactano e arabinogalactano tipo I. O ramnogalacturonano II (RG II) é um

¹Hemicelulose é um termo que abrange vários tipos diferentes de polissacarídeos, porém foi utilizado por ser o mais tradicional. Outra denominação para as moléculas descritas no texto seria glucanos de ligação cruzada.

polissacarídeo péctico altamente ramificado que contém ao menos 10 açúcares diferentes em um padrão complexo de ligações. As unidades de RG II podem formar dímeros com ligações cruzadas por pontes de diéster de borato, muito importantes para a estrutura da parede. As pectinas formam uma fase gel hidratada na qual está implantada a rede celulose-hemicelulose. Elas atuam como preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose (TAIZ; ZEIGER, 2004; CARPITA; McCANN, 2000, FRY, 2004).

Figura 1 – Esquema da estrutura da parede celular primária, adaptada do site <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>

Os polissacarídeos, como as hemiceluloses e pectinas, sofrem modificações que podem alterar sua conformação e a ligação na parede. Essas modificações, como por exemplo, esterificação, acetilação ou arabinosilação, promovem a solubilidade desses polímeros, o que é importante durante o transporte desses do local de síntese (complexo de Golgi) até a parede celular (CARPITA; McCANN, 2000). Os xiloglucanos, por exemplo, são acetilados depois de serem sintetizados (McNEIL et al., 1984). A remoção enzimática das unidades arabinosil e dos grupos acetil permitem a ligação do xiloglucano com a celulose (CARPITA; GIBEAUT, 1993). No caso das pectinas, muitos dos resíduos ácidos são esterificados com metil, acetil e outros grupos durante a síntese no complexo de Golgi. Tal esterificação mascara as cargas dos grupos carboxila e impede ligações de cálcio entre as pectinas. Uma vez na parede, os grupos ésteres podem ser removidos

por pectina esterases, revelando as cargas dos grupos carboxila e aumentando a capacidade da pectina em formar um gel rígido (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Além dos polissacarídeos, a parede celular vegetal contém várias classes de proteínas estruturais, classificadas de acordo com sua composição predominante de aminoácidos, por exemplo, glicoproteína rica em hidroxiprolina (HRGP), proteína rica em glicina (GRP) e proteína rica em prolina (PRP). Essas proteínas são reguladas pelo desenvolvimento e suas quantidades variam de acordo com o tecido e espécie. Um exemplo de HRGP é a extensina (CARPITA e McCANN, 2000), que está envolvida no relaxamento e extensão da parede celular (COSGROVE, 2005). Além dessas proteínas estruturais, as paredes celulares contêm também proteínas arabinogalactanas (AGPs), que são altamente glicosiladas contendo principalmente resíduos de galactose e arabinose (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A composição e organização estrutural da parede celular primária permitem que a mesma seja forte, fina, flexível e capaz de sofrer extensão plástica e elástica (FRY, 2004).

2.2.2 Parede Secundária

A parede celular secundária é depositada após a expansão celular e frequentemente apresenta uma composição e organização distinta. Esse tipo de parede é sintetizado geralmente por células que requerem uma grande força mecânica e um reforço estrutural (COSGROVE, 2005), como por exemplo, traqueídes e elementos de vaso (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A parede secundária pode ser dividida em três camadas distintas, chamadas S_1 , S_2 e S_3 , (PLOMION et al., 2001) que apresentam diferenças na orientação das microfibrilas de celulose (BIDLACK et al., 1992). A primeira camada formada, a S_1 , é a mais fina (0,1-0,35 μm) e representa apenas 5-10% da espessura da parede celular (PLOMION et al., 2001). Nessa camada, as microfibrilas de celulose formam um ângulo de 60-80° em relação ao eixo da célula. A camada S_2 é a mais espessa (1-10 μm) e importante com relação ao suporte mecânico. Essa camada, por sua vez, representa 75-85% da espessura total da parede celular e o ângulo formado pelas microfibrilas de

celulose em relação ao eixo da célula pode variar de 5-30°. A orientação das microfibrilas de celulose da camada S₂ pode influenciar grandemente nas propriedades físicas e mecânicas da célula. A camada S₃ é relativamente fina (0,5-1,10 µm) e as microfibrilas de celulose apresentam um arranjo paralelo, formando um ângulo de 60-90°, em relação ao eixo da célula. Nessas três camadas também estão presentes hemiceluloses e lignina (PLOMION et al., 2001; MELLEROWICZ, et al., 2001). Além de uma proporção mais alta de celulose, a parede secundária tipicamente contém menos xiloglucano e mais xilanos e glucumananos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A lignina, um dos maiores componentes de algumas paredes secundárias (CARPITA; McCANN, 2000), é formada pela polimerização de três diferentes álcoois de fenilpropanóides (ou monolignóis): coniferil, cumaril e sinapil (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esses monolignóis dão origem às unidades G, H e S do polímero de lignina, que diferem entre si apenas pelo grau de metoxilação (PLOMION et al., 2001; MELLEROWICZ, et al., 2001). Essas unidades são sintetizadas a partir de fenilalanina, secretadas na parede, e oxidadas no local apropriado pelas enzimas peroxidase e lacase (TAIZ; ZEIGER, 2004). O conteúdo de lignina, assim como de seus monômeros, diferem entre taxa, tecidos, tipos celulares e camadas da parede, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e condições ambientais (PLOMION et al., 2001; MELLEROWICZ, et al., 2001). A lignina embebida na matriz de polissacarídeos, além de conferir rigidez e coesividade, proporciona hidrofobicidade superficial aos tecidos condutores, necessária para o transporte de água (PLOMION et al., 2001).

2.3 Biossíntese da parede celular vegetal

Os monossacarídeos formadores dos polissacarídeos da parede celular vegetal são sintetizados por uma série de reações enzimáticas conhecida como a via de interconversão dos açúcares nucleotídeos (Figura 2) (REITER; VANZIN, 2001).

A maior parte dos monossacarídeos são sintetizados, nas plantas, a partir do açúcar nucleotídeo UDP-D-glicose (SEIFERT, 2004), metabólito chave do processo de formação da parede celular. O UDP-D-glicose pode ser sintetizado a partir de duas vias metabólicas. A primeira, consiste da conversão, pela ação da enzima fosfoglucomutase (EC 5.4.2.2), de D-glucose-6-fosfato em D-glucose-1-fosfato, que é convertido em UDP-D-glucose pela enzima UDP-D-glucose pirofosforilase (EC 2.7.7.9). E na segunda via, pela conversão de UDP e sacarose em UDP-D-glicose e frutose pela enzima sacarose sintase (SuSy, EC 2.4.1.13) (REITER; VANZIN, 2001). Amor e colaboradores (1995) propõem que essa última via fornece altas concentrações de UDP-D-glicose para a síntese de celulose (Figura 2).

Além da celulose, o UDP-D-glicose serve como substrato para a síntese de outros açúcares nucleotídeos requeridos para a formação dos diversos polissacarídeos da

parede celular (REITER; VANZIN, 2001). UDP-D-glicose pode ser diretamente convertido em UDP-D-galactose, UDP-L-ramnose ou UDP-D-glucuronato (SEIFERT, 2004).

UDP-D-galactose, gerado a partir da epimerização do UDP-D-glicose pela enzima UDP-galactose 4-epimerase (EC 5.1.3.2), é utilizado na síntese de AGPs, RG I, RG II e xiloglucano (Figura 2).

Segundo Watt e colaboradores (2004), a formação de UDP-L-ramnose, principal componente dos polissacarídeos RG I e RG II, envolve dois passos enzimáticos, onde o UDP-D-glicose é convertido em UDP-4-desidro-6-desoxi-D-glicose pela enzima UDP-glicose 4,6-desidratase (EC 4.2.1.76), e este é convertido em UDP-L-ramnose pela enzima bifuncional, nomeada NRS/ER (nucleotídeo-ramnose sintase/epimerase redutase), que apresenta atividades 3,5 epimerase/4-keto redutase (Figura 2).

Já, o UDP-D-glucuronato, pode ser irreversivelmente formado a partir de UDP-D-glicose pela enzima UDP-D-glicose desidrogenase (UGD, EC 1.1.1.22). A biossíntese de UDP-D-glucuronato pode ocorrer também por uma via alternativa conhecida como via de oxigenação do inositol (SEITZ et al., 2000). Nessa via alternativa, D-glucose-6-fosfato (mesmo precursor do UDP-D-glicose) é convertido pela enzima inositol-1-fosfato sintase (EC 5.5.1.4) em inositol 1-fosfato, que por sua vez, é convertido a D-mio-inositol pela enzima mio-inositol 1 monofosfatase (EC 3.1.3.25). O D-mio-inositol é convertido pela enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1) a D-glucuronato, que é fosforilado pela enzima glucuronoquinase (EC 2.7.1.43) e a enzima glucuronato-1-fosfato uridililtransferase (2.7.7.44) transfere o grupo uridil, dando origem ao UDP-D-glucuronato (LOEWUS; LOEWUS, 1983; LOEWUS; MURTHY, 2000) (Figura 2). Existem evidências de que as duas vias metabólicas coexistem, variando a importância de cada uma durante o desenvolvimento da planta (ROBERTS; LOEWUS, 1973; VERMA; DOUGALL, 1979; RUBERY 1972; DALESSANDRO; NORTHCOTE 1977a, 1977b; WITT, 1992). Os resultados obtidos por Seitz e colaboradores (2000) sugerem que a biossíntese de UDP-D-glucuronato pode ocorrer, pela via de oxigenação do inositol, dependendo do tecido e estágio de desenvolvimento das plantas.

O UDP-D-glucuronato representa o principal ponto de ramificação na biossíntese dos açúcares nucleotídeos (REITER; VANZIN, 2001), sendo considerado o intermediário central na biossíntese de muitos dos precursores dos polissacarídeos da parede celular.

Na parede celular de folha de *Arabidopsis*, por exemplo, aproximadamente 50% da massa da parede é produzida através dos derivados do UDP-D-glucuronato, demonstrando a importância deste açúcar nucleotídeo para a biossíntese da parede celular vegetal (SEITZ et al., 2000). O UDP-D-glucuronato serve como precursor para a síntese de UDP-D-xilose, UDP-D-apiose, UDP-D-arabinose e UDP-D-galacturonato (REITER; VANZIN, 2001).

A interconversão entre UDP-D-glucuronato e UDP-D-galacturonato é reversível e mediada pela enzima UDP-D-glucuronato 4-epimerase (EC 5.1.3.6), sendo o UDP-D-galacturonato um importante precursor na síntese de pectinas (USADEL et al., 2004) (Figura 2).

A enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35) converte UDP-D-glucuronato em UDP-D-xilose, que por sua vez é convertido em UDP-D-arabinose pela enzima UDP-D-arabinose 4-epimerase (EC 5.1.3.5) (REITER; VANZIN, 2001) (Figura 2).

O açúcar nucleotídeo UDP-D-apiose é precursor do monossacarídeo D-apiose, presente no RG II, apiogalacturonano e vários apioglicosídeos. O D-apiose serve de sítio de ligação para o borato na formação de dímeros de RG II. O UDP-D-apiose é formado pela conversão de UDP-D-glucuronato pela enzima UDP-D-apiose/ UDP-D-xilose sintase em UDP-D-apiose e UDP-D-xilose (MØLHØJ et al., 2003).

A via de interconversão dos açúcares nucleotídeos, portanto, produz uma variedade de monossacarídeos para a incorporação na parede celular (REITER; VANZIN, 2001).

A regulação do fluxo metabólico e do balanço dos diversos açúcares nucleotídeos, assim como, a maneira pela qual esta regulação afeta a biossíntese dos polissacarídeos e glicoproteínas das plantas, ainda não é entendida (HARPER; BAR-PELED, 2002). Porém, a determinação da atividade específica de algumas enzimas infere a idéia de que aquelas envolvidas na interconversão dos açúcares nucleotídeos regulam de forma quantitativa, enquanto as polissacarídeo sintases governam qualitativamente a síntese dos polissacarídeos formadores da parede celular vegetal (BOLWELL, 2000). Sendo assim, a caracterização genética das enzimas envolvidas na via de interconversão de açúcares nucleotídeos permitirá o entendimento da regulação dessa complexa rota metabólica permitindo também a modificação do material da parede celular pela

alteração da disponibilidade dos precursores dos monossacarídeos (REITER; VANZIN, 2001).

2.4 A enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase

A enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (UDPGlcADC, EC 4.1.1.35) catalisa a conversão de UDP-D-glucuronato em UDP-D-xilose através de uma descarboxilação irreversível, sendo que, este processo requer a presença do cofator NAD^+ , e ocorre provavelmente com a formação de um UDP-4-keto-hexose intermediário (SCHUTZBACH; FEINGOLD, 1970). A enzima UDPGlcADC recebe também a designação UDP-D-xilose sintase (UXS), usada na maioria dos trabalhos científicos publicados, nomeando os genes caracterizados.

Embora a enzima UDPGlcADC tenha sido purificada pela primeira vez, a partir de embrião de trigo, em 1965 por Ankel e Feingold, a primeira sequência codificadora da enzima UDPGlcADC de uma planta superior, só foi clonada em 2002, por Kobayashi e colaboradores. Isso porque a clonagem e caracterização dos genes responsáveis pela codificação dessa, e de outras enzimas, foram possibilitadas pelas recentes informações fornecidas pelo sequenciamento genético de diversos organismos que exerce sem dúvida, um papel fundamental na identificação de genes de interesse.

Antes mesmo de ser identificado em plantas, o gene *uxs* (codificador da enzima UDPGlcADC) foi primeiramente clonado e caracterizado no fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* (BAR-PELED et al., 2001). Desde então, a caracterização do gene *uxs* foi relatada em animais (MORIARITY et al., 2002; GOLLING et al., 2002; HWANG; HORVITZ, 2002) e diversas plantas, como por exemplo, as dicotilêdoneas ervilha (KOBAYASHI et al., 2002), *Arabidopsis* (HARPER; BAR-PELED, 2002) e tabaco (BINDSCHEDLER et al., 2005), e as monocotilêdoneas arroz (SUZUKI et al., 2004) e cevada (ZHANG et al., 2005). A alta similaridade entre os genes *uxs* de plantas, fungos e animais revela a importância fisiológica desta enzima, evolucionariamente conservada (MORIARITY et al., 2002; HARPER; BAR-PELED, 2002).

As enzimas UDPGlcADCs caracterizadas em plantas apresentam dois motivos extremamente conservados. O motivo catalítico YxxxK (BAKER; BLASCO, 1992) e o motivo GxxGxxG, associado com a ligação da proteína ao cofator NAD^+ (WIERENGA et

al., 1986; BELLAMACINA, 1996). Além disso, no caso de plantas, a enzima UDPGlcADC não requer NAD^+ exógeno, sugerindo que este cofator encontra-se fortemente associado à enzima (HARPER; BAR-PELED, 2002).

Em plantas, foram caracterizadas diversas isoformas da enzima UDPGlcADC, sendo algumas isoformas solúveis e outras ligadas à membrana (HARPER; BAR-PELED, 2002; BINDSCHEDLER et al., 2005; SUZUKI et al., 2004; ZHANG et al., 2005). É interessante ressaltar que não foram encontradas diferentes isoformas (solúveis e de membrana) em outras enzimas, envolvidas na via de interconversão de açúcares nucleotídeos, até agora caracterizadas (PATTATHIL et al., 2005).

A existência, em plantas, de várias isoenzimas UDPGlcADCs, solúveis e ligadas à membrana, é consistente com dados bioquímicos anteriores (FEINGOLD et al., 1960; JOHN, et al., 1977a, 1977b; HAYASHI et al., 1988 citados por HARPER; BAR-PELED, 2002; ANKEL et al., 1967; JOHN, et al., 1977; MATERN; GRISEBACH, 1977; KYOSSEV et al., 1995, citados por BINDSCHEDLER et al., 2005). Em *Arabidopsis*, foram identificados cinco genes *uxs* (denominados AtUxs), sendo que as isoformas AtUxs3 e AtUxs5 referem-se provavelmente a proteínas solúveis, enquanto as isoformas AtUxs1, AtUxs2 e AtUxs4 são proteínas que apresentam uma extensão N-terminal hidrofóbica, sugerindo uma topologia de proteína transmembrana do tipo II (HARPER; BAR-PELED, 2002). No caso de arroz, seis isoformas foram identificadas (denominadas OsUXS), sendo que a isoforma OsUXS3 foi caracterizada como sendo solúvel e o restante, ligadas a membrana (SUZUKI et al., 2004). Já em tabaco, a isoforma UDPGlcADCX3 é possivelmente uma proteína de membrana do tipo II, com o N-terminal carregando a região transmembrana e o C-terminal provavelmente localizado no Golgi, e as isoformas UDPGlcADCX1 e UDPGlcADCX2, proteínas citoplasmáticas (BINDSCHEDLER et al., 2005). Em recente estudo envolvendo o nível de expressão gênica da região cambial de eucalipto em diferentes idades de desenvolvimento, via SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (CARNEIRO et al., 2006), foi revelada a existência de três diferentes *tags* representando o gene *uxs*, que apresentaram similaridade com os genes AtUxs4, AtUxs3 e AtUxs5. Esses resultados sugerem a existência de diferentes isoformas da enzima UDPGlcADC em eucalipto.

Uma possibilidade para explicar a ocorrência de diversas isoformas do gene *uxs* em plantas é que diferentes isoformas apresentam propriedades cinéticas distintas, sendo portanto, requeridas para realizar uma função específica em diferentes compartimentos subcelulares. Por exemplo, as características das isoformas AtUxs2, ligada a membrana, e AtUxs3, solúvel, suportam a hipótese de que a localização subcelular das UDPGlcADCs pode regular espacialmente eventos específicos de xilosilação nas células das plantas (PATTATHIL et al., 2005). Os níveis de expressão dos genes OsUXS mudam de diferentes maneiras durante o desenvolvimento da semente do arroz, sugerindo que cada enzima OsUXS apresenta um papel importante em um determinado estágio de desenvolvimento da semente (SUZUKI et al., 2004).

Existem vários papéis possíveis para o UDP-D-xilose e a enzima UDPGlcADC que catalisa sua síntese. Além do UDP-D-xilose ser precursor na síntese de diversos polissacarídeos importantes, este açúcar nucleotídeo pode exercer papel regulatório no controle do fluxo de vários açúcares nucleotídeos (HARPER; BAR-PELED, 2002; SEIFERT, 2004) e ainda funcionar como sensor molecular (PATTATHIL et al., 2005). O UDP-D-xilose inibe, por exemplo, a atividade da enzima citosólica UDP-D-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) (HINTERBERG et al., 2002), que gera UDP-D-glucuronato, um importante açúcar nucleotídeo requerido na síntese de polissacarídeos da parede celular, e substrato da enzima UDPGlcADC. O UDP-D-xilose também inibe a enzima UDPGlcADC que catalisa a sua própria síntese. Essa habilidade sugere um mecanismo de regulação da atividade da enzima *in vivo* (HARPER; BAR-PELED, 2002). Foi verificado, por exemplo, que as duas isoformas do trigo diferem drasticamente quanto ao grau de inibição por UDP-D-xilose (JOHN et al., 1977). Como o próprio mecanismo de inibição por *feedback* precisa ser controlado para modular o fluxo de açúcar nucleotídeo, esse controle poderia se dar pela expressão diferencial dos genes *uxs* que codificam enzimas com propriedades cinéticas distintas (SEIFERT, 2004). Além disso, o UDP-D-xilose inibe fortemente a atividade da enzima UDP-D-glucuronato 4-epimerase (EC 5.1.3.6), responsável pela formação de UDP-GalA, um precursor essencial na síntese de pectinas (GU; BAR-PELED, 2004).

A habilidade de um único açúcar nucleotídeo, no caso o UDP-D-xilose, em regular tantas enzimas envolvidas na via de interconversão dos açúcares nucleotídeos, poderia

indicar que os níveis de açúcares nucleotídeos, na célula, controlam a síntese de polissacarídeos. Além disso, a existência de diferentes isoformas poderia controlar o fluxo de açúcares nucleotídeos dentro de compartimentos celulares, ou fornecer o UDP-D-xilose para uma xilosiltransferase específica, envolvida na síntese, por exemplo, de xilano ou xiloglucano (PATTATHIL et al., 2005).

Dada a importância biológica do UDP-D-xilose, Oka e Jigami (2006) desenvolveram um sistema *in vivo* para produção desse açúcar nucleotídeo em larga escala, possibilitando o acesso a esse substrato na realização de análises funcionais. Nesse sistema, uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta o substrato UDP-D-glicose em abundância no citoplasma, coexpressa os genes *UGD1* e o *UXS3* de *Arabidopsis*, que codificam as enzimas UDP-D-glicose desidrogenase (UGD) e UDPGlcADC, respectivamente. Esse trabalho fornece evidências claras de que o UDP-D-xilose exerce um importante papel na manutenção do conjunto de UDP-D-glicose no citoplasma *in vivo* da levedura, sendo que, este mecanismo regulatório pode ocorrer de maneira semelhante em plantas. É essencial para as plantas manterem um conjunto constante de UDP-D-glicose, o que é realizado pelo sistema regulatório da célula, onde a inibição da enzima UGD por UDP-D-xilose parece estar envolvida (OKA; JIGAMI, 2006). Evidências bioquímicas indicam ainda, que a expressão temporal da UGD, e a atividade das UDPGlcADCs podem controlar o fluxo para hemicelulose em tecido vascular em diferenciação.

Dessa forma, um melhor entendimento do papel de enzimas como a UDP-D-glucuronato descarboxilase e a regulação de sua expressão é essencial para avaliação do potencial da manipulação da alocação do carbono entre os polissacarídeos estruturais e de armazenamento, importantes para espécies alimentícias e industriais, cultivadas para produção de biomassa e fibra de alta qualidade (BINDSCHEDLER et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem do cDNA do gene *uxs* codificador da enzima UDP-glucuronato descarboxilase

A clonagem da sequência codificadora da enzima UDP-glucuronato descarboxilase (UDPGlcADC) foi realizada a partir do acesso à sequência de nucleotídeos do gene *uxs* de ervilha (*Pisum sativum*) depositada, por Kobayashi et al. (2002) com o número de acesso AB059568, no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), que reúne e disponibiliza para acesso público, sequências de nucleotídeos dos organismos sequenciados. Com base nessa sequência de nucleotídeos, *primers* específicos foram desenhados e utilizados como iniciadores na amplificação da região codificadora (ORF) desse gene, a partir do mRNA de ervilha, através da técnica de RT-PCR.

3.1.1 Extração de RNA total

Para evitar a degradação do RNA por RNases, todas as soluções e reagentes foram preparados com água previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) na concentração de 1% (v/v), por 16 horas a 37°C, seguida de autoclavagem (120°C, 1 atm, 20 minutos). Com a mesma finalidade, todo o material plástico utilizado foi tratado através de uma sequência de lavagens com SDS 2% (p/v) por 2 horas a 70°C, álcool comercial por 20 minutos, e H₂O₂ 3% (v/v), por mais 20 minutos. O material foi enxaguado duas vezes com água DEPC 0,01% (v/v) por 20 minutos antes de ser autoclavado. A vidraria e as porcelanas utilizadas foram esterilizadas a seco, a temperatura de 200°C, por 6 horas.

Para a clonagem do cDNA do gene *uxs*, o RNA total de raiz de ervilha foi extraído seguindo a metodologia estabelecida por Salzman et al. (1999). O material vegetal (2 g), macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo, foi transferido para tubos de centrifuga de 30 mL contendo 10 mL do tampão de extração (Anexo A), seguido de agitação vigorosa, por 1 minuto, em vórtex. Em seguida, adicionou-se igual

volume de CIA (24:1 v/v) e agitou-se por 20 minutos, antes da centrifugação (16.000 x g) por 10 minutos a 4°C. A fase superior foi transferida para novo tubo, repetindo-se esse passo mais duas vezes, antes da adição ao sobrenadante final de 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M, para precipitação por 16 horas a -20°C. Após centrifugação (16.000 x g) por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi ressuscitado em 10 mL de água tratada com DEPC e novamente centrifugado por 5 minutos a 20.000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual adicionou-se 1 volume de CIA:Fenol (1:1 v/v). Após 10 minutos de agitação à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos. A fase superior foi transferida para novo tubo, repetindo-se esse passo mais uma vez. Depois da centrifugação, adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M, ao sobrenadante, para precipitação adicional por 16 horas a -20°C. O precipitado resultante da centrifugação (16.000 x g) por 15 minutos a 4°C, foi ressuscitado em 500 µL de água tratada com DEPC. Após uma centrifugação adicional nas mesmas condições, o sobrenadante foi transferido para tubo *ependorf* de 1,5 mL e o volume da amostra, ajustado para 1 mL, com água tratada com DEPC, ao qual adicionou-se 333 µL de LiCl 8 M para precipitação do RNA a 4°C, por 3 horas. O precipitado, resultante da centrifugação (12.000 x g) por 20 minutos a 4°C, foi lavado com 400 µL de etanol 80% (v/v), novamente centrifugado (12000 x g) por 10 minutos a 4°C, e ressuscitado em 100 µL de água tratada com DEPC.

A quantificação das amostras de RNA foi realizada por espectrofotometria, sendo a concentração calculada, para uma cubeta de 10 mm, através da seguinte fórmula:

$$[RNA] = \frac{A_{260} \times Fc \times Fd}{1000}$$

Sendo:

- A₂₆₀**: absorbância da amostra sob o comprimento de onda de 260 nm;
- Fc**: fator de conversão, no qual 1 unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg RNA mL⁻¹ (SAMBROOK et al., 1989);
- Fd**: fator de diluição da amostra de leitura, no caso, 200 (4 µL de amostra em 800 µL de água tratada com DEPC);
- 1000**: fator de correção para obtenção da concentração em µg µL⁻¹.

A qualidade da amostra foi verificada com base na relação $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, sendo que valores entre 1,6 e 2,0 indicam boa qualidade do RNA extraído. Uma amostra de RNA em tampão de corrida (Anexo B), foi ainda submetida à eletroforese sob corrente de 75 V por 45 minutos em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X (Anexo C) (Sambrook et al., 1989), para verificação da qualidade e também da quantidade de RNA.

