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

**Modulação do gene *ugp* e análise das alterações na composição
dos carboidratos da parede celular primária e secundária
de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis***

Gunta Gutmanis

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

Piracicaba

2008

Gunta Gutmanis

Bióloga

**Modulação do gene *ugp* e análise das alterações na composição
dos carboidratos da parede celular primária e secundária
de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis***

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

2008

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

Gutmanis, Guntā

Modulação do gene *ugp* e análise das alterações na composição dos carboidratos da parede celular primária e secundária de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* / Guntā Gutmanis. - - Piracicaba, 2008.
142 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Carboidratos – Composição 2. Eucalipto 3. Fumo 4. Melhoramento genético vegetal 5. Parede celular vegetal 6. Polissacarídeos I. Título

CDD 633.71

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus queridos filhos, Liane e André, e à minha irmã Daina,
meus tesouros, que sempre me apoiaram em todos os sentidos, com
muito amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela oportunidade, orientação e confiança em mim depositada;

À Dra. Mônica Teresa Veneziano Labate, pela orientação, paciência e bom-humor;

À Dra. Daniela Defávares-Nascimento e à Dra. Ana Letícia F. Bertolo, pela amizade e cooperação no grupo de trabalho;

Ao MSc. Juliano Bragatto, pelas análises químicas das plantas;

Ao Eduardo “Zzé” Camargo, pela alegre companhia na redação desta tese;

Aos amigos que encontrei no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Alexander de Andrade, Daniele Bononi, Danielle Gomes, David Moon, Ednilson Rabello, Érika Silva, Esteban González, Felipe Marques, Fernanda Salvato, Gabriela Conti, Gisele Boneli, Guillermo Salvatierra, Ivan Mozol, Matheus Bonatto, Lília Barbosa, Livia Franceschini, Felipe Boaretto, Maria Inez Faraldo, Juliana Rodrigues, Mayra de Carvalho, Paola Celedón, Raphael Carneiro, Raqueline Cordeiro, Renata Clegario, Simone Bragatto e Thiago Leite, pela agradável convivência;

Aos meus amigos Mica, pela energia positiva, e Tuto, por tudo;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular - CENA/USP, pelo seqüenciamento de DNA;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa de estudo para a realização deste trabalho;

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP), pelo auxílio financeiro à execução desse projeto;

À Suzano Papel e Celulose, pelo suporte técnico e financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O eucalipto.....	19
2.2 Formação da madeira.....	23
2.3 Parede celular vegetal.....	23
2.4 Componentes químicos da parede celular	26
2.5 Biossíntese dos componentes da parede celular	28
2.6 Enzima UDP-glucose pirofosforilase	32
2.7 Clonagem do gene/ cDNA <i>ugp</i>	35
2.8 Regulação da expressão do gene <i>ugp</i> em plantas	36
2.9 Superexpressão ou repressão do gene <i>ugp</i> em plantas	37
2.10 Modulação dos outros genes envolvidos na biossíntese de componentes da parede celular	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Organograma de execução do trabalho	42
3.2 Clonagem do cDNA codificador da enzima UGPase.....	43
3.2.1 Definição dos primers que abrangem a ORF de <i>ugp</i> de <i>E. grandis</i>	45
3.2.2 Extração de RNA.....	46
3.2.3 Quantificação de RNA total	47
3.2.4 Purificação de mRNA a partir do RNA total.....	47
3.2.5 Reação de RT-PCR para síntese do cDNA de <i>ugp</i>	48
3.3 Clonagem do cDNA no vetor pENTR/D–TOPO® e transformação química de células competentes de <i>E. coli</i>	49
3.3.1 Análise por PCR dos prováveis clones transformantes	51
3.3.2 Extração de DNA plasmidial.....	51

3.3.3 Sequenciamento de DNA no vetor TOPO [®] recombinante.....	52
3.3.4 Análise do sequenciamento de DNA.....	52
3.4 Análise da expressão dos cDNA clonados em <i>E. coli</i>	53
3.4.1 Clonagem do gene <i>ugp</i> no vetor pDEST [™] 17	54
3.4.2 Transformação da linhagem BL21-AI [™] de <i>E. coli</i>	55
3.4.3 Expressão da enzima UGPase em <i>E. coli</i>	55
3.4.4 Digestão <i>in gel</i> e sequenciamento da enzima UGPase.....	56
3.5 Clonagem no vetor binário Gateway de transformação de plantas	58
3.6 Transformação genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com o vetor binário Gateway recombinante	59
3.6.1 Purificação do plasmídeo pK7WG2D/ <i>ugp</i> pelo método Miniprep	59
3.6.2 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> com o plasmídeo pK7WG2D/ <i>ugp</i> purificado	60
3.7 Transformação genética de plantas de tabaco	60
3.8 Seleção por PCR de plantas transformadas	61
3.8.1 Extração de DNA genômico.....	62
3.8.2 Análise via PCR	63
3.9 Obtenção da geração T ₁ e T ₂ de plantas de tabaco e análises de segregação	63
3.10 Transformação genética de eucalipto	64
3.10.1 Regeneração de plantas de eucalipto transformadas	65
3.10.2 Extração do DNA genômico de eucalipto e análise por PCR	65
3.10.3 Análise molecular das plantas transgênicas de tabaco e eucalipto por <i>Southern blot</i>	66
3.11 Quantificação da expressão gênica pela análise de PCR Quantitativa.....	69
3.12 Análise química dos componentes da parede celular primária em plântulas de tabaco e em folhas de eucalipto.....	73
3.13 Análise química dos componentes da parede celular primária da medula caular	76
3.14 Análise química dos componentes da parede celular secundária do xilema caular	78
3.15 Avaliação morfológica das plantas de tabaco transgênicas.....	79
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1 Produção da enzima UGPase recombinante de batata em <i>E. coli</i>	81
4.1.1 Transformação e indução da enzima UGPase em <i>E. coli</i>	81
4.1.2 Sequenciamento da enzima UGPase recombinante purificada	87

4.2 Clonagem do cDNA do <i>ugp</i> no vetor binário e transformação genética de tabaco	87
4.2.1 Seleção por PCR de plantas de tabaco transformadas	89
4.2.2 Obtenção da geração T ₁ das linhagens transgênicas de tabaco e análise genética quanto ao padrão de segregação	90
4.2.3 Obtenção da geração T ₂ das linhagens de tabaco transgênicas e análise do padrão de segregação	91
4.3 Análise molecular das plantas transgênicas de tabaco	93
4.3.1 Análise de <i>Southern blot</i>	93
4.3.2 Análise por PCR Quantitativa	95
4.4 Análise química das plantas transgênicas de tabaco	97
4.4.1 Análise química da parede celular primária em plântulas	97
4.4.2 Análise química da parede celular primária na medula caulinar	97
4.4.3 Análise química da parede celular secundária no xilema caulinar	98
4.5 Avaliação morfológica das plantas de tabaco transgênicas	103
4.6 Clonagem do cDNA codificador da enzima UGPase de eucalipto	106
4.6.1 Verificação da presença do gene <i>ugp</i> em eucalipto através de <i>Southern blot</i>	106
4.6.2 Definição dos primers que abrangem a ORF de <i>ugp</i> de eucalipto	107
4.6.3 Síntese do cDNA do <i>ugp</i> de eucalipto	112
4.7 Clonagem do cDNA do gene <i>ugp</i> no vetor binário e transformação genética de plantas de eucalipto	113
4.7.1 Avaliação das plantas de eucalipto transformadas por PCR	113
4.8 Análise de <i>Southern blot</i> das plantas transgênicas de eucalipto	114
4.9 Análise química dos componentes da parede celular de folhas de eucalipto transgênico	114
4.10 Comparação entre os diferentes materiais analisados quimicamente	116
5 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
ANEXOS	135

RESUMO

Modulação do gene *ugp* e análise das alterações na composição dos carboidratos da parede celular primária e secundária de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis*

A associação de tecnologias como transgenia, genômica e proteômica aos programas de melhoramento convencional de árvores, pode acelerar o processo de obtenção de exemplares com características específicas da madeira para a indústria de papel e celulose. A parede celular vegetal é extremamente importante para este setor industrial, pois fornece polissacarídeos como celulose e hemiceluloses. A UDP-glucose pirofosforilase (UGPase, EC 2.7.7.9) é uma enzima chave na produção de UDP-glucose, precursor relevante na interconversão de nucleotídeo-açúcares que constituem os monômeros desses polissacarídeos. O objetivo deste trabalho foi clonar os cDNAs que codificam a UGPase, extraídos do tubérculo de batata (*Solanum tuberosum* L.) e da raiz de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), e inseri-los por meio de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente, no genoma de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e de eucalipto, para alterar o fluxo de carbono de modo a aumentar o conteúdo de pentosanas (xilose e arabinose). O maior teor de pentosanas é benéfico economicamente para a indústria de papel e celulose, pois diminui a energia consumida no refino da polpa além de beneficiar a qualidade do papel que se torna mais resistente ao rasgo. O impacto da superexpressão do gene *ugp* nas plantas de tabaco e de eucalipto obtidas da transformação genética, foi avaliado por meio de análises bioquímicas e morfológicas. A análise de *Southern blot* indicou uma a quatro cópias do transgene no DNA genômico de dez linhagens T₂ de tabaco, e uma cópia em uma linhagem T₀ de eucalipto. A análise de qPCR mostrou que todas as linhagens T₂ de tabaco apresentaram expressão do gene *ugp* exógeno, sendo que em quatro o nível de expressão foi maior que nas demais. As linhagens com menor expressão do gene *ugp* exógeno, com exceção de uma delas, também expressaram menos o gene *ugp* endógeno, sugerindo que nessas linhagens algum mecanismo de regulação atuou alterando a expressão desse gene, tanto endógeno, quanto exógeno. As linhagens transgênicas de tabaco foram morfolologicamente semelhantes às plantas controle quando comparadas quanto à altura da planta, comprimento de internós, área foliar total, diâmetro do caule e massa seca da raiz. As alterações nos tabacos transgênicos, em relação aos controles, verificadas através das análises químicas, foram estatisticamente mais significativas na medula caulinar, onde houve aumento no conteúdo dos monossacarídeos e dos ácidos urônicos. As poucas diferenças encontradas no tecido xilemático sugerem que a planta, de alguma forma, tende a alterar menos a composição da parede celular secundária, do que da parede primária. Também sugerem que o metabolismo dos carboidratos pode afetar o conteúdo de lignina, embora seja sintetizada por outra rota metabólica. A parede celular primária, analisada utilizando a medula das plantas de tabaco e folhas de eucalipto, mostrou um aumento no conteúdo de pentosanas, o que não foi observado na análise de plântulas de tabaco.

Palavras-chave: Eucalipto; Parede celular; Polissacarídeos; Hemiceluloses; UGPase.

ABSTRACT

Modulation of *ugp* gene and analysis of the changes in carbohydrates composition of the *Nicotiana tabacum* and *Eucalyptus grandis* primary and secondary cell wall

Associating technologies like transgenesis, genomics and proteomics with conventional forestry breeding can accelerate the process of obtaining new trees with specific wood properties for the paper and pulp industry. Plant cell wall is extremely important for this industry, providing polysaccharides like cellulose and hemicelluloses. UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase, EC 2.7.7.9) is a key enzyme producing UDP-glucose, an important forerunner for nucleotide sugars that constitute the monomers of these polysaccharides. The goal in this work was to clone the cDNAs that encode UGPase, extracted from potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber, and eucalypt (*Eucalyptus grandis*) root, and transfer through genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens*, respectively, in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and eucalypts, in order to change the carbon flux, increasing the pentosans (arabinose and xylose) content. Higher pentosans content is economically important for the paper and pulp industry, as decreases energy consumption at pulp refining and also can benefit paper quality that becomes more resistant to rip. The impact of the *ugp* gene overexpression over tobacco and eucalypt plants obtained through genetic transformation were morphological and biochemically evaluated. *Southern blot* analysis showed one to four copies of the transgene in the genomic DNA of ten tobacco T₂ lines, and one copy in one eucalypt T₀ line. The qPCR analysis showed that all tobacco T₂ lines expressed exogenous *ugp* gene, being the expression level in four of them bigger than the others. Lines that expressed less exogenous *ugp* gene, with exception of one of them, equally had less endogenous *ugp* gene expression level, suggesting that in these lines, some kind of regulation acted changing the gene expression. The transgenic tobacco lines were morphologically similar to the control plants when compared for total height, internode length, total leaf area, stem diameter and root dry mass. Alterations in transgenics tobacco plants, in relation to controls, checked by chemical analysis, were statistically more significant in the pith, where the monosaccharides and uronic acids contents increased. The few differences founded in the xilematic tissue suggest that the plant, somehow, tends to change less the secondary cell wall composition than the primary wall. They also suggest that the carbohydrate metabolism can affect lignin content, though it's synthesized in another metabolic pathway. The primary cell wall, evaluated using tobacco plants pith and eucalypt leaves, showed an increase in pentosans content, that wasn't observed analysing tobacco seedlings.

Keywords: Eucalypt; Cellular wall; Polysaccharides; Hemicelluloses; UGPase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da parede celular primária	25
Figura 2 – Estrutura tridimensional da parede celular secundária de uma célula xilemática.....	25
Figura 3 – Representação esquemática da rota metabólica de interconversão de nucleotídeo- açúcares envolvida na biossíntese dos componentes da parede celular	31
Figura 4 – Organograma de execução do trabalho	42
Figura 5 – Seqüência de nucleotídeos e seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA da UGPase clonado de tubérculo de batata	44
Figura 6 – Representação esquemática da construção do vetor pENTR/D–TOPO [®]	50
Figura 7 – Representação esquemática do vetor pDEST [™] 17.....	54
Figura 8 – Representação esquemática do T-DNA do vetor pK7WG2D.....	59
Figura 9 – Clustal W entre o cDNA do <i>ugp</i> clonado da batata e o <i>ugp</i> de plantas de tabaco	71
Figura 10 – Passos da obtenção de plântulas das linhagens de tabaco com transgene <i>ugp</i> para a análise da composição química da parede primária	74
Figura 11 – Corte transversal do caule de tabaco com indicação do xilema e da medula	77
Figura 12 – Perfil eletroforético do produto da PCR realizada com clones de <i>E. coli</i> portadores do vetor pDEST 17/ <i>ugp</i> e <i>primers</i> específicos para o <i>ugp</i> de batata.....	81
Figura 13 – Sequenciamento do DNA plasmidial de um clone genuíno de <i>E. coli</i> portador do vetor pDEST 17/ <i>ugp</i> e o <i>primer</i> específico para o promotor T7.....	83
Figura 14 – Sequenciamento do DNA plasmidial de um clone de <i>E. coli</i> portador do vetor pDEST 17/ <i>ugp</i> e <i>primer reverse</i> específico para a ORF do <i>ugp</i> de batata.....	83
Figura 15 – Alinhamento pelo <i>Blast 2 Sequences</i> (NCBI) entre a seqüência do vetor pDEST 17/ <i>ugp</i> com o <i>primer forward</i> e o inserto no vetor pENTR/D–TOPO [®] / <i>ugp</i> de batata	84

Figura 16 – Alinhamento pelo <i>Blast 2 Sequences</i> (NCBI) entre a sequência do vetor pDEST 17/ <i>ugp</i> com o <i>primer reverse</i> e o inserto no vetor pENTR/D–TOPO®/ <i>ugp</i> de batata	85
Figura 17 – SDS-PAGE de clones recombinantes de <i>E. coli</i> para o vetor pDEST 17/ <i>ugp</i>	86
Figura 18 – Distribuição dos peptídeos obtidos pela espectrometria de massa a partir da proteína expressa em <i>E. coli</i> ao longo do acesso P19595.....	88
Figura 19 – Perfil eletroforético do produto da PCR realizada com diferentes clones de <i>A. tumefaciens</i> transformados com o vetor pK7WG2D/ <i>ugp</i> (batata)	89
Figura 20 – Diferentes etapas no processo de obtenção de plantas transgênicas de tabaco	89
Figura 21 – Perfil eletroforético de algumas linhagens de tabaco transgênicas para o gene <i>ugp</i> de batata apresentando o produto de amplificação correspondente ao gene <i>nptII</i>	89
Figura 22 – Plantas de tabaco na casa de vegetação.....	90
Figura 23 – Avaliação do padrão de segregação quanto à resistência à canamicina em sementes de tabaco T ₀	90
Figura 24 – <i>Southern blot</i> do DNA genômico de plantas de tabaco digeridos com a enzima de restrição <i>HindIII</i> e hibridizados com a sonda do gene <i>nptII</i>	93
Figura 25 – <i>Southern blot</i> do DNA genômico de plantas de tabaco transgênicas, digerido com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> e hibridizado com sonda do <i>nptII</i>	94
Figura 26 – Expressão do gene <i>ugp</i> exógeno no caule das plantas transgênicas de tabaco, relativa à expressão do gene <i>ugp</i> exógeno na linhagem 12J	96
Figura 27 – Expressão do gene <i>ugp</i> endógeno no caule das plantas transgênicas de tabaco, relativa à expressão do gene <i>ugp</i> endógeno na linhagem do controle Gateway.....	96
Figura 28 – Conteúdo dos monossacarídeos, celulose e ácidos urônicos analisados da parede celular primária de PLÂNTULAS de linhagens transgênicas de tabaco.....	99
Figura 29 – Conteúdo dos monossacarídeos e ácidos urônicos analisados da parede celular primária da MEDULA de linhagens transgênicas de tabaco.....	100
Figura 30 – Conteúdo dos monossacarídeos, ligninas e ácidos urônicos analisados da parede celular secundária do XILEMA de linhagens transgênicas de tabaco.....	101