3.1.2 Purificação do mRNA a partir do RNA total

O mRNA foi isolado com auxílio do *Dynabeads[®] mRNA Purification Kit* (Dyna), conforme recomendações do fabricante. A metodologia desse *kit* baseia-se no pareamento de bases entre resíduos poli A na extremidade 3' da maioria dos mRNAs e, resíduos *oligo* dT covalentemente ligados à superfície dos *Dynabeads Oligo* (dT)₂₅. Dessa maneira, outros tipos de RNAs desprovidos de resíduos poli A não se pareiam aos *Dynabeads Oligo* (dT)₂₅ e são prontamente eliminados.

Ao RNA total, numa diluição de 75 µg em 100 µL de água MilliQ tratada com DEPC, acrescentou-se 100 µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*) (Anexo D). A amostra foi aquecida a 65°C por 2 minutos para o rompimento das estruturas secundárias. Enquanto isso, 200 µL (1 mg) de *Dynabeads Oligo* (dT)₂₅ foram transferidos do estoque para um tubo *ependorf* de 1,5 mL de capacidade. Os *Oligo* (dT)₂₅ foram lavados uma vez com auxílio do *Dynal MPC[®]-S* (concentrador magnético de partículas). Essa lavagem foi feita removendo-se o tubo do *Dynal MPC[®]-S*, ressuspensando os *Oligo* (dT)₂₅ em 100 µL de tampão de ligação (Anexo D) e recolocando o tubo no *Dynal MPC[®]-S*. Depois de 30 segundos, o sobrenadante foi removido e o tubo, contendo os *Oligo* (dT)₂₅ limpos, retirado do *Dynal MPC[®]-S*.

Aos *Oligo* (dT)₂₅ adicionou-se 100 µL do tampão de ligação e a diluição contendo o RNA total. A homogeneização foi feita por rotação, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, no agitador *sample mixer* (Dyna), que acompanha o *kit*.

Em seguida, a amostra homogeneizada foi colocada no *Dynal MPC[®]-S* e o sobrenadante removido após 30 segundos. Foram feitas duas lavagens com 200 µL de tampão de lavagem B (*Washing Buffer B*) (Anexo E), com auxílio do *Dynal MPC[®]-S*, da

mesma forma descrita anteriormente, removendo-se completamente o sobrenadante entre cada lavagem.

Para a eluição do mRNA adicionou-se 20 μL de Tris-HCl 10 mM ao precipitado que foi aquecido a 65°C por 2 minutos. Em seguida, o tubo foi colocado imediatamente no *Dynal MPC*[®]-S e o mRNA eluído foi transferido para um novo tubo, livre de RNase.

3.1.3 Reação de RT-PCR

A reação de RT-PCR, que promoveu a síntese e amplificação do cDNA do gene *uxs* de ervilha em uma única reação, foi realizada com auxílio do *Kit SuperScriptTM One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq* (Invitrogen), a partir do mRNA de raiz de ervilha e os *primers* (ORF*uxs*) específicos para a sequência codificadora do gene *uxs* de ervilha.

Para um volume final de reação de 50 μL foram adicionados 25 μL de 2X *Reaction Mix* contendo 0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO_4 , 10 pg-1 μg de mRNA; 0,2 μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 1 μL de RT/ *Platinum[®] Taq Mix* e, água MilliQ autoclavada suficiente para completar o volume da reação. O programa utilizado no termociclador (*Applied Biosystem - GeneAmp[®] PCR System 9700*) para a realização da reação foi: 50°C por 30 minutos (síntese de cDNA), 94°C por 2 minutos (pré-desnaturação), 38 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento do *primer*), 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão), seguidos de uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

A identificação do produto de amplificação, obtido na reação de RT-PCR, foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TBE 0,5X (Anexo F), submetido a corrente de 75 V por 45 minutos. As amostras foram acrescidas de solução *Dye IV* (Anexo G) (SAMBROOK et al., 1989) antes de serem aplicadas no gel. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng μL^{-1}). O marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen) foi utilizado para a verificação do tamanho do fragmento amplificado.

3.1.4 Clonagem do cDNA do gene *uxs* de ervilha no vetor de entrada TOPO® e transformação química de células competentes de *E. coli*.

O produto de amplificação da reação de RT-PCR foi clonado no vetor pENTR/D-TOPO® com auxílio do *Kit p-Entry directional TOPO® cloning* (Invitrogen).

Para cada reação foram utilizados 2 µL do produto da reação de RT-PCR; 1 µL da solução salina contendo 1,2 M de NaCl e 0,06 M de MgCl₂; 2 µL de água MilliQ autoclavada e 1 µL do vetor pENTR/D-TOPO®. A reação foi mantida por 5 minutos à temperatura ambiente. Para a transformação, utilizou-se 3 µL da reação em 25 µL de células quimicamente competentes de *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen). Os tubos, contendo as células e o vetor recombinante, foram mantidos em gelo por 5 minutos, e após o choque térmico a 42°C por 30 segundos, transferidos novamente para gelo, por mais 5 minutos. As células recombinantes permaneceram por 1 hora sob agitação (150 rpm) a 37°C em 250 µL de meio SOC (Invitrogen) (Anexo H), antes do plaqueamento em meio LB sólido (Anexo I), acrescido de 50 µg mL⁻¹ de canamicina. Os clones recombinantes foram selecionados após 16 horas a 37°C.

3.1.5 Análise da transformação das células competentes por PCR

As colônias resistentes a canamicina (50 µg mL⁻¹) foram analisadas através de PCR utilizando-se *primers* (ORF*uxs*) específicos da ORF do gene *uxs* a fim de verificar a transformação. Para isso, uma amostra de cada colônia foi transferida separadamente, em fluxo laminar e com auxílio de um palito autoclavado, para um tubo plástico contendo: 5 µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl) (Invitrogen), 0,4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP, 1 unidade da enzima Platinum® *Taq* DNA Polimerase, 50 pmol de cada *primer* e água MilliQ autoclavada suficiente para completar o volume da reação de 50 µL. O programa utilizado no termociclador (*Applied Biosystem* - *GeneAmp®PCR System 9700*) foi: 94°C por 10 minutos (rompimento das células e inativação de endonucleases), 35 ciclos de 92°C por 45 segundos (desnaturação do DNA), 55°C por 1 minuto (anelamento dos *primers*) e 72°C por 2 minutos (polimerização da fita complementar à molde) seguido de uma extensão final por 10 minutos a 72°C. A

identificação do produto de amplificação, obtido na reação de PCR, foi feita por meio de eletroforese como descrito no item 3.1.3.

3.1.6 Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial de algumas colônias transformadas, confirmadas por PCR, foi extraído utilizando-se o *Plasmid Mini Kit* (Qiagen). Para isso, colônias que apresentaram produto de amplificação correspondente ao peso molecular esperado foram inoculadas em 10 mL de meio LB líquido (Anexo I) suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina, e mantidas sob agitação (200 rpm) a 37°C por 16 horas. Uma parte (3 mL) da cultura bacteriana foi sedimentada por centrifugação (3.500 x g) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano utilizado para a extração do DNA plasmidial.

De acordo com o protocolo de purificação do *kit*, baseado na técnica de lise alcalina modificada (BIRBOIM e DOYLE, 1979), após a adição dos tampões P1, P2 e P3 (Anexo J) o DNA plasmidial foi adicionado à membrana de troca-aniônica Qiagen, previamente equilibrada com a solução QBT (Anexo L). Moléculas de baixo peso molecular, assim como, RNA, proteínas, pigmentos e impurezas foram removidos por meio de 4 lavagens com a solução QC (Anexo M) de concentração salina mediana. O DNA, eluído pela solução QF (Anexo N) de alta salinidade, foi concentrado e dessalinizado por precipitação em isopropanol e lavagem com etanol 70% (v/v). O DNA resultante foi diluído em água e a quantificação feita através de eletroforese como descrito no item 3.1.3. O DNA marcador λ (Promega) foi utilizado nas concentrações de 50 e 100 ng para a quantificação do DNA plasmidial extraído por comparação visual. O DNA plasmidial foi submetido ao sequenciamento para confirmação da clonagem.

3.1.7 Sequenciamento do vetor TOPO® recombinante

O sequenciamento do vetor TOPO® contendo o cDNA do gene *uxs* de ervilha foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular (CENA/USP), no aparelho ABI PRISM 3100 *genetic analyser*, com auxílio do ABI Prism *BigDye*™

Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems). Na reação de sequenciamento foram utilizados 2 μ L de TRR *Mix* fornecido pelo *kit*, 6 μ L de tampão 2,5X (Tris-HCl 200 mM pH 9 e $MgCl_2$ 5 mM), 200 ng de DNA e 3,2 pmoles de *primer* M13 *forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') ou *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), em um volume final de 20 μ L. O programa utilizado foi de 40 ciclos a 96°C por 10 segundos, 52°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. As amostras de DNA foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em termociclador *GeneAmp 9700* e mantidas em gelo por 2 minutos antes de serem transferidas para o sequenciador 3100.

As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foram comparadas com a sequência da ORF do gene *uxs* de ervilha através do programa *Blast 2 Sequences*, disponível no *site* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2 Expressão da enzima UDP-glucuronato descarboxilase de ervilha em *E. coli*

O *kit E. coli Expression System with Gateway® Technology* (Invitrogen), baseado no sistema de expressão pET, foi utilizado para a expressão da enzima UDPGlcADC em *E. coli*. Este sistema, inicialmente desenvolvido por Studier et al. (1990), apresenta alta atividade e especificidade da RNA polimerase do bacteriófago T7, permitindo a expressão regulada de genes heterólogos, em *E. coli*, a partir do promotor T7 (ROSENBERG et al., 1987; STUDIER; MOFFATT, 1986; STUDIER et al., 1990).

A linhagem bacteriana *E. coli* BL21-AITM, utilizada para a expressão do cDNA do gene *uxs*, é derivada das linhagens BL21 (GRODBERG e DUNN, 1988; STUDIER e MOFFATT, 1986) e contém uma inserção cromossômica do gene codificador da RNA polimerase T7 dentro do *locus araB* do *operon araBAD*. Desta forma, a expressão da RNA polimerase T7 se encontra sob controle do promotor *araBAD*.

O promotor *araBAD* (P_{BAD}), por sua vez, pode ser regulado, na linhagem BL21-AITM de *E. coli*, pelo produto do gene *araC* (OGDEN et al., 1980; SCHLEIF, 1992), um regulador transcricional que forma um complexo com L-arabinose. Na presença deste substrato, o dímero *AraC* se une aos sítios inibidores I_1 e I_2 , permitindo a expressão do promotor P_{BAD} .

3.2.1 Clonagem do gene *uxs* no vetor pDESTTM17

O vetor Gateway[®]pDESTTM17, específico para expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*, foi utilizado para expressão da enzima recombinante UDPGlcADC. Este vetor, além do promotor T7, apresenta o sítio de ligação do ribossomo (sequência Shine-Dalgarno) localizado anteriormente ao sítio de iniciação da tradução (ATG) em uma distância adequada para o início da tradução em *E. coli*. O vetor apresenta ainda, uma *tag* de 6 histidinas na região N-terminal que permite a detecção e purificação da proteína recombinante.

Para clonagem do cDNA do gene *uxs* de ervilha no vetor de expressão em *E. coli* (pDESTTM17) utilizou-se o *kit* LR *clonase*TM *Enzyme Mix* (Invitrogen). Para a reação foram adicionados 300 ng do vetor de entrada (pENTR D-TOPO contendo o cDNA do gene *uxs*), 300 ng do vetor de destino (Gateway – pDESTTM17), 4 µL do tampão de reação (5X LR *Clonase*TM), 16 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) e 4 µL de LR *Clonase*TM *enzyme mix*. A reação foi mantida a 25°C por 3 horas, antes da adição de 4 µg de proteinase K e incubação por 10 minutos a 37°C.

A transformação das células competentes de *E. coli* (DH5α) foi feita acrescentando-se 2 µL da reação LR *clonase* em 25 µL de células que foram mantidas em gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos, sendo imediatamente transferidas para gelo. Após 5 minutos, 450 µL de meio SOC (Anexo H) foram acrescentados às células que foram incubadas a 37°C sob agitação (200 rpm) por 1 hora. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas contendo meio LB sólido (Anexo I) acrescido de ampicilina (100 µg mL⁻¹). Os clones recombinantes foram selecionados após 16 horas a 37°C.

A clonagem e transformação da *E. coli* foi verificada pela avaliação da suscetibilidade das células transformadas ao antibiótico cloranfenicol. O gene que confere resistência ao cloranfenicol encontra-se entre os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*. Portanto, os clones carregando o vetor de expressão recombinante, ou seja, contendo o segmento clonado (cDNA do gene *uxs* de ervilha), entre os sítios de recombinação, não devem crescer na presença deste antibiótico. Para isso, os clones de *E. coli*, previamente selecionado em ampicilina 100 µg mL⁻¹, foram plaqueados em meio

LB (Anexo I) contendo o antibiótico cloranfenicol (30 mg L^{-1}). A confirmação da clonagem e transformação se deu ainda através de PCR das colônias, feito de acordo com o descrito no item 3.1.5, e pelo sequenciamento utilizando o *primer* específico para o promotor T7 *forward* (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') e o *primer reverse* específico para a ORF do gene *uxs*, como descrito no item 3.1.7.

3.2.2 Transformação da linhagem BL21-AITM de *E. coli*

O plasmídio pDESTTM17 recombinante, ou seja, contendo o cDNA do gene *uxs*, depois de extraído conforme descrito anteriormente no item 3.1.6, foi utilizado para a transformação da linhagem de *E. coli* BL21-AITM (Invitrogen). Para isso, acrescentou-se 10 ng de DNA (plasmídio pDESTTM17/cDNA do gene *uxs*) em 50 μL de células quimicamente competentes da linhagem BL21-AITM. Essas foram mantidas em gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos, sendo imediatamente transferidas para gelo. Após 5 minutos, 250 μL de meio SOC (Anexo H) foram adicionados às células que foram mantidas a 37°C sob agitação (200 rpm) por 30 minutos. Alíquotas de 100 μL foram transferidas para placas contendo meio LB sólido (Anexo I) acrescido de ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os clones recombinantes foram selecionados após 16 horas a 37°C .

3.2.3 Seleção do clone de maior expressão da enzima UDP-glucuronato descarboxilase

Para posterior purificação da proteína recombinante em grandes quantidades, clones selecionados em meio LB (Anexo I) acrescido de ampicilina (100 mg L^{-1}) foram analisados quanto ao nível de expressão da enzima UDPGlcADC, para escolha do clone de maior expressão. Para isso, três clones foram cultivados em 5 mL de meio LB (Anexo I) acrescido de 100 mg L^{-1} de ampicilina, a 37°C sob agitação (200 rpm) até atingir D.O._{600 nm} entre 0,6 e 1,0. Essas culturas foram usadas como inóculo de nova cultura (diluição 1:20), mantida sob as mesmas condições. Essa diluição permite o retorno rápido das células bacterianas à fase *log* de crescimento. Quando as células atingiram a D.O._{600 nm} =

0,4 (fase *mid-log*), a cultura foi dividida em duas partes de igual volume. Em uma das partes, adicionou-se L-arabinose numa concentração final de 0,2% (p/v) para indução da expressão da proteína UDPGlcADC em *E. coli*. Assim, foram obtidas duas culturas de cada clone transformante: uma induzida e outra não-induzida pela L-arabinose.

Após adição de L-arabinose, amostras de 500 µL foram coletadas nos tempos T_0 (0 hora), T_1 (2 horas), T_2 (4 horas) de cultivo a 37°C, e centrifugadas (8.000 x g) por 1 minuto a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 80 µL de tampão 1X SDS-PAGE (Anexo O) e submetido a fervura por 5 minutos antes de ser aplicado (15 µL) em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) (Anexo P). O marcador molecular SDS-PAGE *Molecular Weight standards, broad range* (BIO-RAD) foi utilizado para verificação, em kDa, do peso molecular das proteínas. Finalizada a eletroforese, após 5 horas a 100 V, os géis foram corados com *Comassie Blue* G250 sob agitação por 4 horas, seguido de descoloração (Anexo Q) por mais 8 horas. A análise de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida permitiu a escolha do clone de maior expressão.

3.2.4 Sequenciamento da proteína UDPGlcADC por espectrometria de massas

Para confirmação da sequência da proteína UDPGlcADC recombinante, expressa em *E. coli*, através de espectrometria de massas, a banda do gel correspondente a UDPGlcADC foi extraída com um bisturi, cortada em segmentos de aproximadamente 1 mm³, colocada em tubos *ependorf* e armazenada a 4°C.

Os segmentos de gel contendo as proteínas foram lavados em água deionizada, e descorados com solução 5% v/v de acetonitrila (ACN) e bicarbonato de amônio (AMBIC) 25 mM por 15 minutos e, com solução 50% v/v de ACN e AMBIC 25 mM por 30 minutos (duas vezes), antes de serem desidratados com ACN 100% por 10 minutos. O líquido excedente foi removido e o tubo contendo o resíduo remanescente do gel foi deixado aberto para evaporação da ACN à temperatura ambiente.

Os fragmentos de gel contendo as proteínas foram reidratados e reduzidos com solução DTT 20 mM e AMBIC 50 mM por 40 minutos a 60°C. Em seguida, foram alquilados com solução iodoacetamida (IAA) 55 mM e AMBIC 50 mM por 30 minutos no

escuro. A IAA foi removida e os fragmentos lavados com AMBIC 50 mM onde permaneceram por 1 hora antes de serem desidratados com ACN 100%. A acetonitrila foi descartada e os fragmentos de gel, contendo as proteínas, reidratados com solução 10 ng μL^{-1} de tripsina em 25 mM de AMBIC. A digestão foi realizada a 37°C por 12 horas e o sobrenadante resultante de centrifugação breve foi transferido para novo tubo. Os peptídeos foram eluídos através de sonicação (40 KHz e 30 Watts) a 45°C por 20 minutos em solução contendo 60% (v/v) metanol e 1% (v/v) ácido fórmico. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e esse processo repetido mais uma vez antes de ser realizado com ACN 100%, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram concentrados a 30 μL em concentrador a vácuo (5301 Eppendorf) sob temperatura ambiente e, transferidos para os tubos de vidro, próprios para injeção no espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (Water-Micromass) acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar CapLC (Waters®).

A separação dos peptídeos foi realizada utilizando-se uma pré-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 μm 0,32 x 150 mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% v/v H_2O , 5% v/v acetonitrila e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v acetonitrila, 5% v/v H_2O e 0,1% v/v ácido fórmico). Durante a corrida, o fluxo usado foi de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ nos primeiros 15 minutos, 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ entre 15 minutos e 40 minutos e de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ entre 40 minutos e 45 minutos. A ionização das moléculas por *electrospray* foi realizada a uma voltagem fixa de 3 KV, temperatura de 90°C sob 5 psi de nitrogênio. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP através do sistema *Nanolock Spray* (Micromass), para corrigir as variações de calibração que ocorrem ao longo do tempo. Os espectros de massas obtidos foram processados utilizando-se o programa ProteinLynx V 2.1 (Waters) e também o programa Mascot (http://www.matrixscience.com/search_intro.html) (PERKINS et al., 1999) para identificação no banco de dados do NCBI. As sequências de aminoácidos foram obtidas pelo sequenciamento *de novo*, no qual os peptídeos gerados pelo programa de análise foram verificados pela inspeção manual dos espectros MS/MS. Essas sequências foram submetidas à identificação na opção *MS/MS Ions Search* do programa Mascot.

3.2.5 Purificação da UDPGlcADC

Para a purificação da proteína UDPGlcADC recombinante, o clone da linhagem BL21-AITM/*uxs* selecionado foi cultivado a 37°C sob agitação (200 rpm) em 5 mL de meio LB (Anexo I) acrescido de 100 mg L⁻¹ de ampicilina até atingir D.O._{600 nm} entre 0,6 e 1,0. Essa cultura foi usada como pré-inóculo de nova cultura em 50 mL de meio LB (Anexo I) contendo ampicilina e mantida sob as mesmas condições. Quando esta cultura atingiu D.O._{600 nm} de 0,4, esta foi dividida em duas partes de igual volume. Em uma das partes, acrescentou-se L-arabinose (0,2% p/v) para indução da expressão do cDNA do gene *uxs*. Após 4 horas, esta cultura foi centrifugada (3.000 x g) por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi mantido a -80°C até o momento do uso.

A purificação da proteína em condições nativas foi realizada com o auxílio de partículas magnéticas *Dynabeads*[®]TALONTM específicas para purificação de proteínas recombinantes contendo 6 resíduos de histidina (6xHis-tag) (BUSH et al., 1991). O funcionamento dessas partículas baseia-se na técnica de cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) com cobalto como metal quelador. A ligação da proteína à partícula magnética ocorre através da ocupação dos sítios de coordenação do metal quelador pelos anéis de imidazol dos resíduos de histidina. Para isso, o precipitado, armazenado a -80°C, foi ressuscitado em 2 mL de Tampão de extração e lavagem TALONTM (Anexo R) e mantido em gelo por 20 minutos após a adição de lisozima (0,75 mg mL⁻¹) e PMSF (1 mM). O rompimento das células foi feito por choque de temperatura através de três ciclos de congelamento em etanol resfriado em gelo seco e descongelamento em água gelada. As células foram ainda sonicadas em gelo por três ciclos de sonicação de 10 segundos e pausa de 30 segundos, em média intensidade. Em seguida, a amostra foi centrifugada (11.000 x g) por 20 minutos a 4°C para precipitação do material insolúvel. Uma parte do sobrenadante foi reservada para análise em SDS-PAGE (10 µL) e verificação da atividade enzimática da UDPGlcADC no extrato bruto. A outra parte (600 µL) foi adicionada às partículas magnéticas *Dynabeads*[®]TALONTM ressuscitadas em 100 µL de Tampão de ligação e lavagem TALONTM (Tampão de extração e lavagem TALONTM + 0,01% de Tween 20). Após incubação em agitador *sample mixer* (Dyna) por 10 minutos a 4°C procederam-se quatro lavagens com 700 µL

de Tampão de ligação e lavagem TALON™ com auxílio do *Dyna/ MPC*®-S (concentrador magnético de partículas). A proteína, eluída em 100 µL de Tampão de eluição TALON™ (Tampão de ligação e lavagem TALON™+ imidazol 150 mM), foi analisada por SDS-PAGE.

3.2.6 Análise da atividade enzimática

A atividade da enzima UDP-GlcADC foi verificada no extrato bruto e na fração purificada obtidos tanto da cultura bacteriana induzida com L-arabinose, quanto na cultura bacteriana não induzida. Porém, antes da realização da reação enzimática, as amostras de proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente *Protein Assay* (BioRad). Para isso, 10 µL das amostras do extrato bruto e 2 µL das amostras da fração purificada foram diluídos em água a um volume final de 100 µL. Cada diluição foi adicionada a 5 mL do reagente *Protein Assay* diluído em água (1:4 v/v), agitadas e mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente, antes da leitura da absorbância a 595 nm. As concentrações de proteínas foram calculadas através da comparação com uma curva padrão feita com BSA nas concentrações 3, 5, e 8 µg.

Para o ensaio enzimático, reações (volume total de 50 µL) compostas por 0,1 M de Tris-HCl pH 7,4; 1 mM de UDP-GlcA; 1 mM de NAD⁺ e 10 µg de proteína (HARPER e BAR-PELED, 2002) foram feitas em triplicatas, assim como o controle negativo, no qual adicionou-se água ao invés de proteína. A reação foi paralisada pela adição de igual volume de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), após incubação por 20 minutos a 30°C. A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada (16.000 x g) por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e 80 µL de água foram adicionados a fase inferior, repetindo-se o passo anterior para recuperação adicional da fase aquosa. As duas fases aquosas foram combinadas e diluídas em água (1:10 v/v) para análise por HPLC (Dionex ICS-2500) usando coluna de troca aniônica (CarboPac™ PA10, Dionex). Os açúcares nucleotídeos foram separados a 0,25 mL min⁻¹, usando gradiente de 50 a 800 mM de acetato de sódio e um eluente isocrático de 4 M de NaOH em um tempo de corrida de 110 minutos e pressão no sistema de aproximadamente 2700 psi. Os

açúcares nucleotídeos foram detectados por amperometria (PAD). Os tempos de eluição dos componentes das amostras foram comparados com os de padrões autênticos de UDP-GlcA (Fluka®) e UDP-Xilose (CarboSource, Complex Carbohydrate Research Center, Universidade da Geórgia, EUA).

3.3 Clonagem do cDNA do gene *uxs* de ervilha no vetor binário *Gateway* de transformação de plantas

O vetor *Gateway* pK7WG2D (KARIMI et al., 2002) possui o gene marcador *nptII* (neomicina fosfotransferase II) que permite a seleção de transformantes em meio seletivo contendo canamicina (BEVAN et al., 1983). Possui ainda, na borda esquerda do T-DNA, a sequência codante (gene *EgfpER*) da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) sob o controle transcrricional do promotor e terminador *nos* (nopalina sintetase) (HELLENS et al., 2000), o que permite a seleção visual das plantas transformadas. Já, na borda direita do T-DNA, estão localizados os sítios de recombinação *att* (LANDY, 1989) para inserção do fragmento de interesse (Figura 3).

Figura 3 - Mapa do cassete de expressão do vetor *Gateway*. O vetor está caracterizado com os símbolos e abreviações: gene *nptII* - gene marcador, que confere resistência a canamicina, para seleção em plantas; promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor; terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor; *Egfp* - amplificador do gene *gfp* que codifica uma proteína verde-fluorescente (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA); promotor *nos* da nopalina sintetase; terminador *nos* da nopalina sintetase; *attR1* e *attR2* - sítios de recombinação; *ccdB* - gene da proteína CcdB que interfere com a DNA girase de *E.coli* (Bernard; Couturier, 1992; Bernard et al., 1993); *CmR* - gene de resistência a cloranfenicol; promotor *rolD* de *Agrobacterium rhizogenes* (Goddijn et al., 1993); LB e RB - bordas, esquerda (L) e direita (R) do T-DNA

A tecnologia *Gateway*[®] (Invitrogen) permite a clonagem direcional do segmento de interesse entre vetores que possuem sítios de recombinação *att* (HARTLEY et al., 2000) através de uma reação mediada pela *Gateway*[®] LR *Clonase*[™] *Enzyme Mix* (Invitrogen) que realiza a reação de recombinação entre o sítio *attL* do vetor pENTR/D-TOPO e o sítio *attR* do vetor *Gateway* pK7WG2D.

O sítio de clonagem *attR1* e *attR2* do vetor *Gateway* pK7WG2D está localizado entre o promotor e o terminador do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S (ODELL et al., 1985) possibilitando a expressão constitutiva do cDNA do gene *uxs* em plantas de tabaco transformadas.

Para a reação de clonagem do cDNA do gene *uxs* no vetor binário, foram utilizados 300 ng do vetor de entrada (pENTR D-TOPO contendo o cDNA do gene *uxs*), 300 ng do vetor de destino (*Gateway* pK7WG2D), 4 µL do tampão de reação (5X LR *Clonase*[™]), 4 µL de LR *Clonase*[™] *enzyme mix* e 16 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). A reação foi mantida a 25°C por 3 horas. Em seguida adicionou-se 4 µg de proteinase K (em solução contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl₂ 2 mM e glicerol 50% v/v) à reação, que foi mantida por 10 minutos a 37°C.

A transformação das células de *E. coli* DH5α com o vetor *Gateway* recombinante (contendo o cDNA do gene *uxs* de ervilha) foi feita acrescentando-se 1 µL da reação de clonagem (LR *clonase*) a 25 µL de células quimicamente competentes. As células foram então mantidas em gelo por 30 minutos sendo, em seguida, submetidas a um choque térmico por 45 segundos a 42°C e imediatamente transferidas para gelo, onde permaneceram por 5 minutos. Um volume de 450 µL de meio SOC (Anexo H) foi acrescentado às células que, foram mantidas a 37°C sob agitação constante (200 rpm) por 1 hora. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas contendo meio LB sólido (Anexo I) acrescido de espectinomicina (100 µg mL⁻¹) e incubadas por 16 horas a 37°C para seleção dos clones recombinantes.

3.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor binário *Gateway* recombinante

O plasmídeo recombinante *Gateway* pK7WG2D (contendo o cDNA do gene *uxs* de ervilha) foi utilizado para a transformação da linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) por eletroporação, de acordo com Lilley (1993).

Células de *A. tumefaciens* (EHA 105) “desarmadas” (HOOD et al., 1986), foram purificadas em placa de Petri contendo meio AB (ISHIDA et al., 1996) (Anexo S) sólido e mantidas por 72 horas a 28°C, para obtenção de colônias isoladas. Uma única colônia foi transferida para 100 mL de meio de cultura AB líquido (Anexo S). A cultura foi mantida sob agitação constante (200 rpm) a 28°C até atingir a fase logarítmica de crescimento (10^5 – 10^7 células mL⁻¹), verificada pela leitura da absorbância no comprimento de onda de 600 nm. As células bacterianas foram decantadas por centrifugação (4.600 x *g*) a 4°C por 10 minutos. O precipitado bacteriano resultante, foi submetido a lavagens feitas por sucessivas ressuspensões e centrifugações (4.600 x *g*, 4°C, 10 minutos) com 30 mL das seguintes soluções: a) tampão Hepes 1 mM (pH 7); b) água autoclavada; c) tampão Hepes 1 mM (pH 7) acrescido de glicerol (10% v/v). Uma alíquota de 80 µL do precipitado ressuspendido em 500 µL de tampão Hepes 1 mM (pH 7) acrescido de glicerol (10% v/v) foi transferida para a cubeta de eletroporação (0,2 cm de intervalo entre eletrodos), onde foram adicionados também 500 ng do vetor *Gateway* recombinante (pK7WG2D/cDNA do gene *uxs*) purificado. O pulso elétrico de 2,5 kVolts foi aplicado em eletroporador (Bio-Rad) e a solução transferida para tubo contendo 500 µL de meio SOC (Anexo H) sem antibiótico para a recuperação das células bacterianas por 2 horas (200 rpm) a 28°C, antes do plaqueamento em meio seletivo.

A seleção das bactérias transformadas foi feita pelo plaqueamento de alíquotas de 50 e 100 µL da cultura bacteriana em meio AB sólido (Anexo S), contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹). As placas foram mantidas à temperatura de 28°C por 72 horas. A análise das colônias foi feita via PCR, com *primers* específicos para a ORF do gene *uxs* de ervilha como descrito no item 3.1.5.

3.5 Transformação genética do tabaco

Um clone de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) contendo o vetor *Gateway* recombinante (pK7WG2D/cDNA do gene *uxs*) e um clone contendo o vetor *Gateway* sem o cDNA do gene *uxs* de ervilha (controle *Gateway*, CG) foram utilizados para a transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana), por infecção de discos foliares de acordo com Horsch et al. (1985) e Deroles e Gardner (1988).

Folhas jovens de plantas de tabaco cultivadas em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, foram colhidas, lavadas e, em fluxo laminar, rapidamente imersas (10 segundos) em etanol 70% (v/v), antes de serem transferidas para solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v), contendo 0,05% (v/v) de Tween 20, onde permaneceram por 5 minutos, sob agitação manual. Após a desinfestação, as folhas foram lavadas 6 vezes com água MilliQ autoclavada.

Discos foliares de 1 cm de diâmetro, cortados em fluxo laminar, foram incubados sob leve agitação manual por 5 minutos em placas de Petri, contendo 10 mL de cultura de *A. tumefaciens* transformada. Esta cultura foi preparada a partir da inoculação de uma colônia isolada em 100 mL de meio de cultura AB (Anexo S) líquido acrescido de 100 mg L⁻¹ de espectinomicina. A cultura foi mantida sob agitação constante (200 rpm) a 28°C até atingir a fase logarítmica de crescimento (10^5 – 10^7 células mL⁻¹), verificada pela absorbância no comprimento de onda de 600 nm. As células bacterianas foram decantadas por centrifugação (4.600 x g) a 4°C por 10 minutos e o precipitado bacteriano ressuspenso em 30 mL de meio de cultura (Anexo T) líquido (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Os discos foliares inoculados foram transferidos para meio de cultura sólido (Anexo T) composto por sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e vitaminas B5, acrescido de 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de NAA (DEROLES; GARDNER, 1988) por 48 horas. Após esse período, os discos foram lavados em solução 0,25% (v/v) de hipoclorito de sódio contendo 0,05% (v/v) de Tween 20, por 10 minutos, seguido de mais três lavagens em água MilliQ autoclavada, e transferidos para meio de cultura (Anexo T) acrescido de 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,1 mg L⁻¹ de NAA e dos antibióticos canamicina (100 mg L⁻¹) para seleção das células vegetais transformadas e cefotaxima (600 mg L⁻¹) para a

inibição do desenvolvimento da *A. tumefaciens*. Após aproximadamente 4 semanas, os brotos regenerados a partir dos calos formados nesse meio seletivo, foram transferidos para meio de cultura (Anexo T) acrescido de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de IBA e dos antibióticos cefotaxima (400 mg L^{-1}) e canamicina (50 mg L^{-1}) para indução de alongamento, por aproximadamente 1 a 2 semanas. Os brotos alongados foram transferidos para meio de cultura (Anexo T) sem fitorreguladores, acrescido apenas dos antibióticos canamicina (25 mg L^{-1}) e cefotaxima (300 mg L^{-1}), a fim de promover o enraizamento.

Os brotos enraizados foram submetidos à análise de PCR para confirmação da transgenia.

3.6 Análise das plantas de tabaco transformadas via PCR

Discos foliares de aproximadamente 80 mg foram coletados de brotos que enraizaram em meio de cultura para extração do DNA genômico, pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). O material vegetal das plantas selecionadas foi separadamente macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo, e transferido para tubos *epENDORF* estéreis (1,5 mL) contendo 700 μL de tampão de extração (Anexo U) previamente aquecido (60°C). Esses tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos a 60°C , com homogeneização em intervalos de 5 minutos. Em seguida, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos, antes da adição de 600 μL de CIA (24:1 v/v). A homogeneização foi feita por inversão dos tubos (25 vezes) antes da centrifugação ($18.000 \times g$) por 7 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para novo tubo ao qual adicionou-se 200 μL de tampão de extração (Anexo U) sem 2-mercaptoetanol e 600 μL de CIA (24:1 v/v). Após a homogeneização, as amostras foram novamente centrifugadas ($18.000 \times g$) por 7 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi então transferida para novo tubo, repetindo-se esse passo mais uma vez. Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o DNA genômico, foi recuperada. A precipitação se deu pela adição de 600 μL de isopropanol, seguida de centrifugação ($18.000 \times g$) por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com 600 μL de etanol 70% (v/v), mantido a -20°C por 20 minutos, antes de centrifugação ($18.000 \times g$) por 15 minutos a 4°C . Após secagem, o precipitado

foi ressuspendido em 30 μL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) contendo 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RNase, e mantido por 1 hora a 37°C, antes de ser armazenado a 4°C. A verificação da qualidade e a quantificação do DNA genômico foi feita através de eletroforese como descrito no item 3.1.6.

O DNA extraído foi utilizado para confirmação dos eventos de transformação via PCR, utilizando-se os *primers forward* (5'-GCGATACCGTAAAGCACGAG-3') e *reverse* (5'-GCTTGGGTGGAGAGGCTATT-3') específicos para o gene *nptII*. Para um volume final de reação de 50 μL foram utilizados: 5 μL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl) (Invitrogen), 2,5 μL de MgCl_2 50 mM (Invitrogen), 200 μM de cada dNTP, 1 unidade da enzima Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 50 pmol de cada *primer*, 50 ng de DNA e água MilliQ autoclavada suficiente para completar o volume da reação. O programa utilizado no termociclador (*Applied Biosystem - GeneAmp®PCR System 9700*) foi : 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos.

3.7 Análise das progênes das plantas transformadas

Após a confirmação por PCR da transgenia, os brotos enraizados foram transferidos para vasos contendo substrato e vermiculita na proporção de 1:1, e aclimatados em câmara de crescimento (Convicon E15) com intensidade de luz de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25/18°C dia/noite, fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro. Depois da aclimação, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e as sementes, produzidas por autofecundação, foram analisadas quanto à segregação genética do gene *nptII*.

Para realização da análise de segregação genética das progênes, as sementes das plantas transformadas foram coletadas e desinfestadas, em fluxo laminar, pelo tratamento com etanol 70% (v/v) por 10 segundos, seguida da lavagem com hipoclorito de sódio 1,0% (v/v) por 10 minutos, sob agitação constante. As sementes foram lavadas 5 vezes com água autoclavada e deixadas sob papel de filtro autoclavado para secar, antes de serem semeadas em meio de cultura (Anexo T) contendo canamicina (100 mg L^{-1}). Um total de 400 sementes de cada transformante, divididas em 4 placas de Petri

contendo 100 sementes cada foram testadas. Após 30 dias, em meio seletivo, as progênies foram avaliadas, sendo que, as plantas que sobreviveram e se desenvolveram normalmente foram consideradas resistentes. A segregação obtida foi aplicada ao teste χ^2 , conforme fórmula abaixo, e o valor de χ^2 calculado foi comparado ao valor de χ^2 tabelado. No caso, sendo o grau de liberdade 1 e a probabilidade de 5%, o valor do χ^2 tabelado utilizado foi de 3,84.

$$\frac{(Or - Er)^2}{Er} + \frac{(Os - Es)^2}{Es} = \chi^2_{calculado}$$

Sendo: **Or:** Número observado de plântulas resistentes
 Er: Número esperado de plântulas resistentes
 Os: Número observado de plântulas sensíveis
 Es: Número esperado de plântulas sensíveis

Para a seleção de indivíduos homozigotos na geração T₂, nove plantas resistentes de cada um dos genótipos que apresentaram segregação mendeliana tipo 3:1, foram transferidas para vasos, contendo substrato e vermiculita (1:1), e aclimatadas em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade. A probabilidade de ocorrer uma planta homozigota entre nove plantas é de 99,9%, devido à probabilidade de 33,3% de ocorrência de um indivíduo homozigoto entre as três plantas resistentes da segregação mendeliana. Após uma semana, os vasos foram transferidos para casa de vegetação e as sementes provenientes de autofecundação foram novamente avaliadas quanto à segregação do gene de resistência a canamicina. As progênies que não apresentaram segregação para o gene *np^{fl}II* na geração T₂, ou seja, homozigotas, foram selecionadas para a realização das análises subsequentes.

3.8 Southern blot

Para a realização da análise de *Southern blot*, o DNA genômico de cada linhagem transgênica homozigota analisada, da linhagem selvagem (WT) e da linhagem controle Gateway (CG), foi extraído de folhas pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) descrito no item 3.6. Cada amostra de 15 µg de DNA foi digerida separadamente com as

enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (Invitrogen), por 16 horas a 37°C. O DNA digerido foi precipitado pela adição de 1/10 do volume total de acetato de amônia e 2,5 vezes o volume total de etanol absoluto. As amostras foram deixadas a -20°C por 24 horas. Após centrifugação (18.000 x g) por 40 minutos a 4°C, o precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 70% (v/v), seguido de centrifugação e secagem, antes de ser ressuscitado em 40 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5). A este volume adicionou-se 8 µL de sacarose 40%, para aumentar a densidade da amostra a ser submetida à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídio (0,01 ng µL⁻¹) em tampão TBE 0,5X (Anexo F). Como marcador de peso molecular foi utilizado 1kb DNA *Ladder* (Invitrogen). O gel foi submetido a uma corrente de 35 V por 15 horas e fotografado juntamente com uma régua visível sob luz ultravioleta, que permite correlacionar a altura da banda obtida ao peso molecular do marcador.

O gel contendo o DNA foi lavado com solução ácida (HCl 0,25 M) por 10 minutos para depuração, seguida de lavagem com solução básica (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 minutos para desnaturação e duas lavagens, de 15 minutos cada, com solução de neutralização pH 7,5 (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M; EDTA 1 mM), todas intercaladas com enxágues em água MilliQ autoclavada.

Após lavagem, o DNA foi transferido do gel para a membrana de nylon *Hybond-N+* (Amersham Biosciences) por capilaridade utilizando solução de transferência 20X SSC (Anexo V) por 16 horas, de acordo com Sambrook et al. (1989). O DNA foi fixado à membrana por aquecimento a 80°C por duas horas.

Como sonda para hibridização utilizou-se o produto da reação de PCR do plasmídeo *Gateway* pK7WG2D com os *primers* específicos para o gene *np1l forward* (5'-GCTTGGGTGGAGAGGCTATT-3') e *reverse* (5'-GCGATACCGTAAAGCACGAG-3'). A reação foi feita como descrito no item 3.6, e o produto, purificado com auxílio do *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN). Para purificação, 5 volumes do tampão PB fornecido pelo *kit* foram adicionados a 1 volume (42 µL) da reação de PCR. A amostra foi aplicada na coluna *QIAquick* disposta em um tubo coletor e centrifugada (13.000 x g) por 1 minuto à temperatura ambiente. O material acumulado no tubo coletor foi descartado e a coluna lavada com 750 µL do tampão PE, fornecido pelo *kit*, acrescido de etanol e centrifugação (13.000 x g) por 1 minuto à temperatura ambiente. Realizou-se uma

centrifugação adicional da coluna para total remoção do etanol residual. A coluna foi disposta em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL antes da eluição do DNA com 30 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,5) e centrifugação (13.000 x g) por 1 minuto à temperatura ambiente. O DNA resultante foi quantificado por eletroforese como descrito no item 3.1.6.

A sonda foi marcada de forma não radioativa com auxílio do *kit Gene Images™ random prime labelling module* (Amersham Biosciences), segundo normas do fabricante. Para isso, 1 µL do produto da reação de PCR (aproximadamente 50 ng) foi acrescentado a 24 µL de água MilliQ autoclavada. Esta solução foi mantida a 98°C por 7 minutos e transferida imediatamente para gelo, antes da adição de: 10 µL de nucleotídeo *mix*; 5 µL de *primers*, 1 µL de enzima *Klenow*, fornecidos pelo *kit* e água MilliQ suficiente para completar o volume da reação de 50 µL. Misturou-se suavemente e incubou-se a 37°C por 1 hora. Antes da hibridização, procedeu-se nova desnaturação da sonda a 98°C por 7 minutos.

Todos os passos da hibridização foram realizados no forno de hibridização *Hybridiser HB-2D* (Techne). A membrana foi umedecida com 50 mL de solução 5X SSC (Anexo V) a 55°C por 30 minutos. Em seguida, substituiu-se esta solução por 20 mL da solução de hibridização (Anexo X), na qual a membrana foi deixada por pelo menos 1 hora a 55°C. A hibridização se deu, após a adição da sonda marcada à solução de hibridização, por 16 horas a 55°C. As lavagens de pós-hibridização da membrana foram realizadas a 55°C com 100 mL de solução I (1X SSC + SDS 0,1% p/v) e 100 mL de solução II (0,5X SSC + SDS 0,1% p/v) por 15 minutos cada.

A detecção dos pontos de hibridização foi realizada com auxílio do *kit* de detecção *Gene Images CDP-Star detection module* (Amersham Biosciences). Após as lavagens de pós-hibridização a membrana foi mantida por 1 hora à temperatura ambiente, em solução bloqueadora, composta de 45 mL de Tampão A (Anexo Z) e 1/10 v/v do agente bloqueador de detecção fornecido pelo *kit*. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo *antifluorescein-AP conjugate* diluído (1:5000) em 25 mL de Tampão A + 0,5% (p/v) BSA, à temperatura ambiente, por 1 hora. O excesso de anticorpo foi removido por três lavagens de 10 minutos cada, com 100 mL de solução de lavagem (300 mL Tampão A + 0,3% Tween 20 v/v). Em fluxo laminar, a membrana foi

colocada sobre um plástico, e sobre ela distribuiu-se homogeneamente 300 µL do reagente de detecção, fornecido pelo *kit*. A reação se deu durante 5 minutos. O excesso de líquido foi removido com auxílio de uma régua e, as bordas do saco plástico seladas.

Em câmara escura, um filme de auto-radiografia foi exposto sobre a membrana hibridizada, mantida na ausência de luz no interior de um cassete de Raios X. A sensibilização do filme ocorreu devido à reação luminosa resultante da oxidação do luminol (*CDP-Star*) em contato com a membrana hibridizada. O tempo de exposição do filme foi variável, iniciando-se com 30 segundos. Após a exposição, o filme foi revelado manualmente em câmara escura através da seguinte sequência de lavagens: 4 minutos em solução reveladora GBX diluída (Kodak), 1 minuto em água, 15 minutos em solução fixadora GBX diluída (Kodak) seguida de lavagem em água por 15 minutos.

3.9 Northern blot

Para a análise de *Northern blot* o RNA total foi extraído de folhas e caules utilizando-se o *ConcertTM Plant RNA Reagent* (Invitrogen). Amostras (100 mg) de tecido, pulverizadas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo, foram mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente após a adição de 1 mL do *ConcertTM Plant RNA Reagent* (Invitrogen). Após centrifugação (12.000 x *g*) por 2 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para novo tubo onde 100 µL de NaCl 5 M foram adicionados. Em seguida, adicionou-se 300 µL de clorofórmio e agitou-se a amostra por inversão. A amostra foi centrifugada (12.000 x *g*) por 10 minutos a 4°C, a fase aquosa transferida para novo tubo e, igual volume de isopropanol adicionado. Após 10 minutos à temperatura ambiente, realizou-se nova centrifugação (12.000 x *g*) por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v) e centrifugado (12.000 x *g*) por 1 minuto a temperatura ambiente. Após secagem por 10 minutos, o RNA precipitado foi ressuspensionado em 30 µL de água livre de RNase. A quantidade e a qualidade do RNA total extraído foram verificadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose, como descrito no item 3.1.1.

Após a quantificação, as amostras de RNA foram precipitadas a fim de reduzir o volume da amostra. Para isso, o volume de cada amostra correspondente a 45 µg de RNA

foi ajustado para 250 μL com TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5), ao qual adicionou-se 1/10 do volume total de acetato de amônia e 2,5 vezes do volume total de etanol absoluto. As amostras foram deixadas a -80°C até o momento do uso. Após centrifugação ($16.000 \times g$) por 40 minutos a 4°C , o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% (v/v), seguido de centrifugação adicional ($11.200 \times g$) por 15 minutos a 4°C e secagem por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado em 3 μL de água tratada com DEPC e acrescido de 12 μL de tampão de amostra de RNA (Anexo B) antes de ser submetido à eletroforese a 75 Volts por 75 minutos (SAMBROOK et al., 1989) em gel desnaturante de agarose 1% (p/v) contendo formaldeído (12,3 M) em tampão MOPS 1X (Anexo AA) (HAMES e HIGGINS, 1995). Após a transferência para a membrana de Nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences), seguindo a metodologia descrita no item 3.8, foi realizada a hibridização com uma sonda específica para o transgene.

Como sonda utilizou-se o produto da reação de PCR do plasmídeo *Gateway* pK7WG2D com os *primers forward* (5' – GCAGGTCACTGGATTTTGGT – 3') e *reverse* (5' – TCCGCAAAAATCACCAGTCT – 3'), específicos para o terminador 35S abrangendo a região correspondente ao sinal da adição da cauda poli A. A reação foi feita como descrito no item 3.6, e o produto foi purificado com auxílio do *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN) de acordo com o item 3.8. A sonda foi marcada de forma não radioativa, com auxílio do *kit Gene ImagesTM AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), segundo normas do fabricante. Para isso, 1 μL do produto da reação de PCR (aproximadamente 100 ng) foi acrescentado a 9 μL de água MilliQ autoclavada, resultando em uma concentração final de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA. Esta solução foi mantida a 98°C por 7 minutos e transferida imediatamente para gelo onde permaneceu por 5 minutos, antes da adição de: 10 μL de *Reaction Buffer*, 2 μL de *Labelling Reagent*, 10 μL de *Cross-linker* diluído (1:4 v/v) em água MilliQ, fornecidos pelo *kit*. Após suave homogeneização, a reação foi mantida por 30 minutos a 37°C .

A membrana foi colocada na garrafa de hibridização onde adicionou-se o tampão de hibridização (Anexo AB) pré-aquecido a 55°C , permanecendo por pelo menos 15 minutos, antes da adição da sonda já marcada. A hibridização ocorreu no hibridizador *Hybridiser* HB-2D (Techne) a 55°C por 16 horas. A membrana foi lavada duas vezes com

100 mL do tampão de lavagem I (Anexo AC) por 10 minutos a 55°C no hibridizador, seguida de duas lavagens com tampão de lavagem II (Anexo AD) por 5 minutos a temperatura ambiente.

A detecção dos pontos de hibridização foi realizada com auxílio do *Gene Images™ AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), segundo normas do fabricante. Em fluxo laminar, a membrana foi colocada sobre um plástico, e sobre ela distribuiu-se homogeneamente o reagente de detecção ($35 \mu\text{L cm}^{-2}$), fornecido pelo *kit*. A reação se deu durante 5 minutos. O excesso de líquido foi removido e as bordas do saco plástico seladas. O procedimento seguido para a sensibilização do filme de Raio X foi o mesmo descrito no item 3.8.

A mesma membrana foi hibridizada com uma sonda de DNA (600 pb) referente a região que codifica o RNA ribossômico 18S de ervilha (fornecida pelo Dr. Eric Lam, *Rutgers – The State University of New Jersey*), para verificação da quantidade de RNA total de cada amostra. Para isso, após a detecção da sonda específica para o terminador 35S, a membrana foi lavada com uma solução SDS 0,5 % (p/v) por 1 hora a 60°C, e em seguida, enxaguada por 5 minutos, à temperatura ambiente, com 100 mM de Tris (pH 8). A hibridização e a detecção, com a sonda 18S, foram realizadas sob as mesmas condições descritas acima.

3.10 Análise do nível de expressão dos transgenes por PCR Semi-Quantitativo (SQ-PCR) e PCR em Tempo Real

Amostras de tecido foliar (80 mg) foram coletadas de plantas de tabaco semeadas e crescidas por três semanas em substrato contendo 75% de solo, 25% de cerâmica porosa condicionadora de solo (turface), 1 g L^{-1} de inseticida (Marathon) e $1,8 \text{ g L}^{-1}$ de nutriente (Osmocote). Essas amostras, pulverizadas em nitrogênio líquido, foram mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente, após a adição de 1 mL do reagente TRIZOL® (Invitrogen), permitindo assim, a dissociação completa dos complexos nucleoprotéicos. Clorofórmio (0,2 mL) foi adicionado à amostra que, após agitação vigorosa por 15 segundos, foi incubada, à temperatura ambiente, durante 3 minutos antes da centrifugação ($11.000 \times g$), por 15 minutos a 4°C. Uma alíquota de 650 μL da

fase aquosa foi transferida para novo tubo e o RNA foi precipitado com a adição de 0,5 mL de isopropanol. A amostra permaneceu por 10 minutos à temperatura ambiente antes da centrifugação ($11.000 \times g$) por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado por agitação com 1 mL de etanol 75% (v/v) seguida de centrifugação ($7.000 \times g$) por 5 minutos a 4°C . O RNA precipitado foi deixado secar por 15 minutos, à temperatura ambiente, antes da ressuspensão em 50 μL de água livre de RNases. O RNA foi mantido em banho-maria a 60°C por 10 minutos para sua total dissolução, antes da quantificação.

O RNA (2 μL) foi quantificado pela leitura da absorbância a 260 nm e a qualidade determinada pela razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm obtidas em espectrofotômetro *Nano-Drop* (ND-1000). A qualidade também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X (Anexo F). O RNA não utilizado na síntese de cDNA foi armazenado a -80°C depois da adição de 20 U de inibidor de RNase (SUPERase•In™, Ambion, Inc).