Figura 31 – Fenótipo de uma linhagem do controle Gateway e linhagens transgênicas de tabaco portadoras do gene <i>ugp</i> clonado de batata	104
Figura 32 – Altura, área foliar, altura média dos internós, diâmetro do caule e massa seca da raiz das linhagens transgênicas de tabaco	104
Figura 33 – Análise de <i>Southern blot</i> do DNA genômico de eucalipto digerido com as enzimas de restrição <i>HindIII</i> e <i>PstI</i>	107
Figura 34 – ESTs do xilema de eucalipto (<i>Eucalyptus gunnii</i>) que apresentam similaridade à sequência codificadora da enzima UGPase	109
Figura 35 – BlastX no NCBI para o EST CT981449.1 de <i>E. gunnii</i> com alinhamento da UGPase de bambu (<i>Bambusa oldhamii</i>).....	110
Figura 36 – EST do embrião de noqueira (<i>Juglans regia</i>) que apresenta similaridade à sequência codificadora da enzima UGPase.....	110
Figura 37 – Alinhamento encontrado pelo BlastX entre o EST de noqueira e a UGPase de batata (<i>Solanum tuberosum</i>).....	111
Figura 38 – Parte da ORF do gene <i>ugp</i> de noqueira obtida pelo programa ORF Finder.....	111
Figura 39 – Perfil eletroforético do produto da RT-PCR do mRNA da região cambial de eucalipto com <i>primers</i> específicos para o <i>ugp</i> de eucalipto.....	112
Figura 40 – Diferentes estádios no processo de obtenção de plantas transgênicas de eucalipto.	115
Figura 41 – <i>Southern blot</i> do DNA genômico de plantas de eucalipto digerido com a enzima de restrição <i>HindIII</i> e hibridizado com sonda do gene <i>nptII</i>	115
Figura 42 – Alterações nas plantas transgênicas <i>ugp</i> verificadas pelas análises químicas	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados na qPCR.....	70
Tabela 2 – Peso molecular e número de aminoácidos de UGPases de origem vegetal	86
Tabela 3 – Peptídeos obtidos a partir da proteína expressa em <i>E. coli</i>	88
Tabela 4 – Padrão de segregação da expressão do gene <i>nptII</i> na progênie dos transformantes primários de tabaco.....	91
Tabela 5 – Padrão de segregação da expressão do gene <i>nptII</i> na geração T ₂ de plantas transgênicas de tabaco	92
Tabela 6 – Composição da parede celular primária de PLÂNTULAS transgênicas de tabaco ..	102
Tabela 7 – Composição da parede celular primária da MEDULA do caule de linhagens transgênicas de tabaco	102
Tabela 8 – Composição da parede celular secundária do XILEMA do caule de linhagens transgênicas de tabaco	103
Tabela 9 – Conteúdo de monossacarídeos, lignina, ácidos urônicos e celulose da parede celular primária de FOLHAS de eucalipto.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A ₂₆₀ ou A ₂₈₀	Absorbância a 260 ou 280 nm de comprimento de onda
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	Benzilaminopurina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CDS	<i>Coding sequence</i> (concatenação de éxons)
CIA	Mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 v/v)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EC	Código da enzima dado pela <i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
g	Grama
g	Força Centrífuga Relativa à aceleração padrão de gravidade
GDP	Guanosina difosfato
gi	<i>GenInfo Identifier</i> (identificador de uma sequência de nucleotídeos)
HPAE-PAD	<i>High Performance Anion Exchange-Pulsed Amperometric Detection</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

kb	Quilobase (mil pares de bases)
kDa	Quilo Dáltons
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma (10^{-9} grama)
nm	Nanômetro
<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferase II
Oligo (dT)	Oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli-T)
ORF	Seqüência aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pfam	<i>Protein family</i>
pmoles	Picomoles
<i>primer</i>	Oligonucleotídio iniciador
p/v	Peso por volume
PVP	Polivinilpirrolidone
q.s.p.	Quantidade suficiente para

RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Síntese de cDNA por uma transcriptase reversa, seguida de PCR
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>Taq</i>	DNA polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
T _m	<i>Melting temperature</i>
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades de enzima
UDP	Uridina difosfato
UGPase	UDP-glucose pirofosforilase
v/v	Volume por volume
µg	Micrograma (10 ⁻⁶ grama)
µl	Microlitro (10 ⁻³ mililitro)
µM	Micromolar
λ	DNA do fago lambda (marcador de peso molecular)

1 INTRODUÇÃO

A madeira é um importante recurso natural renovável. Anualmente, enormes quantidades de madeira são retiradas das florestas e destinadas para uma vasta gama de produtos, como fonte de energia (carvão vegetal), construção civil, indústrias moveleira, química e farmacêtica, e principalmente para a indústria de papel e celulose (PLOMION; LEPROVOST; STOKES, 2001).

Esse último setor industrial apresenta forte crescimento e perspectivas de expansão. De acordo com a Associação Brasileira de Celulose e Papel (BRACELPA, 2007), a produção estimada no Brasil em 2007 foi de 11,8 milhões de toneladas de celulose e 8,7 milhões de toneladas de papel de todos os tipos, respectivamente com um crescimento de 5,5 % e 2,8 % em relação aos números de 2006. Atualmente, o Brasil é o 7º maior produtor mundial de celulose de todos os tipos, mas ocupa a liderança na produção de celulose de fibra curta de eucalipto, sendo responsável por 18% da produção mundial.

O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália e foi introduzido no Brasil devido a características como crescimento rápido, fuste reto e resistência às intempéries do ambiente. Atualmente é produzido em larga escala, estando perfeitamente aclimatado principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil, com predominância da espécie *Eucalyptus grandis*.

A madeira é composta principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina, que são acumuladas na parede celular. Devido à importância econômica destes polissacarídeos para o setor florestal, existe grande interesse na identificação de genes responsáveis pela biossíntese de seus componentes, que poderiam ser modulados através das técnicas de biologia molecular. Mas, o sucesso desta manipulação depende do conhecimento das rotas metabólicas responsáveis pela sua síntese, como também das rotas que competem pelo carbono nas várias partes da planta, nos diferentes estádios de desenvolvimento (PLOMION; LEPROVOST; STOKES, 2001).

A fotossíntese gera açúcares que constituem a matéria prima para a biossíntese de moléculas orgânicas, a partir das quais, a planta sintetiza diversas estruturas, entre elas a parede celular. Neste processo, destaca-se a enzima UDP-glucose pirofosforilase (UGPase) que catalisa a interconversão de glucose 1-fosfato em UDP-glucose, um metabólito chave importante na partição do carbono entre os vários compostos. Porém, a rota metabólica de biossíntese desses polissacarídeos e a sua regulação ainda não são bem compreendidas (REITER; VANZIN, 2001).

Neste trabalho, a nomenclatura dos carboidratos segue a recomendação de Buckeridge et al. (2000), que ao invés de glicose, utiliza o termo glucose. Isto visa distinguir termos como glicosídeo (aglicona ligada a qualquer açúcar) de glucosídeo (aglicona ligada a uma molécula de glucose). Esta designação permite utilizar o termo glicano(s) para polissacarídeos compostos de qualquer mistura de monossacarídeos, do termo glucano(s), polissacarídeos compostos inteira ou predominantemente por moléculas de glucose, como a celulose, amido ou xiloglucanos.

Embora a enzima UGPase seja encontrada em praticamente todos os organismos, incluindo bactérias, animais e vegetais, a maioria dos trabalhos referentes à UGPase relaciona-se à biossíntese de sacarose e/ou amido, principalmente de batata. Esse interesse decorre do fato de que a batata ao ser frita pode apresentar um escurecimento devido ao acúmulo de açúcares redutores durante o armazenamento da batata a baixas temperaturas. Esse escurecimento deprecia o produto, o que causa grandes prejuízos na indústria alimentícia (SPYCHALLA et al., 1994).

Na indústria de papel e celulose, sabe-se que as propriedades físicas do produto final são determinadas pela composição química da pasta celulósica, principalmente em relação à presença de hemiceluloses. A elevação do teor de pentosanas, que formam ligações entre as fibras, seria benéfica economicamente para a indústria de papel e celulose, pois diminuiria a energia consumida no refino da polpa, além de beneficiar a qualidade do papel que se tornaria mais resistente ao rasgo (LIMA; OLIVEIRA; BUCKERIDGE, 2003).

Apesar da importância do produto da UGPase, o nucleotídeo-açúcar UDP-glucose, para a síntese de hemiceluloses, ainda não se conhece o reflexo da superexpressão ou da inibição do gene *ugp* sobre a biossíntese e composição final desses polissacarídeos da madeira.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo clonar os cDNAs que codificam a UGPase, extraídos de batata (*Solanum tuberosum* L.) e de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), e inseri-los por meio de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente, no genoma de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e de eucalipto, para alterar o fluxo metabólico do carbono de modo a aumentar o conteúdo de pentosanas. Os efeitos da superexpressão do gene *ugp* sobre o fluxo metabólico do carbono nas plantas transgênicas foram avaliados por meio de análises morfológicas e quanto à composição química dos polissacarídeos da parede celular primária e secundária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O eucalipto

No Hemisfério Norte, a madeira é fornecida principalmente pelas Gimnospermas (coníferas), designadas na literatura como *softwoods* (madeiras moles), ao passo que quase a totalidade das espécies das florestas tropicais é composta pelas Angiospermas, usualmente designadas como *hardwoods* (madeiras duras). Entre as Angiospermas distinguem-se as dicotiledôneas, grupo ao qual pertence o gênero *Eucalyptus*.

Eucalyptus é um grande gênero da Família Myrtaceae, composto por arbustos a árvores de grande porte, que atingem alturas de 30 a 50 metros. Existem cerca de 500 a 700 espécies de eucalipto descritas, além de muitas subespécies e alguns híbridos naturais.

Neste gênero as flores são pequenas, bissexuadas, sem pétalas, com opérculo e com muitos estames livres. O fruto do tipo cápsula, quando seco, libera muitas sementes de testa escura, lisa e fina (CAVALCANTI, 1963). As folhas são alternas, coriáceas, lanceoladas com glândulas oleíferas. O fuste pouco ramificado e com casca lisa, que periodicamente se desprende, fornece madeira de alburno delgado, claro, de cerne cuja cor vai do amarelo ao pardo, pardo avermelhado e vermelho, (JOLY, 1976). Nas populações naturais, os eucaliptos exibem um sistema de cruzamento misto, mas predominantemente alógamo, com alto grau de compatibilidade nos cruzamentos interespecíficos (ELDRIDGE, 1976; PRYOR, 1976).

As espécies do gênero *Eucalyptus* tiveram sua origem na Austrália e regiões próximas (ELDRIDGE et al., 1993). Atualmente o eucalipto é plantado, na maioria das regiões de clima tropical e subtropical do mundo, entre as latitudes de 40°N e 45°S. As espécies mais utilizadas no mundo são *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. globulus* e *E. viminalis*.

A expansão em larga escala da eucaliptocultura no Brasil teve início em 1903, em Rio Claro, com o trabalho de Edmundo Navarro de Andrade na então Companhia Paulista de Estradas de Ferro, visando a produção de dormentes para ferrovias, lenha para locomotivas, além de postes para eletrificação. O eucalipto havia despertado interesse em razão da sua rusticidade, altos incrementos volumétricos e boa qualidade da madeira para carvão (LIMA, 1993). Até 1911,

Navarro de Andrade cultivara em São Paulo 75 espécies do gênero e nos anos subsequentes chegou a introduzir 144 espécies, tendo fundado ao todo 17 hortos para a Cia. Paulista de Estradas de Ferro.

Na década de 50, o eucalipto começou a despertar a atenção como matéria prima para a produção de celulose. Em 1966, o governo federal estabeleceu o programa de incentivos fiscais a fim de atender a crescente demanda na utilização de madeira pelas indústrias, o que propiciou grande evolução tecnológica e possibilitou a formação de expressivo estoque de madeira. As pesquisas em melhoramento genético se iniciaram efetivamente a partir da década de 60. Inicialmente os programas foram dedicados à introdução de diferentes espécies de eucalipto mais adaptadas às condições ambientais e às diferentes finalidades. No início da década de 80, já eram produzidas sementes melhoradas de espécies puras, hibridação entre árvores superiores ou hibridação interespecífica, através de polinização controlada, com estabelecimento de pomares de sementes.

As espécies de eucalipto apresentam excelente opção para a produção de madeira em função de sua diversidade, adaptabilidade, potencial de produção e características físicas e mecânicas, permitindo inúmeras utilizações e fornecendo matéria-prima para produção de celulose, papel, chapas, lâminas, compensados, aglomerados, dormentes, moirões, postes, lenha, carvão vegetal, madeira serrada e processada, caixotaria, estruturas para construção civil, produção do óleo essencial para indústria química e farmacêutica (cosméticos e medicamentos naturais), como também na apicultura e ornamentação. Do ponto de vista ambiental, o uso de madeira reflorestada contribui significativamente para a proteção e conservação dos recursos naturais existentes, preservando áreas de mata nativa e prevenindo a extinção de espécies consideradas nobres, diminuindo assim a pressão sobre as florestas nativas (FERREIRA, 1979). Por ser uma espécie de crescimento rápido, pode participar no controle do aquecimento global, causado pelo efeito estufa, através de sua ação no seqüestro de gás carbônico (TREXLER; FAETH; KRAMER, 1989).

Atualmente o grande desafio dos programas de melhoramento de eucalipto é promover a melhoria da qualidade da madeira, embora a busca de ganhos em volume continue sendo de grande interesse. Os critérios universais para seleção são: altura total e diâmetro (refletem maior capacidade de conversão de produtos fotossintetizados em produtos úteis), retidão do fuste

(facilita seu transporte), resistência a pragas e doenças, capacidade de rebrota e capacidade de enraizamento. Já os critérios mais específicos são: densidade básica da madeira, comprimento das fibras, resistência das fibras, ângulo das fibrilas, espessura das paredes celulares, número de fibras por grama, teor de extrativos, teor de lignina, retratibilidade (teor de umidade afeta dimensões).

Para a indústria de papel e celulose os fatores mais importantes geralmente estão ligados às fibras e à densidade básica. A celulose produzida com madeira de densidade mais baixa possui fibras de paredes menos espessas e é mais adequada à produção de papel para imprimir e escrever. Já a celulose produzida com madeira mais densa pode ser mais adequada para atender as indústrias dos papéis absorventes (ASSIS, 1996). Para celulose a madeira deve ter alto teor de fibras (em relação a outros elementos anatômicos), alto teor de celulose, características das fibras adequadas, baixos teores de extrativos e de umidade, visando a redução do custo da polpa através do maior rendimento por tonelada de madeira posto fábrica.

Na indústria siderúrgica, fatores importantes são o maior teor de lignina que confere maior poder calorífero ao carvão vegetal, e a maior densidade da madeira, que confere maior poder calorífero a um mesmo volume de madeira. Para serraria exige-se madeira com boas propriedades físico-mecânicas e uniformidade no gradiente medula-casca, reduzindo-se as rachaduras, fendas, empenamento, nós e colapsos.

A melhoria da qualidade da madeira afeta a quantidade do produto comercial a ser obtido por unidade de área, e também permite a diferenciação de produtos, de forma a melhorar a competitividade das empresas no mercado mundial. Neste cenário, o primeiro desafio dos melhoristas é definir as características da madeira a serem trabalhadas. Esta definição depende de uma avaliação criteriosa das demandas do processo e de mercado. Deve-se considerar, entretanto, que em se tratando de uma planta perene, com idades de rotação avançadas, é necessário trabalhar com um número reduzido de características desejáveis em longo prazo.

Com o advento da clonagem em escala comercial foi dada grande ênfase à seleção e propagação das árvores superiores resultantes dos programas de melhoramento, e também dos plantios comerciais já estabelecidos. A cultura de tecidos de plantas tem a grande vantagem de proporcionar resultados em um menor espaço de tempo. Para o eucalipto, tem permitido a multiplicação rápida de indivíduos superiores, com maior rendimento em número de mudas

obtidas por árvore, e ainda em qualquer época do ano, o que é vantajoso em comparação com a técnica tradicional de estaquia. A mais alta taxa de multiplicação com técnicas *in vitro* é estimada em 100.000 plantas por ano a partir de um simples broto. Este dado é um forte indicador da vantagem do uso de métodos *in vitro* para produção em larga escala de plantas com genótipo superior.

Dentro do contexto de um programa de melhoramento genético, A biotecnologia, segundo Ferreira (1992), poderá ser de grande utilidade desde que utilizada como ferramenta de auxílio ao melhoramento. Já a idéia de que novos genótipos radicalmente vantajosos possam ser facilmente criados por biologia molecular e introduzidos em pouco tempo no reflorestamento é considerada hoje com mais cautela do que no início da difusão dessas técnicas no mundo. Especialmente devido à restrição do uso de transgênicos no Brasil e no mundo, e ao ainda pouco conhecimento do impacto ambiental e genético que eles possam causar.