As amostras de RNA foram submetidas à digestão com DNase (TURBO DNA-free™ kit, Ambion, Inc.) antes da síntese do cDNA. Para isso, uma reação de 50 μL contendo 5 μL do tampão de reação 10X (TURBO DNase Buffer 10X), 2 U TURBO DNase, 10 μg de RNA e água suficiente para completar o volume final, foi mantida a 37°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 5 μL do reagente de inativação (DNase Inactivation Reagent). A amostra foi mantida à temperatura ambiente por 2 minutos, antes da centrifugação ($10.000 \times g$) à temperatura ambiente por 1,5 minutos. O RNA foi transferido para novo tubo.

O RNA livre de DNA foi utilizado para a síntese do cDNA utilizando-se o kit *iScript™ cDNA Synthesis* (Bio-Rad). Para um volume total de reação de 20 μL foram adicionados 5 μL do reagente 5X *iScript Reaction mix*, 1 μL da enzima *iScript Reverse Transcriptase*, 1 μg de RNA e água suficiente para completar o volume final. A reação foi realizada em um termociclador (*MJ Research PTC 100 thermal cycler*) por 5 minutos a 25°C , seguidos de 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C . Logo após, foram adicionados 80 μL de água MilliQ autoclavada.

O volume final de todas as reações de PCR e SQ-PCR realizadas foi de 25 μL utilizando-se 10 μL da mistura de reação Eppendorf® *MasterMix* (2,5X), 250 nM de cada

primer, cDNA e água, em volumes variáveis. O programa utilizado no termociclador (*MJ Research PTC 200 thermal cycler*) foi: 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45–60°C por 1 minuto e 74°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 5 minutos a 74°C.

Porém, anteriormente ao SQ-PCR, os conjuntos de *primers* foram testados quanto à temperatura de anelamento e, a concentração de cDNA de cada amostra estimada. Para testar a melhor temperatura de anelamento de cada *primer* uma reação de PCR foi realizada em termociclador com gradiente de temperatura (*MJ Research PTC 200 thermal cycler*) testando oito temperaturas de anelamento diferentes (45; 46,3; 49,2; 51,4; 53,9; 56; 58,8 e 60°C). As sequências de todos os *primers* utilizados, assim como as descrições dos mesmos, estão apresentadas no Anexo AE. A estimativa da concentração de cDNA nas amostras foi baseada na medida da intensidade do brilho conferido pelo brometo de etídio ao DNA, no gel de agarose, que é proporcional à quantidade de DNA presente. A intensidade das bandas foi medida com auxílio do programa de computador *Quantity One* (Bio-Rad) e a concentração de cDNA, estimada pela comparação com padrões de quantidades conhecidas de DNA.

O SQ-PCR foi feito em duplicata para todas amostras testadas com cada conjunto de *primers*. Para verificação do nível de expressão do transgene nas plantas transgênicas que superexpressam o cDNA do gene *uxs* de ervilha, foram utilizados os *primers* específicos para actina e ubiquitina (genes de expressão constitutivos) e os *primers* específicos para o transgene (Anexo AE). As temperaturas de anelamento usadas foram: 50°C para os *primers* da actina e 55°C para os *primers* da ubiquitina e do transgene *uxs*. O volume inicial de reação foi de 50 µL e ao fim dos ciclos 26, 28, 30, 32 e 34, retirou-se uma alíquota de 5 µL de cada tubo e armazenou-se a 4°C antes da aplicação em gel de agarose 1% (p/v).

O PCR em tempo real foi feito em um termociclador específico (*Stratagene MX3000P QRT-PCR machine*) utilizando-se 12,5 µL do reagente *iTaqTM SYBR[®] Green Supermix with ROX*, 250 nM de cada *primer*, cDNA e água, em volumes variáveis em uma reação de 25 µL. O PCR em tempo real foi feito em quadruplicata para cada amostra de cDNA testada com cada um dos diferentes *primers*. A quantidade de cDNA de cada reação foi normalizada usando o *primer* específico para o gene constitutivo da

ubiquitina de tabaco. O “corante” interno de referência, ROX, foi usado para normalizar o sinal fluorescente e corrigir a variação ótica de cada tubo. A eficiência de cada conjunto de *primers* foi testada através de uma série de diluições do cDNA de uma das linhagens transgênicas testadas no ensaio (pois esta apresenta amplificação para ambos *primers* testados, ou seja, específico para detectar o transgene e a ubiquitina). Para preparar as diluições, a concentração do cDNA usado na reação foi diluída 10, 100 e 1000 vezes, produzindo uma curva padrão relacionando a quantidade inicial de cDNA nas diluições e o (Ct) *threshold cycle* (ciclo no qual um aumento estatisticamente significativo na fluorescência é detectado).

3.11 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por FTIR (*Fourier Transform Infrared microspectroscopy*)

A microespectroscopia infravermelha detecta a vibração de todas as ligações moleculares pelas quais os átomos de um composto diferem em eletronegatividade, incluindo ligações assimétricas como C-H e O-H, e grupos funcionais, tais como, ésteres, amidas e carboxilatos. O espectro infravermelho de um material com picos de absorção correspondentes as frequências de vibrações das ligações entre os átomos que o compõe, representa uma “impressão digital” desse material. Como cada composto diferente tem uma combinação única de átomos, o espectro produzido nunca será o mesmo. Sendo assim, a microespectroscopia infravermelha pode ser utilizada na identificação de diferentes tipos de materiais. Entretanto, as frequências das ligações moleculares são modificadas pelo ambiente no qual estas ligações estão presentes, como por exemplo, nível de hidratação, estrutura e conformação da molécula, além da interação com outras moléculas. Dessa maneira, o espectro infravermelho é característico da arquitetura, assim como, da composição da parede celular.

O espectrômetro infravermelho por *Fourier Transform* obtém os espectros infravermelhos pela coleta, através de um interferômetro, de todas as frequências das ligações moleculares simultaneamente, produzindo um interferograma. Esse interferograma pode, então, ser decodificado através da técnica matemática de transformação de dados de Fourier (*Fourier Transformation*). A transformação é

realizada pelo computador que fornece as informações necessárias para a análise do espectro (Figura 4).

Figura 4 - Ilustração esquemática do sistema FTIR (Adaptado do site <http://www.nuance.northwestern.edu/KeckII/ftir1.asp>)

Para análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por FTIR, as sementes de tabaco da geração T₂ foram desinfestadas seguindo a metodologia descrita no item 3.7, antes de serem semeadas em meio de cultura MS (Anexo T) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo metade da concentração original de sais, pH 5,7 acrescido de 1% (p/v) de sacarose e 0,8% (p/v) de ágar. As plântulas foram mantidas por duas semanas, à temperatura de 23°C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz na intensidade de 240 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gerada por lâmpadas fluorescentes GE F21. Após desenvolvimento por duas semanas, as plântulas foram transferidas para o escuro por 2 dias, à temperatura de 23°C, para a redução do conteúdo de amido, contaminante característico em análises de parede celular que pode gerar altas absorbâncias no espectro infravermelho, interferindo assim, nos resultados.

As plântulas, desprovidas de raiz, foram coletadas em nitrogênio líquido, pulverizadas em tubos plásticos de 15 mL (Falcon) e ressuspensas em Tris-HCl 50 mM pH 7, contendo SDS 1% (p/v). Após 15 minutos em banho-maria a 80°C, para extração de proteínas e outros componentes não pertencentes à parede celular, a suspensão foi filtrada em filtro de *nylon* (47 μm , Nitex cloth; Tetko Industries, Briarcliff Manor, NY) de 2,5 cm de diâmetro disposto em filtro a vácuo (1225 *Sampling Manifold*, Millipore). O material retido no filtro foi lavado com água aquecida a 80°C para a remoção do SDS e transferido para tubos *ependorf* de 2 mL. Três esferas de aço inoxidável foram adicionadas e a amostra, após a adição de água, foi homogeneizada em agitador (Geno-

Grinder, SPEX Certi-Prep® Ltd.) a $1.200 \text{ ciclos min}^{-1}$, por 10 minutos. O homogeneizado foi novamente coletado em filtro de *nylon* e lavado com etanol 50% aquecido a 80°C , seguido da lavagem com água também a 80°C . A parede celular dissolvida em água foi transferida novamente para os tubos *ependorf* de 2 mL contendo três esferas de aço inoxidável e homogeneizada pela segunda vez ($1200 \text{ ciclos min}^{-1}$) por 10 minutos. Após ter sido coletada em filtro de *nylon* e lavada com água à temperatura ambiente a fração sólida correspondente à parede celular foi ressuspensa em água deionizada. Alíquotas de $7 \mu\text{L}$ da parede celular, resultante da decantação por pelo menos 30 minutos, foram dispostas em lâmina de ouro (EZ-Spot, Spectra-Tech, que reflete a luz infravermelha) e deixadas secar durante 12 horas a temperatura ambiente.

Os espectros infravermelhos foram obtidos pelo modo de transfectância a partir das amostras de parede celular aplicadas na lâmina de ouro que foi disposta em um microscópio ótico (Nicolet Continuum) acoplado a um espectrômetro infravermelho (670 IR *spectrometer*) com detector de telúrio, cádmio e mercúrio (HgCdTe), e resfriamento por nitrogênio líquido (Thermo-Electron, Madison, WI) (Figura 5). Pelo modo de transfectância, o feixe infravermelho é transmitido através da amostra de parede celular, refletido pela lâmina de ouro e transmitido através da amostra novamente.

Figura 5 - Foto do microscópio ótico (Nicolet Continuum) acoplado a um espectrômetro infravermelho (670 IR *spectrometer*) utilizado na análise da parede celular por FTIR

O espectro referente à intensidade de absorção da lâmina de ouro em uma área sem amostra foi medido para a obtenção de uma escala relativa (*background*). Os espectros das amostras foram coletados em uma área de $125 \times 125 \mu\text{m}$, excluindo células vasculares e foram selecionados com base em algumas características que asseguraram a comparação entre espectros como, absorbância do pico na região 1050-

1000 cm^{-1} entre 0,4 e 0,8 e valor maior do que o do pico em 1600 cm^{-1} ; valores em 1800 cm^{-1} e 800 cm^{-1} razoavelmente iguais e com absorvência abaixo de 0,3 (para assegurar uma boa correção da linha de base) (Figura 6).

Figura 6 - Tela do computador contendo as informações mostradas durante a seleção dos espectros coletados

Um total de 128 interferogramas foi coletado com 8 cm^{-1} de resolução e somados para melhorar o sinal de cada amostra. Para cada genótipo, um total de 50 espectros foi obtido a partir de uma população de 15 plantas. Porém, a média das áreas de apenas 40 espectros coletados em diferentes regiões na mesma amostra foi calculada e a linha de base corrigida (os espectros mais ruidosos foram descartados).

O conjunto de dados gerado pelos espectros dos genótipos transgênicos e do selvagem foram analisados pelo programa Microsoft® Excel. Um arquivo foi criado para cada genótipo contendo, a escala de infravermelho de 800 a 1800 cm^{-1} na primeira coluna de dados e os valores de absorvência para cada espectro dentro dessa escala nas colunas subsequentes. Um gráfico foi gerado utilizando-se a escala de infravermelho (primeira coluna) representando o eixo X e os valores de absorvência como eixo Y. Desta forma, foi possível obter um espectro representando a média dos espectros totais, a subtração digital entre o espectro da planta selvagem e um genótipo transgênico, e realizar a análise de componentes principais (PCA).

Um algoritmo estatístico como a análise de componentes principais (PCA) que aborda dados multivariados (KEMSLEY, 1998) foi aplicado aos espectros (constituídos

por uma série discreta de medidas em intervalos definidos) para revelar características moleculares que serviram de base para a discriminação entre populações (CHEN et al., 1998). O programa WIN-DAS (KEMSLEY, 1998) foi utilizado para a realização da análise de componentes principais. Essa análise reduziu a alta dimensionalidade dos dados do espectro a um conjunto menor de variáveis derivadas pelo computador, chamadas de componentes principais, que juntos representaram toda a variância de um grupo (aparentemente similar) de espectros (KEMSLEY, 1998). Cada espectro tem um valor associado a cada nova variável (PC *score*), representando a distância relativa à média da população.

A análise dos dados obtidos foi feita com base em cinco novas variáveis (PC *score*) geradas pelo computador para classificação dos espectros por comparação entre o conjunto de espectros referentes ao genótipo selvagem e o conjunto de espectros referentes a cada genótipo transgênico. Um total de 40 espectros para cada genótipo foi usado na comparação entre selvagem e transgênico. A distância relativa ao centro de cada classe (selvagem ou transgênico) foi calculada utilizando a distância métrica denominada Mahalanobis. Essa distância, calculada a partir de cinco variáveis dos componentes principais, permitiu a correta classificação dos espectros dentro das populações. Para ser classificado como selvagem, por exemplo, a distância entre um espectro individual e a média dos espectros da população selvagem deve ser menor que a distância em relação à média da população transgênica.

3.12 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

A composição dos monossacarídeos da parede celular das plantas transgênicas de tabaco foi determinada através da técnica de GC-MS. Essa técnica combina a propriedade de separação por cromatografia a gás com a habilidade de identificação da espectrometria de massas. Essa combinação gera uma poderosa ferramenta analítica que fornece informações qualitativas e quantitativas.

Para análise no equipamento de GC-MS, a amostra injetada deve ser vaporizada, introduzida no topo da coluna cromatográfica e transportada através dessa coluna por

um fluxo de gás inerte. A coluna contém uma fase estacionária líquida que é adsorvida a uma fina superfície de sílica onde a amostra fica aderida. A temperatura é aumentada a certo ponto que a interação com a matriz é quebrada e a amostra, empurrada para fora da coluna pelo gás. Dessa forma, quando um gradiente de temperatura é aplicado, diferentes componentes da amostra são eluídos em diferentes tempos. Após saírem da coluna, os componentes da amostra são quebrados em fragmentos por um feixe de elétrons gerados pelo ionizador. Esses fragmentos, com carga elétrica, são acelerados pela manipulação das cargas e caminham através do quadrupolo do espectrômetro de massas de acordo com a razão entre massa e carga (m/z). Pela comparação entre os resultados obtidos de cada amostra com os de padrões tratados similarmente, é possível determinar a razão molecular de cada componente da amostra. Porém, para poderem ser analisados pela técnica de GC-MS, os monossacarídeos gerados a partir dos polissacarídeos por hidrólise ácida, devem ser derivatizados para se tornarem voláteis. A derivatização compreende a redução dos monossacarídeos em alditol com o agente redutor NaBH_4 seguida da acetilação com anidrido acético produzindo acetatos de alditol (*alditol acetates*). Os acetatos de alditol derivados de diferentes monossacarídeos são voláteis a diferentes temperaturas permitindo a separação pela cromatografia a gás.

Para análise de GC-MS, discos foliares das plantas de tabaco foram lavados com etanol 80%, após serem pulverizados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. A suspensão foi coletada em membranas de *nylon* dispostas em um filtro a vácuo acoplado a um Kitassato. O material retido na membrana de *nylon* foi transferido para tubo *eppendorf* de 2 mL e seco por centrifugação a vácuo à temperatura de 40°C.

Aproximadamente 1 mg da amostra de parede celular, transferida para tubos de vidro (1 mL) com fundo cônico, foi hidrolisada com 1 mL de TFA 2 M contendo 1 μmol de mio-inositol (padrão interno) por 90 minutos, a 120°C em bloco de aquecimento, com agitação a cada 30 minutos para beneficiar a dissolução da parede celular.

Após esfriamento, o material foi centrifugado (3.000 rpm) por 3 minutos para separação dos monossacarídeos hidrolisados da celulose não digerida, cuja quantidade foi determinada posteriormente como descrito no item 3.13. O sobrenadante contendo os monossacarídeos foi transferido para tubo de vidro, o ácido evaporado por corrente de ar

comprimido e os monossacarídeos derivatizados a acetatos de alditol de acordo com Blakeney et al. (1983) e modificações por Carpita e Shea (1989).

Em cada amostra adicionou-se 0,6 mL de uma solução de NaBH_4 (20 mg mL^{-1}) dissolvido em 0,5 mL de DMSO acrescido de 0,1 mL de NH_4OH 1M para a redução dos monossacarídeos a alditol. A diluição do NaBH_4 em DMSO tem como vantagem a manutenção da estabilidade da solução e inibição do consumo de anidrido acético durante a acetilação. O papel do NH_4OH é neutralizar a solução originada da hidrólise ácida. A reação de redução foi incubada em banho-maria a 40-45°C por 90 minutos com agitação em vórtex a cada 30 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 100 μL de ácido acético à solução para a eliminação do excesso de NaBH_4 . Em seguida, foram adicionados 100 μL de metilimidazol e 0,75 mL de anidrido acético para reação de acetilação que ocorreu por 30 minutos em banho-maria a 40-45°C. O metilimidazol permitiu a acetilação quantitativa dos alditóis na presença de borato (derivado da redução). O excesso de anidrido acético foi eliminado com a adição de 1,5 mL de água seguida de vigorosa agitação. Após atingir a temperatura ambiente, completou-se o volume do tubo com diclorometano (CH_2Cl_2). As amostras foram centrifugadas (2.000 rpm) por 1 minuto após vigorosa agitação durante 1-2 minutos. A fração aquosa foi aspirada e adicionou-se água até completar o volume do tubo. As amostras foram novamente agitadas durante 1-2 minutos antes da centrifugação (2.000 rpm) por 1 minuto. Essa lavagem com água foi repetida por mais cinco vezes antes da evaporação do CH_2Cl_2 por corrente de ar comprimido. As amostras foram ressuspensas em 1 mL de CH_2Cl_2 e uma alíquota de 250 μL foi transferida para os tubos com insertos usados para corrida no equipamento de GC-MS (Figura 7).

Os acetatos de alditol foram separados por cromatografia gasosa em uma coluna SP-2330 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) de 0,25 mm x 30 m. Após carregamento inicial a 80°C, a temperatura foi rapidamente ajustada para 170°C a 25°C min^{-1} e programado para 240°C a 5°C min^{-1} com 10 minutos de permanência na maior temperatura. O fluxo do gás hélio foi de 1 mL min^{-1} com uma injeção sem divisão de fluxo (*splitless*), ou seja, toda a amostra injetada alcançou a coluna. A espectrometria de impacto de elétrons (EIMS) foi feita por um espectrômetro de massas Agilent System MSD (Wilmington, DE,

EUA) a 70 eV e temperatura de 250°C. Os dados foram processados pelo programa de computador fornecido pelo fabricante do equipamento (Figura 8).

Figura 7 - Foto do equipamento de GC-MS usado nas análises

Figura 8 - a) Exemplo de um cromatograma gerado pelo GC. b) Exemplo de um espectro de massas gerado pelo MS

3.13 Determinação de celulose por método colorimétrico

A quantidade de celulose das plantas de tabaco foi determinada pelo método colorimétrico adaptado de Dubois e colaboradores (1956). Para a realização do ensaio, a celulose não digerida pela hidrólise ácida (descrita no item 3.12) foi ressuspensa em água, agitada e centrifugada (3.000 rpm) por 3 minutos. Essa lavagem foi repetida cinco

vezes antes da ressuspensão em 800 µL de água. Cada amostra foi subdividida em quatro repetições transferindo-se 200 µL da suspensão em diferentes tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200 µL de fenol 5% (v/v) em água, seguida da adição de 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado produzindo uma coloração amarelo-alaranjada estável e proporcional à quantidade de polissacarídeo presente. A mistura foi imediatamente agitada em vórtex por alguns segundos. As amostras foram deixadas por 16 horas à temperatura ambiente antes da leitura da absorbância a 500 nm, já que a intensidade da coloração atinge o máximo em 2 horas à temperatura de 30°C e é estável. A concentração de celulose nas amostras foi calculada através da curva padrão obtida pela leitura da absorbância de padrões preparados com celulose pura (Cellex, Bio-Rad) nas seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12 e 0,15 mg mL⁻¹.

3.14 Análise da esterificação dos ácidos urônicos das plantas transgênicas de tabaco

A esterificação dos ácidos urônicos foi investigada pelo método de dupla redução adaptado por Kim e Carpita (1992) com base nos procedimentos desenvolvidos por Maness e colaboradores (1990) que determina indiretamente o total de unidades de ácidos urônicos esterificados, e Taylor e Conrad (1972), sobre o uso de CMC para ativação do grupo carboxílico.

Para essa análise foram usadas plantas desenvolvidas sob as mesmas condições descritas no item 3.11. Entretanto, antes do isolamento da parede celular, as plântulas congeladas foram tratadas com solventes orgânicos para inativação de pectina metiltransferases prevenindo assim, a clivagem enzimática dos ésteres durante a preparação da parede celular. Para isso, o material suspenso em metanol 100% foi mantido a 50°C por 30 minutos, repetindo-se esse passo mais uma vez antes da incubação com acetona 100% a 50°C por 30 minutos e lavagem com água. O material foi homogeneizado em um sistema de maceração vidro-vidro (Duall Thomas glass). O procedimento seguinte para o isolamento da parede celular foi feito de acordo com os passos descritos no item 3.11.

A parede celular, liofilizada após o isolamento, foi suspensa em 4 mL de água e subdividida em duplicatas de 2 mL. As alíquotas foram distribuídas em frascos de vidro, tipo Becker (50 mL), dispostos em bandeja com gelo e sobre agitadores magnéticos para agitação constante, e 1 mL de acetato de sódio pH 4,6 foi adicionado. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de imidazol 4 M pH 7 gelado, imediatamente após a adição de aproximadamente 300 mg do agente redutor. Em uma das duplicatas adicionou-se NaBH_4 e na outra NaBD_4 . Após uma hora de incubação em gelo sob agitação, o excesso de NaBH(D)_4 foi destruído por acidificação com ácido acético glacial que foi sendo adicionado gradativamente até que a solução parasse de borbulhar. As amostras foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente até a eliminação completa das bolhas. A solução foi transferida para membranas de diálise recém fervidas em água deionizada e deixadas em corrente de água deionizada por aproximadamente 16 horas. As membranas foram então deixadas em água MilliQ, sob agitação constante, por 5 horas.

As misturas dialisadas foram distribuídas em frascos de vidro (50 mL) dispostos sobre agitadores magnéticos para agitação constante e a essas adicionou-se 1 mL de acetato de sódio pH 4,6. Em seguida, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 2 horas, sob agitação constante, após a adição de 250 mg de CMC. Sobre os agitadores foram colocadas bandejas com gelo contendo os frascos, a fim de resfriar a amostra para a realização da segunda redução. Novamente, 0,5 mL de imidazol 4 M pH 7 gelado foi adicionado imediatamente após a adição de aproximadamente 300 mg do agente redutor. Porém, dessa vez, adicionou-se NaBH_4 nas amostras que foram reduzidas anteriormente com NaBD_4 e vice-versa. O excesso de NaBH(D)_4 foi eliminado e as amostras dialisadas por 48 horas. Antes da liofilização, as amostras ficaram sob agitação por 8 horas em água MilliQ.

A parede celular liofilizada foi ressuspensa em 1 mL de TFA 2M e os procedimentos descritos nos itens 3.12 foram seguidos para análise do material por GC-MS.

3.15 Determinação do grupo O-Acetil pelo método de Hestrin

O método de Hestrin (HESTRIN, 1949) se baseia na habilidade que as cadeias ésteres de ácido carboxílico, lactonas e anidridos tem de reagir quantitativamente com hidroxilamida em solução alcalina. O ácido hidroxâmico derivado reage então quantitativamente com cloreto férrico (FeCl_3) produzindo um cromógeno laranja-amarronzado. Para essa análise, a parede celular das plantas foi isolada seguindo-se o procedimento descrito no item 3.14 e liofilizada. Aproximadamente 1 mg da parede celular liofilizada foi ressuspensa em 1 mL de água e usada para a determinação do grupo O-Acetil seguindo a metodologia descrita por Downs e Pigman (1976). Foram adicionados 2 mL de uma solução contendo volumes iguais de hidroxilamina 2 M e hidróxido de sódio 3,5 M em cada triplicata de 1 mg de parede celular cada. Após agitação e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, o pH foi reduzido a aproximadamente 1,2 com 1 mL de HCl 4 M seguido da adição de 1 mL de FeCl_3 . A amostra foi agitada vigorosamente antes da centrifugação por 30 minutos a 5.000 rpm. A leitura de absorbância a 540 nm foi feita tanto para a amostra, assim como, para os padrões preparados com concentrações conhecidas de etilacetato.

3.16 Análise da composição da parede celular secundária das plantas

Para análise da composição da parede celular secundária das plantas de tabaco, um total de quinze plantas transgênicas de cada um de 7 genótipos homozigotos, assim como das linhagens selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG), foi cultivado em casa de vegetação, sob fotoperíodo adequado (16 horas de luz e 8 horas de escuro), até o momento de coleta, após a emissão do botão floral. Os caules, secos em estufa a 40°C por aproximadamente 30 dias, foram separados em porções de cinco caules possibilitando a análise de três repetições por evento. A serragem, obtida após a moagem em moinho tipo Willey, que passou por peneira de malha 40 mesh mas ficou retida em malha 60 mesh, de acordo com a norma ABCP M1 da ABTCP, foi utilizada. Devido a alta higroscopicidade, a serragem obtida foi mantida em estufa a 104°C por 4 horas antes da determinação do peso seco.

A remoção de extrativos solúveis em solventes orgânicos, como ácidos resinosos e graxos, ésteres, ceras, substâncias insaponificáveis e coloridas, foi feita, de acordo com a metodologia TAPPI T 264 om-88 (TAPPI, 1999) adaptada, a partir de porções de 1 g de matéria seca, de cada repetição, em bateria de extração *Soxhlet* através de três etapas: a) solução de tolueno e etanol na proporção 2:1 (v/v) por 4 horas (4 refluxos por hora); b) etanol por 4 horas (4 refluxos por hora); c) banho-maria termostatizado a 95°C por 1 hora. Em seguida, este material foi filtrado em placa porosa obtendo-se então a amostra livre de extrativos.

O material livre de extrativos foi submetido à hidrólise de acordo com a metodologia TAPPI T 249 cm 85 (TAPPI, 1991). Para isso, 300 mg de amostra seca foram transferidos para frascos de vidro de 5 mL, onde adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico 72%, padronizado de acordo com norma TAPPI T 222 om-88 (TAPPI, 1996) ($24 \pm 0,1$ N, densidade $1,6338 \text{ g cm}^{-3}$ à temperatura de 10°C). Em seguida, a amostra foi mantida a 30 °C em banho-maria, por uma hora sob agitação, e homogeneização com bastão de vidro a cada 10 minutos. A amostra foi transferida para frascos de 100 mL juntamente com 84 mL de água deionizada para diluição do ácido para aproximadamente 4%. Após incubação em autoclave a 120 °C por uma hora, as amostras foram esfriadas em gelo durante 10 minutos, antes de serem filtradas em cadinhos de placa porosa. O filtrado obtido, chamado de hidrolisado secundário, foi transferido para balão volumétrico e o volume completado para 1 L com água MilliQ. O resíduo sólido, remanescente nos cadinhos, foi seco em estufa a 104 °C durante 5 horas e pesado para obtenção do teor de lignina Klason (insolúvel).

O hidrolisado secundário foi utilizado tanto para determinação da lignina solúvel, através de leitura da absorbância a 215 e 280 nm em espectrofotômetro, segundo metodologia TAPPI T 259 cm-75 (TAPPI, 1991), quanto para determinação dos monossacarídeos via HPAE-PAD de acordo com Fardim e Duran (2001). Para determinação dos monossacarídeos, 25 µL de cada amostra, assim como, da mistura de padrões contendo L-Arabinose, D-Galactose, D-Glicose, D-Xilose e D-Manose (Sigma®) submetida às mesmas condições da amostra, foram injetados no HPLC ICS 2500 (Dionex) equipado com detector amperométrico ED 50 com eletrodo de ouro, e amostrador automático AS 50. A separação dos monossacarídeos em coluna de troca

aniônica Dionex CarboPac PA10 (2 x 250 mm) com coluna-guarda Dionex CarboPac PA10 (2 x 50 mm), foi efetuada com fluxo de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ de água MilliQ como eluente e pressão de aproximadamente 2.500 psi, e com eluente de pós-coluna de 300 mM de NaOH e pressão 20 psi conferida por gás nitrogênio externo. Para a detecção, o eletrodo de ouro foi ajustado com os seguintes potenciais: +100 mV (0 a 200 ms), +100mV de integração (200 a 400 ms), -2000 mV (410 a 420 ms), +600 mV (430 ms), e -100 mV (440 a 500 ms).

Os ácidos urônicos foram determinados também por HPLC, nas mesmas condições descritas acima. Entretanto, os ácidos urônicos foram separados com um gradiente de 100 mM de NaOH e 150 mM de NaOAc e comparados a uma mistura de padrões contendo ácido D-glucurônico (Sigma®) e ácido D-galacturônico (Fluka®), submetida às mesmas condições da amostra.

3.17 Ferramentas de bioinformática

Alguns procedimentos realizados envolveram o uso de ferramentas de bioinformática apresentadas abaixo.

3.17.1 BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), disponível no *site* do NCBI, foi utilizado para encontrar regiões de similaridade entre sequências de nucleotídeos ou aminoácidos. Foram utilizados especificamente o BLAST N (*Nucleotide Blast*), que confronta uma sequência de nucleotídeos a ser analisada contra as sequências de nucleotídeos disponíveis na base de dados do NCBI, o BLAST X que confronta uma sequência de nucleotídeos contra as sequências de aminoácidos disponíveis na base de dados do NCBI e, o BLAST 2 SEQUENCES (*Pairwise Blast*), que faz a análise comparativa do alinhamento múltiplo de 2 sequências de nucleotídeos ou proteínas (TATUSOVA et al., 1999).

3.17.2 NEBcutter V 1.0

O programa NEBcutter versão 1.0 (VINCZE et al., 2003), disponível no site (<http://tools.neb.com/NEBcutter>) produz uma lista das enzimas de restrição que teoricamente clivam uma determinada sequência de nucleotídeos analisada. Este programa foi utilizado para verificar os sítios de restrição presentes na sequência do gene *np1l* (BEVAN et al., 1983), e na sequência da ORF do gene *uxs* de ervilha, auxiliando a interpretação dos resultados da análise de *Southern blot*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Clonagem do cDNA do gene *uxs* codificador da enzima UDP-glucuronato descarboxilase

A partir da entrada do código enzimático (EC 4.1.1.35) da enzima UDP-glucuronato descarboxilase, na seção de buscas por nucleotídeos, no *site* do NCBI, obteve-se o número de acesso da sequência de nucleotídeos da região codificadora do gene *uxs* de ervilha (*Pisum sativum*), única sequência de plantas disponível na época em que a pesquisa foi realizada.

AB059568 *Pisum sativum* *uxs1* mRNA for UDP-D-glucuronate carboxy-lyase, complete cds
gi|13591616|dbj|AB059568.1|[13591616]

```
>gi|13591615|dbj|AB059568.1| Pisum sativum uxs1 mRNA for
UDP-D-glucuronate carboxy-lyase, complete cds
TATAAATTGATCTCATCACAGTGTTATTAAATCACAAGAGCGGGTAGGGTTTTGGTTTAATCGTTTTTTT
GTTTTTCAATCTCGCGATCAGGAATTGAAAATTTTGGAGGTTCTTGCAATGGCTGCGAATTCCTTCTAATG
GAGATAACCAAAAAACATCTAAGCAACCTCCATTGCCATCTCCCCTGCGTTTCTCCAAATTCCTTCAGTC
TAACATGAGAATCTTGGTTACTGGAGGAGCTGGATTCAATTGGTTCTCACCTTGTCGATAGATTGATGCAA
AATGAAAAGAATGAGGTCATTGTTGCTGATAACTACTTCACTGGATCGAAGGACAACCTCAAAAAATGGA
TTGGTCATCCAAGATTTGAGCTTATCCGTCATGATGTCCTGAGCCTTTGATGATTGAGGTCGATCAGAT
CTACCATCTTGCTTGTCCCGCATCTCCTATTTTCTACAAATATAATCCCGTGAAGACAATCAAGACAAAC
GTGATTGGCACTCTGAACATGCTTGGGCTTGCAAAACGAGTTGGAGCAAGGATTTTGCTTACATCAACTT
CGGAGGTATATGGTGATCCTCTTGAGCATCCTCAACCTGAAACCTATTGGGGCAATGTTAACCCTATTGG
AGTTCGTAGCTGCTATGATGAGGGGAAACGTGTCGCTGAGACTTTGATGTTTGATTATCATAGACAGCAT
GGAATAGAAATACGTGTTGCAAGAATCTTCAACACATATGGGCCGCGCATGAATATCGATGATGGACGTG
TTGTCAGCAACTTCATTGCTCAAGCATTGCGTGATGAATCCTTGACAGTCCAATCTCCAGGAACGCAAAC
TCGCAGTTTTTTGTTATGTCTCTGACCTGGTTGATGGCCTTATCCGTCTCATGGGAGGATCAGACACCGGT
CCAATCAATCTTGGAACCCGGGTGAATTCATCTATGCTTGAACCTTGCTGAGACAGTGAAGGAGCTTATTA
ATCCAAATGTGGAGATAAAGATAGTGGAGAACACTCCTGATGATCCAAGACAGAGAAAGCCAGACATAAC
CAAAGCACAGGAACCTGCTCGGCTGGGAACCAAAGGTCAAGCTGCGCGACGGTCTTCCTCTTATGGAAGGA
GATTTCCGTTTGAGGCTTGGAATTGAGAAGAACAACTAACTTGTTTGAGTTGTTGTTATTACATGTCAAT
AGATAATAAGTGGGATGGATTGCTCTCAGCTTTCATATTTTTTTTACTTTACATAATTATGGTACTGAGG
AAGTTGGGGTGCCATAAATTTTAGCTTCCAAGAGTATCAGAGACGTGCTAGCTCTTTTGTGTTGACAAAAC
ATTACAGCATGTCTGTCCAATTTTTGCTTGTGGAATTATTGAGTTTACATTTATCTAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA
```

Na sequência de nucleotídeos acima, obtida diretamente do *site* do NCBI, estão em destaques o códon iniciador ATG e o códon terminador da tradução TAA. Esses códons delimitam a região codificadora (ORF) do gene *uxs* de 1.401 pares de base (pb), incluindo esses códons. Essa ORF codifica uma sequência de 346 aminoácidos (aa),

apresentada abaixo, identificada no banco de dados do NCBI sob o número de identificação (gi) 13591616. Cada aminoácido está representado por uma letra, de acordo com a nomenclatura e símbolos de padrões internacionais (Anexo AF).

```
>gi|13591616|dbj|BAB40967.1|UDP-D-glucuronate carboxy-lyase
[Pisum sativum]
MAANSSNGDNQKTSKQPPLPSPLRFSKFFQSNMRILVTGGAGFIGSHLVDRMLQNEKNEVIVADNYFTGS
KDNLKKWIGHPRFELIRHDTVTEPLMIEVDQIYHLACPASPIFYKYNPVKTIKTNVIGTLNMLGLAKRVGA
RILLTSTSEVYGDPLEHPQPETYWGNVNPIGVRSCYDEGKRVAETLMFDYHRQHGEIRVARIFNTYGPR
MNIDDGRVVSNFIAQALRDESLTVQSPGTQTRSFCYVSDLVDGLIRLMGGSDTGPINLGNPGEFTMLELA
ETVKELINPNVEIKIVENTPDDPRQRKPDITKAQELLGWEPKVKLRLDGLPLMEGDFRLRLGIEKNN
```

Os *primers* específicos para abranger a ORF do gene *uxs* de ervilha (*primers* ORF*uxs*), foram estabelecidos a partir das primeiras 22 bases incluindo o códon de iniciação ATG para o *primer forward* 5'-**CACCATGGCTGCGAATTCTTCTAATG**-3' e a partir das 25 últimas bases incluindo o códon de terminação para o *primer reverse* 5'-TTAGTTGTTCTTCTCAATTCCAAGC-3'. Uma sequência de direcionamento **CACC** foi adicionada à extremidade 5' do *primer forward* para possibilitar a inserção do produto de amplificação no sentido correto no vetor de clonagem utilizado, que apresenta a tecnologia Gateway® (Invitrogen).

O produto amplificado na reação de RT-PCR, a partir do mRNA de ervilha e os *primers* específicos ORF*uxs*, apresentou altura de banda, em gel de agarose, pouco acima de 1 kb, tamanho semelhante ao da ORF do gene *uxs* (1.041pb). Este produto da reação, correspondente ao cDNA do gene *uxs* de ervilha, foi clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO®, usado na transformação de células competentes de *E. coli* (TOP10). A confirmação da clonagem do cDNA do gene *uxs* de ervilha e transformação das células competentes foi feita através de PCR, a partir de colônias crescidas em meio seletivo. Os produtos de amplificação com os *primers* específicos ORF*uxs* apresentaram novamente tamanho de aproximadamente 1 kb, confirmando assim, que as colônias possuíam o vetor que carrega o cDNA do gene *uxs* de ervilha (1.041 pb). O DNA plasmidial foi extraído dessas colônias e uma fração foi enviada para o sequenciamento. O resultado do sequenciamento do plasmídio recombinante com o *primer* M13 *forward*, apresentado abaixo, foi analisado através dos programas BLAST 2 SEQUENCES e BLAST X. Em destaque estão a sequência de direcionamento CACC e o códon de iniciação ATG.

Clone:	153	atggctgcgaattcttctaattggagataacccaaaaacatctaagcaacctccattgcc	212
ORF:	1	atggctgcgaattcttctaattggagataacccaaaaacatctaagcaacctccattgcc	60
Clone:	213	tctcccctgcgtttctccaaattctttcagtcatacatgagaatcttggttactggagga	272
ORF:	61	tctcccctgcgtttctccaaattctttcagtcatacatgagaatcttggttactggagga	120
Clone:	273	gctggattcattggttctcaccttgctgatagattgatgcaaaatgaaaagaatgaggtc	332
ORF:	121	gctggattcattggttctcaccttgctgatagattgatgcaaaatgaaaagaatgaggtc	180
Clone:	333	attgttgctgataaactacttcactggatcgaaggacaacctcaaaaaatggattgggtcat	392
ORF:	181	attgttgctgataaactacttcactggatcgaaggacaacctcaaaaaatggattgggtcat	240
Clone:	393	ccaagatttgagcttatccgtcatgatgncactgagcctttgatgatngaggncnatna-	451
ORF:	241	ccaagatttgagcttatccgtcatgatgtcactgagcctttgatgattgaggtcgatcag	300
Clone:	452	aacta-catcttgct--gnccgcacnccta-tttcta-aanat-ancccggggaanaca	505
ORF:	301	atctaccatcttgcttgctccgcacatcctattttctacaaatataatcccgtgaagaca	360
Clone:	506	atcaa-anaaacgggnatggccnctgaa-atgcttgggctggcaaa	550
ORF:	361	atcaagacaaacgtgattggcactctgaacatgcttgggcttgcaaa	407

A análise pelo programa BLAST X mostrou a existência de identidade de 114 aa entre a sequência do clone e a sequência de aminoácidos da região codificadora do

gene *uxs* de ervilha (gi 13591616) presente no banco de dados do NCBI, como mostrado abaixo.

Clone	153	MAANSSNGDNQKTSKQPPLPSPLRFSKFFQSNMRILVTGGAGFIGSHLVDRLMQNEKNEV	332
GI	1	MAANSSNGDNQKTSKQPPLPSPLRFSKFFQSNMRILVTGGAGFIGSHLVDRLMQNEKNEV	60
Clone	333	IVADNYFTGSKDNLKKWIGHPRFELIRHDXTEPLMXEXXT--TSCXPHXLFLKXXPGXQ	506
GI	61	IVADNYFTGSKDNLKKWIGHPRFELIRHD TEPLM E +C +F K P	120
Clone	507	-SXKRXPPEMLGLANXWXXKDFXXXXXXE-XGXPL-GPPPEXXWGXXXP	644
GI	121	MLGLA E G PL P PE WG P	169

4.2 Expressão da enzima UDP-glucuronato descarboxilase de ervilha em *E. coli*

Os clones de *E. coli* (DH5 α) transformados com o vetor de expressão pDESTTM17 recombinante, selecionados em ampicilina (100 mg L⁻¹), apresentaram suscetibilidade ao antibiótico cloranfenicol (30 mg L⁻¹), confirmando a clonagem do cDNA do gene *uxs* no vetor Gateway[®]pDESTTM17 e a transformação das células competentes.

A verificação por PCR, de 6 clones de *E. coli* selecionados em ampicilina e cloranfenicol, utilizando-se os *primers* ORF*uxs*, mostrou a presença de um produto de amplificação de aproximadamente 1.041 pb, correspondendo ao tamanho esperado (Figura 9). O DNA plasmidial do vetor recombinante TOPO/*uxs* foi utilizado como controle positivo (C+) na reação de PCR.

Figura 9 - Padrão eletroforético da reação de PCR de 6 clones (1 a 6) de *E. coli* selecionados em ampicilina e cloranfenicol com os *primers* ORF*uxs*. λ = marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); C+ = controle positivo

Um desses clones foi multiplicado para extração de plasmídio que foi enviado para sequenciamento com o *primer forward* específico para o promotor T7, cujo

resultado está apresentado abaixo. Em destaques estão: a sequência Shine-Dalgarno (sublinhado), a sequência da *tag* de 6 histidinas (sombreado) e o códon de iniciação ATG (em negrito).

```
CAAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTCNCTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCTTCCTACCATC
ACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCCTTCACCAT
GGCTGCGAATTCTTCTAATGGAGATAACCAAAAAACATCTAAGCAACCTCCATTGCCATCTCCCCTGCGT
TTCTCCAAATTCTTTCAGTCTAACATGAGAATCTTGTTACTGGAGGAGCTGGATTTCATTGGTTCTCACC
TTGTCGATAGATTGATGCAAAATGAAAAGAATGAGGTCATTGTTGCTGATAACTACTTCACTGGATCGAA
GGACAACCTCAAAAAATGGATTGGTCATCCAAGATTTGAGCTTATCCGTCATGATGTCAGTGGAGCCTTG
ATGATTGAGGTCGATCAGATCTACCATCTTGCTTGTCCTCCGCATCTCCTATTTTCTACAAATATAATCCCG
TGAAGACAATCAAGACAAACGTGATTGGCACTCTGAACATGCTTGGGCTTGCAAAACGAGTTGGAGCAAG
GATTTTGCTTACATCAACTTCGGAGGTATATGGTGATCCTCTTGAGCATCCTCAACCTGAAACCTATTGG
GGCAATGTTAACCCTATTGGAGTTCGTANCTGCTATGATGAGGGGAAACGTGTCGCTGAAACTTTGATGT
TTGATTATCATAGACAGCATGGAATANAAATACGTGTTGCAAGAATCTTCAACACATATGGGCCNCGCAT
GAAATATCGATGATGGACGTGTTGTCNCCAACCTTCATTGCNCAAGCATGGCGNGANGAATCNTTGANAGC
```

A análise pelo programa BLAST 2 SEQUENCES mostrou a existência de identidade de 688 pares de bases (98%) entre a sequência do clone (840 pb) e a sequência da ORF do gene *uxs* de ervilha (1.041 pb). Essa similaridade inicia-se a partir da base 139 da sequência do clone, como mostrado abaixo.

ORF	1	ATGGCTGCGAATTCTTCTAATGGAGATAACCAAAAAACATCTAAGCAACCTCCATTGCCA	60
Clone	139	ATGGCTGCGAATTCTTCTAATGGAGATAACCAAAAAACATCTAAGCAACCTCCATTGCCA	198
ORF	61	TCTCCCCTGCGTTTCTCCAAATTCTTTCAGTCTAACATGAGAATCTTGTTACTGGAGGA	120
Clone	199	TCTCCCCTGCGTTTCTCCAAATTCTTTCAGTCTAACATGAGAATCTTGTTACTGGAGGA	258
ORF	121	GCTGGATTTCATTGGTTCTCACCTTGTGCGATAGATTGATGCAAAATGAAAAGAATGAGGTC	180
Clone	259	GCTGGATTTCATTGGTTCTCACCTTGTGCGATAGATTGATGCAAAATGAAAAGAATGAGGTC	318
ORF	181	ATTGTTGCTGATAACTACTTCACTGGATCGAAGGACAACCTCAAAAAATGGATTGGTCAT	240
Clone	319	ATTGTTGCTGATAACTACTTCACTGGATCGAAGGACAACCTCAAAAAATGGATTGGTCAT	378
ORF	241	CCAAGATTTGAGCTTATCCGTCATGATGTCAGTGGAGCCTTTGATGATTGAGGTCGATCAG	300
Clone	379	CCAAGATTTGAGCTTATCCGTCATGATGTCAGTGGAGCCTTTGATGATTGAGGTCGATCAG	438
ORF	301	ATCTACCATCTTGCTTGTCCTCCGCATCTCCTATTTTCTACAAATATAATCCCGTGAAGACA	360
Clone	439	ATCTACCATCTTGCTTGTCCTCCGCATCTCCTATTTTCTACAAATATAATCCCGTGAAGACA	498
ORF	361	ATCAAGACAAACGTGATTGGCACTCTGAACATGCTTGGGCTTGCAAAACGAGTTGGAGCA	420
Clone	499	ATCAAGACAAACGTGATTGGCACTCTGAACATGCTTGGGCTTGCAAAACGAGTTGGAGCA	558

ORF	421	AGGATTTTGCTTACATCAACTTCGGGGTATATGGTGATCCTCTTGAGCATCCTCAACCT	480
Clone	559	AGGATTTTGCTTACATCAACTTCGGAGGTATATGGTGATCCTCTTGAGCATCCTCAACCT	618
ORF	481	GAAACCTATTGGGGCAATGTTAACCCCTATTGGAGTTCGTAGCTGCTATGATGAGGGGAAA	540
Clone	619	GAAACCTATTGGGGCAATGTTAACCCCTATTGGAGTTCGTANCTGCTATGATGAGGGGAAA	678
ORF	541	CGTGTGCTGAGACTTTGATGTTTGATTATCATAGACAGCATGGAATAGAAATACGTGTT	600
Clone	679	CGTGTGCTGAAACTTTGATGTTTGATTATCATAGACAGCATGGAATANAAATACGTGTT	738
ORF	601	GCAAGAATCTTCAACACATATGGGCCGCGCATG-AATATCGATGATGGACGTGTTGTCAG	659
Clone	739	GCAAGAATCTTCAACACATATGGGCCNCGCATGAAATATCGATGATGGACGTGTTGTCNC	798
ORF	660	CAACTTCATTGCTCAAGCATTGCGTGATGAATCCTTGACAG	700
Clone	799	CAACTTCATTGCNCAAGCATGGCGNGANGAATCNTTGANAG	839

A análise pelo programa BLAST X mostrou a existência de identidade de 209 aa (99%) entre a sequência do clone e a sequência de aminoácidos da região codificadora do gene *uxs* de ervilha (gi 13591616) presente no banco de dados do NCBI, como apresentado abaixo.

Clone:	139	MAANSSNGDNQKTSKQPPLPSPLRFSKFFQSNMRILVTGGAGFIGSHLVDRLMQNEKNEV	318
GI:	1	MAANSSNGDNQKTSKQPPLPSPLRFSKFFQSNMRILVTGGAGFIGSHLVDRLMQNEKNEV	60
Clone:	319	IVADNYFTGSKDNLKKWIGHPRFELIRHDVTEPLMIEVDQIYHLACPASPIFYKYNPVKT	498
GI:	61	IVADNYFTGSKDNLKKWIGHPRFELIRHDVTEPLMIEVDQIYHLACPASPIFYKYNPVKT	120
Clone:	499	IKTNVIGTLNMLGLAKRVGARILLTSTSEVYGDPLEHPQPETYWGNVNPIGVRXCYDEGK	678
GI:	121	IKTNVIGTLNMLGLAKRVGARILLTSTSEVYGDPLEHPQPETYWGNVNPIGVR CYDEGK	180
Clone:	679	RVAETLMFDYHRQHGI XIRVARIFNTYGPRM	771
GI:	181	RVAETLMFDYHRQHGI EIRVARIFNTYGPRM	211

O resultado do sequenciamento desse mesmo clone com o *primer* ORFuxs *reverse* está apresentado abaixo.

CNNCTNACGGAATCTCCTTCCATAAGAGGANCCANCGTCGCGCAGCATTGACCTTTGGTTCTNCCCCGAG
CAGTTCCTGTGCTTTGGTTATGTCTGGCTTTCTCTGTCTTGATCATNAGNGTGTTCTCCACTATCTTT
ATCTCCACATTTGGATTAATAAGCTCCTTCACTGTCTCAGCAAGTTCAAGCATAGTGAATTCACCCGGGT
TTCCAAGATTGATTGGACCGGTGTCTGATCTCCCATGAGACGGATAAGGCCATCAACCAGGTCAGAGACA
TAACAAAACTGCGAGTTTGCCTTCTGGAGATTGGACTGTCAAGGATTCATCACGCAATGCTTGAGCAA
TGAAGTTGCTGACAACACGTCCATCATCGATATTCATGCGCGGCCCATATGTGTTGAAGATTCTTGCAAC
ACGTATTTCTATTCCATGCTGTCTATGATAATCAAACATCAAAGTCTCAGCGACACGTTTCCCCTCATCA

```

TAGCAGCTACGAACTCCAATAGGGTTAACATTGCCCAATAGGTTTCAGGTTGAGGATGCTCAAGAGGAT
CACCANANACCTCCGAAGTTGATGTAAGCAAATCCTTNGCTCCAACCTCGNTTTTGCAAGCCCAAGCATG
TTCANAGTGCCAATCACGNTTGGNCTTGATTGNCTTCACGGGAATTATATTTGNANAAAATAGGAGATGC
NGGACAAGCANAANGGNANANCNGATCCACCNCAATCCACAAANGGNTCNGNGACATCATGACGAANANC
CCAAATTNTGGAAGNACCAANCCATTTTGNNGNNGNCCNTCNANCCANGGAANNNTNTCNNCNACNNG
GACCTCCTTNNTTTC

```

A análise pelo programa BLAST 2 SEQUENCES, apresentado abaixo, mostrou a existência de identidade de 737 pares de bases (93%) entre a sequência do clone (855 pb) e a sequência da ORF do gene *uxs* de ervilha (1.041 pb).