A transformação genética de *Eucalyptus* tem sido o objetivo de vários grupos de pesquisa nos últimos anos, tanto no setor público como privado. Poucos trabalhos relatam a obtenção de plantas transgênicas das principais espécies de interesse econômico. Serrano et al. (1996), utilizaram biobalística com o objetivo de introduzir DNA em embriões zigóticos de *E. globulus*, conseguindo assim calos com expressão do gene marcador *uidA* da β -glucuronidase. A integração do DNA foi demonstrada por *Southern blot*, embora não tenham conseguido regenerar plantas transformadas. Já Moralejo et al. (1998), obtiveram plantas transgênicas de *E. globulus* utilizando embriões zigóticos injuriados por bombardeamento, seguido da inoculação com *A. tumefaciens* e Mullins et al. (1997), também obtiveram plantas transgênicas de *E. camaldulensis* via inoculação com *A. tumefaciens* de folhas de um único clone, dos 24 testados. Ho et al. (1998) obtiveram plantas transgênicas de *E. calmadulensis* utilizando a inoculação com *A. tumefasciens* de hipocótilos provenientes de plântulas. Só mais recentemente, González et al. (2002a,b) conseguiram obter plantas transgênicas de espécies de interesse comercial como *E. grandis* com o gene marcador *uidA*, além de plantas transgênicas do híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) com o gene quimérico Lhcb1*2 (chlorophyll a/b binding protein) de ervilha, pertencente ao sistema antena LHCII.

Espera-se agora que características de interesse possam ser introduzidas no gênero *Eucalyptus*, sendo possível promover ainda maior valor agregado à cultura, garantindo para que o

Brasil que já é considerado líder mundial na produção de derivados de eucalipto, continue nesta posição, gerando muitas divisas para o Brasil.

2.2 Formação da madeira

O crescimento das árvores ocorre em dois sentidos: em altura (denominado crescimento primário ou crescimento apical) e em diâmetro (crescimento secundário). Durante o crescimento primário, tanto da raiz, quanto do caule, o procâmbio inicial, derivado de meristemas apicais, produz o xilema e o floema primários. No crescimento secundário, o câmbio, camada localizada entre o floema e o xilema e formado a partir do procâmbio e outras células do parênquima, dividi-se tanto em direção à casca como em direção ao centro do tronco. O câmbio vascular inicial dá suporte ao crescimento secundário, originando o floema e o xilema secundários (ZHENG, 2002).

O tecido xilemático, característico das plantas superiores e comumente chamado de madeira, é composto por elementos de condução (traqueídeos e vasos) e por elementos com função de sustentação mecânica e armazenamento como as fibras e células parenquimatosas (FUKUDA, 1996).

A formação do xilema secundário (xilôgênese) se dá por uma sucessão de processos: divisão celular, expansão celular (alongamento e aumento da largura radial), deposição ordenada das diferentes camadas da parede celular secundária (composta de celulose, hemiceluloses e proteínas), biossíntese e deposição de lignina (lignificação) e morte celular programada (CHAFFEY, 2002).

2.3 Parede celular vegetal

A estrutura anatômica da madeira pode ser compreendida não apenas em termos do arranjo de suas células, como também com base na organização e nas peculiaridades das substâncias químicas componentes da parede celular. Nas plantas superiores, a parede celular confere rigidez mecânica, determina a forma, controla a expansão celular, protege a célula contra agentes potencialmente patogênicos ou predadores e participa na comunicação intercelular. A parede celular precisa ser forte o bastante para impedir o rompimento dos protoplastos devido à

pressão exercida, mas, por outro lado, ela precisa ter propriedades que permitam a expansão celular de maneira controlada (CARPITA; GIBEAUT, 1993; REITER, 1994).

A parede celular é dinâmica e sofre mudanças na sua composição ao longo da vida da célula e decorrente das condições ambientais (BLEE et al., 2001). Está relacionada com o crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta. Morfologicamente, na parede celular podem-se distinguir três regiões: parede celular primária, a parede celular secundária e a lamela média (CARPITA; McCANN, 2000).

A parede celular primária é depositada durante o crescimento celular, enquanto é capaz de crescer em área ou de se alongar, através de crescimento difuso ou orientado. Consiste basicamente de celulose, hemiceluloses e pectinas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). As hemiceluloses e a pectina são sintetizadas no complexo de Golgi e transportadas para a parede celular, e a celulose é sintetizada na membrana plasmática sob a forma de microfibrilas paracristalinas (Figura 1). A proporção de cada componente na parede celular primária é 9-25% de celulose, 25-50% de hemiceluloses, 10-35% de pectinas e 10% de proteínas (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992). Células adjacentes são separadas por duas paredes primárias finas unidas por uma substância intercelular, a lamela média, cuja composição é rica em substâncias pécicas além de proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O processo de diferenciação celular inicia-se quando se completa o crescimento celular e uma espessa parede celular secundária se deposita no lado interno da parede primária. Esse tipo de parede geralmente é sintetizado por células que requerem grande força mecânica e um reforço estrutural (COSGROVE, 2005).

A formação da parede secundária é dirigida pela expressão coordenada de um grande número de genes especialmente envolvidos na biossíntese e reunião de quatro componentes principais: os polissacarídeos celulose (40-80%) e hemiceluloses (10-40%), lignina (5-25%) (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992), proteínas da parede celular e outros constituintes menores solúveis (stilbeno, flavonóides, taninos e terpenóides), e componentes insolúveis em solvente neutro (pectina e proteínas). A parede celular secundária apresenta três diferentes camadas, S₁, S₂ e S₃ (Figura 2), onde cada uma dessas camadas é composta de celulose, hemiceluloses e lignina em diferentes proporções (PLOMION; LEPROVOST; STOKES, 2001).

Figura 1 – Estrutura da parede celular primária. **A.** As microfibrilas de celulose são sintetizadas por um complexo hexomérico na membrana plasmática, enquanto que as hemiceluloses e pectinas, que compõem a matriz polissacarídica, são sintetizadas no aparelho de Golgi e são depositadas na superfície da parede por vesículas. Para maior clareza, a interação celulose-hemicelulose é apresentada sem as pectinas no lado esquerdo da parede, que são mostradas no lado direito da figura A. **B.** Modelo de síntese da microfibrila de celulose pelo complexo celulose sintase onde cada proteína sintetiza uma única cadeia de β-glucano e onde uma roseta é um hexâmero de hexâmeros de celulose sintase. Adaptado de Cosgrove (2005)

Figura 2 – Estrutura tridimensional da parede celular secundária de uma célula xilemática. A parede secundária é dividida em diferentes camadas (S₁, S₂ e S₃), cada uma com um arranjo particular de microfibrilas de celulose. Na parede primária, as microfibrilas são alinhadas irregularmente. A lamela média garante a adesão entre as células adjacentes. Adaptado de Plomion; Leprovost e Stokes (2001)

O processo de diferenciação celular termina em uma intensa lignificação (onde a lignina estabelece ligações covalentes e não covalentes com a matriz de carboidratos) e na morte celular programada. A lignificação inicia-se na região da parede primária e se dirige tanto para o interior da célula, como para a lamela média (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.4 Componentes químicos da parede celular

A composição e a proporção entre as substâncias orgânicas constituintes das estruturas anatômicas dos vegetais refletem na qualidade da madeira, que é avaliada por suas propriedades físicas e químicas. Por exemplo, um estudo realizado com *E. saligna* de diferentes idades constatou que a densidade básica, fator determinante no destino da madeira, está relacionada com a sua composição química, sendo que os principais responsáveis pela sua variação são os carboidratos (TRUGILHO; LIMA; MENDES, 1996).

A celulose é um polissacarídeo, de cadeia longa e sem ramificações, alto peso molecular, não solúvel em água, composto por monômeros de glucose, cujo grau de polimerização pode variar de 500 a 14.000 unidades (BRETT, 2000). Estes polissacarídeos organizam-se em feixes paralelos formando microfibrilas. Cada microfibrila é formada por aproximadamente 36 cadeias lineares de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose, unidas umas às outras ao longo de seu comprimento, por pontes de hidrogênio. Várias microfibrilas mantêm-se ligadas por polímeros de hemiceluloses e outras substâncias que se encontram sem orientação regular. Em geral, a celulose compõe cerca de 10 a 40% da massa seca da parede primária e 40 a 50% da secundária (McNEIL et al., 1984; PLOMION; LEPROVOST; STOKES, 2001). Trata-se do principal componente estrutural da madeira, caracterizado por regiões cristalinas em grande parte de seu comprimento, entrecortadas por zonas amorfas. A celulose provavelmente constitui o biopolímero mais abundante na natureza (HOPKINS, 1995).

O termo hemicelulose designa um conjunto de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo cada um propriedades peculiares. As hemiceluloses, componentes com alta capacidade higroscópica das paredes celulares, atuam como uma matriz onde estão imersas as cadeias de celulose, conferindo maior elasticidade. Enquanto a celulose contém exclusivamente a D-glucose como unidade fundamental, as hemiceluloses podem ser homopolímeros, tais como galactano, arabinano e glucano, ou heteropolímeros como

glucomanano, galactoglucomanano, arabinogalactano e glucuronoxilano (PLOMION; LEPROVOST; STOKES, 2001). São polímeros amorfos formados de uma cadeia central à qual se somam cadeias laterais curtas formadas por resíduos de hexoses, pentoses e ácidos urônicos. São as cadeias laterais que garantem a solubilidade das hemiceluloses (BUCKERIDGE et al., 2000). Em sua composição podem aparecer condensados em proporções variadas, os açúcares xilose, manose, glucose, arabinose, galactose, ácido galacturônico, ácido glucurônico e ácido metilglucurônico. As hemiceluloses podem ser divididas em pentosanas e hexosanas com fórmulas gerais $(C_5H_8O_4)_n$ e $(C_6H_{10}O_5)_n$, respectivamente, onde n é o grau de polimerização, sendo que as pentosanas por hidrólise produzem pentoses (xilose e arabinose).

Nas dicotiledôneas, a hemicelulose mais abundante na parede primária é o xiloglucano, representando cerca de 20% (FRY, 1989). Os xiloglucanos estão associados às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio e promovem a união entre microfibrilas adjacentes. Na parede celular secundária de dicotiledôneas a principal hemicelulose é a glucuronoxilana, além de outras, como as glucomananas. As hemiceluloses constituintes em Gimnospermas são principalmente as galactoglucomananas e pequenas porções de outras hemiceluloses como as arabinoglucuronoxilanas e arabinogalactanas.

A lignina, o terceiro constituinte mais importante da madeira, é uma molécula polifenólica, resistente à hidrólise, hidrofóbica, de estrutura tridimensional complexa, de elevado peso molecular, amorfa, que atua como material incrustante em torno das microfibrilas, dando rigidez à parede celular dos elementos anatômicos, o que confere à planta o suporte mecânico e defesa contra o ataque de patógenos, e a resistência característica a esforços mecânicos (WHETTEN; MACKAY; DEDEROFF, 1998; ROGERS; CAMPBELL, 2004)).

As pectinas são os principais componentes da lamela média. Funcionam como agentes cimentantes entre as células. São polissacarídeos ácidos, altamente hidratados, ricos em ácido galacturônico (WILLATS et al., 2001).

Outras substâncias, chamadas de extrativos, podem ser extraídas da madeira pela água, solventes orgânicos ou por volatilização. Os extrativos abrangem os taninos, óleos, gomas, resinas, corantes, sais de ácidos orgânicos, compostos aromáticos, depositados preponderantemente no cerne, conferindo-lhe coloração mais acentuada e maior densidade. Os extrativos são considerados constituintes secundários.

2.5 Biossíntese dos componentes da parede celular

A xilogênese tem sido foco de muitos estudos de diferenciação em plantas superiores, pelo fato do xilema exercer função essencial para as plantas, como também para compreender os mecanismos e a ação de genes envolvidos na formação da madeira (ZHENG, 2002).

A comparação por meio de *microarrays* de um tecido normal da planta herbácea *Arabidopsis thaliana* com um tecido da *Arabidopsis* induzido a formar xilema secundário mostrou que aproximadamente 20% do seu genoma, que tem cerca de 8.300 genes, é diferencialmente expresso, o que dá uma idéia da complexidade do mecanismo da xilogênese nas plantas em geral (OH; PARK; HAN, 2003).

O carbono fixado nos cloroplastos pela fotossíntese é exportado na forma de triose-fosfato para o citoplasma, onde duas moléculas são condensadas para formar frutose-1,6-bisfosfato. A direção do fluxo vai depender de vários fatores como estágio de desenvolvimento das folhas, estado fisiológico da planta, condição nutricional, entre outros. Nas folhas jovens, grande parte dos fluxos metabólicos é preferencialmente utilizada para a síntese de lipídeos, via da pentose fosfato (para a síntese de ácidos nucléicos), glicólise (gerando ATP e piruvato), ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), síntese de aminoácidos, e a via de interconversão dos nucleotídeo-açúcares, responsáveis pela síntese dos componentes da parede celular.

A biossíntese dos componentes da parede celular, como celulose, hemiceluloses e pectina, depende do fornecimento de nucleotídeo-açúcares como, por exemplo, UDP-glucose, UDP-glucuronato, UDP-galactose, UDP-xilose e UDP-arabinose. A síntese dos nucleotídeo-açúcares ocorre a partir de uma série de reações enzimáticas conhecida como via de interconversão dos açúcares nucleotídeos (REITER; VANZIN, 2001).

A compreensão de biosíntese da celulose, polímero com uma estrutura relativamente simples, ainda é muito limitada, devido à dificuldade de se determinar sua atividade bioquímica. Dependendo do organismo estudado, têm-se encontrado diferentes tipos de subunidades da celulose sintase. Por exemplo, no genoma de *Arabidopsis* foram identificados 10 genes *CesA*. Entre eles, três genes foram relacionados com a biossíntese de celulose da parede secundária (TAYLOR et al., 2004). Além da *CesA*, outras enzimas estão envolvidas na biossíntese de celulose, por exemplo, a sacarose sintase (*SuSy*), que converte a sacarose em UDP-glucose, tem o papel de provedora de substrato para o alongamento da cadeia de celulose pela *CesA* (HAIGLER

et al., 2001). Em *E. grandis*, foram identificados seis genes para celulose sintase, sendo três relacionados à síntese de parede primária (EgCesA4, EgCesA5 e EgCesA6), e três mais expressos em xilema, relacionados à síntese de parede secundária (EgCesA1, EgCesA2 e EgCesA3) (RANIK; MYBURG, 2006). Quanto ao substrato, em bactérias, a síntese de celulose parece depender apenas da disponibilidade de UDP-glucose para a formação de cadeias de glucanos. Em plantas superiores, modelos também indicam o nucleotídeo-açúcar UDP-glucose como provável substrato, uma vez que a celulose sintase se associa ao UDP-glucose promovendo a síntese de celulose *in vitro* (DELMER, 1999a). *In vivo*, a biossíntese de celulose ocorre na membrana plasmática em uma estrutura complexa de proteínas, chamada de roseta (Figura 1B), embora esta estrutura ainda não tenha sido isolada (DOBLIN et al., 2002). As rotas de síntese de UDP-glucose, assim como seus intermediários não estão bem claros (DELMER, 1999 b; HAIGLER et al., 2001; DELMER; HAIGLER, 2002). Esses trabalhos mostram a existência de uma inter-relação dos vários substratos envolvidos na síntese de celulose e hemiceluloses, de tal forma que o fluxo de carbono para esses dois compostos é altamente regulado.

A biossíntese de hemiceluloses é difícil de ser estudada porque eles são polímeros compostos por múltiplos monossacarídeos ligados em diversas estruturas, mais complexos que a celulose. A maioria das enzimas de interconversão de nucleotídeo-açúcares está localizada no citosol, onde interage metabolicamente com a glicólise e gluconeogênese (Figura 3). Os nucleotídeo-açúcares são conduzidos para o complexo de Golgi onde os polissacarídeos são sintetizados e exportados para a matrix celular por meio de vesículas derivadas do Golgi. O transporte destas vesículas pelo interior da célula é direcionado por microtúbulos da malha do citoesqueleto (DELMER; STONE, 1988).

O UDP-D-glucose é o ponto de partida para a geração dos nucleotídeo-açúcares *in vivo* podendo também ser metabolizado pela celulose sintase ou calose sintase, na membrana plasmática. GDP-D-manose é convertido tanto em GDP-L-fucose, GDP-L-galactose e GDP-L-gulose. UDP-D-glucose é convertido em UDP-D-galactose, em UDP-D-ácido glucurônico ou UDP-L-ramnose. Existe uma segunda via de formação do UDP-D-ácido glucurônico chamada de rota metabólica de oxidação do mio-inositol. Duas enzimas UDP-D-ácido glucurônico descarboxilases diferentes dão origem a UDP-D-xilose ou à mistura de UDP-D-xilose e UDP-D-apiose. UDP-D-glucose, UDP-D-galactose, UDP-D-ácido glucurônico, UDP-L-ramnose, UDP-D-apiose, GDP-D-manose, GDP-L-fucose e GDP-L-galactose são transportados para o sistema

de endomembranas onde se localizam glicosiltransferases específicas. As glicano sintases e glicosiltransferases são respectivamente responsáveis pela formação da cadeia principal e das ramificações laterais das hemiceluloses. No lúmen do sistema de endomembranas, o UDP-D-ácido glucurônico é convertido em UDP-D-xilose ou em UDP-D-ácido galacturônico, e UDP-D-xilose é convertida em UDP-L-arabinose (revisão de SEIFERT, 2004).

As hemiceluloses nas dicotiledôneas são formadas, em grande parte, a partir de xilose e ácido glucurônico e, em menor proporção, a partir de glucose e manose (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977).

As plantas fornecedoras de madeira mais utilizadas para a realização de estudos envolvendo a análise de genes e proteínas relacionados à formação e qualidade da madeira são *Populus spp* (álamo) e *Eucalyptus spp*, pelo fato de apresentarem facilidade da propagação vegetativa, pequeno tamanho do genoma e, por último, a disponibilidade de mapas genéticos (PLOMION; LEPROVOST; STOKES, 2001). Todavia, a grande maioria dos estudos vem sendo realizada utilizando-se plantas modelo anuais, como *Zinnia elegans* e *Arabidopsis thaliana*. Em *Zinnia*, células em suspensão podem ser estimuladas a produzir elementos traqueários, e, dessa forma, proteínas e genes puderam ser identificados em diferentes estádios do desenvolvimento desses elementos traqueais (FUKUDA, 1997). A *Arabidopsis*, espécie herbácea, pode ser induzida, sob condições específicas (remoção repetida das inflorescências e cultivo sob dias curtos ou a baixas densidades), a desenvolver um crescimento com características semelhantes ao crescimento secundário de espécies arbóreas (LEV-YADUN, 1994).

A identificação e caracterização de várias proteínas e genes envolvidos em diferentes estádios da xilogênese, da formação da parede celular secundária e da morte celular têm se servido de técnicas bioquímicas, moleculares e de hibridização. Desta forma foram caracterizadas várias enzimas que atuam no processo de formação da parede celular e da madeira (MELLEROWICZ et al., 2001 ; REITER et al., 2002 ; YE, 2002; JOSHI et al., 2004 ; MORRIS et al., 2004 ; SCARPELLA; MEIJER, 2004; SOMERVILLE et al., 2004; LI; LU; CHIANG, 2006; FARROKHI et al., 2006), da celulose (JOSHI et al., 2004) e proteínas da parede celular (ZHANG; SEDEROFF; ALLONA, 2000; YONG et al., 2005).

Os mutantes deficientes quanto ao desenvolvimento do sistema vascular também têm contribuído para a compreensão das rotas metabólicas e determinação das enzimas envolvidas na formação e regulação da xilogênese (TURNER; TAYLOR; JONES, 2001).

Recentemente, o transcritoma (genômica funcional) da xilogênese começou a ser estudado em diferentes espécies arbóreas, como *Pinus* (ALLONA et al., 1998), *Populus* (STERKY et al., 2004) e *Eucalyptus* (PAUX et al., 2004; CALDAS, 2007), sendo que o grande número de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) seqüenciado do câmbio, xilema e floema, vem fornecendo informações quanto aos mecanismos responsáveis principalmente pela deposição da parede celular secundária e lignificação.

Em 2004, Paux e colaboradores, fazendo uso de biblioteca de genes expressos no xilema subtraída dos genes expressos nas folhas, identificaram 182 genes que são preferencialmente expressos no xilema secundário de árvores do gênero *Eucalyptus*. Além disso, muitos fatores de transcrição têm sido identificados, entre eles as famílias MYB e LIM, envolvidos na regulação da lignificação (PAUX et al., 2005).

A proteômica também está contribuindo para se alcançar a completa compreensão da xilogênese. Entre os trabalhos neste sentido está o de Celedón et al. (2007) que compararam as proteínas da região cambial de *E. grandis* de três idades diferentes (6 meses, 3 e 6 anos).

2.6 Enzima UDP-glucose pirofosforilase

A enzima UDP-glucose pirofosforilase (UGPase ou UDPGP, EC 2.7.7.9), também chamada de UTP--glucose-1-fosfato uridililtransferase (<http://us.expasy.org/enzyme>) catalisa a interconversão de α -D-glucose 1-fosfato + UTP em UDP-glucose + difosfato, tendo o Mg^{2+} como cofator. Ela atua na via de interconversão de pentose e glucoronato, síntese de sacarose (via sacarose-fosfato sintase e sacarose-fosfato fosfatase), celulose (via celulose sintase), de outros nucleotídeo-açúcares e de metabólitos (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). Nos tecidos de reserva, a glucose-1-fosfato, precursor do UDP-glucose, pode ser importada pelos amiloplastos e ser incorporada no amido via ADP-glucose pirofosforilase e amido sintase (HATZFELD; STITT, 1990; VIOLA et al., 1991).

A sua expressão foi observada em todos os tecidos vegetais, fotossintetizantes ou não (SPYCHALLA et al., 1994). A atividade da UGPase está envolvida com a biogênese da parede celular, e em tecidos de reserva, como tubérculos de batata, promove o acúmulo de açúcar reduzido durante a estocagem a baixas temperaturas (SPYCHALLA et al., 1994; CIERESZKO; JOHANSSON; KLECZKOWSKI, 2001). Em frutos como a banana e tomate, a enzima está relacionada com o amadurecimento de frutos (PUA et al., 2000; PICTON et al., 1993). Em mamíferos, o UDP-glucose é um importante intermediário na interconversão de glicogênio que atua em várias funções metabólicas em diferentes tecidos, tendo a UGPase relação com o diabetes. Do ponto de vista evolutivo, a ampla distribuição e manutenção desta enzima na natureza deve-se ao seu papel na síntese de numerosos compostos que requerem o UDP-glucose, o que a torna uma enzima chave.

A importância metabólica da UGPase na formação de UDP-glucose foi demonstrada em linhagens mutantes de *Dictyostelium discoideum* que tiveram a atividade da UGPase reduzida. A morfogênese de linhagens mutantes foi interrompida em estádios de crescimento que necessitavam a mobilização de estoques de glicogênio em UDP-glucose equivalente ao usado na formação de celulose (DIMOND; FARNSWORTH; LOOMIS, 1976). Mais tarde, provou-se a participação da UGPase na síntese de celulose por *Acetobacter xylinum* (VALLA, 1989).

A UGPase já foi purificada de uma variedade de organismos, incluindo bactéria (HOSSAIN et al., 1994), tecido animal (KONISHI et al., 1993) e vegetal (NAKANO et al., 1989). Apresenta-se predominantemente como proteína citosólica solúvel embora haja registros de atividade de UGPase ligada à membrana tanto para tecidos animais como vegetais (KLECZKOWSKI, 1994).

Segundo Nakano et al. (1989), em plantas, a UGPase existe na forma de monômero de aproximadamente 50 kDa, porém, há indícios de que a UGPase na batata apresenta-se na forma de homodímero, como proposto por Sowokinos; Sychalla e Desborough (1993), além de que na cevada foi observado que a UGPase tem a capacidade de oligomerizar e depolimerizar (MARTZ; WILCZYNSKA; KLECZKOWSKI, 2002; KLECZKOWSKI; MARTZ; WILCZYNSKA, 2005), sendo o monômero a forma ativa. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a UGPase encontra-se na forma de octâmero com subunidades idênticas (ROEBEN et al., 2006) e em *E. coli*, na forma de tetrâmero (THODEN; HOLDEN, 2007). Entretanto, as UGPases de origem eucariótica são

significativamente divergentes daquelas de origem bacteriana, com apenas aproximadamente 8% de identidade entre as seqüências de aminoácidos (KLECZKOWSKI et al., 2004).

Segundo Sowokinos; Thomas e Burrell (1997) as seqüências encontradas em diferentes cultivares de batata podem representar um polimorfismo alélico no gene, especialmente se a UGPase é codificada por um único gene em batata (BOROVKOV et al., 1996).

A presença de um único gene *ugp* em batata, ou a presença de uma família de genes que produzem transcritos altamente homólogos foi sugerida a partir da inibição antisense da expressão do gene que levou tanto a um decréscimo dos níveis de mRNA como da proteína em todos os tecidos estudados de batata (ZRENNER; WILLMITZER; SONNEWALD, 1993).

Eimert e colaboradores (1996) concluíram que em cevada a UGPase é codificada por um único gene. No entanto, esta hipótese de um único gene dificilmente se ajusta às evidências dadas pelo polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) que indicam a presença de pelo menos três genes que codificam a UGPase em cevada (KLEINHOF, apud EIMERT et al., 1996).

Em *Populus* (álamo) foram encontrados dois genes que codificam a UGPase, *UGP1* com maior expressão na zona cambial do caule, e *UGP2* com maior expressão em flores masculinas maduras (MENG et al., 2007). Em arroz (*Oryza sativa* L.), também foram encontradas duas isoformas, *OsUGP1* e *OsUGP2*, sendo a primeira muito mais expressa do que a outra (CHEN et al., 2007a).

Da mesma forma, na região cambial de *E. grandis* juvenil (~3 anos), foram identificados dois transcritos para UGPase, um de baixo nível de expressão e outro com nível intermediário de expressão (CALDAS, 2007). Mas, ainda não se sabe se os dois transcritos representam dois genes diferentes, alelos diferentes de um mesmo gene, ou se são produtos de *splicing* alternativo. Também na região cambial de *E. grandis*, pela análise proteômica, Celedón e colaboradores (2007), localizaram entre as proteínas de plantas de 6 meses, 3 e 6 anos de idade, respectivamente 3, 2 e 2 *spots* correspondentes à UGPase, que podem eventualmente ser atribuídos a diferentes isoformas da enzima.

As estruturas 3D das UGPases de cevada, álamo e *Arabidopsis* já foram deduzidas através da estratégia de modelagem de proteínas por homologia, baseadas na estrutura cristalina definida pouco antes para UDP-*N*-acetilglucosamina pirofosforilase humana. A estrutura 3D deduzida

corresponde a uma proteína na forma de tigela, tendo o sítio ativo localizado na cavidade central, e um domínio C-terminal em forma de alça (*I-loop*) possivelmente envolvida na dimerização. Também foi observado que uma das duas formas da UGPase de álamo, que na época acreditava-se tratar-se de formas obtidas por *splicing* alternativo, tem a alça *I-loop* muito curta, sugerindo que pode haver diferença na capacidade de oligomerização das duas isozimas (GEISLER et al., 2006).

2.7 Clonagem do gene/ cDNA *ugp*

Clones de cDNA que codificam UGPase têm sido isolados a partir de bibliotecas de cDNA obtidas de diversos organismos como, por exemplo, fígado humano (PENG; CHANG, 1993), levedura (DARAN et al., 1995) e cevada (EIMERT et al., 1996), sendo que suas seqüências encontram-se disponíveis em bancos de dados de acesso público, via Internet.

Em plantas, a seqüência completa do cDNA que codifica a UGPase foi clonada pela primeira vez de tubérculos de batata por Katsube e colaboradores (1990) que utilizaram uma biblioteca de cDNA previamente elaborada por Nakano; Mori e Fukui (1989) e sondas de oligonucleotídeos sintetizados com base na seqüência parcial de aminoácidos da enzima. Uma ORF de 1431 pb com início no códon de iniciação ATG e término no códon *nonsense* TAG, foi identificada como a unidade de tradução da UGPase, tendo a seqüência deduzida de aminoácidos 477 resíduos e peso molecular calculado de 51.783 Da.

Spychalla e colaboradores (1994) utilizaram uma biblioteca de expressão de cDNA de tubérculos de batata em fagos, e anticorpo policlonal anti-UGPase de Sowokinos; Spychalla e Desborough (1993). O maior clone isolado foi subclonado em pUC119 e seqüenciado em ambas as direções. O cDNA encontrado apresentou 1701 pb e uma ORF de 1431 pb, altamente homólogo ao descrito por Katsube e colaboradores (1990). As duas ORFs diferiram em apenas 26 bases, o que resultou em cinco diferenças na seqüência deduzida de aminoácidos.

A organização do gene que codifica a UGPase em batata foi determinada por Borovkov; McClean e Secor (1997) para a cv. Lemhi, a partir de biblioteca genômica λ FIXII. O gene clonado consiste de uma região estrutural de 6,6 kb e uma regulatória de 1 kb. A região estrutural contém 20 éxons e 19 íntrons. Foram identificados os sítios putativos de poliadenilação, de início de transcrição e TATA-box. A região regulatória contém um *enhancer*, supressor e regiões

responsáveis por expressão tecido-específica da UGPase. A sequência codante, com exceção de três bases, é idêntica ao cDNA de UGPase previamente clonado do cv. Danshaku-Imo. (KATSUBE et al., 1990).

A comparação de dois clones de cDNA de UGPase de batata (KATSUBE et al., 1990; SPYCHALLA et al., 1994) e um clone genômico (BOROVKOV; McCLEAN; SECOR, 1997) revelou apenas poucas diferenças na região codificadora. Segundo o último autor, as sequências são formas alélicas diferentes em cultivares diferentes.

A quantidade de informações sobre a sequência codificadora desta enzima disponíveis nos bancos de dados permitiu determinar um par de *primers* que pôde ser usado na amplificação do cDNA de tubérculos de batata da cultivar Bintje, pela reação de RT-PCR (GUTMANIS, 2003).

2.8 Regulação da expressão do gene *ugp* em plantas

A regulação da UGPase vegetal surpreendentemente ainda é pouco conhecida, seja através da expressão do gene *ugp*, seja pela atividade enzimática. Foi observado que sua atividade aumenta através da regulação ao nível transcricional, decorrente da deficiência de fosfato (CIERESZKO et al., 2001; CIERESZKO; JOHANSSON; KLECZKOWSKI, 2005; CIERESZKO; KLECZKOWSKI, 2005, 2006), pela diminuição do suprimento de sacarose às folhas (SPYCHALLA et al., 1994), pelo estresse causado por baixas temperaturas (SPYCHALLA et al., 1994; BOROVKOV et al., 1996; CIERESZKO; JOHANSSON; KLECZKOWSKI, 2001), pelo estresse por cádmio em raízes de ervilha (REPETTO et al., 2003), afetando o status dos carboidratos em geral nas plantas. A regulação da expressão do *ugp* pela sacarose pode refletir um complexo mecanismo de ativação por *feedback* já que a sacarose é o principal produto da UGPase em folhas.

Ao nível de proteína, sabe-se que a UGPase de cevada tem a capacidade de oligomerizar e depolimerizar, e a depolimerização pode ter importância na eficiência catalítica da enzima (MARTZ; WILCZYNSKA; KLECZKOWSKI, 2002; KLECZKOWSKI; MARTZ; WILCZYNSKA, 2005). Alexander e Morris (2006) observaram que a UGPase da cevada também pode se ligar às proteínas da família 14.3.3, que são proteínas regulatórias importantes em eucariotos. Eles verificaram que a maior categoria de proteínas que se liga às proteínas 14:3:3

era do metabolismo de carboidratos, como da biossíntese de sacarose a partir da triose fosfato, sugerindo que há regulação coordenada dessas vias.

Todavia, deve-se tomar cuidado na generalização dos dados obtidos para uma dada espécie. A regulação de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos em espécies arbóreas perenes pode diferir significativamente da regulação em plantas herbáceas, como a cevada ou *Arabidopsis* (GEISLER-LEE et al., 2006).

2.9 Superexpressão ou repressão do gene *ugp* em plantas

Um estudo do efeito do gene *ugp* no sentido antisense, utilizando uma construção com o cDNA clonado de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) em plantas da mesma espécie, que levou ao intenso decréscimo de até 96% na atividade da UGPase nos tubérculos, não afetou significativamente os conteúdos de sacarose, amido, glucose-6-P, frutose-6-P, glucose-1-P ou UDP-glucose, mas teve um aumento na proporção entre UDP-glucose e glucose-1-P. Os autores interpretaram este aumento como o desvio do fluxo de carboidratos em direção à síntese de amido atribuído aos 4% remanescentes da atividade da UGPase. Como os tubérculos de batata desenvolvem-se por meses, esta redução no fluxo de carboidratos não teve efeito no conteúdo daqueles açúcares nos tubérculos maduros, no crescimento, nem o desenvolvimento de plantas crescidas sob condições padrão (ZRENNER; WILLMITZER; SONNEWALD, 1993).

Por outro lado, Spychalla, Borovkov e seus colaboradores (1994 e 1996, respectivamente) desenvolveram um trabalho semelhante ao citado acima, mas onde os tubérculos das plantas transformadas foram submetidos a diferentes períodos de frio, visando analisar a atividade da UGPase sobre o “adoçamento” de tubérculos induzido por baixas temperaturas, que leva ao escurecimento da batata frita. Eles obtiveram batata transgênica com atividade enzimática de até 30% e 50% menor que a dos controles, respectivamente, sendo que este nível de inibição foi suficiente para reduzir o teor de sacarose em tubérculos. Spychalla et al. não encontraram diferenças significativas no conteúdo de glucose-1-P, glucose-6-P, frutose-6-P, UDP-glucose, glucose ou frutose, mas obtiveram uma redução estatisticamente significativa no conteúdo de sacarose, que foi associada à redução de atividade da UGPase depois de 3 e 6 semanas de armazenamento. Observaram também uma relação com atividade das enzimas sacarose sintase e ADP-glucose pirofosforilase-B propondo que a atividade da UGPase ou os níveis de UDP-

glucose intracelular poderiam influenciar a transcrição de genes metabolicamente relacionados, como já havia sido proposto por Maas e colaboradores (1990). Concluíram que a UGPase limita a taxa de síntese de UDP-glucose em tubérculos armazenados, podendo ser potencialmente usada para controlar o acúmulo de açúcar-reduzido durante o estoque a frio. Já Borovkov e colaboradores, cujo trabalho se diferenciou do anterior quanto à inibição adicional por ribozima e do uso de construção antisense com apenas um fragmento do cDNA, encontraram conteúdo de glucose e frutose nos tubérculos armazenados por 2 meses a 6°C até 10 vezes maior do que antes do armazenamento, e este conteúdo foi geralmente menor nos tubérculos transgênicos do que nos controles.