ORF	224	AAAAATGGATTGGTCATCCAAGATTGAGCTTATCCGTCATGATGTCACTGAGCC-TTTG	82
Clone	799	AAAAATGGNTTGGTNCCTCCANAATTTGGGNTNTTCGTCATGATGTCTCNCNGANCCNTTTG	40
ORF	283	ATGATTGAGGTCGATCAGATCTACCATCTTGCTTGTCCCGCATCTCCTATTTTCTACAAA	42
Clone	739	TGGATTGNGGTGGATCNGNTNTNCCNTTNTGCTTGTCCNGCATCTCCTATTTTNTNCAAA	80
ORF	343	TATAAT-CCCGTGAAGACAATCAAGAC-AAACGTGATTGGCACTCTGAACATGCTTGGGC	400
Clone	679	TATAATTCCCGTGAAGNCAATCAAGNCCAANCGTGATTGGCACTNTGAACATGCTTGGGC	620
ORF	401	TTGCAAAA-CGAGTTGGAGC-AAGGATTTTGCTTACATCAACTTCGGAGGTATATGGTGA	458
Clone	619	TTGCAAAANCAGTTGGAGCNAAGGATTTTGCTTACATCAACTTCGGAGGTNTNTGGTGA	560
ORF	459	TCCTCTTGAGCATCCTCAACCTGAAACCTATTGGGGCAATGTTAACCCTATTGGAGTTCG	518
Clone	559	TCCTCTTGAGCATCCTCAACCTGAAACCTATTGGGGCAATGTTAACCCTATTGGAGTTCG	500
ORF	519	TAGCTGCTATGATGAGGGGAAACGTGTCGCTGAGACTTTGATGTTTGATTATCATAGACA	578
Clone	499	TAGCTGCTATGATGAGGGGAAACGTGTCGCTGAGACTTTGATGTTTGATTATCATAGACA	440
ORF	579	GCATGGAATAGAAATACGTGTTGCAAGAATCTTCAACACATATGGGCCGCGCATGAATAT	638
Clone	439	GCATGGAATAGAAATACGTGTTGCAAGAATCTTCAACACATATGGGCCGCGCATGAATAT	380
ORF	639	CGATGATGGACGTGTTGTCAGCAACTTCATTGCTCAAGCATTGCGTGATGAATCCTTGAC	698
Clone	379	CGATGATGGACGTGTTGTCAGCAACTTCATTGCTCAAGCATTGCGTGATGAATCCTTGAC	320
ORF	699	AGTCCAATCTCCAGGAACGCAAACCTCGCAGTTTTTGTATGTCTCTGACCTGGTTGATGG	758
Clone	319	AGTCCAATCTCCAGGAACGCAAACCTCGCAGTTTTTGTATGTCTCTGACCTGGTTGATGG	260
ORF	759	CCTTATCCGTCTCATGGGAGGATCAGACACCGGTCCAATCAATCTTGAAACCCGGGTGA	818
Clone	259	CCTTATCCGTCTCATGGGA-GATCAGACACCGGTCCAATCAATCTTGAAACCCGGGTGA	201
ORF	819	ATTCACTATGCTTGAACCTGCTGAGACAGTGAAGGAGCTTATTAATCCAAATGTGGAGAT	878
Clone	200	ATTCACTATGCTTGAACCTGCTGAGACAGTGAAGGAGCTTATTAATCCAAATGTGGAGAT	141

ORF	879	AAAGATAGTGGAGAACTCCTGATGATCCAAGACAGAGAAAGCCAGACATAACCAAAGC	938
Clone	140	AAAGATAGTGGAGAACACNCCTNATGATCCAAGACAGAGAAAGCCAGACATAACCAAAGC	81
ORF	939	ACAGGAAGTCTCGGCTGGGAACCAAAGGTCAA-GCTGCGCGACGGT-CTTCCTCTTATG	996
Clone	80	ACAGGAAGTCTCGGGNAGAACCAAAGGTCAATGCTGCGCGACGNTGGNTCCTCTTATG	21
ORF	997	GAAGGAGATT	1006
Clone	20	GAAGGAGATT	11

A análise pelo programa BLAST X mostrou a existência de identidade de 118 aa (99%) entre a sequência do clone e a sequência de aminoácidos da região codificadora do gene *uxs* de ervilha (gi 13591616) presente no banco de dados do NCBI, como mostrado abaixo.

Clone	597	RILLTSTSEVXGDPLEHPQPETYWGNVNPIGVRSCYDEGKRVAETLMFDYHRQHGIEIRV	418
		RILLTSTSEV GDPLEHPQPETYWGNVNPIGVRSCYDEGKRVAETLMFDYHRQHGIEIRV	
GI	141	RILLTSTSEVYGDPLEHPQPETYWGNVNPIGVRSCYDEGKRVAETLMFDYHRQHGIEIRV	200
Clone	417	ARIFNTYGPRMNIDDGRVVSNFIAQALRDESLTVQSPGTQTRSFCYVSDLVDGLIRLMG	241
		ARIFNTYGPRMNIDDGRVVSNFIAQALRDESLTVQSPGTQTRSFCYVSDLVDGLIRLMG	
GI	201	ARIFNTYGPRMNIDDGRVVSNFIAQALRDESLTVQSPGTQTRSFCYVSDLVDGLIRLMG	259

Com as sobreposições dos resultados dos sequenciamentos foi possível confirmar a identidade de apenas 260 aa da sequência clonada. Porém, a amplificação do produto de aproximadamente 1.041 pb indica que a sequência clonada está completa.

O plasmídio sequenciado foi utilizado para transformação da linhagem BL21-AITM (Invitrogen) de *E. coli*. Para purificação da proteína recombinante em grandes quantidades, clones selecionados em ampicilina (100 mg L⁻¹) foram analisados por SDS-PAGE para escolha do clone de maior expressão da enzima UDPGlcADC, após a indução por arabinose. A figura 10 apresenta dois géis de poliacrilamida onde foram aplicadas as amostras de proteínas de três clones coletadas nos tempos T₀ (0 hora), T₁ (2 horas), T₂ (4 horas) após adição de L-arabinose, no caso do material induzido.

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS-PAGE das amostras de proteínas de três diferentes clones de *E. coli* BL21-AI™ expressando a proteína UDPGlcADC, após diferentes tempos de exposição a L-arabinose. MW = padrão de peso molecular; T₀, T₁, T₂, correspondem aos diferentes tempos de exposição dos clones a L-arabinose, sendo que em azul estão apresentados os clones não induzidos, e em vermelhos, os clones induzidos

Pela análise por SDS-PAGE foi possível observar um aumento progressivo, nos tempos T₀, T₁ e T₂, da banda na altura de aproximadamente 41 kDa, nas amostras induzidas por L-arabinose. Esse resultado está de acordo com Kobayashi et al. (2002) que obteve um polipeptídeo de 38 kDa. O valor de aproximadamente 41 kDa refere-se, portanto, ao polipeptídeo de 38 kDa acrescido de 2,6 kDa correspondente a *tag* de histidina. Esse resultado mostra que houve a indução da expressão do cDNA do gene *uxs*, sendo que o clone 2 foi considerado o que apresentou maior expressão. Porém, para confirmar que esse polipeptídeo corresponde realmente à proteína UDPGlcADC, este foi isolado do gel e sequenciado. Os peptídeos resultantes do sequenciamento *de novo* por espectrometria de massas foram submetidos à identificação pelo programa Mascot (PERKINS et al., 1999). Os peptídeos identificados estão destacados em vermelho na sequência de aminoácidos da proteína UDPGlcADC de ervilha apresentada abaixo. O resultado completo do programa Mascot está apresentado no Anexo AG. Os resultados obtidos pelo sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas confirmam, portanto, que a proteína de aproximadamente 41 kDa, acumulada após a indução por L-arabinose, corresponde a proteína UDPGlcADC de ervilha.

```
MAANSSNGDNQKTSKQPPLPSPLRFSKFFQSNMRILVTGGAGFIGSHLVDRMLMQNEKNEVIVADNYFTGSK
DNLKKWIGHPRFELIRHDTVTEPLMIEVDQIYHLACPASPIFYKYNPVKTIKTNVIGTLNMLGLAKRVGARI
LLTSTSEVYGDPLEHPQPEYWGNNVPIGVRSCYDEGKRVAETLMFDYHRQHGIERVARIFNTYGPMMNI
DDGRVVSNFIAQALRDESLTVQSPGTQTRSFYVSDLVLDGLIRLMGGSDTGPINLGNPGEFTMLELAETVK
ELINPNVEIKIVENTPDDPRQRKPDITKAQELLGWEPKVKLRDGLPLMEGDFRLRLGIEKNN
```

Uma vez confirmada a identidade da proteína por sequenciamento, foi realizada a indução da expressão da proteína recombinante em grandes quantidades, a partir do clone 2, para sua purificação em condições nativas e, verificação da atividade enzimática. As amostras, induzida e não induzida, foram coletadas 4 horas após a adição de L-arabinose. Pelo gel de poliacrilamida/SDS-PAGE (Figura 11) observa-se o acúmulo da proteína UDPGlcADC no extrato bruto da amostra induzida (2) em relação à amostra não induzida (1). Observa-se também o resultado da purificação da proteína UDPGlcADC (3 e 4).

Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS-PAGE das amostras de proteínas induzida e não induzida por L-arabinose, antes e após a purificação. MW = padrão de peso molecular; 1 = extrato bruto da amostra não induzida; 2 = extrato bruto da amostra induzida; 3 = proteína purificada a partir da amostra não induzida; 4 = proteína purificada a partir da amostra induzida

Para a realização do ensaio enzimático foram utilizados 10 µg de proteínas de cada uma das amostras. Os perfis da separação, por HPLC, dos produtos da reação enzimática estão apresentados na figura 12. Pela análise de HPLC observou-se que a proteína recombinante purificada, assim como a presente no extrato bruto, tanto do material induzido quanto do não induzido, apresentam atividade enzimática, já que em todos os casos houve a conversão do substrato UDP-GlcA em um novo produto, que migrou no HPLC, com o mesmo tempo de retenção do padrão UDP-xilose. A reação controle (C) utilizando água ao invés de amostra de proteína não apresentou pico no tempo de eluição correspondente a UDP-xilose.

Figura 12 - Perfil de eluição dos produtos do ensaio enzimático da proteína recombinante UDPGlcADC. P= perfil de eluição dos padrões UDP-GlcA e UDP-xilose; 1 = extrato bruto da amostra não induzida; 2 = extrato bruto da amostra induzida; 3 = proteína purificada a partir da amostra não induzida; 4 = proteína purificada a partir da amostra induzida; C = controle sem amostra de proteína. Os picos não estão apresentados na mesma escala. Sob as condições de separação utilizadas, o tempo de retenção do UDP-GlcA foi de 108 minutos, enquanto do UDP-xilose foi de 71 minutos

A área dos picos de eluição referentes a UDP-xilose foi utilizada no cálculo da atividade específica da enzima UDPGlcADC, apresentada no gráfico 1.

Gráfico 1 - Atividade específica da enzima UDPGlcADC (Unidade mg⁻¹ proteína). Uma unidade corresponde a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1 μ mol do produto por minuto. 1 = extrato bruto da amostra não induzida; 2 = extrato bruto da amostra induzida; 3 = proteína purificada a partir da amostra não induzida; 4 = proteína purificada a partir da amostra induzida. Os valores representam a média de 3 repetições e as barras, o erro padrão da média

A observação de atividade enzimática no material não induzido se deve a expressão basal da linhagem BL21-AITM (Invitrogen) de *E. coli*, que só é inibida pela adição de glicose ao meio de cultivo, que não foi realizado. A diferença entre o material induzido e o não induzido foi apenas a quantidade de proteína produzida, que foi bem maior no material induzido.

Os resultados apresentados acima confirmam que o cDNA do gene *uxs* de ervilha foi clonado corretamente, sendo, a proteína recombinante enzimaticamente ativa.

4.3 Clonagem do cDNA do gene *uxs* de ervilha no vetor binário Gateway de transformação de plantas

A verificação da clonagem do cDNA do gene *uxs* de ervilha no vetor binário Gateway de transformação de plantas foi realizada através de reações de PCR com cinco clones de *E. coli* crescidos em meio seletivo e utilizando os *primers* ORFuxs. O resultado da reação de PCR revelou a presença de um produto de amplificação, em gel

de agarose, de aproximadamente 1.041pb correspondente ao tamanho esperado (Figura 13). Assim, um desses clones foi multiplicado em meio LB contendo o antibiótico seletivo para extração de plasmídio.

Figura 13 - Padrão eletroforético da reação de PCR com os *primers* ORFuxs de 5 clones (1 a 5) de *E. coli* transformados com o vetor *Gateway* recombinante e selecionados em espectinomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). λ = marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

4.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor binário *Gateway* recombinante

O plasmídio recombinante, purificado a partir de um clone de *E. coli*, foi utilizado para a transformação da linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

A análise dos clones recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* foi feita através de reações de PCR utilizando-se os *primers* ORFuxs. Cinco clones selecionados apresentaram um produto de amplificação de aproximadamente 1.041pb, correspondente ao tamanho esperado. Um dos clones foi armazenado a -80°C em glicerol 15%, para posterior utilização na transformação genética do tabaco.

4.5 Transformação genética do tabaco

Um total de 380 discos foliares de tabaco (Figura 14 a) foi inoculado com uma cultura da linhagem EHA 105 de *A. tumefaciens*, portando o vetor recombinante *Gateway*. Esses discos foram mantidos em meio de cultivo MS (Anexo T) acrescido de vitaminas B5, 1 mg L^{-1} de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de NAA, contendo canamicina (100 mg L^{-1}) para seleção das células vegetais transformadas e cefotaxima (600 mg L^{-1}) para a inibição do desenvolvimento da *A. tumefaciens*. Os discos foliares não inoculados,

cultivados também em meio de cultura seletivo, não formaram calos, evidenciando assim, a eficiência da concentração utilizada (100 mg L^{-1}) do antibiótico canamicina na seleção de células vegetais transformadas. Os brotos (Figura 14 c) provenientes dos calos (Figura 14 b) que se desenvolveram na presença da canamicina (100 mg L^{-1}) foram induzidos ao alongamento, sendo posteriormente, induzidos ao enraizamento. Um total de 31 brotos que enraizaram em canamicina (Figura 14 d) foram transferidos para vasos e aclimatados (Figuras 14 e e 14 f) em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, descritas no item 3.7. Após análise de PCR, as plantas transformadas (Figura 14 g e 14 h) foram transferidas para casa de vegetação, e mantidas sob condições controladas de temperatura e luminosidade, até a produção de sementes.

Figura 14 - a) Discos foliares de tabaco recém inoculados. b) Regeneração em meio de cultura seletivo (canamicina 100 mg L^{-1}) dos discos foliares inoculados à esquerda, e dos discos foliares não inoculados, à direita. c) Broto isolado de calo em meio de alongamento. d) Broto que desenvolveu raízes em meio seletivo (canamicina 25 mg L^{-1}). e) Brotos transferidos para vasos, envoltos por sacos plásticos para assegurar o controle da umidade. f) Os sacos plásticos foram retirados, após uma semana de aclimação. g) Plantas transferidas para casa de vegetação. h) Planta transformada em fase adulta de desenvolvimento

4.6 Análise das plantas de tabaco transformadas via PCR

Das 31 plantas analisadas por PCR, 28 apresentaram um produto de amplificação, com os *primers* específicos para o gene *npII*, de 700 pb, correspondente

ao tamanho esperado. Utilizou-se como controle negativo da reação de PCR, o DNA genômico da linhagem selvagem (WT) de tabaco e, como controle positivo, o DNA plasmidial do vetor *Gateway* recombinante pK7WG2D/*uxs*. A figura abaixo ilustra o padrão eletroforético para 11 plantas transformadas.

Figura 15 - Padrão eletroforético da reação de PCR do DNA genômico de 11 plantas transformadas (1 a 11) com os *primers* específicos para o gene *nptII*. λ = marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen); C- = controle negativo; C+ = controle positivo

4.7 Análise das progênes das plantas transformadas

Sementes (geração T_1) provenientes de autofecundação dos 28 transformantes primários (geração T_0) foram analisadas quanto à segregação para o caráter de resistência à canamicina. Desse total, 15 apresentaram o padrão de segregação mendeliana 3:1 para o gene *nptII*, com 5 % de probabilidade na análise estatística de significância pelo teste do X^2 (Tabela 1).

A figura 15 apresenta a comparação entre plântulas selvagens e plântulas transformadas de tabaco, após 30 dias de cultivo em meio MS (Anexo T) seletivo (canamicina 100 mg L⁻¹). A figura 15 mostra que é possível avaliar-se a eficiência da canamicina na seleção exclusiva das plântulas transformadas, assim como, o melhor momento em que deve ser realizada a análise de segregação. Também, é possível observar o padrão de segregação 3:1 na figura 15 b.

Um total de nove plantas (geração T_1), provenientes de sementes de 9 transformantes que apresentaram o padrão de segregação 3:1, foram cultivadas em casa de vegetação (Figura 16) para produção de sementes (geração T_2) por autofecundação.

Tabela 1 – Padrão de segregação das plantas transgênicas de tabaco da geração T₁. O resist. = número observado de plântulas resistentes; O sens. = número observado de plântulas sensíveis; E resist. = número esperado de plântulas resistentes; E sens. = número esperado de plântulas sensíveis; GL = graus de liberdade. Os valores seguidos de asteriscos são significativos de acordo com o teste χ^2

Planta	O resist.	O sens.	Total	E resist.	E sens.	$\chi^2=3,84(1GL)$
1	186	72	258	193,5	64,5	1,1627*
3	343	46	389	291,75	97,25	36,0111
14	344	44	388	291	97	38,6116
27	360	36	396	297	99	53,4545
44	295	101	396	297	99	0,0538*
64	348	44	392	294	98	39,6734
67	1	299	300	225	75	892,0177
68	380	9	389	291,75	97,25	106,7772
71	226	114	340	255	85	13,1921
73	284	110	394	295,5	98,5	1,7901*
92	223	50	273	204,75	68,25	6,5067
100	255	121	376	282	94	10,3404
105	299	98	397	297,75	99,25	0,0209*
110	302	98	400	300	100	0,0533*
111	281	99	380	285	95	0,2245*
112	292	105	397	297,75	99,25	0,4441*
140	257	104	361	270,75	90,25	2,7931*
E10	261	90	351	263,25	87,75	0,0769*
E41	234	87	321	240,75	80,25	0,7570*
E46	241	37	278	208,5	69,5	20,2637
E64	175	52	227	170,25	56,75	0,5301*
E67	217	66	283	212,25	70,75	0,4252*
E70	271	8	279	209,25	69,75	72,8900
E81	270	8	278	208,5	69,5	72,5611
E100	270	8	278	208,5	69,5	72,5611
E116	190	76	266	199,5	66,5	1,8095*
E120	198	49	247	185,25	61,75	3,5101*
E122	204	75	279	209,25	69,75	0,5268*

Figura 15 – Plântulas de tabaco (geração T₁) após 30 dias de cultivo em meio MS contendo canamicina (100 mg L⁻¹). a) Plântulas selvagens; b) Plântulas transformadas

Figura 16 - Plantas (geração T₁) cultivadas em casa de vegetação. a) Plantas em estágio inicial de desenvolvimento; b) Plantas em desenvolvimento; c) Proteção da inflorescência da planta adulta para autofecundação e obtenção de sementes

As progênes (geração T₂) foram avaliadas novamente quanto à segregação para o caráter de resistência a canamicina e as que não segregaram (Figura 17) foram mantidas para a realização das análises subsequentes. Foram obtidas pelo menos uma planta homozigota para cada um dos genótipos avaliados.

Figura 17 - Plântulas de tabaco da geração T₂ após 30 dias de cultivo em meio MS contendo canamicina (100 mg L⁻¹). a) Plântulas selvagens; b) Plântulas transgênicas homozigotas; c) Plântulas transgênicas segregantes

As linhagens mantidas foram 1H, 44A, 73E, 105A, 110F, 111F, 112A, 140D e E10H. Essas linhagens transgênicas, assim como, a linhagem controle *Gateway* (CG), transformada com o vetor vazio, não apresentam alterações morfológicas aparentes, mudanças no hábito de crescimento ou na fisiologia (Figura 18), quando cultivadas, em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade.

Figura 18 – Plantas adultas das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG), cultivadas em casa de vegetação

A ausência de alterações visuais, como modificações morfológicas e fisiológicas, foi observada também em diversos estudos de genes relacionados à parede celular. Por exemplo, diversos mutantes de *Arabidopsis*, denominados *mur*, apresentam diferentes alterações na composição dos polissacarídeos da parede celular (REITER et al., 1997) e são visualmente indistinguíveis em relação à planta de *Arabidopsis* selvagem. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *uge1*, codificador da enzima UDP-galactose 4-epimerase (EC 5.1.3.2), envolvida na síntese de UDP-D-galactose, açúcar nucleotídeo precursor de AGPs, RG I, RG II e xiloglucano, também não apresentaram modificações visuais. Isso indica que alterações na composição da parede celular podem ser geradas sem comprometer a viabilidade das plantas.

4.8 Southern blot

A análise das plantas homozigotas da geração T₂ pela técnica de *Southern blot* foi realizada com a finalidade de confirmar, tanto a integração estável do transgene ao genoma do material transformado, quanto à presença de diferentes eventos de transformação. Além disso, essa análise permitiu estimar o número de cópias do transgene em cada linhagem. Para a realização do *Southern blot*, o DNA genômico de ervilha e das linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG) foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*. A sequência do gene *np11* (BEVAN et al., 1983) foi utilizada como sonda na hibridização. Pela análise da sequência do gene *np11*, pelo programa NEBcutter versão 1.0 (VINCZE et al., 2003), verificou-se que esta sequência não apresenta sítios de corte para as enzimas de restrição utilizadas (*HindIII* e *EcoRI*).

Pela análise dos resultados do *Southern blot* (Figura 19), observa-se que o DNA da linhagem selvagem de tabaco, assim como, o DNA de ervilha, não apresentaram bandas, enquanto todas as linhagens transgênicas, incluindo o controle *Gateway*, apresentaram uma ou mais bandas, confirmando assim, a inserção do transgene no genoma. Observa-se ainda, que todas as linhagens transgênicas foram originadas de diferentes eventos de transformação, uma vez que o padrão de bandas é diferente em cada linhagem. Quando o DNA foi digerido com a enzima *HindIII*, verificou-se a hibridização de uma única banda em cada um dos genótipos transgênicos, com exceção da linhagem 140D que apresentou duas bandas (entre 6 e 8 kb) (Figura 19 a). Neste caso, pode-se inferir que os genótipos com apenas uma banda, apresentam possivelmente uma única cópia do transgene. Já na análise do DNA digerido com a enzima *EcoRI*, observou-se a presença de três bandas nos genótipos 44A e 140D, e apenas uma banda nos demais. Sendo assim, pode-se inferir que os genótipos 44A e 140D apresentam possivelmente 3 cópias do transgene. Entretanto, como as linhagens transgênicas analisadas foram selecionadas com base na segregação mendeliana do tipo 3:1 (geração T₁) para o caráter de resistência a canamicina, é provável que apenas uma cópia do transgene esteja sendo expressa em cada evento.

Figura 19 – Análise de *Southern blot* das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG) de tabaco e ervilha (*Ps*), utilizando sonda específica para o gene *nptII*. a) DNA genômico digerido com a enzima de restrição *HindIII*. b) DNA genômico digerido com a enzima de restrição *EcoRI*

4.9 Northern blot

A análise por *Northern blot* das plantas homozigotas da geração T₂ foi realizada com a finalidade de verificar o nível de expressão do transgene nas folhas e nos caules das plantas de tabaco transformadas. A sonda específica para o transgene, detecta uma região do terminador 35S, inserido pela transformação genética, que está sob o controle do mesmo promotor do transgene, portanto, sua expressão está diretamente relacionada com a expressão do transgene. A sonda 18S foi utilizada como controle da quantidade de RNA total de cada amostra.

Pela análise do *Northern blot* (Figura 20) observa-se que todas as linhagens transformadas apresentam expressão do transgene nas folhas e nos caules. Entretanto nota-se uma expressão maior nos caules do que nas folhas, apesar do promotor 35S não ser tecido-específico. Resultados semelhantes, sobre a variação da atividade do promotor 35S de acordo com o tecido, foram encontrados, por exemplo, por Coleman et al. (2006). Porém, neste caso, o autor verificou que a abundância de transcritos sob o controle do promotor 2x35S (dois promotores 35S repetidos em tandem) foi maior nas folhas do que nos caules das linhagens transgênicas de tabaco superexpressando o gene UDP-glicose pirofosforilase (UGPase). Observa-se que a sonda específica para o terminador 35S não foi detectada nos controles WT, CG e ervilha. A variação de intensidade do sinal, detectado para a sonda específica para o terminador 35S, parece ser devido à variação na quantidade de RNA total entre as amostras, verificada pela variação do sinal para a sonda 18S.

Figura 20 – Análise de *Northern blot* das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG) de tabaco e ervilha (*Ps*). a) RNA extraído de caule e hibridizado com sonda específica para o terminador 35S. b) RNA extraído de caule e hibridizado com sonda 18S. c) RNA extraído de folha e hibridizado com sonda específica para o terminador 35S. d) RNA extraído de folha e hibridizado com sonda 18S

4.10 Análise do nível de expressão dos transgenes por PCR Semi-Quantitativo (SQ-PCR) e PCR em Tempo Real

O nível de expressão dos transgenes das linhagens transgênicas, assim como, das linhagens selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG), foram investigadas por PCR semi-quantitativo e por PCR em tempo real. Essas análises foram realizadas para uma

verificação mais precisa do nível de expressão do transgene nas plantas de tabaco transformadas.

Figura 21 - Perfil eletroforético das amostras referentes ao produto de PCR das linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG), após 26, 28, 30, 32 e 34 ciclos de amplificação. A = *primers* da actina, T = *primers* do transgene e U = *primers* da ubiquitina. A sequência dos *primers* está apresentada no Anexo AE

Pela análise de SQ-PCR (Figura 21) foi possível observar que todas as linhagens transgênicas, com exceção da 73E, superexpressam o transgene. Isso é notado pela intensidade semelhante entre as bandas referentes ao produto de PCR amplificado com os *primers* específicos para o transgenes e as bandas referentes aos produtos de PCR amplificados com os *primers* constitutivos da actina e ubiquitina. Observa-se ainda, a ausência de bandas referentes ao produto de PCR amplificado com os *primers* específicos para o transgene nas linhagens selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). A linhagem 105A não apresentou produto de amplificação para o *primer* da actina, mas em uma segunda tentativa, sintetizando-se novamente o cDNA, o produto foi observado.

Gráfico 2 - Nível de expressão relativa entre o gene *uxs* de ervilha e de tabaco (endógeno) nas linhagens transgênicas e selvagem

O resultado da análise por PCR em tempo real das plantas transgênicas confirmou a superexpressão do transgene e permitiu uma quantificação relativa da expressão desse em cada linhagem transgênica em relação à linhagem selvagem. Foi possível ainda observar que o transgene apresenta uma expressão muito maior que a expressão do gene *uxs* endógeno de tabaco (Gráfico 2).

4.11 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por FTIR (*Fourier Transform Infrared microspectroscopy*)

Os resultados da análise da parede celular por FTIR das plantas transgênicas de tabaco estão resumidamente mostrados na tabela 2 que apresenta uma coluna referente ao número de variáveis utilizada (PC) e outra coluna referente à porcentagem de espectros corretamente classificados. Foi estabelecido, de forma empírica, que o valor obtido deveria estar acima de 80% para considerar que o genótipo tem um espectrotipo, ou seja, um fenótipo espectroscópico. Na tabela estão em destaque os valores de PC acima de 80%.