A divergência entre os resultados obtidos no primeiro trabalho e nos outros dois provavelmente deve-se aos diferentes estádios de desenvolvimento em que os produtos transgênicos foram analisados. O fluxo de carbono é consideravelmente diferente em tubérculos em fase de crescimento e em tubérculos maduros armazenados. No tubérculo em crescimento, a maior parte da sacarose produzida é convertida em amido, enquanto que no tubérculo armazenado o excesso de hexoses-fosfato formado do metabolismo do amido é convertido em sacarose.

A inibição antisense relativamente pequena de 30% na atividade da UGPase em folhas de *Arabidopsis* também levou à redução de sacarose e, de certo modo, de amido (JOHANSSON, 2003 apud KLECZKOWSKI et al., 2004). Esses dados indicam que a enzima pode atuar como fator limitante na síntese de carboidratos. Não se pode excluir a possibilidade de que a presença de 2 genes *ugp* em *Arabidopsis* pode interferir no efeito antisense com inibição diferencial de genes *ugp*.

Através da transformação genética de um híbrido de *Populus* com UGPase de *Acetobacter xylinum*, sob o controle duplo do promotor 35S (2 x 35S), Coleman e colaboradores (2007) demonstraram que é possível alterar a partição de carbono a favor da biossíntese de celulose, embora as mudanças gerais na planta resultassem em taxas de crescimento arbóreo reduzidas, redução nas taxas de crescimento na altura da planta e no diâmetro do caule, sendo as folhas mais numerosas e menores. As linhagens transgênicas também tiveram redução de açúcar solúvel e amido, além de aumento significativo na produção de celulose na parede secundária. O conteúdo de lignina diminuiu, apesar dessa redução não estar acompanhada de correspondente diminuição

na abundância de transcritos do gene da lignina. Quanto aos metabólitos, apresentaram significativo acúmulo de ácido salicílico glucosídeo.

Porém, um trabalho anterior de Coleman e colaboradores (2006), com tabaco, rendeu resultados quase que opostos aos de *Populus*. A superexpressão dos genes *ugp* e *SuSy* (sacarose sintase) (transformação individual e dupla) em tabaco resultou aumento significativo na altura das plantas e no conteúdo de celulose em várias linhagens transformadas individualmente e em todas de transformação dupla (efeito aditivo). Este fato sugere que há correlação entre a regulação dos dois genes e o crescimento em tabaco.

Da mesma forma, Maas et al. (1990) e Spychalla et al. (1994) já haviam proposto que a atividade da UGPase ou os níveis de UDP-glucose intracelular poderiam influenciar a transcrição de genes metabolicamente relacionados. Mas, ainda faltam trabalhos que analisem o efeito da superexpressão ou da inibição do gene *ugp* sobre a síntese de hemiceluloses componentes da parede celular, apesar da importância do produto da UGPase, o nucleotídeo-açúcar UDP-glucose, na rota metabólica de biossíntese de componentes da parede celular.

Neste sentido, recentemente Chen et al. (2007b) perceberam que a UGPase é essencial para a deposição de calose no processo da meiose na célula mãe do pólen de arroz e que sua cosupressão resulta em novo tipo de macho-esterilidade genética termosinsitiva. A calose é um polissacarídeo formado por ligações lineares de β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano que é um polissacarídeo importante na formação da parede celular do grão de pólen e, em algumas plantas, sob condições ambientais adversas, é depositado sobre os poros dos elementos de condução causando a queda de folhas de espécies caducifólias.

2.10 Modulação dos outros genes envolvidos na biossíntese de componentes da parede celular

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas para estudar o impacto da alteração do fluxo metabólico do carbono na composição da parede celular, por meio da superexpressão ou repressão de diferentes genes envolvidos no seu metabolismo.

No experimento elaborado por Nascimento (2005) de modulação do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana*, o efeito antisense em plantas transgênicas de tabaco resultou em acúmulo estatisticamente significativo de arabinose e de ácido glucurônico no caule. O gene *miox* codifica a enzima mio-inositol oxigenase, que sintetiza o UDP-glucuronato. Na continuidade, a superexpressão do mesmo gene *miox2* de *Arabidopsis* em plantas de tabaco (CONTI, 2007) não provocou alterações no conteúdo dos monossacarídeos precursores da parede celular das plantas transgênicas. A dificuldade de se alterar o conteúdo dos componentes hemicelulósicos pela modulação da expressão do gene *miox2* pode ser devida à ação da rota metabólica alternativa, mediada pela enzima UGDH (Figura 3). Talvez, a preferência por uma via ou por outra é determinada pelo tecido em que a síntese de UDP-D-ácido glucurônico está ocorrendo. A via de inositol oxigenase requer oxigênio ao passo que a outra via pode acontecer sob condições anaeróbicas, como no xilema. Ainda que a via de oxidação do inositol seja alterada, o ácido UDP-D-glucurônico será produzido a partir do UDP-D-glucose.

Em outro trabalho, Bertolo (2007) superexpressou em tabaco o gene *uxs* (clonado da ervilha) que codifica a enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase e que converte UDP-D-glucuronato em UDP-D-xilose, importante nucleotídeo-açúcar. A análise da parede celular primária das plantas transgênicas obtidas mostrou que não ocorreram alterações na proporção dos monossacarídeos e na quantidade de celulose. Em algumas plantas transgênicas *uxs* foram observadas diferenças na proporção de galactose não esterificada. Com relação à parede celular secundária, algumas linhagens transgênicas apresentaram maior concentração de lignina solúvel relacionada a uma redução no conteúdo de lignina insolúvel.

O terceiro trabalho neste sentido, desenvolvido no Laboratório Max Feffer, analisou o impacto da superexpressão do gene *ugdh* da enzima UDP-glucose desidrogenase que produz o UDP-glucuronato (um dos principais precursores de polissacarídeos hemicelulósicos da parede celular) a partir de UDP-glucose, em plantas transgênicas de tabaco (BRAGATTO, 2007). A análise da composição química da parede celular secundária do tecido xilemático mostrou que as plantas transgênicas apresentaram aumento do conteúdo de xilose, embora não significativo e um aumento de arabinose significativo em três linhagens transgênicas. Houve redução na relação hexoses/pentoses em todas as linhagens transgênicas. No tecido foliar houve redução significativa no conteúdo de monossacarídeos da parede celular primária.

As diferenças na composição química de carboidratos tanto de reserva como estruturais, entre linhagens selvagem e transgênicas foram mínimas quando Park e colaboradores (2007) superexpressaram SPS (sacarose fosfato sintase). Mas, todas as plantas transformadas tiveram aumento significativo na altura do caule, atribuído à elongação de internos, maior diâmetro caulinar, fibras mais longas e maior biomassa seca, em relação às plantas controle. A correlação entre maior conteúdo de sacarose no caule e os fenótipos das plantas com elevada expressão do gene SPS confirma o papel da disponibilidade da sacarose no crescimento da planta e elongação das fibras.

Alterações bastante discretas, estatisticamente não significativas, no conteúdo de monossacarídeos componentes da parede celular, além da ausência de alterações morfológicas, foram obtidas através da modulação sense e antisense do gene UGE1 (UDP-glucose 4-epimerase) que cataliza a reação reversível de UDP-glucose em UDP-D-galactose, em *Arabidopsis* (DÖRMANN; BENNING, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organograma de execução do trabalho

A execução deste trabalho seguiu o organograma apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Organograma de execução do trabalho

3.2 Clonagem do cDNA codificador da enzima UGPase

Duas seqüências codificadoras da enzima UGPase foram utilizadas neste trabalho. Para a avaliação dos efeitos da sua superexpressão em plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) utilizou-se a seqüência já clonada por Gutmanis (2003) a partir do cDNA do gene *ugp* encontrado em tubérculos de batata, e para a avaliação dos efeitos da superexpressão desse gene em plantas de *Eucalyptus grandis* (eucalipto) utilizou-se a seqüência codificadora da enzima UGPase clonada a partir do próprio eucalipto.

A seqüência consenso do cDNA clonado de batata apresenta 1402 pb, sendo que 12 delas não foram identificadas, e a correspondente seqüência deduzida de aminoácidos, 467 aminoácidos, representada na Figura 5 de acordo com o código IUPAC (Anexo A). Os tamanhos são próximos ao tamanho da ORF (1434 pb) e a da proteína deduzida (477 aminoácidos) obtidos para a UGPase de tubérculos de batata por Katsube et al. (1990), Spychalla et al. (1994), Borovkov; McClean e Secor (1997) e Sowokinos; Vigdorovich e Abrahamsen (2004). O tamanho menor (-32 pb) encontrado deve-se a dificuldade no sequenciamento da extremidade 3'.

Neste cDNA é possível encontrar três resíduos lisina (K^{263} , K^{329} , K^{367}) em posições idênticas às citadas em estudos anteriores sobre UGPase de tubérculos de batata, que são críticos para a catálise (K^{367}) e para a ligação do substrato (K^{263} e K^{329}) pirofosfato e/ou α -D-glucose 1-fosfato à enzima (KATSUBE et al., 1991; KAZUTA et al., 1991). As posições dos três resíduos lisina no sítio ativo putativo da enzima são conservadas na enzima do fígado bovino (K^{291} , K^{357} , K^{396}) (KONISHI et al., 1993), duas são encontradas na seqüência protéica de *Saccharomyces cerevisiae* (K^{280} , K^{388}) (DARAN et al., 1995), e pelo menos uma (K^{287}) é conservada na seqüência de *E. coli* (HOSSAIN et al., 1994).

A seqüência deduzida de aminoácidos da UGPase de batata contém dois sítios putativos de N-glicosilação que podem estar relacionados com o direcionamento intracelular da proteína. Em plantas, a maioria das enzimas relacionadas à parede celular e membrana são N-glicosiladas. A seqüência reconhecida pelo aparato de glicosilação é N-X-S/T, onde X significa qualquer aminoácido menos prolina (STAEHELIN; MOORE, 1995). A atividade da UGPase ligada à membrana pode estar envolvida com o fornecimento de UDP-glucose para a biossíntese de componentes da parede celular, incluindo β -glucanos e celulose (KLECZKOWSKI, 1994).

```

ATGGCTACTGCTGCTACTCTTTCTCTGCTGAGTCCGAAAAGCTCAACAATCTCAAATCT 60
M A T A A T L S P A E S E K L N N L K S 20
GCCGTCGCCGGTCTTAATCAAATCAGTGAAAATGAGAAATCTGGATTATTAACCTTGTC 120
A V A G L N Q I S E N E K S G F I N L V 40
GGTCGCTATCTAAGTGGAGAAGCGCAACACATTGACTGGAGTAAGATCCAGACGCCAACT 180
G R Y L S G E A Q H I D W S K I Q T P T 60
GATGAGGTGGTGGTGCCATATGACAAGTTAGCACCTCTTTCTGAAGATCCCGCAGAGACT 240
D E V V V P Y D K L A P L S E D P A E T 80
AAGAAGCTTTTGGACAAACTTGTGTCTGAAGCTCAATGGAGGCTTGGGAACAACAATG 300
K K L L D K L V V L K L N G G L G T T M 100
GGATGCACTGGTCCCAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGACATTCCTTGACTTG 360
G C T G P K S V I E V R N G L T F L D L 120
ATTGTCAAGCAAATTGAGGCCCTCAATGCCAAATTCGGATGCAGTGTTCCCTGCTTTTG 420
I V K Q I E A L N A K F G C S V P L L L 140
ATGAATTCGTTCAACACCCATGATGATACACTGAAGATTGTAGAAAAATATGCGAACTCA 480
M N S F N T H D D T L K I V E K Y A N S 160
AACATTGATATTCATACATTCAATCAGAGCCAGTACCCTCGCTGGTTACGGAAGACTTT 540
N I D I H T F N Q S Q Y P R L V T E D F 180
GCCCCACTTCCATGCAAAGGCAATTCTGGAAAAGATGGNTGGNACCCTTCANGTCATGGT 600
A P L P C K G N S G K D G W X P S X H G 200
GATGTTTCCNTTCTTTGATGAATAGTGGAAGCTTGGTGCACTACTAACCAGGAAAG 660
D V F X S L M N S G K L G A L L T K G K 220
GAATATGTTTTGTNGCAAATTAAGATAACTTGGGTGCCATTGTTGATTGAAAATCTTA 720
E Y V F V A N * D N L G A I V D L K I L 240
GATATTCTATCTGATCNTAACCAAAATAGATATGGCATGGAGGTNACTCCCAAACTTTA 780
D I H L I X T K I E Y G M E V T P K T L 260
GTGTCAAAGGTGGCNCITTAATCTCATATGAAGGAAAAGTNCAGCTGCTGGAATAGCA 840
V V K G G X L I S Y E G K V Q L L E I A 280
CAAGCCCNIGATGAACATGTCAATGAATCAAGTCAATTGAAAAATTCAAAATTTTCAAT 900
Q A X D E H V N E F K S I E K F K I F N 300
ACCAACAACCTTGTGGGTGAATCTGAGTGTCTATTAAGAACTTGTAGAAGCAGATGCACTC 960
T N N L W V N L S A I K R L V E A D A L 320
AAGATGGAGATTATCCCAACCAAGGAAGTGGACGGAGTCAAAGTTCTTCAACTTGAA 1020
K M E I I P N P K E V D G V K V L Q L E 340
ACTGCTGCCGGTGTGCAATTAAGTTTTTTGACCGGGCAATTGGTGCTAATGTTCTCGA 1080
T A A G A A I K F F D R A I G A N V P R 360
TCTCGTTTCCTTCCCGTGAAAGCAACTTCAGATTGTGCTCCTTGTTTCAGTCTGATCTTTAC 1140
S R F L P V K A T S D L L L V Q S D L Y 380
ACCTTGACTGATGAGGGCTATGTTATCCGAAACCGGCCAGGTGCAATCCATCCAACCCA 1200
T L T D E G Y V I R N P A R S N P S N P 400
TCCATCGAGTTGGGACCTGAATTCAGAGGGTGGCCAACTTCTTAGGCCGTTTCAAGTCT 1260
S I E L G P E F K R V A N F L G R F K S 420
ATTCCCAGCATCATTGATCTAGATAGCTTGAAGGTGACCGGTGATGTATGGTTCGGATCC 1320
I P S I I D L D S L K V T G D V W F G S 440
GGCGTTACCTAAAGGGGAAAGTGACTGTTGCAGCCAAATCAGAGTGAAGCTAGAAATT 1380
G V T L K G K V T V A A K S G V K L E I 460
CCAGATGGTGTGTGNNGCCAC
P D G A V X P

```

Figura 5 – Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do cDNA da UGPase clonado de tubérculo de batata. A sequência de nucleotídeos encontra-se numerada na direção 5'-3', e a sequência de aminoácidos está numerada a partir do sítio de início de tradução. Na sequência deduzida de aminoácidos, os motivos para N-glicosilação estão sombreados, os resíduos lisina, homólogos àqueles considerados de importância crítica para o funcionamento da UGPase em tubérculos de batata, estão circulos, e os motivos conservados estão sublinhados

Na proteína deduzida a partir do cDNA clonado encontram-se três sequências (91-122, 194-224, 338-367) semelhantes aos motivos conservados registrados por Flores-Díaz et al. (1997), em posições praticamente idênticas (90-121, 193-223, 337-366).

O cDNA que codifica a enzima UGPase no eucalipto foi clonado da mesma forma que o da batata, sem a necessidade de construção de bibliotecas e de sondagens, por meio da técnica de RT-PCR que pode amplificar a região codificadora (ORF) de um gene, a partir do seu mRNA. Desde que as seqüências que delimitam sua ORF sejam conhecidas, um par de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) pode ser quimicamente sintetizado e usado para amplificar esse fragmento, a partir do cDNA, em quantidade suficiente para a clonagem em um vetor (SCHARF; HORN; ERLICH, 1986; SCHARF, 1990).

3.2.1 Definição dos *primers* que abrangem a ORF de *ugp* de *E. grandis*

A seqüência do gene que codifica a enzima UGPase em eucalipto ainda não foi depositada nos bancos de dados de acesso público como o NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). Desta forma, os *primers* que amplificam a ORF do *ugp* de eucalipto foram definidos com auxílio do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), através da seqüência de 21 nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de genes ortólogos (homólogos que apresentam a mesma função em organismos diferentes) em outra espécie arbórea e de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de eucalipto obtidos do Genoscope (*Centre National de Séquençage* - <http://www.genoscope.cns.fr/>).

A clonagem do cDNA que codifica a UGPase foi feita com o auxílio do Sistema Gateway™ de clonagem da Invitrogen (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002). Assim, a seqüência de direcionamento CACC do sistema Directional TOPO® foi adicionada à extremidade 5' do *primer forward*. Com a ajuda das páginas eletrônicas http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi e <http://www.operon.com> (*bioinformatics – oligo analysis & plotting tool*) verificou-se a viabilidade destes *primers* relacionada à porcentagem de C/G, temperatura de anelamento (Tm) e ausência de auto-complementariedade. Estes *primers* foram sintetizados pela Invitrogen.

O par de *primers* específico para a amplificação da ORF do *ugp* de batata é o mesmo que havia sido desenhado e sintetizado para a clonagem do cDNA: *forward* [5'-ATGGCTACTGCTRCTACTCTT-3'] e *reverse* [5'-CTATATATCCTCAGGTCCATT-3'].

A confirmação da eficiência desses pares de *primers* foi verificada por meio de PCR utilizando-se o DNA genômico como fita molde.

3.2.2 Extração de RNA

O RNA total das plantas foi extraído inicialmente para a síntese de cDNA, empregado na clonagem do gene *ugp* e, depois, para a análise por RT-PCR em tempo real. O reagente Trizol[®] (Invitrogen, catálogo nº 15596-026) foi utilizado para a extração de RNA total a partir de cada tecido vegetal (folha ou caule), de plantas de tabaco ou de eucalipto, conforme normas do fabricante, desenvolvidas a partir de Chomczynski e Sacchi (1987), como descrito abaixo.

Para evitar a degradação do RNA por RNases, todas as soluções e reagentes foram preparados com água ultrapura 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). A vidraria e porcelanas utilizadas foram previamente esterilizadas a seco, a 200°C, por 6 horas.

A quantidade de 200 mg de tecido vegetal foi macerada em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado foi transferido a um tubo de centrifuga (15 ml) contendo 1ml de Trizol[®], seguido de agitação rápida em vórtex e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo foi igualmente dividido em 2 tubos Eppendorf aos quais adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio. Esse foi, então, agitado vigorosamente por 15 segundos e incubado à temperatura ambiente por 3 minutos, antes da centrifugação a 10.000 g, por 15 minutos, a 4°C. A fase superior foi cuidadosamente transferida para novo tubo livre de RNase ao qual adicionou-se 500 µl de isopropanol. A amostra foi misturada seguida de repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação a 10.000 g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% (v/v) preparado em água tratada com DEPC 1%, centrifugado a 7.500 g, 4°C, por 5 minutos e seco à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos antes de ser ressuspensionado em 50 µl de água tratada com DEPC 1% (v/v), seguido de incubação por 10 minutos a 55°C.

3.2.3 Quantificação de RNA total

A quantificação das amostras de RNA foi realizada em espectrofotômetro, sendo a concentração calculada, para uma cubeta de 10 mm, através da equação:

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

onde A_{260} = absorvância da amostra sob o comprimento de onda de 260 nm;
 Fc = fator de conversão no qual 1 unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg RNA/ml (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989);
 Fd = fator de diluição da amostra de leitura, no caso, 200 (4 µl de amostra em 800 µl água tratada com DEPC);
 1000 = fator de correção para obter-se a concentração em µg/µl.

A qualidade do RNA foi analisada com base na relação A_{260}/A_{280} , onde valores entre 1,6 e 2,0 indicam boa qualidade do RNA extraído. A qualidade também foi observada através de eletroforese em gel de 1 % agarose em tampão TAE 1X (Anexo B) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Para isso, o volume correspondente a 1 µg de RNA em 7,5 µl de Mix (Anexo C) foi desnaturado a 65°C por 10 minutos, seguido de 5 minutos no gelo, antes de ser aplicado no gel que foi submetido a 75V por 30 minutos. A cuba de eletroforese e seus componentes foram previamente lavados com SDS 0,1% e enxaguados com água previamente tratada com DEPC 1% para estar livre de RNases.

Para armazenar a amostra até o momento de uso, cada alíquota foi precipitada completando-se o volume de RNA para 250 µl com TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), 25 µl de acetato de sódio 2,5 M pH 5,3 e 500 µl etanol absoluto e mantida a -80°C.

3.2.4 Purificação de mRNA a partir do RNA total

O RNA mensageiro (mRNA) foi purificado a partir do RNA total utilizando-se o *Dynabeads[®] mRNA Purification kit* (Dyna), seguindo-se as recomendações do fabricante. Esse kit baseia-se no pareamento de bases entre os resíduos poli A presentes na extremidade 3' da maioria dos mRNA e resíduos oligo dT covalentemente ligados à superfície dos *Dynabeads Oligo (dT)₂₅*. Outros tipos de RNA desprovidos de cauda poli A não hibridizam aos *Dynabeads Oligo (dT)₂₅* e são prontamente eliminados.

A amostra de RNA total, numa diluição de 50 µg em 100 µl de água ultrapura tratada com DEPC, foi aquecida a 65°C por 2 minutos para que as estruturas secundárias fossem rompidas. Enquanto isso, 200 µl (1 mg) de *Dynabeads Oligo* (dT)₂₅ foram transferidos do estoque para um tubo Eppendorf 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 é feita removendo-se o tubo do magneto, ressuspensando os *Oligo* (dT)₂₅ em 100 µl de tampão de ligação e recolocando o tubo no magneto. Depois de 30 segundos, o sobrenadante foi pipetado e o tubo, contendo os *Oligo* (dT)₂₅ limpos, removido do magneto.

Aos *Oligo* (dT)₂₅ adicionou-se 100 µl do tampão de ligação (*Binding Buffer*) (Anexo D) e 75 µg de RNA total. A homogeneização foi feita por rotação, por 5 minutos, à temperatura ambiente, no *mixer* que acompanha o kit.

Em seguida, a amostra homogeneizada foi colocada no magneto e depois de 30 segundos o sobrenadante foi removido. O tubo foi retirado do magneto e lavado duas vezes com 200 µl de tampão de lavagem B (*Washing Buffer B*) (Anexo E), com auxílio do concentrador magnético de partículas, da mesma forma como descrito acima, removendo-se completamente o sobrenadante entre cada lavagem.

Para a eluição do mRNA adicionou-se 20 µl de Tris-HCl 10 mM ao precipitado, seguido de aquecimento (65°C) por 2 minutos. Após o aquecimento, o tubo foi colocado imediatamente no magneto. O mRNA eluído foi transferido para um tubo novo livre de RNases.

3.2.5 Reação de RT-PCR para síntese do cDNA de *ugp*

A reação de RT-PCR, síntese de cDNA sobre um molde de mRNA e amplificação por meio de PCR, foi realizada utilizando-se amostra de mRNA extraído do xilema de eucalipto e *primers forward* e *reverse* específicos para a ORF do gene *ugp*, com auxílio do kit Super Script[™] One-step RT-PCR with Platinum[®] *Taq* (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante.

Para cada reação adicionou-se 25 µl de Mix de Reação (tampão contendo 0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO₄) fornecido pelo kit, 8 µl mRNA (a partir de 75 µl de RNA total), 1 µl de cada *primer* 10 µM, 1 µl RT/ Platinum[®] *Taq* e água ultrapura autoclavada em q.s.p. 50 µl.

O programa utilizado no termociclador para a reação de amplificação foi: 50°C por 30 minutos (síntese de cDNA), 94°C por 2 minutos (pré-desnaturação) e 38 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1,5 minuto (alongamento), seguido de uma extensão adicional por 5 minutos, a 72°C.

A identificação do produto de amplificação obtido da reação de RT-PCR, utilizando-se o mRNA de batata e os *primers* específicos para a ORF do gene *ugp* foi feita por meio de eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão TBE 0,5 X (Anexo F), submetido a corrente de 75 V por 60 minutos, tendo como marcador de peso molecular 1kb DNA *Ladder* (Fermentas), todos acrescidos de tampão de amostra (Dye IV) (Anexo G) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O tamanho esperado corresponde a 1.434 pb, equivalente a 477 aminoácidos. As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/μl) sobre luz ultravioleta.

3.3 Clonagem do cDNA no vetor pENTR/D–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® (Figura 6) utilizando-se o kit pENTR Directional TOPO® Cloning (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante. Este kit permite a clonagem de produtos de reação de PCR sem extremidades coesivas no vetor do Sistema Gateway™ onde uma recombinação sítio-específico possibilita a clonagem do inserto na orientação correta com eficiência igual ou superior a 90%.

O vetor pENTR/D–TOPO® (2.580 nucleotídeos) é composto de:

- T2 sequência de terminação de transcrição *rrnB*: bases 268-295
- T1 sequência de terminação de transcrição *rrnB*: bases 427-470
- sítio *primer* M13 *forward*: bases 537-552 (5' GTAAAACGACGGCCAG 3')
- *attL1* (permite clonagem no vetor de destino Gateway™): bases 569-668
- sítio específico único da enzima de restrição *NotI* (5' GC/GGCCGC 3')
- sítio 1 de reconhecimento TOPO® : bases 680-684 (5' CCCTT 3')
- sequência de sobreposição (*overhang*): bases 685-688 (5' CACC 3')
- sítio 2 de reconhecimento TOPO® : bases 689-693 (5' AAGGG 3')

- sítio específico único da enzima de restrição *AscI* (5' GG/CGCGCC 3')
- *attL2* (permite clonagem no vetor de destino Gateway™): bases 705-804
- sítio *primer M13 reverse*: bases 845-861 (5' GTCATAGCTGTTTCCTG 3')
- gene de resistência à canamicina para seleção em *E. coli*: bases 974-1783
- origem de replicação (*ori*) pUC: bases 1904-2577

Figura 6 – Representação esquemática da construção do vetor pENTR/D-TOPO® com a indicação do sítio de clonagem delimitado por sítios de restrição únicos. O gene quimérico foi inserido entre os sítios de reconhecimento TOPO

Em cada reação TOPO® Cloning foram utilizados 1 µl de solução salina (NaCl 1,2 M; MgCl₂ 0,06M), 2 µl de água ultrapura autoclavada, 1 µl do vetor pENTR/D-TOPO® e 2µl do produto da RT-PCR (volume final de 6 µl). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos.

Logo em seguida, o vetor pENTR/D-TOPO® recombinante foi inserido em células de *E. coli* One Shot® TOP10 quimicamente competentes (Invitrogen), via transformação química. O volume de 3 µl da reação TOPO Cloning foi adicionado a 25 µl de *E. coli*. A suspensão bacteriana foi então mantida em gelo por 5 minutos seguida de choque térmico a 42°C por 30 segundos, retornando ao gelo por mais 5 minutos. As células recombinantes foram ressuspensas em 250 µl de meio de cultura SOC (Anexo H) a 37°C e mantidas em agitador orbital (150 rpm), por 1 hora, antes de serem plaqueadas em meio LB sólido (Anexo I) seletivo, ou seja, acrescido de 50 µg/ml de canamicina. Os clones recombinantes putativos foram selecionados após um período de incubação de 16 horas, a 37°C.

3.3.1 Análise por PCR dos prováveis clones transformantes

A análise de clones putativos obtidos pela transformação de *E. coli* foi realizada por meio de PCR, utilizando-se um inóculo de cada clone resistente ao meio seletivo, juntamente com os *primers* específicos para a ORF do gene *ugp* e reagentes *Taq* Gen da Biosystems, conforme Anexo J. O inóculo foi adicionado à reação de PCR em câmara de fluxo laminar, com auxílio de um palito previamente enfiado a 180°C por 8 horas. O programa utilizado no termociclador foi o proposto no protocolo de transformação do vetor pENTR/D-TOPO®, onde uma incubação prévia a 94°C, por 10 minutos, rompe as células e inativa as nucleases. A amplificação propriamente dita foi obtida com 35 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturação), 1,5 minuto a 55°C (anelamento dos *primers*) e 2 minutos a 72°C (polimerização da fita complementar ao molde), complementado por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto de PCR (10 µl de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de 1% de agarose com tampão TBE 0,5% (Anexo F), a 75 V, por 60 minutos, tendo como marcador de peso molecular 1 kb de DNA Ladder (Promega), todos acrescidos de tampão de amostra Dye IV (Anexo G). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/µl) sobre luz ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.3.2 Extração de DNA plasmidial

Para confirmar a autenticidade desses clones recombinantes por meio de sequenciamento, extraiu-se o DNA plasmidial do clone PCR positivo utilizando-se *Plasmid Mini Kit* (QIAGEN). Uma colônia contendo o produto de amplificação referente ao gene de interesse foi utilizada como inóculo em 10 ml de meio LB líquido (Anexo I) suplementado com 50 µg/ml de canamicina sendo mantida em agitador orbital a 200 rpm, a 37°C, por 16 horas. Em seguida, uma fração (3 ml) foi sedimentada por meio de centrifugação a 3.500 g, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado bacteriano foi então utilizado para a extração de DNA plasmidial.

O protocolo de purificação do kit baseia-se na técnica modificada de lise alcalina pela adição dos tampões P1, P2 e P3 (Anexo K), seguida pela ligação do DNA plasmidial à resina de troca-aniônica Qiagen previamente equilibrada com tampão QBT (Anexo L). RNA, proteínas, pigmentos e impurezas de baixo peso molecular são removidos por meio de 2 lavagens com

tampão QC (Anexo L) de média salinidade. O DNA é eluído pelo tampão QF (Anexo L) de alta salinidade e, então, concentrado e desalinizado por meio de precipitação em isopropanol e lavagem com etanol 70%. O DNA resultante foi diluído em água para posterior seqüenciamento. A quantificação foi feita através de eletroforese em gel de 1% de agarose, tendo 50 e 100 ng de DNA λ (Promega) como padrão de peso molecular. As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/ μ l) sobre luz ultravioleta. O DNA plasmidial foi submetido ao seqüenciamento para obter-se a confirmação da clonagem.

3.3.3 Seqüenciamento de DNA no vetor TOPO[®] recombinante

O seqüenciamento de DNA foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular – CENA/ USP, através do “ABI PRISM 3100 genetic analyser” que consiste de uma plataforma automatizada com capacidade de analisar 16 amostras simultaneamente por eletroforese capilar. Antes de serem transferidas para o seqüenciador, as amostras de DNA foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em termociclador *GeneAmp 9700* e mantidas em gelo por 2 minutos.

As amostras foram seqüenciadas com o ABI PRISM *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems). Foram utilizados 2 μ l de TRR Mix, 3,2 pmoles de *primer* M13 *forward* (5'-GTAAACGACGGCCAG-3') ou *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 6 μ l de buffer 2,5X (200 mM Tris-HCL pH 9,0 e 5 mM MgCl₂) e 200 ng de DNA, em um volume final de 20 μ l. As amostras foram submetidas a um programa de 40 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.3.4 Análise do seqüenciamento de DNA

As seqüências de nucleotídeos obtidas dos seqüenciamentos foram comparadas com dados genéticos no *GenBank* por meio do programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997), disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, que permite a procura de uma proteína a partir de uma seqüência de nucleotídeos. A busca resulta em uma representação gráfica onde a linha vermelha que se estende por toda a parte superior representa a própria seqüência examinada, denominada *query*. As seqüências resultantes da busca são ordenadas por valores

decrecentes de *Score (Bits)*. À medida que o valor do *Score* decai (e o correspondente *E-value* aumenta), menor é o grau de similaridade.

Os resultados dos seqüenciamentos também foram confrontados com as seqüências da ORF do *ugp* de batata através do programa *Align*, disponível no mesmo *site*, que alinha duas seqüências, ou através do programa *ClustalW*, disponível na página eletrônica <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.

3.4 Análise da expressão dos cDNA clonados em *E. coli*

A análise da expressão da enzima UGPase da batata foi realizada utilizando-se o kit *E. coli Expression System with Gateway® Technology* (Invitrogen). Este sistema permite a expressão regulada de genes heterólogos em *E. coli* sob controle da região promotora do bacteriófago T7 resultando alta atividade e especificidade da RNA polimerase T7 (ROSENBERG, et al., 1987; STUDIER; MOFFATT, 1986; STUDIER et al., 1990).

Para isso, o cDNA clonado no vetor pENTR/D–TOPO®/*ugp* foi subclonado no vetor Gateway pDEST™17 (Invitrogen) (Figura 7), que é específico para expressão de proteínas heterólogas, e utilizada na transformação da linhagem DH5α de *E. coli*. A inserção do gene de interesse com o códon de início ATG, posicionado logo em seguida ao promotor T7 de expressão em procariotos, foi possível graças à presença dos sítios de recombinação compatíveis com o sistema Gateway de clonagem. Este vetor também insere um *tag* de 6 histidinas na região N-terminal da proteína heteróloga traduzida, que permite a sua purificação. Depois de clonado, o vetor pDEST™17 foi inserido na linhagem *E. coli* BL21-AI™, a bactéria hospedeira integrante do kit para a expressão de uma determinada proteína.

Na linhagem BL21-AI™ de *E. coli*, a expressão da RNA polimerase T7 se encontra sob controle do promotor *araBAD* (P_{BAD}) que, por sua vez, pode ser regulado positivamente e negativamente pelo produto do gene *araC* (OGDEN et al., 1980; SCHLEIF, 1992). *AraC* é um regulador transcricional que forma um complexo com L-arabinose. Na ausência deste substrato, a transcrição de *araC* é inibida pelo sítio I_2 . Quando a L-arabinose está presente no meio, o dímero *AraC* se une aos sítios inibidores I_1 e I_2 , o que permite que o AMPc una-se ao seu ativador, promovendo a expressão do promotor P_{BAD} .

Figura 7 – Representação esquemática do vetor pDEST™17 (6354 nucleotídeos) com a indicação do **T7** (promotor do bacteriófago T7), **RBS** (sítio de ligação do ribossomo – sequência Shine-Dalgarno), **ATG** (códon de iniciação), **6xHis** (tag para 6 resíduos de histidina que permite a posterior purificação da proteína traduzida), **attR1** e **attR2** (sítios de clonagem), **Cm^R** (gene de resistência ao cloranfenicol), **ccdB** (gene da proteína CcdB que interfere na DNA girase de *E.coli*), **T7 term** (região de terminação de transcrição), **Amp** (gene de resistência à ampicilina), **pBR322 ori** (origem de replicação) e **ROP** (controle de cópias do plasmídeo). O gene foi inserido direcionalmente por recombinação no sítio de clonagem

3.4.1 Clonagem do gene *ugp* no vetor pDEST™17

Para clonagem do gene no vetor de destino Gateway pDEST™17 utilizou-se o kit LR *Clonase™ Enzyme Mix* (Invitrogen) e cada um dos clones pENTR/D–TOPO®/*ugp*, conforme normas do fabricante.