Tabela 2 - PCs das linhagens transgênicas e da linhagem controle *Gateway* (CG) em relação à linhagem selvagem (WT) de tabaco.

	WT/1H	WT/44A	WT/73E	WT/105A	WT/110F	WT/111F	WT/112A	WT/140D	WT/E10H	WT/CG
PC1	56	81	62	92	52	84	51	58	56	49
PC2	61	81	65	98	59	85	51	54	72	45
PC3	71	90	71	98	62	84	65	61	71	45
PC4	75	86	74	98	62	85	66	64	75	54
PC5	74	86	74	98	68	91	75	61	70	66

Os componentes principais (PC) são ordenados de acordo com a proporção de variância dos espectros, portanto, quanto menor o número de variáveis usadas para obter uma alta porcentagem de classificação correta mais evidente é o fenótipo. No caso, apenas uma dessas variáveis foi requerida para discriminar a população de espectros entre selvagem e transgênico. A porcentagem de classificação correta reflete a probabilidade de classificar corretamente um indivíduo como selvagem ou transgênico com base somente no espectro infravermelho. Em relação às plantas transgênicas verifica-se que as três linhagens (44A, 105A e 111F) que apresentaram espectrotipos, ou seja, PC score maior que 80%, foram classificadas corretamente como populações distintas do selvagem com apenas o primeiro componente principal (PC) mostrando que essas linhagens apresentam um fenótipo, referente à composição da parede celular, bem evidente.

Pelos resultados obtidos verifica-se ainda, que não é possível classificar os indivíduos selvagens (WT) e transgênicos controle *Gateway* (CG) em populações distintas com base nos espectros, ou seja, essa linhagem (CG) não difere da selvagem, com relação à composição da parede celular. Esse resultado é importante pois mostra que constituintes do vetor de transformação que são inseridos na obtenção das plantas transgênicas, como por exemplo, o gene *npII* de resistência a canamicina, não provocam alterações na composição da parede celular. Dessa maneira, as alterações da parede celular detectadas nas linhagens transgênicas se devem exclusivamente a presença do gene de interesse *uxs*.

As figuras abaixo ilustram as características dos espectros das linhagens transgênicas 44A, 105A e 111F, que apresentaram diferenças na composição da parede celular em relação ao selvagem. As figuras apresentam: (a) resultados da separação das populações de espectros selvagens e transgênicos, (b) o padrão do espectro obtido pelo primeiro componente principal (PC) que apresentou score significativo ($\geq 80\%$), (c) comparação dos espectros médios das duas populações e (d) a subtração digital mostrando as diferenças entre os grupos funcionais das duas populações de espectros.

Figura 22 - a) Separação dos espectros WT e 44A pela análise dos PC. b) Padrão do espectro obtido pelo primeiro PC. c) Comparação dos espectros médios das duas populações. d) Subtração digital mostrando as diferenças entre os grupos funcionais das duas populações de espectros

Figura 23 - a) Separação dos espectros WT e 105A pela análise dos PC. b) Padrão do espectro obtido pelo primeiro PC. c) Comparação dos espectros médios das duas populações. d) Subtração digital mostrando as diferenças entre os grupos funcionais das duas populações de espectros

Figura 24 - a) Separação dos espectros WT e 111F pela análise dos PC. b) Padrão do espectro obtido pelo primeiro PC. c) Comparação dos espectros médios das duas populações. d) Subtração digital mostrando as diferenças entre os grupos funcionais das duas populações de espectros

A separação entre as duas populações, ou seja, selvagem e transgênicas, baseada apenas no espectro infravermelho, pode ser observada nas figuras 22 a, 23 a e 24 a, onde cada ponto representa um espectro infravermelho coletado.

Pela análise dos espectros das linhagens transgênicas é possível verificar que essas linhagens apresentam consistência em relação às alterações da composição da parede celular, pois na comparação dos espectros médios das duas populações (selvagem e transgênica), observam-se diferenças nas mesmas regiões do espectro (Figuras 22 c, 23 c e 24 c).

A subtração digital permitiu verificar quais ligações ou grupos funcionais da parede celular diferem entre as linhagens transgênicas e a selvagem, uma vez que picos específicos no espectro infravermelho podem ser correlacionados com um determinado componente da parede celular. O trabalho de Kačuráková et al. (2000) descreve os picos de absorção no espectro infravermelho de diferentes polissacarídeos da parede celular. Os valores de absorção foram obtidos em polissacarídeos isolados e portanto os picos obtidos a partir de parede celular podem variar ($\pm 4 \text{ cm}^{-1}$) de acordo com as interações moleculares e o ambiente da parede celular. Para a classificação de um determinado componente é necessária a presença de vários picos, por exemplo, os picos 1162, 1120, 1059, 1033, 930 e 898 cm^{-1} estão relacionados à celulose.

Pela subtração digital (Figuras 22 d, 23 d e 24 d), verificam-se diferenças nos mesmos picos de absorção do espectro entre as linhagens transgênicas que apresentaram espectrotipos. Alguns picos como 1053 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} podem indicar alterações em pectina (KAČURÁKOVÁ et al., 2000) e a região entre 1740 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} caracterizam a região de ligações ésteres carboxílica, provavelmente de pectinas esterificadas (MARRY et al., 2000; SENE et al., 1994). Esses picos se encontram na região positiva do gráfico da subtração digital indicando uma redução de pectinas e ligações ésteres carboxílica nas linhagens transgênicas 44A, 105A e 111F.

Dalessandro e Northcote (1977a, 1977b) sugeriram que o controle no fluxo dos açúcares nucleotídeos estaria relacionado com a regulação da síntese dos polissacarídeos, porém esse mecanismo de controle não foi determinado. O estudo realizado por Gu e Bar-Peled (2004) fornece evidências sobre esse tipo de mecanismo de controle. Esses autores verificaram que os açúcares nucleotídeos UDP-xilose e UDP-

arabinose inibem a enzima UDP-glucuronato 4-epimerase, responsável pela epimerização do UDP-GlcA em UDP-GalA, precursor de GalA, o principal resíduo dos polissacarídeos pécticos de plantas. Dessa forma, a inibição da enzima UDP-glucuronato 4-epimerase por UDP-xilose e UDP-arabinose, sugerem que esses açúcares nucleotídeos podem estar envolvidos na regulação da quantidade de UDP-GalA disponível para a biossíntese de pectinas. Esse mecanismo poderia portanto, estar relacionado com as alterações da composição da parede celular referentes à pectina, observadas nas linhagens transgênicas que superexpressam a enzima catalisadora da reação que forma UDP-xilose. Esses resultados evidenciam uma interligação entre os mecanismos envolvidos na biossíntese dos diferentes polissacarídeos da parede celular vegetal.

É interessante ressaltar ainda, que os transgênicos apresentam características espectrotípicas relacionadas àquelas apresentadas pelo mutante de *Arabidopsis* para o gene *uxs2* (At3g62830), codificador da mesma enzima (UDP-glucuronato descarboxilase), em *Arabidopsis*. Esse mutante apresenta, por exemplo, um enriquecimento de ligações metil-éster (<http://cellwall.genomics.purdue.edu>).

Diante desses resultados, as alterações da composição da parede celular das plantas transgênicas foram investigadas também através de análises mais específicas como a esterificação dos ácidos urônicos e a determinação do grupo O-acetil.

4.12 Análise da composição da parede celular primária das plantas transgênicas de tabaco por GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

O conteúdo relativo de cada monossacarídeo em relação ao conteúdo total de monossacarídeos (mol%), das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle Gateway (CG), apresentado nos gráficos abaixo (Figura 25), referem-se a amostras de folhas coletadas de plantas adultas, maceradas em etanol 80% e secas em liofilizador.

Os resultados da composição dos açúcares da parede celular mostram alterações nas proporções de monossacarídeos (Figura 25). Porém, não há uma consistência dessas modificações entre as linhagens transgênicas. Observa-se, por exemplo, que algumas linhagens apresentaram aumento de xilose, em relação à planta selvagem

(5,17% e 3,95% para as linhagens 73E e 111F, respectivamente), enquanto outras tiveram redução desse açúcar (2,92% para a linhagem 1H). Entre as alterações mais acentuadas em relação à planta selvagem, estão os aumentos de 2,35 % de arabinose e 3,95% de xilose na linhagem 111F; redução de 3,5% de ramnose e 4,09% de arabinose na linhagem 44A; aumento de 2,88% de ramnose, 5,17% de xilose e redução de 7,85% de galactose para a linhagem 73E; aumento de 8,92 % e 10,16% de galactose nas linhagens 1H e E10H, respectivamente.

Figura 25 – Gráficos referentes ao conteúdo relativo dos monossacarídeos (mol%) das linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). a) Mol % de ramnose. b) Mol % de xilose. c) Mol % de arabinose. d) Mol % de manose. e) Mol % de galactose. As barras representam duplicatas. Os dados da linhagem transgênica 44A referem-se a apenas uma repetição

Na figura 26 estão apresentados os gráficos do conteúdo relativo de cada monossacarídeo em relação ao conteúdo total de monossacarídeos (mol%), referentes

às plântulas de duas semanas de idade (desprovidas de raiz) das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG).

Comparando os resultados do conteúdo relativo de monossacarídeos obtidos a partir de folhas coletadas de plantas adultas e os obtidos a partir de plântulas, observa-se basicamente uma inversão nos conteúdos de xilose e galactose. No caso das folhas, o conteúdo de xilose observado foi ao redor de 20% enquanto o conteúdo de galactose foi de 30-40%. Já, nas plântulas, observa-se o conteúdo de xilose entre 35-45% e o de galactose em torno de 15%.

Figura 26 – Gráficos referentes ao conteúdo relativo dos monossacarídeos (mol%) das linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). a) Mol % de ramnose. b) Mol % de xilose. c) Mol % de arabinose. d) Mol % de manose. e) Mol % de galactose. Os valores representam a média de 3 repetições e as barras, o erro padrão da média

A glicose não foi incluída nos cálculos do conteúdo relativo de monossacarídeos, porque uma parte das moléculas de glicose na amostra pode ter origem do amido e não

da parede celular. Dessa forma, a omissão da glicose nos cálculos reduz a chance de incluir erros na proporção dos outros monossacarídeos.

Os resultados revelam que as diferenças no conteúdo relativo dos monossacarídeos, embora existentes, não são altamente expressivas, sugerindo que a rota metabólica envolvida na biossíntese de monossacarídeos é extremamente complexa e que a alteração da produção de uma única enzima nesta rota pode não aumentar a produção do produto final. No caso deste trabalho, era esperado um aumento na proporção de xilose, uma vez que a enzima superexpressa é responsável pela produção de seu açúcar nucleotídeo precursor, UDP-D-xilose. Dörmann e Benning (1998) observaram que tanto a superexpressão quanto a repressão do gene codificador da enzima UDP-galactose 4-epimerase (EC 5.1.3.2), responsável pela síntese de UDP-D-galactose, não alteraram a composição da parede celular. Da mesma forma, Coleman e colaboradores (2006) observaram que a co-superexpressão dos genes responsáveis pela codificação de UDP-D-glucose pirofosforilase (EC 2.7.7.9) e sacarose sintase (SuSy, EC 2.4.1.13), envolvidos na produção de UDP-D-glicose não promoveram aumento na porcentagem de celulose em plantas transgênicas de tabaco como esperado. Outro fator que pode estar envolvido na ausência de um aumento na produção do produto final, é a regulação da enzima superexpressa, UDPGlcADC, por *feedback*. Por esse tipo de regulação, o produto final inibe a atividade da enzima envolvida na sua produção. Nesse caso, o acúmulo de UDP-D-xilose estaria influenciando sua produção pela inibição tanto da enzima UDPGlcADC, quanto da enzima UDP-D-glicose desidrogenase (UGD, EC 1.1.1.22), responsável pela produção do substrato da UDPGlcADC.

4.13 Determinação de celulose por método colorimétrico

O gráfico abaixo (Figura 27) apresenta a porcentagem de celulose em relação à quantidade de parede celular das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). Esses resultados se referem às amostras de folhas coletadas de plantas adultas, maceradas em etanol 80% e secas em liofilizador.

Figura 27 – Gráfico da porcentagem de celulose por miligrama de parede celular (PC) das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG)

Apesar da variação que existe entre as duplicatas, é possível observar diferenças, embora não relevantes, no conteúdo de celulose em todas as linhagens transgênicas.

O conteúdo de celulose de plântulas de duas semanas de idade (desprovidas de raiz) também foi verificado, porém não foram notadas alterações expressivas.

4.14 Análise da esterificação dos ácidos urônicos das plantas transgênicas de tabaco

A esterificação dos ácidos urônicos, investigada pelo método de dupla redução, foi feita a partir de plântulas com 15 dias de idade. A figura 28 apresenta os gráficos do conteúdo relativo dos monossacarídeos da parede celular (mol%) das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG), obtida pelo GC-MS, juntamente com a análise da esterificação.

Pelos gráficos, é possível observar que não há diferenças entre as linhagens transgênicas e a selvagem em relação à composição de monossacarídeos da parede celular. A diferença na proporção dos monossacarídeos em relação a análise anterior (item 4.12) se deve ao aumento da porcentagem da galactose devido à metodologia de dupla redução. Além disso, foi observado por Marry et al. (2000) que a proporção de manose, glicose e xilose diferem quando se compara os dados obtidos a partir de parede celular tratada com metanol antes do isolamento e parede celular não tratada.

Figura 28 - Gráficos do conteúdo relativo dos monossacarídeos (mol%) da parede celular das linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG)

O gráfico abaixo (Figura 29) refere-se ao grau de esterificação dos ácidos urônicos (%) e a porcentagem de galactose não esterificada dos ácidos urônicos, nas linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). O grau de esterificação foi obtido a partir da razão entre o número de resíduos de GalA esterificados e o número total de resíduos de GalA. A razão foi multiplicada por 100 para obtenção do valor em porcentagem.

Figura 29 - Gráfico da porcentagem de esterificação e porcentagem de galactose não esterificada dos ácidos urônicos, nas linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG)

Esses resultados mostram diferenças na proporção de galactose não esterificada entre algumas linhagens transgênicas em relação à selvagem. As linhagens que apresentaram diferenças mais expressivas foram a 44A com aumento de 3,01% de galactose não esterificada, a linhagem 105A com aumento de 3,13%, e a linhagem 111F, com aumento de 5,12%, em relação à selvagem. É interessante ressaltar que essas linhagens são também aquelas que apresentaram espectrotipos na análise por FTIR, cujo resultado apontou uma redução das ligações ésteres carboxílicas.

4.15. Determinação do grupo O-Acetil pelo método de Hestrin

Pelo gráfico 3, observam-se as porcentagens de acetilação da parede celular linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). Os resultados obtidos revelam que aparentemente não houve alteração na acetilação da parede celular, apesar dos valores apresentarem variações entre repetições.

É importante considerar que centenas de genes são requeridos para a síntese dos polissacarídeos componentes da parede celular e portanto, os métodos utilizados neste estudo, como por exemplo, o método de Hestrin para verificação da acetilação, ou até mesmo as metodologias utilizadas para a quantificação dos monossacarídeos, podem não ser suficientemente sensíveis para detectar as possíveis alterações provocadas pela

modificação de um único gene envolvido nesse metabolismo, no caso a superexpressão do cDNA do gene *uxs*. Além disso, assumindo que muitas enzimas diferentes são responsáveis por modificações complexas dos polissacarídeos da parede celular, a intervenção em um gene pode levar a mudanças tão pequenas na composição da parede celular que se torna extremamente difícil sua detecção. Nesse caso, somente metodologias com alta sensibilidade, como o FTIR, podem detectar mudanças relativamente sutis consequentes da alteração da expressão de genes como o *uxs*, que está inserido em uma via metabólica extremamente complexa, como o metabolismo de biossíntese dos polissacarídeos da parede celular vegetal.

Gráfico 3 - Porcentagem de acetilação da parede celular das linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). Os valores representam a média de 3 repetições e as barras, o erro padrão da média

4.16 Análise da composição da parede celular secundária

Para a análise da composição da parede celular secundária, foram utilizados caules secos de plantas adultas das linhagens transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). A quantificação dos componentes da parede celular foi determinada por HPLC e espectrofotometria. Os resultados estão apresentados na tabela 3 e incluem a determinação do conteúdo dos monossacarídeos, lignina e ácidos urônicos.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste de comparação de médias Dunnett com 5% de probabilidade. A comparação entre as

médias obtidas na determinação do conteúdo dos monossacarídeos, lignina e ácidos urônicos para a linhagem selvagem (WT) e para a linhagem controle *Gateway* (CG), não apresentaram diferenças significativas, portanto, a linhagem controle *Gateway* (CG) foi utilizada como testemunha nas comparações com as linhagens transgênicas.

Tabela 3 - Composição química da parede celular de caules das linhagens de tabaco transgênicas, selvagem (WT) e controle *Gateway* (CG). Os valores estão expressos em mg g⁻¹ de matéria seca

	WT	CG	44A	73E	105A	110F	111F	112A
Arabinose	15,241	13,852	13,919	14,811	15,339	13,898	14,453	13,000
Rhaminose	10,198	9,705	10,965	12,371	10,686	9,782	9,290	10,131
Galactose	9,775	8,336	9,961	8,631	11,027	10,955	8,267	9,128
Glicose	558,714	543,602	548,965	550,969	557,708	562,874	559,143	548,919
Xilose	134,193	133,903	136,366	128,994	133,274	139,247	135,072	126,781
Manose	25,733	24,812	27,282	24,255	27,158	29,205*	27,354	26,180
Lignina Solúvel	26,323	23,773	30,147*	31,130*	28,647	26,113	26,183	29,910*
Lignina Insolúvel	166,181	168,627	160,480	154,487	163,900	163,047	175,310	158,033
Ácido galacturônico	78,23	77,86	78,48	91,02	82,28	78,82	81,22	82,26
Ácido glucurônico	1,73	1,94	1,42	1,83	1,82	1,96	1,77	1,77

Os resultados do teste estatístico revelam a existência de diferença significativa, a 5% de probabilidade, no conteúdo de lignina solúvel nas linhagens transgênicas 44A, 73E e 112A. Essas linhagens apresentaram um aumento no conteúdo de lignina solúvel e, apesar de não apresentarem diferenças significativas, essas linhagens apresentaram também uma redução no conteúdo de lignina insolúvel. Essa mudança na solubilidade da lignina pode ser muito interessante para a indústria de papel e celulose, pois possibilita a retirada de maior quantidade de lignina no processo de obtenção da pasta celulósica. O teste estatístico mostrou ainda, que a linhagem transgênica 110F apresenta diferença significativa, a 5% de probabilidade, no conteúdo de manose.

Pelos resultados apresentados observa-se que não houve alteração significativa nos conteúdos dos monossacarídeos, lignina insolúvel e ácidos urônicos.

5 CONCLUSÕES

— A análise de FTIR da parede celular primária, mostrou que três linhagens transgênicas apresentaram espectrotipos consistentes, indicando uma redução de pectinas e ligações ésteres carboxílica nessas linhagens transgênicas.

— Foram observadas diferenças na proporção de galactose não esterificada, nas linhagens que apresentaram espectrotipo.

— Não foram detectadas alterações na proporção dos monossacarídeos ramnose, xilose, arabinose, manose e galactose, e na quantidade de celulose, na parede celular primária das plantas transgênicas.

— Com relação à parede celular secundária, observou-se que algumas linhagens transgênicas apresentaram maior concentração de lignina solúvel relacionada a uma redução no conteúdo de lignina insolúvel.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. E LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

AMOR, Y; HAIGLER, C.H.; JOHNSON, S.; WAINSCOTT, M.; DELMER, D.P. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 9353-9357, 1995.

ANKEL, H.; FEINGOLD, D.S. Biosynthesis of uridine diphosphate D-xylose I. Uridine diphosphate glucuronate carboxy-lyase of wheat germ. **Biochemistry**, Washington, v. 4, p. 2468-2475, 1965.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA TÉCNICA DE CELULOSE E PAPEL. **ABCP M1**: Normas técnicas. São Paulo: 1974, Não paginado.

BAKER, M.E.; BLASCO, R. Expansion of the mammalian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/plant dihydroflavonol reductase superfamily to include a bacterial cholesterol dehydrogenase, a bacterial UDP-galactose-4-epimerase, and open reading frames in vaccinia virus and fish lymphocystis disease virus. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 301. p. 89-93, 1992.

BAR-PELED, M.; GRIFFITH, C.L.; DOERING, T.L. Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 21, p. 12003-8, 2001.

BELLAMACINA, C.R. The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 10, p. 1257-1269, 1996.

BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.226, n.3, p.735-745, 1992.

BERNARD, P.; KEZDY, K.E.; MELDEREN, L.V., STEYAERT, J.; WYNS, L.; PATO, M.L.; HIGGINS, P.N. COUTURIER, M. The F Plasmid CcdB Protein Induces Efficient ATP-dependent DNA Cleavage by Gyrase. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.234, n.3, p.534-541, 1993.

BEVAN, M.W.; FLAVELL, R.B.; CHILTON, M.D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, London, v. 304, p. 184-187, 1983.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, Edmond, v. 72, p. 51-56, 1992.

BINDSCHEDLER, L.V.; WHEATLEY, E.; GAY, E.; COLE, J.; COTTAGE, A.; BOLWELL, P. Characterization and expression of the pathway from UDP-glucose to UDP-xylose in differentiating tobacco tissue. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, p. 285-301, 2005.

BIRBOIM, H.C.; DOYLE, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, p. 1513, 1979.

BLAKENEY, A.B.; HARRIS, P.J.; HENRY, R.J.; STONE, B.A. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 113, p. 291- 299, 1983.

BLEE, K.A.; WHEATLEY, E.R.; BONHAM, V.A.; MITCHELL, G.P.; ROBERTSON, D.; SLABAS, A.R.; BURRELL, M.M.; WOJTASZEK, P.; BOLWELL, P. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. **Planta**, Berlin, v. 212, p. 404-415, 2001.

BOLWELL, P.G. Biosynthesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, Ibaraki-ken, v. 12, n. 65, p. 143-160, 2000.

BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends in plant science**, Kidlington, v. 3, p. 67-71, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 141-156, 2000.

BUSH, G.L.; Tassin, A.M.; Friden, H.; Meyer, D.I. Secretion in yeast: purification and *in vitro* translocation of chemical amounts of prepro- α -factor. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 13811–13814, 1991.

CARNEIRO, R.T.; CARVALHO, M.C.C.G.; CALDAS, D.G.G.; SALVATIERRA, G.R.; FRANCESCHINI, L.M.; ANDRADE, A.; CELEDON, P.A.F.; ODA, S.; LABATE, C.A. SAGE transcript profiling of *Eucalyptus grandis*: A dynamic view of wood formation, from seedlings to 6-year-old trees. **New Phytologist**, London, (submitted), 2006.

CARPITA N.C.; SHEA, E.M. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In BIERMANN, C.J.; MacGINNIS, G.D. (Eds.) **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Boca Raton: CRC Press, 1989, p. 157-216.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.C.; McCANN, M. The Cell Wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. chap. 2, p. 52-108.

CARPITA, N.C.; TIERNEY, M.; CAMPBELL, M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 1-5, 2001.

CHEN, L.; CARPITA, N.C.; REITER, W-D.; WILSON, R.H.; JEFFRIES, C.; McCANN, M.C. A rapid method to screen for cell wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 375-382, 1998.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v. 6, p. 850-861, 2005.

DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Changes in enzymic activities of nucleoside diphosphate sugar interconversions during differentiation of cambium to xylem in sycamore and poplar. **The Biochemical Journal**, London, v. 162, p.267-279, 1977b.

DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Possible control sites of polysaccharides synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.). **Planta**, Berlin, v. 134, p. 39-44, 1977a.

DEROLES, S.C.; GARDNER, R.G. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 355-364, 1988.

DÖRMANN, P.; BENNING, C. The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 641-652, 1998.

DOWNS, F.; PIGMAN, W. Determination of O-Acetyl groups by the Hestrin method. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 7, p. 241-243, 1976.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v.12, p.13-15, 1987.

DUBOIS, N.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

FARDIM, P.; DURÁN, N. Wood and pulp carbohydrates analysis using HPLC and electrochemical detection. **Chemistry Preprint Archive**, Zurich, v. 2001, n. 7, p. 158-163. 2001.

FRY, S.C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of the wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, London, v. 161, p. 641-675, 2004.

GIERTZ, H.W. Cellulosa 8ch Paper, **SPC Review**, Sockholm, v. 417p.1908-1948, 1948.

GODDIJN, O.J.M.; LINDSEY, K.; VAN DER LEE, F.M.; KLAP, J.C.; SIJMONS, P.C. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-*gusA* fusion constructs. **The Plant Journal**, Oxford, v.4, n.5, p.863-873, 1993.

GOLLING, G.; AMSTERDAM, A.; SUN, Z.; ANTONELLI, M.; MALDONADO, E.; CHEN, W.; BURGESS, S.; HALDI, M.; ARTZT, K.; FARRINGTON, S.; LIN, S. Y.; NISSEN, R.M.; HOPKINS, N. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. **Nature Genetics**, New York, v. 31, n. 2, p. 135-140, 2002.

GRODBERG, J.; DUNN, J.J. *ompT* Encodes the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease that Cleaves T7 RNA Polymerase During Purification. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 170, n. 3, p. 1245-1253, 1988.

GU, X.; BAR-PELED, M. The Biosynthesis of UDP-Galacturonic Acid in Plants. Functional cloning and Characterization of Arabidopsis UDP-D-Glucuronic Acid 4-Epimerase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, p. 4256-4264, 2004.

HAMES, B.D.; HIGGINS, S. J. **Gene Probes 1: A practical approach**. New York: IRL Press, 1995. 284 p.

HARPER, A.D.; BAR-PELED, M. Biosynthesis of UDP-Xylose. Cloning and Characterization of a Novel Arabidopsis Gene Family, *UXS*, Encoding Soluble and Putative Membrane-Bound UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase Isoforms. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 2188-2198, 2002.

HARTLEY, L.; TEMPLE, G.F.; BRASCH, M.A. DNA cloning using *in vitro* Site-Specific recombination. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, p. 1788-1795, 2000.