Para cada reação adicionou-se 300 ng do vetor pENTR/D–TOPO®/*ugp* de batata ou de eucalipto, 300 ng do vetor pDEST™17, 4 µl de tampão de reação 5X LR *Clonase™*, 16 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e 4 µl de LR *Clonase™ enzyme mix*. A reação foi mantida por 3 horas a 25°C, e posteriormente inativada pela adição de 4 µg de proteinase K, e incubada por 10 minutos a 37°C.

Dessa reação, foram usados 2 µl para a transformação de 25 µl de células competentes de *E. coli* DH5α. As células foram mantidas no gelo por 30 minutos, submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos, imediatamente transferidas para o gelo, e recuperadas em 450 µl de meio SOC (Anexo H) à temperatura ambiente por 5 minutos. Após uma incubação a 37°C sob agitação constante (200 rpm) por 1 hora, foram transferidas para placas contendo meio LB sólido (Anexo I) acrescido de ampicilina (100 µg/ ml). Os clones recombinantes putativos foram obtidos após 16 horas a 37°C.

A confirmação da clonagem deu-se por meio da PCR utilizando-se um inóculo de cada um dos clones, juntamente com o *primer forward* específico para o promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') e o *primer reverse* específico para a ORF do cDNA clonado da batata ou do eucalipto, numa reação preparada conforme Anexo J. O inóculo foi adicionado à reação de PCR em câmara de fluxo laminar, com auxílio de um palito previamente enfiado a 180°C por 8 horas. O programa no termociclador iniciou-se com uma desnaturação prévia a 94°C, por 10 minutos, e a amplificação propriamente dita que foi obtida com 35 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturação), 1,5 minuto a 55°C (anelamento dos *primers*) e 2 minutos a 72°C (polimerização da fita complementar ao molde), complementada por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto de PCR (10 µl de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de 1% de agarose com tampão TBE 0,5% (Anexo F), a 75 V, por 60 minutos, tendo como marcador de peso molecular 1 kb de DNA Ladder (Invitrogen), todos acrescidos de tampão de amostra Dye IV (Anexo G). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/µl) sobre luz ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.4.2 Transformação da linhagem BL21-AI™ de *E. coli*

O vetor pDEST™17/*ugp*, foi extraído de células de *E. coli* DH5α conforme descrito no Item 3.3.2 e utilizado para a transformação química da linhagem de *E. coli* BL21-AI™ One Shot (Invitrogen). Para isso, 10 ng do vetor pDEST™17/*ugp* foram adicionados a 50 µl de células quimicamente competentes da linhagem BL21-AI™ que foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos, imediatamente transferidas para o gelo, antes da adição de 250 µl de meio SOC (Anexo H) à temperatura ambiente. Após uma incubação a 37°C sob agitação (200 rpm) por 1 hora, a suspensão bacteriana foi plaqueada em meio LB sólido (Anexo I) acrescido de ampicilina (100 µg/ ml). Os clones recombinantes putativos foram selecionados após 16 horas a 37°C.

3.4.3 Expressão da enzima UGPase em *E. coli*

Clones da linhagem BL21-AI™ recombinantes, selecionados em meio LB acrescido do agente seletivo ampicilina, foram analisados quanto ao nível de expressão da proteína UGPase

recombinante. Para isso, um inóculo de cada clone foi cultivado em 5 ml de meio LB (Anexo I) acrescido de 100 mg/L de ampicilina, a 37°C, sob agitação a 200 rpm, até atingir a DO_{600nm} entre 0,6 e 1,0. Uma alíquota dessas culturas foi usada como inóculo de uma nova cultura (diluição 1:20) mantida nas mesmas condições, até atingir a fase mid-log (DO_{600nm} = 0,4), adequada para a expressão gênica. A cultura bacteriana foi dividida em duas frações de igual volume. Em uma das frações adicionou-se L-arabinose filtrada na concentração final de 0,2% (p/v), necessária para indução da expressão da proteína UGPase no sistema de expressão em *E. coli* (Gateway® - Invitrogen). A fração desprovida de L-arabinose foi utilizada como controle. Assim, de cada colônia transformante foram obtidas uma cultura induzida e outra não-induzida pela L-arabinose.

Após a adição de L-arabinose, os tubos foram mantidos por 3 horas a 37°C sob agitação a 200 rpm, quando amostras foram coletadas (500 µl) e centrifugadas a 16.300 g, 4°C, por 1 minuto. O precipitado contendo tanto proteínas solúveis como as insolúveis, presentes em células íntegras, foi utilizado para as análises de SDS-PAGE.

Para isso, uma parcela (7,5 µl) do precipitado ressuspenso em 80 µl de tampão 1X SDS-PAGE (Anexo M) e o marcador de peso molecular *SDS-Page Standards – Broad Range* (Bio-Rad) (5 µl), foram submetidos à fervura por 2 minutos antes de serem aplicados no gel de poliacrilamida (Anexo N) (LAEMMLI, 1970) de 1,5 mm de espessura. As amostras foram submetidas à eletroforese a 75 V por aproximadamente 3 horas. Após a corrida, o gel foi corado com Comassie Blue R250 0,25 % (Anexo O) por 3-4 horas, sob agitação lenta (40 rpm), seguida de descoloração (ácido acético 7,5 % (v/v); metanol 10 % (v/v)) por 16 horas, com leve agitação. O gel foi armazenado umedecido com ácido acético 1% (v/v) em embalagem plástica. O perfil eletroforético obtido no gel entre as amostras induzidas e não induzidas por L-arabinose correspondeu à proteína exógena expressa e a comparação entre os diferentes clones no gel permitiu a escolha do clone de BL21-AI™/*ugp* com maior expressão da proteína, ou seja, aquela onde a banda correspondente à enzima mostrou-se mais espessa.

3.4.4 Digestão *in gel* e seqüenciamento da enzima UGPase

Os *spots* (área intensamente corada) correspondentes à enzima UGPase foram recortados do gel, lavados com água ultrapura e descorados *overnight* em 250 µl Solução de Descoloração (50% bicarbonato de amônio 25 mM / 50% acetoneitrila). Em seguida, os *spots* foram

desidratados com 20-30 μ l de acetonitrila até ficarem totalmente esbranquiçados (cerca de 10 min). A acetonitrila foi removida e as bandas reidratadas com 40 mM Ditioneitol (DTT) em 50 mM de bicarbonato de amônio em um volume suficiente para ficarem imersos (80-100 μ l), por 60 minutos, a 60°C. Para a alquilação, o DTT foi substituído por 50-80 μ l de 55 mM de iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amônio. As amostras foram então mantidas por 40 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. O líquido foi removido e os *spots* lavados com 200 μ l de 50 mM bicarbonato de amônio, por 3 horas, que depois foi substituído por 50 mM de bicarbonato de amônio por mais 3 horas. Após um pulso na centrífuga, o bicarbonato de amônio remanescente foi removido. Os *spots* foram completamente desidratados com 20 μ l de acetonitrila 100% e, depois de secos por 2-3 minutos, reidratados com 15 μ l de solução de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo 166 ng de tripsina por *spot*. Depois de homogeneizada a amostra, a digestão foi concluída a 37°C por 12 horas aplicando-se um volume de bicarbonato de amônio 25 mM suficiente para cobrir os *spots* (~20 μ l).

Após a digestão enzimática, a amostra foi submetida a um pulso em centrífuga, e o sobrenadante transferido para novo tubo (nessas etapas nada foi descartado). Para a completa eluição dos peptídeos, os géis foram cobertos com 35 μ l da solução [60% acetonitrila (v/v); 1% ácido fórmico (v/v)] e sonicados (40 KHz e 30 Watts, sonicador Ultra Som, Thronton-IPEC Eletrônica Ltda) em banho a 45°C, por 30-40 minutos. Foram feitas então, as seguintes adições, cada uma seguida de sonicação, pulso em centrífuga e recuperação dos sobrenadantes, que foram reunidos num mesmo tubo: 35 μ l 60% acetonitrila/ 1% ácido fórmico (mesma solução que a anterior); 35 μ l acetonitrila 100 %; 35 μ l de Solução de Eluição 7 [0.1 % TFA (v/v); 50% acetonitrila (v/v)] (*Montage*TM kit – Millipore); 30 μ l de acetonitrila 100 %. O volume das amostras foi reduzido a 30 μ l no *Speed Vac* (Concentrator 5301 – Eppendorf) à temperatura ambiente.

O sequenciamento dos peptídeos foi conduzido em plataforma LC/MS/MS (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) com espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/*time of flight* Q-ToF Ultima API (Waters). Através dos espectros produzidos, foram geradas as seqüências de aminoácidos utilizadas para a identificação da proteína que elas representam. As seqüências foram analisadas contra o banco de dados SwissProt (<http://ca.expasy.org>) utilizando-se a ferramenta BlastP do NCBI (ALTSCHUL et al., 1997). Na busca, considerou-se adequada o grau de identidade com seqüências do SwissProt que apresentaram probabilidade $\geq 85\%$.

3.5 Clonagem no vetor binário Gateway de transformação de plantas

O vetor binário Gateway pK7WG2D (Figura 8) de transformação genética das plantas possui os sítios de recombinação *attR1* e *attR2* (onde ocorre a inserção do fragmento de interesse) e o gene marcador *nptII* (neomicina fosfotransferase II) que permite a seleção de transformantes, em meio seletivo contendo canamicina (BEVAN; FLAVELL; CHILTON, 1983). Possui também o gene *EgfpER* que codifica a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), que permite a seleção visual das plantas transformadas sobre luz ultra violeta.

Os vetores pENTR/D–TOPO[®], tanto com o cDNA clonado a partir de tubérculos de batata como com o cDNA do *ugp* clonado a partir de eucalipto, estão flanqueados por sítios de recombinação *att* (*attL1* e *attL2*) que permitem a clonagem de forma direcional nos vetores que contêm sítios de recombinação compatíveis, como o vetor Gateway pK7WG2D (*attR1* e *attR2*), numa reação realizada pela Gateway LR *Clonase*[™] (Invitrogen) (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002).

Desta forma, a inserção do cDNA do gene *ugp* no vetor pK7WG2D deu-se nos sítios de clonagem *attR1* e *attR2*, localizados entre o promotor e o terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (ODELL; NAGY; CHUA, 1985). Utilizou-se 300 ng do vetor pENTR/D–TOPO[®]/*ugp*, 4 µl de tampão de reação LR *Clonase*[™] 5X, 4 µl de LR *Clonase*[™] *enzyme mix*, q.s.p. 20 µl de tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) e 300 ng do vetor Gateway pK7WG2D. A reação foi incubada por 3 horas a 25°C. Após a adição de 2 µl de Solução de Proteinase K (2 µg/ µl em Tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl₂ 2 mM; glicerol 50% v/v) a reação foi mantida por 10 minutos a 37°C.

As transformações de *E. coli* DH5α com os vetores pK7WG2D recombinantes (*ugp* de batata ou de eucalipto) foram induzidas por meio de choque térmico. A mistura composta de 1 µl de reação LR *Clonase*[™] e 25 µl de células quimicamente competentes foi mantida em gelo por 30 minutos, submetida a 42°C por 45 segundos, e imediatamente transferida para gelo. Após 5 minutos, acrescentou-se 450 µl de meio SOC (Anexo H) 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) e incubadas por 16 horas a 37°C para a seleção de clones recombinantes.

Figura 8 – Representação esquemática do T-DNA do vetor pK7WG2D com a indicação do gene *nptII* (gene que confere resistência à canamicina para seleção de plantas), promotor e terminador *nos* (promotor e terminador do gene nopalina sintetase), promotor e terminador *35S* (promotor e terminador do vírus do mosaico da couve-flor), *attR1* e *attR2* (sítios de recombinação), *ccdB* (gene da proteína CcdB que interfere na DNA girase de *E.coli*), *Cm^R* (gene de resistência ao cloranfenicol), *EgfpER* (amplificador do gene *gfp* que codifica a proteína verde-fluorescente, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), promotor *rolD* (promotor de *Agrobacterium rhizogenes*), **LB** e **RB** (respectivamente, bordas esquerda e direita do T-DNA)

3.6 Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor binário Gateway recombinante

O plasmídeo recombinante pK7WG2D/*ugp* foi purificado e utilizado na transformação da linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens* através de eletroporação, de acordo com Lilley (1993).

3.6.1 Purificação do plasmídeo pK7WG2D/*ugp* pelo método Miniprep

Uma colônia de *E. coli* DH5 α recombinante para o vetor pK7WG2D/*ugp* foi inoculada em 5 ml de meio de cultura LB (Anexo I) acrescido do antibiótico seletivo espectinomicina (100 μ g/ml) e após a incubação *overnight* a 37°C, sob agitação a 200 rpm, uma alíquota de 1,5 ml da cultura foi centrifugada a 15500 g, por 3 minutos. O *pellet* produzido foi ressuscitado e agitado em vórtex com 100 μ l de Solução I (Anexo P). Depois de 2 minutos no gelo, adicionou-se 200 μ l de Solução II (Anexo P), à temperatura ambiente, misturando-se levemente e incubando-se por 10 minutos no gelo. Após a adição de 150 μ l solução III (Anexo P) gelada, a amostra foi mantida no gelo por mais 10 minutos antes de ser centrifugada a 15500 g, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf ao qual acrescentou-se 2 μ l RNase (10 mg/ml). Depois de misturado e incubado por 20 minutos a 37°C, o DNA foi precipitado com 1 ml de etanol absoluto gelado e centrifugação a 15500 g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 μ l de etanol 70% gelado seguido de centrifugação por 5

minutos. O *pellet* foi seco em estufa, a 37°C, antes de ser ressuspensionado em 30 µl de água ultrapura autoclavada.

3.6.2 Transformação de *A. tumefaciens* com o plasmídeo pK7WG2D/*ugp* purificado

Um clone obtido a partir de uma única célula de *A. tumefaciens* da linhagem desarmada EHA 105 foi isolado em placa de Petri contendo meio AB (Anexo Q) (ISHIDA et al., 1996) sólido após 72 horas, a 28°C, e inoculado em 100 ml de meio AB líquido (Anexo Q), mantido a 200 rpm a 28°C, por 24 horas. Em seguida, 1 ml de inóculo dessa cultura foi transferido para frasco contendo 50 ml de meio AB líquido e mantido a 28°C, sob agitação (200 rpm) constante até atingir a fase logarítmica de crescimento ($0,6 < DO_{600nm} < 0,9$). Depois, as células foram concentradas por centrifugação a 3.300 g, 4°C, por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células passaram pelas seguintes lavagens intercaladas por centrifugações: tampão Hepes 1mM pH 7,0, água ultrapura autoclavada e tampão Hepes 1mM pH 7,0 com glicerol 10 % (v/v). O último precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de tampão Hepes 1mM pH 7,0 com glicerol 10%.

O plasmídeo pK7WG2D/*ugp* purificado foi inserido nas células de *A. tumefaciens* ressuspensionadas, por meio de eletroporação utilizando-se 80 µl de suspensão celular em tampão Hepes com glicerol acrescido de 50 ng do plasmídeo. As cubetas (0,2 cm de vão entre eletrodos) utilizadas foram submetidas a um pulso elétrico de 2,5 kvolts em eletroporador (Bio-Rad). As células foram então transferidas para 500 µl de meio SOC (Anexo H) e mantidas a 200 rpm e 28°C por 2 horas. Após esse período, alíquotas de 50 µl foram plaqueadas em meio AB sólido (Anexo Q) contendo espectinomicina (100 µg/ml), incubadas a 28°C, por 72 horas. A confirmação da inserção do plasmídeo na bactéria foi obtida por meio da PCR realizada da mesma forma como descrito no Item 3.3.1, com *primers* específicos para a ORF do *ugp* de batata ou de eucalipto.

3.7 Transformação genética de plantas de tabaco

Um clone de *A. tumefaciens* recombinante, na fase log de crescimento, contendo o vetor Gateway pK7WG2D/*ugp* derivado da batata, foi utilizado na transformação genética de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana), por meio de infecção de discos foliares

(HORSCH et al., 1985; DEROLES; GARDNER, 1988) previamente desinfestados, e posteriormente transferidos para placas de Petri (cerca de 25 discos por placa) contendo meio de cultura MS sólido (Anexo R) acrescido de vitaminas.

A indução dos diferentes estádios de desenvolvimento (*calli*, gemas, brotos, alongamento e enraizamento) foi obtida por diferentes concentrações dos reguladores de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA) (auxina), e Benzilaminopurina (BAP) (citocinina) adicionados no meio de cultura MS (MURASHIGE; SHOOG, 1962).

Como controle negativo do tratamento, utilizaram-se plantas transformadas com um clone de *A. tumefaciens* recombinante, contendo o vetor Gateway pK7WG2D desprovido do cDNA do gene de interesse, denominado controle Gateway (CG). Como controle negativo na cultura de tecidos utilizaram-se discos foliares não inoculados sobre meio de cultura igual ao tratamento, e como controle positivo foram utilizados discos foliares inoculados sobre meio de cultura igual ao tratamento, porém sem canamicina (agente seletivo).

Toda a manipulação foi realizada em câmara de fluxo laminar. O meio de cultura de todo o material vegetal foi renovado a cada 15 dias para não ocorrer o esgotamento de nutrientes nem inativação de antibióticos.

Os brotos que enraizaram e com aproximadamente 2 cm de altura foram transferidos para vasos contendo mistura de substrato organomineral (Plantmax HA) e vermiculita (granulação média) na proporção 2:1 (v/v) mantidos na câmara de crescimento controlado (Convion E15) sob regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro com fluxo luminoso de 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura de 25°C, cobertos por sacos plásticos transparentes, para garantir a constância do ambiente, que foram removidos depois de uma semana.