HELLENS, R.P.; EDWARDS, E.A.; LEYLAND, N.R.; BEANS, S.; MULLINEAUX, P.M. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, n. 6, p. 819-832, 2000.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 180, p. 249-261, 1949.

HINTERBERG, B.; KLOS, C. TENHAKEN, R. Recombinant UDP-glucose dehydrogenase from soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 1011-1017, 2002.

HOOD, E.E.; HELMER, G.L.; FRALEY, R.T.; CHILTON, M.D. The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 Is Encoded in a Region of pTiBo542 Outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 168, n. 3, p. 1291-1301, 1986.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICH HOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, Washington, v. 227, n. 4691, p. 1229-1231, 1985.

HWANG, H.Y.; HORVITZ, H.R. The SQV-1 UDP-glucuronic acid decarboxylase and the SQV-7 nucleotide-sugar transporter may act in the Golgi apparatus to affect *Caenorhabditis elegans* vulval morphogenesis and embryonic development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 22, p. 14218-14223, 2002.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEL, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea Mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, 1996.

JONH, K.V.; SCHUTZBACH, J.S.; ANKEL, H. Separation and allosteric properties of two forms of UDP-glucuronate carboxy-lyase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 252, p. 8013-8017, 1977.

KAČURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 43, p. 195-203, 2000.

KARIMI, M., INZE, D., DEPICKER, A., Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002.

KEMSLEY, E.K. In: **Discriminant Analysis and Class Modeling of Spectroscopic Data**. Chichester UK: John Wiley and Sons. 1998. 124 p.

KIM, J.B.; CARPITA, N.C. Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, p. 646-653, 1992.

KOBAYASHI, M.; NAKAGAWA, H.; SUDA, I.; MIYAGAWA, I.; MATOH, T. Purification and cDNA Cloning of UDP-D-Glucuronate Carboxy-lyase (UDP-D-xylose Synthase) from Pea Seedlings. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 43, p. 1259-1265, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 58, p. 913-949, 1989.

LILLEY, G. Survey number 007. **Gene Pulser Eletroprotocol**, BIO-RAD, 1993.

LIMA, D.U.; OLIVEIRA, R.C.; BUCKERIDGE, M.S. Seed storage hemicelluloses at wet-end additives in papermaking. **Carbohydrate Polymers**, London, v.52, p. 367-373, 2002.

LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M.W. mio-Inositol: Its biosynthesis and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 34, p. 137-161, 1983.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. mio-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, Shannon, v. 150, p. 1-19, 2000.

MANESS, N.O.; RYAN, J.D.; MORT, A.J. Determination of the degree of methyl esterification of pectins in small samples by selective reduction of esterified galacturonic acid to galactose. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v 185, p. 346-352, 1990.

MARRY, M.; McCANN, M.C.; KOLPAK, F.; WHITE, A.R.; STACEY, N.J.; ROBERTS, K. Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 17-28, 2000.

McCANN, M.C.; WELLS, B.; ROBERTS, K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. **Journal of Cell Science**, London, v. 96, p. 323-334, 1990.

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.53, p. 625-663, 1984.

MELLEROWICZ, E.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 239-274, 2001.

MØLHØJ, M.; VERMA, R.; REITER, W.D. The biosynthesis of the branched-chain sugar D-apiose in plants: functional cloning and characterization of a UDP-D-apiose/ UDP-D-xilose synthase from *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v.23, p. 693-703, 2003.

MORIARTY, J.L.; HURT, K.J.; RESNICK, A.C.; STORM, P.B.; LAROY, W.; SCHNAAR, R.L.; SNYDER, S.H. UDP-glucuronate Decarboxylase, a Key Enzyme in Proteoglycan Synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.277, n. 19, p. 16968-16975, 2002.

MURASHIGE, T.E; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-497, 1962.

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

OGDEN, S.; HAGGERTY, D.; STONER, C.M.; KOLODRUBETZ, D.; SCHLEIF, R. The *Escherichia coli* L-Arabinose Operon: Binding Sites of the Regulatory Proteins and a Mechanism of Positive and Negative Regulation. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 6, p. 3346-3350, 1980.

OKA, T. JIGAMI, Y. Reconstruction of *de novo* pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 273, p. 2645-2657, 2006.

PATTATHIL, S.; HARPER, A.D.; BAR-PELED, M. Biosynthesis os UDP-xylose: characterization of membrane-bound At Uxs2. **Planta**, Berlin, v.221, p. 538-548, 2005.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood Formation in Trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, p. 1513-1523, 2001.

REITER, W.D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 536-542, 2002.

REITER, W.D.; CHAPPLE, C.; SOMERVILLE, C.R. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 335-345, 1997.

REITER, W.D.; VANZIN, G.F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 95-113, 2001.

ROBERTS, R.M.; LOEWUS, F.A. The conversion of D-glucose-6-[¹⁴C] to cell wall polysaccharide material in *Zea mays* in the presence of high endogenous levels of myo-inositol. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 52, p. 646-650, 1973.

ROSENBERG, A.H.; LADE, B.N.; CHUI, D.-S.; LIN, S.-W.; DUNN, J.J.; STUDIER, F.W. Vectors for Selective Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. **Gene**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 125-135, 1987.

RUBERY, P.H. The activity of uridine diphosphate-D-glucose:nicotinamide-adenine dinucleotide oxidoreductase in cambial tissue and differentiating xylem isolated from sycamore trees. **Planta**, Berlin, v. 103, p. 188-192, 1972.

SALZMAN, R.A.; FUJITA, T.; ZHU-SOLZMAN, K.; HASEGAWA, P.M.; VERNON, R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 17, n. 1, p. 11-17, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 765p.

SCHLEIF, R.S. DNA Looping. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 61, p. 199-223, 1992.

SCHUTZBACH, J.S.; FEINGOLD, D.S. Biosynthesis of uridine diphosphate D-xylose IV. Mechanism of action of uridine diphosphoglucuronate carboxy-lyase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 245, p. 2476-2482, 1970.

SEIFERT, G.J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v 7, p. 277-284, 2004.

SEITZ, B.; KLOS, C.; WURM, M.; TENHAKEN, R. Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 537-546, 2000.

SENE, C.; McCANN, M. C.; WILSON, R. H.; GRINTER, R. Fourier Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (An Investigation of Five Higher Plant Cell Wall and Their components). **Plant Physiology**, Lancaster, v 106, p. 1623-1631, 1994.

STUDIER, F.W.; MOFFATT, B.A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 189, n. 1, p. 113-130, 1986.

STUDIER, F.W.; ROSENBREG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned genes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 185, p. 60-89, 1990.

SUZUKI, K.; WATANABE, K.; MASUMURA, T.; KITAMURA, S. Characterization of soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase (OsUXS) isoforms in rice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 431, p. 169-177, 2004.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão. In: _____ **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p.339-364.

TATUSOVA T.A.; MADDEN, T.L. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 174, p. 247-250, 1999.

TAYLOR R.L.; CONRAD, H.E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, Washington, v. 11, p 1383-1388, 1972.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test Method T 249 cm-85**: Carbohydrate Composition of Extractive-free Wood and Wood Pulp by Gas-liquid Chromatography. Atlanta, 1991.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test Method T 259 cm-75**: Species identification of nonwood plant fibers. Atlanta, 1991.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test Method T 222 om-88**: Acid insoluble lignin wood and pulp. Atlanta, 1996.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test Method T 264 om-88**: Preparation wood for chemical analysis. Atlanta, 1999.

USADEL, B.; SCLÜTER, U.; MØLHØJ, M.; GIPMANS, M.; VERMA, R.; KOSSMANN, J.; REITER, W.D.; PAULY, M. Identification and characterization of a UDP-D-glucuronate 4-epimerase in *Arabidopsis*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 569, p. 327-331, 2004.

VERMA, D.C.; DOUGALL, D.K. Biosynthesis of *myo*-inositol and its role as a precursor of cell-wall polysaccharides in suspension cultures of wild-carrot cells. **Planta**, Berlin, v. 146, p. 55-62, 1979.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 13, p. 3688-3691, 2003.

WATT, G.; LEOFF, C.; HARPER, A.D.; BAR-PELED, M. A Bifunctional 3,5 epimerase/4-keto reductase for nucleotide-rhamnose synthesis in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, p. 1337-1346, 2004.

WHEATLEY, E.R.; DAVIES, D.R.; BOLWELL, G.P. Characterisation and immunolocation of an 87kDa polypeptide associated with UDP-glucuronic acid decarboxylase activity from differentiating tobacco cells (*Nicotiana tabacum* L.). **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, p. 771-780, 2002.

WIERENGA, R.K. TERPSTRA, P.; HOL, W.G.J. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta-alpha beta fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.187, p. 101-107, 1986.

WITT, H.J. UDP-glucose metabolism during differentiation and dedifferentiation of *Riella helicophylla*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p. 276-281, 1992.

ZHANG, Q.; SHIRLEY, N.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G.B. Characterization Expression Patterns of UDP-D-Glucuronate Decarboxylase genes in Barley. | **Physiology**, Lancaster, v.138, p. 131-141, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Tampão de Extração de RNA (SALZMAN et al., 1999)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Tiocianato de Guanidina	4 M
Tris-HCl pH 8,0	100 mM
Citrato de Sódio pH 8,0	25 mM
N-lauril sarcosina	0,5%
*PVP solúvel	1%
*2-mercaptoetanol	0,2%
H ₂ O DEPC 0,1%	q.s.p. volume final

(* Adicionado na hora do uso)

ANEXO B - Tampão de corrida de RNA (SAMBROOK et al., 1989)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
MOPS 10x (Anexo U)	1,5 µL
Formaldeído 37%	3,0 µL
Formamida deionizada	7,5 µL
Tampão Dye III	2,0 µL
Brometo de etídeo	1,0 µL
RNA	5,0 µg

ANEXO C - TAE 1X (SAMBROOK et al., 1989)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Tris	4,84 g
Ácido acético glacial	1,142 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	2 mL
Água	q.s.p. 1 L

ANEXO D - Tampão de ligação (*Binding Buffer*) (conforme protocolo *Dynabeads[®] mRNA Purification kit* – Dynal)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
LiCl	1 M
EDTA	2 mM
Água MilliQ tratada com DEPC	q.s.p. volume final
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	

ANEXO E - Tampão de lavagem B (*Washing Buffer B*) (conforme protocolo *Dynabeads[®] mRNA Purification kit* – Dynal)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
LiCl	0,15 M
EDTA	1 mM
Água MilliQ tratada com DEPC	q.s.p. volume final
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	

ANEXO F - Tampão TBE 0,5X (SAMBROOK et al., 1989)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Tris	5,4 g
Ácido bórico	2,75 g
EDTA pH 8.0	2 mL
Água MilliQ	q.s.p. 1 L

ANEXO G - Tampão da amostra *Dye IV* (SAMBROOK et al., 1989)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Sacarose	40%
Azul de bromofenol	0,25%
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. volume final

ANEXO H - Meio de cultura SOC

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Bacto Triptona	2% (p/v)
Bacto extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂ *	10 mM
MgSO ₄ *	10 mM
Glicose*	20 mM
Água MilliQ	q.s.p. volume final
pH ajustado para 7; esterilização por autoclavagem	

* Preparados à parte, esterilizados por filtração (Millipore 0,2 µm) e adicionados após autoclavagem.

ANEXO I - Meio de cultura LB (Luria-Bertani)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Bacto triptona	1% (p/v)
Bacto extrato de levedura	0,5%
NaCl	0,5%
Ágar bacteriológico (para meio sólido)	1,5%
Água MilliQ	q.s.p. volume final
pH ajustado para 7; esterilização por autoclavagem	

ANEXO J - Tampões P1, P2 e P3 (Conforme protocolo do *Plasmid Mini kit* da QIAGEN)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
<u>Tampão P1</u>	
Tris	50 mM
EDTA	10 mM
Água MilliQ	q.s.p. volume final
pH ajustado para 8 com HCl	
RNase (adicionada após autoclavagem)	100 µg mL ⁻¹
<u>Tampão P2</u>	
NaOH	200 mM
SDS	1% (p/v)
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. volume final
<u>Tampão P3</u>	
Acetato de potássio	3 M
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. volume final
pH ajustado para 5,5 e filtragem (Millipore 0,2 µm)	

ANEXO L - Solução QBT (Conforme protocolo do *Plasmid Mini Kit* da QIAGEN)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
pH ajustado para 7	
Isopropanol puro	15% (v/v)
Triton [®] X-100	0,15% (v/v)
Água MilliQ	q.s.p. volume final

 Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)

 ANEXO M - Solução QC (conforme protocolo do *Plasmid Mini kit* da QIAGEN)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	1 M
MOPS	50 mM
pH ajustado para 7	
Isopropanol puro	15% (v/v)
Água MilliQ	q.s.p. volume final
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	

 ANEXO N - Solução QF (Conforme protocolo do *Plasmid Mini Kit* da QIAGEN)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	1,25 M
Tris	50 mM
pH ajustado para 8,5 com HCl	
Isopropanol puro	15% (v/v)
Água MilliQ	q.s.p. volume final
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	

 ANEXO O - Tampão 1X SDS-PAGE

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Tris-HCl pH 6,8	62,8 mM
Glicerol (100%)	10%
SDS	2%
β-mercaptoetanol	2%
Azul de Bromofenol	0,1%
Água MilliQ	q.s.p. volume final

 ANEXO P - Gel de Poliacrilamida (LAEMMLI, 1970)

<i>Componentes</i>	<i>Tipo de Gel</i>	
	<i>Runnig 12%</i>	<i>Stacking 4%</i>
Acrilamida/Bis (30%/2,67%)	40%	13%
Tris-HCl pH 8,0	375 mM	-
Tris-HCl pH 6,8	-	125 mM

Persulfato de amônio	0,05%	0,05%
TEMED	0,05%	0,1%
Água MilliQ	q.s.p. vol. final	q.s.p. vol. final

Tampões de corrida

<u>Superior - pH 8,3</u>	<u>Inferior - pH 8,3</u>
25 mM Tris	25 mM Tris
192 mM Glicina	192 mM Glicina
0,1 % SDS	-

ANEXO Q - Solução de descoloração

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Ácido acético	7,5%
Metanol	10%
Água MilliQ	q.s.p. 3L

ANEXO R - Tampão de extração e lavagem TALON™

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Água MilliQ	q.s.p. 30 mL

ANEXO S - Meio de cultura AB (ISHIDA et al., 1996)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
<u>Estoque de Tampão</u>	
K ₂ HPO ₄	60 g
NaH ₂ PO ₄	20 g
Água MilliQ	q.s.p. 1 L
pH ajustado para 6,6	
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	
<u>Estoque de Sais</u>	
NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6 g
KCl	3 g
CaCl ₂	0,2 g

FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
Água MilliQ	q.s.p. 1 L

Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)

Obs.: Para preparo de 1 L de meio AB, adicionou-se 5 g de glicose (e 10 g de ágar bacteriológico, em meios sólidos) à 900 mL de água destilada e, após autoclaveagem, acrescentou-se 50 mL L⁻¹ de Tampão e 50 mL L⁻¹ de Sais, em fluxo laminar

ANEXO T - Meio de cultura de plantas, composto por sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e vitaminas B5

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
<u>Macronutrientes</u>	
NH ₄ NO ₃	1,65 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44 g
KNO ₃	1,90 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37 g
KH ₂ PO ₄	0,17 g
<u>Fe-EDTA</u>	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,0413 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0278 g
Agitação sob aquecimento até atingir cor amarela intensa	
<u>Micronutrientes</u>	
H ₃ BO ₃	6,20 mg
MnSO ₄ .1H ₂ O	16,9 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60 mg
KI	0,83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg
Sacarose	20 g
Ágar (em meios sólidos)	0,8%
Água	q.s.p. 1 L
pH ajustado para 5,7 e esterilização por autoclaveagem	

<u>Vitaminas</u>	
Ácido nicotínico	0,50 mg
Piridoxina-HCl	0,50 mg
Tiamina-HCl	0,10 mg
D-Ca-Pantotenato	0,10 mg
Água	q.s.p. 1 L
Esterilização por filtragem (Millipore 0,2 µm) e adição após autoclavagem do meio	

ANEXO U - Tampão de extração de DNA - método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	1,4 M
Tris-HCl pH 8	100 mM
EDTA pH 8	20 mM
*PVP-40	1%
*CTAB	2%
2-mercaptoetanol	0,4%
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. volume final

(*Adicionado no momento do uso)

ANEXO V - Solução 20X SSC (conforme protocolo *Hybond* da Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	3 M
Citrato de Sódio	0,3 M
Água MilliQ	q.s.p. volume final
pH ajustado para 7 e esterilização por autoclavagem	

Obs: As soluções 5X SSC, 1X SSC e 0,5X SSC foram preparadas a partir da diluição da solução 20X SSC em Água MilliQ autoclavada

ANEXO X - Solução de hibridização (*Southern blot*) (conforme protocolo do *kit Gene ImagesTM random prime labelling module* - Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Dextran sulfato de sódio	5% (p/v)
Agente bloqueador de marcação (<i>kit</i>)	1 mL
SDS	0,1% (p/v)

Solução 5 X SSC	q.s.p. 20 mL
-----------------	--------------

ANEXO Z - Tampão A (conforme protocolo do *kit Gene Images CDP-Star detection module* - Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	100 mM
Tris-HCl	300 mM
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. volume final
pH ajustado para 9,5	

ANEXO AA - MOPS 10X (HAMES e HIGGINS, 1995)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
MOPS	0,2 M
Acetato de sódio	0,05 M
EDTA pH 7	0,01 M
Água MilliQ	q.s.p. volume final
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	

Obs: A solução 1X MOPS foi preparada a partir da diluição da solução 10X MOPS em Água MilliQ autoclavada

ANEXO AB - Solução de hibridização (*Northern blot*) (conforme protocolo do *kit Gene Images™ AlkPhos Direct Labelling and Detection System* - Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	0,5 M
Agente bloqueador (<i>kit</i>)	4% (p/v)
Tampão de hibridização (<i>kit</i>)	q.s.p. volume final

ANEXO AC - Solução de Lavagem I (*Northern blot*) (conforme protocolo do *kit Gene Images™ AlkPhos Direct Labelling and Detection System* - Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Uréia	2 M
Agente bloqueador (<i>kit</i>)	0,2% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
Fosfato de sódio pH 7	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1 mM

Água MilliQ	q.s.p. volume final
-------------	---------------------

ANEXO AD - Solução de Lavagem II (*Northern blot*) (conforme protocolo do *kit Gene Images™ AlkPhos Direct Labelling and Detection System* - Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Tris	50 mM
NaCl	100 mM
*MgCl ₂	2 mM
Água MilliQ	q.s.p. volume final

(*Adicionado no momento do uso)

ANEXO AE - Sequências e descrições dos *primers* utilizados nas reações de PCR

<i>Nome</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Descrição</i>
ActinTab-Left	CAGTGGCCGTACAACAGGTA	Específico para o gene constitutivo da actina de tabaco
ActinTab-Right	CTGCAGCTTCCATTCCAA	
UbiquitinTab-Left	AGACATTGACTGGGAAGACCA	Específico para o gene constitutivo da ubiquitina de tabaco
UbiquitinTab-Right	GAGACGGAGGACAAGGTGAC	
UxsErv-Left	GCTGCGAATTCTTCTAATGGA	Específico para o transgene (cDNA do gene <i>uxs</i> de ervilha)
UxsErv-Right	GAGGTTGTCCTTCGATCCAG	
UxsTab1-Left	TGACAAATTGATGGARAATGAGA	Específico para o gene <i>uxs</i> endógeno de tabaco
UxsTab1-Rigth	MGGGCAWGCAAGRTGATAAA	

Nota: Em negrito estão em destaque as bases degeneradas usadas para anelar em diferentes genes constituintes da mesma família.

ANEXO AF - Nomenclatura e simbolismo para aminoácidos recomendado pela IUPAC e IUB

Código IUPAC de uma e de três letras para os aminoácidos					
<i>Códigos</i>	<i>Resíduo</i>		<i>Códigos</i>	<i>Resíduo</i>	
A	Ala	alanina	P	Pro	prolina
B	Asx	aspartato ou asparagina	Q	Gln	glutamina
C	Cys	cisteína	R	Arg	arginina
D	Asp	aspartato	S	Ser	serina
E	Glu	glutamato	T	Thr	treonina

F	Phe	fenilalanina	U		selenocisteína
G	Gly	glicina	V	Val	valina
H	His	histidina	W	Trp	triptofano
I	Ile	isoleucina	X	Xaa	desconhecido
K	Lys	lisina	Y	Tyr	tirosina
L	Leu	leucina	Z	Glx	glutamato ou glutamina
M	Met	metionina	*		fim de tradução
N	Asn	asparagina	-		Intervalo comprimento indeterminado

Nomenclatura IUB de bases em seqüências de ácidos nucleicos

<i>Código</i>	<i>Significado</i>	<i>Código</i>	<i>Significado</i>
A	adenina (A)	M	amino (A ou C)
C	citosa (C)	S	forte (G ou C)
G	guanina (G)	W	fraco (A ou T)
T	timina (T)	B	G ou T ou C
U	uracila (U)	D	G ou A ou T
R	purina (G ou A)	H	A ou C ou T
Y	pirimidina (T ou C)	V	G ou C ou A
K	ceto (G ou T)	N	qualquer base (A, G, C ou T)
-	intervalo(s)		

ANEXO AG. Resultado completo da análise pelo programa Mascot dos peptídeos sequenciados

Mascot Search Results

Protein View

Match to: **Q9AV98_PEA** Score: **206** Expect: **5.2e-15**

UDP-D-glucuronate carboxy-lyase (EC 4.1.1.35).- Pisum sativum (Garden pea).

Nominal mass (M_r): **38887**; Calculated pI value: **6.68**

NCBI BLAST search of [Q9AV98_PEA](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Pisum sativum](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[BAB40967](#) from [Pisum sativum](#)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **13**

Number of mass values matched: **13**

Sequence Coverage: **38%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAANSSNGDN QKTSK**QPPL SPLRFSKFFQ SNMRILVTGG AGFIGSHLVD**
 51 **RLMQNEKNEV IVADNYFTGS** KDNLKKWIGH PR**FELIR**HDV TEPLMIEVDQ
 101 IYHLACPASP IFYKYNPVKT IK**TNVIGTLN MLGLAK**RVGA RILLTSTSEV
 151 YGDPLEHPQP ETYWGNVNPI GVRSCYDEGK RVAETLMFDY HRQHGIEIRV
 201 AR**IFNTYGPR** MNIDDGR**VVS NFIAQALR**DE SLTVQSPGTQ TRSFCYVSDL
 251 VDGLIR**LMGG SDTGPINLGN** PGEFTMLELA **ETVKELINPN VEIK**IVENTP
 301 DDPQRKPKDI TKAQELLGWE PKVKLR**DGLP LMEGDFRLRL** GIEKNN

Show predicted peptides also

Sort Peptides By

Residue Number

Increasing Mass

Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss Sequence
16 - 24	1003.5480	1003.5480	1003.5815	-0.0335	0 K.QPPLPSPLR.F
28 - 34	928.4380	928.4380	928.4225	0.0155	0 K.FFQSNMR.I
35 - 51	1710.8770	1710.8770	1710.9416	-0.0646	0 R.ILVTTGGAGFIGSHLVDR.L
35 - 51	1710.9540	1710.9540	1710.9416	0.0124	0 R.ILVTTGGAGFIGSHLVDR.L
58 - 71	1555.7520	1555.7520	1555.7518	0.0002	0 K.NEVIVADNYFTGSK.D
83 - 87	676.3960	676.3960	676.3908	0.0052	0 R.FELIR.H
123 - 136	1443.7500	1443.7500	1443.8119	-0.0619	0 K.TNVIGTLNMLGLAK.R
203 - 210	966.5100	966.5100	966.4923	0.0177	0 R.IFNTYGPR.M
218 - 228	1216.6920	1216.6920	1216.6927	-0.0007	0 R.VVSNFIAQALR.D
218 - 228	1216.6760	1216.6760	1216.6927	-0.0167	0 R.VVSNFIAQALR.D
257 - 284	2890.4560	2890.4560	2890.4091	0.0469	0 R.LMGGS D TGPINLGNPGEFTMLELAETVK.E
285 - 294	1167.5740	1167.5740	1167.6499	-0.0759	0 K.ELINPNVEIK.I
327 - 337	1248.6120	1248.6120	1248.5808	0.0312	0 R.DGLPLMEGDFRL.L

>P1;Q9AV98_PEA

UDP-D-glucuronate carboxy-lyase (EC 4.1.1.35).- Pisum sativum (Garden pea).

C;Species Q9AV98_PEA: Pisum sativum (Garden pea).

C;Species BAB40967: Pisum sativum

C;Family: Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids I; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Viciae; Pisum.

C;Accession: Q9AV98;

C;Gene name: Name=uxs1;

C;Reference [1]

C;NUCLEOTIDE SEQUENCE.

C;MEDLINE=22350278; PubMed=12461125; DOI=10.1093/pcp/pcf157;

R;Kobayashi M., Nakagawa H., Suda I., Miyagawa I., Matoh T.;

Plant Cell Physiol. 43:1259-1265(2002).

C;01-JUN-2001 (TrEMBLrel. 17, Created)
C;01-JUN-2001 (TrEMBLrel. 17, Last sequence update)
C;01-OCT-2003 (TrEMBLrel. 25, Last annotation update)
C;EMBL; AB059568; BAB40967.1; -; mRNA.
C;GO; GO:0016853; F:isomerase activity; IEA.
C;GO; GO:0016829; F:lyase activity; IEA.
C;GO; GO:0048040; F:UDP-glucuronate decarboxylase activity; IEA.
C;GO; GO:0005975; P:carbohydrate metabolism; IEA.
C;GO; GO:0009225; P:nucleotide-sugar metabolism; IEA.
C;InterPro; IPR001509; Epimerase_Dh.
C;Pfam; PF01370; Epimerase; 1.
C;Keywords: Lyase.
C;SRCDB TREMBL
C;IDN_GENBANK BAB40967;