3.8 Seleção por PCR de plantas transformadas

Os brotos que enraizaram (geração T₀) foram avaliados quanto à presença do transgene por meio de PCR utilizando-se DNA genômico total extraído de folhas e *primers* específicos ao gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina.

3.8.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico total foi extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) de folhas de plantas de tabaco. Discos de 100 mg de tecido foliar jovem foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . As amostras depois de pulverizadas em cadinho de porcelana (previamente esterilizado a 200°C , por 8 horas), com auxílio de nitrogênio líquido, foram transferidas para tubos Eppendorf estéreis, contendo 700 μl de tampão de extração com β -mercaptoetanol (Anexo S), previamente aquecido (65°C), agitadas em vórtex e deixadas por 15-20 minutos a 55°C , com homogeneização suave em intervalos de 5 minutos. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos antes da adição de 600 μl de CIA (24:1 v/v clorofórmio e álcool isoamílico), seguida de homogeneização por inversão dos tubos (25 vezes) e centrifugação a 18.000 g, à temperatura ambiente, por 7 minutos.

O volume de 600 μl da fase superior foi transferido para novo tubo (evitando-se perturbar a interface), ao qual foram adicionados 200 μl de tampão de extração (Anexo S), porém sem β -mercaptoetanol. Foram feitas duas extrações adicionais com 600 μl de CIA, com homogeneização, centrifugação a 18.000 g, à temperatura ambiente, por 7 minutos, para completa remoção da interface.

A fase superior foi novamente transferida para novo tubo, a qual adicionou-se 600 μl de isopropanol para a precipitação do DNA. Após homogeneização suave a amostra foi centrifugada a 18.000 g, a 4°C , por 15 minutos.

O precipitado foi lavado com 600 μl de etanol 70% (v/v), e mantido a -20°C por 20 minutos, antes da centrifugação por 15 minutos, a 4°C , a 18.000 g. Após secagem, o precipitado foi ressuspenso em 30 μl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) acrescido de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase e mantido a 37°C , por 1 hora.

A qualidade e a quantidade de DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5% (Anexo F). Foram aplicados 5-10 μl da amostra e as bandas visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 $\text{ng}/\mu\text{l}$) sobre luz ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e comparadas com padrões de 25 e 50 ng de DNA.

3.8.2 Análise via PCR

A reação de PCR foi realizada como uma das etapas de confirmação da transgenia. Foi preparada conforme indicado no Anexo J, tendo o volume final de 25 µl. Foram utilizados o DNA genômico total extraído de folhas e *primers forward* (5'-GCTTGGGTGGAGAGGCTATT-3') e *reverse* (5'-GCGATACCGTAAAGCACGAG-3') específicos ao gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina. A amplificação ocorreu com 2 minutos iniciais a 94°C e 38 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 2,5 minutos a 72°C.

O produto de PCR (10 µl de cada reação) e o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega), acrescidos de tampão de amostra Dye IV (Anexo G) foram submetidos à eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão TBE 0,5% (Anexo F) com brometo de etídio (0,01 ng/µl) que permite a visualização das bandas sobre luz ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.9 Obtenção da geração T₁ e T₂ de plantas de tabaco e análises de segregação

As plântulas que apresentaram o produto de amplificação esperado na reação de PCR foram transferidas da câmara de crescimento para casa de vegetação (vasos de 8 litros) onde foram cultivadas por aproximadamente 2 meses, até atingirem o estado adulto reprodutivo. Estas plantas tiveram as inflorescências imaturas cobertas por sacos de papel para garantir a autofecundação e a coleta de suas sementes (geração T₁). A irrigação das mesmas foi diária alternando-se solução nutritiva (Ouro Verde 1 g/L) com água.

Uma parte dessas sementes (geração T₁) foi avaliada quanto ao padrão de segregação do gene de resistência à canamicina. As sementes foram desinfestadas, em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% (v/v) por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, 5 lavagens com água ultrapura autoclavada seguida de secagem sobre papel de filtro autoclavado, antes de serem semeadas em meio de cultura sólido, composto por metade da concentração dos macro e micronutrientes MS (MURASHIGE; SHOOG, 1962), sem sacarose, acrescido de canamicina (100 mg/L), em 3 placas com 100 sementes cada, por genótipo. Após 30 dias, a segregação obtida foi submetida ao teste de χ^2 por meio da seguinte equação:

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

onde: Or = número observado de plântulas resistentes;
 Er = número esperado de plântulas resistentes;
 Os = número observado de plântulas sensíveis;
 Es = número esperado de plântulas sensíveis.

Os genótipos cujas plântulas apresentaram apenas segregação de 3 resistentes: 1 sensível (DEROLES; GARDNER, 1988; BUDAR et al., 1986) significativa pelo teste de χ^2 para nível de significância de 5% e 1 grau de liberdade ($\chi^2 \leq 3,84$) foram semeados em vasos plásticos de 800 ml de capacidade contendo mistura na proporção 2:1 (v/v) de substrato organomineral (Plantmax HA) e vermiculita (granulação média) e mantidos na câmara de crescimento controlado (Convicon E15) sob regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com fluxo luminoso de 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura de 25°C. As plantas foram irrigadas diariamente alternando-se solução nutritiva (Ouro Verde 1 g/L) com água.

Quando maiores (aproximadamente 1 mês), dez plantas de cada genótipo foram transferidas para vasos de 8 L de capacidade, contendo o mesmo tipo de substrato, e distribuídos na casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado, onde foram autofecundadas. Uma fração de suas sementes (geração T₂) foi desinfestada e submetida à análise de segregação da mesma forma que as sementes T₁. Aqueles genótipos que não apresentaram segregação (100% resistentes), juntamente com o Controle Gateway, foram semeados e 15 plantas de cada genótipo foram cultivadas como descrito anteriormente para a geração T₁. Na fase inicial de floração, foi realizada a análise morfológica e coleta do material utilizado nas análises químicas e moleculares.

3.10 Transformação genética de eucalipto

Um clone de *A. tumefaciens* da linhagem EHA 105 recombinante, obtido como descrito no Item 3.6.2, contendo o transgene codificador da UGPase de eucalipto, foi utilizado na transformação genética de eucalipto (*Eucalyptus grandis* – clone 11 fornecido pela Suzano Papel e Celulose), por meio de infecção de micro-estacas mantidas em cultura *in vitro*, previamente submetidas à sonicação, e depois transferidas para placas contendo meio MS (MURASHIGE;

SHOOG, 1962) sólido, modificado conforme González e colaboradores (2002 a), pH 5,3,. Após a inoculação, as micro-estacas foram lavadas e as folhas transferidas para placas (70-80 folhas/placa) contendo meio sólido pH 5,7 acrescido de canamicina (30 mg/ L).

3.10.1 Regeneração de plantas de eucalipto transformadas

As brotações transformantes (T_0) foram regeneradas segundo o protocolo desenvolvido por González e colaboradores (2002 b), a partir das folhas retiradas das micro-estacas inoculadas. A regeneração deu-se por organogênese indireta em meio de cultivo constituído pela metade da concentração dos macronutrientes do meio MS, micronutrientes de MS, 3% (p/v) de sacarose e 0,6% de ágar, pH 5,8 e vitaminas MS-B (CID et al., 1999). Os diferentes estádios de desenvolvimento (indução de *calli*, desenvolvimento de gemas, multiplicação de brotos, alongamento e enraizamento) foram obtidos por diferentes concentrações dos reguladores de crescimento como ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) (auxinas), e benzilaminopurina (BAP) (citocinina).

Para controle negativo na cultura de tecidos utilizaram-se folíolos não inoculados sobre meio de cultura igual ao do tratamento, e como controle positivo utilizaram-se folíolos inoculados sobre meio de cultura igual ao do tratamento, porém desprovido de agente seletivo (canamicina).

Todas as manipulações foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

O meio de cultura foi renovado a cada 15 dias para não ocorrer o esgotamento de nutrientes nem inativação de antibióticos.

3.10.2 Extração do DNA genômico de eucalipto e análise por PCR

A confirmação da presença do transgene nos brotos transformantes foi feita pela análise de PCR utilizando-se os *primers forward* e *reverse* específicos ao gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina.

A extração e amplificação do DNA de folhas de eucalipto foi realizada com auxílio do *Extract-N-AmpTM Plant PCR Kit* (Sigma). O DNA foi extraído a partir de um pedacinho de tecido

foliar (~0,5 cm de diâmetro), obtido ainda na fase de cultura de tecidos, por incubação em 100 µl Solução de Extração (kit) a 95°C por 10 minutos, seguida da adição de igual volume de Solução de Diluição (kit) para neutralizar inibidores. Uma alíquota de 4 µl do extrato diluído foi acrescido a 10 µl *Extract-N-Amp PCR Reaction Mix* (contendo o tampão, sais, dNTPs e Taq polimerase, otimizados para uso com os reagentes de extração) juntamente com 0,4 µM de cada *primer* (*forward* 5'-GCTTGGGTGGAGAGGCTATT-3' e *reverse* 5'-GCGATACCGTAAAGCAC GAG-3'), num volume final de 20 µl. Depois de misturados os componentes, a reação foi submetida à ciclagem térmica por 3 minutos iniciais a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2 minutos a 72°C, seguida de uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

O produto de PCR (10 µl de cada reação) e o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), acrescidos de tampão de amostra Dye IV (Anexo G) foram submetidos à eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão TBE 0,5% (Anexo F) com brometo de etídio (0,01 ng/µl) que permite a visualização das bandas sobre luz ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Os brotos que enraizaram (geração T₀) e apresentaram o produto de amplificação esperado na PCR foram transferidos para vasos (800 ml) contendo uma mistura na proporção de 2:1 (v/v) de substrato organomineral (Plantmax HA) e vermiculita (granulação média), mantidos na câmara de crescimento sob condições controladas (Convicon E15) com regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro com fluxo luminoso de 250 µmol/m²/s e temperatura de 25°C. Quando as plantas estavam maiores, foram transferidas para casa de vegetação onde foram cultivadas e transplantadas para vasos de 4 L contendo o mesmo tipo de substrato. As irrigações foram diárias, alternando-se água e adubo Ouro Verde (1 g/L).

3.10.3 Análise molecular das plantas transgênicas de tabaco e eucalipto por *Southern blot*

A análise de *Southern blot* (SOUTHERN, 1975; SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) foi empregada para confirmação da integração do transgene no genoma, identificação do número de eventos de transformação independentes e para a determinação do número de cópias do transgene inserido. A análise foi aplicada em plantas T₂ de tabaco que não segregaram na seleção, ou seja, homozigotas para o gene *ugp* exógeno, tendo como controle uma linhagem de tabaco com o vetor Gateway desprovido do gene de interesse. Também foi aplicada em plantas

T₀ de eucalipto, tendo o clone 11 de eucalipto como controle do tratamento na transformação genética.

O DNA genômico dessas plantas foi extraído de folhas conforme descrito no Item 3.8.1. Uma alíquota de DNA genômico de cada genótipo a ser analisado foi digerida com uma enzima de restrição que não reconhece sítios internos à ORF do *ugp*. Com o auxílio do *web site* <http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html> – *New England Biolabs NEBcutter* – opção *List 0 cutters* definiu-se que poderiam ser utilizadas as enzimas *EcoRI* ou *HindIII*, entre outras. O DNA (20 µg) foi digerido com 50 unidades de enzima *EcoRI* ou *HindIII* (Invitrogen), de acordo com recomendações do fabricante, a 37°C, por 16 horas. O produto digerido foi precipitado pela adição de 1/10 do volume da amostra de acetado de amônia 7,8 M e 2,5 vezes o volume da amostra de etanol absoluto. As amostras foram deixadas a –20°C por 24-72 horas. Após a centrifugação a 18.000 g, por 40 minutos, a 4°C, o precipitado foi lavado com 600 µl de etanol 70%, seguido de centrifugação e secagem, antes de ser ressuscitado em 40 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A este volume adicionou-se 8 µl de sacarose 40% para aumentar-se a densidade da amostra a ser submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5 X (Anexo F), contendo brometo de etídio (0,01 µg/ml). Como marcador de peso molecular utilizou-se 1 kb DNA *Ladder* (Fermentas). O gel foi submetido a uma corrente de 35 V por 15 horas e fotografado juntamente com uma régua visível sobre luz ultravioleta que permite correlacionar a altura da banda obtida ao correspondente peso molecular do marcador.

O DNA foi desnaturado por uma série de lavagens do gel, em solução ácida (HCl 0,25 M) por 10 minutos para a depuração, básica (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 minutos para a desnaturação, e duas lavagens de 15 minutos cada para a neutralização (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M pH 7,2; EDTA 1 mM). Todas as lavagens foram intercaladas com enxágües em água ultrapura autoclavada.

A transferência por capilaridade do DNA do gel para a membrana de nylon carregada positivamente Hybond-N+ (Amersham Biosciences) foi realizada pela solução de transferência 20 X SSC (NaCl 3 M; Na₃ Citrate dihidratado 0,3 M; pH 7,0) por 16 horas, de acordo com Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989). O DNA foi fixado à membrana por meio de aquecimento (80°C) em forno, por duas horas.

Como sonda para hibridização na análise de *Southern blot* utilizou-se o produto de amplificação da reação de PCR do DNA do vetor Gateway com *primers* específicos para o gene *nptII*, que confere resistência à canamicina. Não foi utilizada uma sonda que se hibridiza ao gene quimérico porque a sequência do cDNA clonado a partir da batata tem alto grau de identidade (91%) com a CDS parcial de *Nicotiana tabacum* disponível no banco de dados (GenBank, acesso AB055502) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Portanto, uma sonda específica para o cDNA de batata iria abranger tanto o gene endógeno das plantas transformadas, como também o gene exógeno. Desta forma, o número de inserções do gene exógeno só seria determinado pelo diferencial em relação às plantas controles.

A sonda foi marcada de forma não radioativa, com auxílio do kit *Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), segundo normas do fabricante. Primeiramente, uma alíquota de 100 ng do DNA a ser usado como sonda foi desnaturada a 98°C, por 7 minutos, e transferida imediatamente para o gelo, por 5 minutos. A este DNA adicionou-se 10 µl de *Reaction Buffer*, 2 µl de *Labelling Reagent* (0,1 % w/v sodium azide) e 10 µl de *Cross-linker* (4,7 % v/v formaldeído) diluído 5x, fornecidos pelo kit. Depois de homogeneizada, a amostra foi incubada por 30 minutos a 37°C, sendo mantida no gelo até o momento de uso.

Todos os passos da hibridização foram realizados na câmara de hibridização. A membrana de nylon contendo o DNA fixado foi umedecida com 0,125 ml/cm² de Tampão de Hibridização (Anexo T) à temperatura de 55°C, durante 15 minutos. Essa solução foi recolhida para adição da sonda já marcada, que depois de misturada levemente retornou para a garrafa de hibridização. A hibridização se deu por 16 horas, à temperatura de 55°C. As lavagens de pós-hibridização da membrana foram realizadas em duas etapas. A primeira foi com 100 ml do Primeiro Tampão de Lavagem (Anexo U) a 55°C, por 10 minutos cada, no forno de hibridização, seguida de duas lavagens com 100 ml do Segundo Tampão de Lavagem (Anexo V), por 5 minutos, à temperatura ambiente.

A geração de sinal e detecção dos pontos de hibridização foi realizada com auxílio do kit *Gene Images CDP-Star Detection* (Amersham Biosciences). Assim, a membrana foi retirada do tampão de lavagem e sobre ela distribuiu-se homogeneamente 30 µl/cm² do Reagente de Detecção, fornecido pelo kit. A reação se deu durante 5 minutos. O excesso de líquido foi retirado com auxílio de uma régua, antes da selagem das bordas do saco plástico.

Numa câmara escura, um filme de autoradiografia foi exposto sobre à membrana hibridizada, mantida na ausência de luz no interior de um cassete de Raios X. A sensibilização do filme ocorreu devido à reação de decomposição do substrato quimioluminescente dioxetane (*CDP-Star*) catalisada pela fosfatase alcalina ligada à sonda. O tempo de exposição do filme foi variável, iniciando-se com 1 hora (o pico de luminescência atinge seu máximo em 4 horas). Após a exposição, o filme foi revelado manualmente em câmara escura por meio 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 corrente por 15 minutos.

O número de bandas visualizado em cada genótipo indica o número mínimo de cópias do transgene inserido, já que pode eventualmente ocorrer sobreposição de bandas de mesmo tamanho.

3.11 Quantificação da expressão gênica pela análise de PCR Quantitativa

A quantificação da expressão do transgene relativa à expressão de um gene de referência, neste caso a ubiquitina, foi realizada através da PCR Quantitativa (qPCR) a partir do cDNA. Este método é uma combinação da técnica de PCR e fluorescência utilizando-se a *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), que contém o marcador fluorescente SYBR Green I, que se intercala à dupla fita de DNA durante a reação. Assim, a geração de um sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade do produto de amplificação resultante da reação de PCR. A intensidade de fluorescência é monitorada após cada ciclo da PCR, o que possibilita a análise durante a fase exponencial da reação. Para obter resultados exatos e reprodutíveis, a eficiência da reação deve ser próxima a 100%, ou seja, a quantidade de DNA duplica após cada ciclo da fase exponencial.

a) Obtenção da 1ª fita de cDNA

A extração de RNA total foi realizada como descrito previamente no Item 3.2.2, a partir de um segmento do caule coletado a 20 cm de distância da base, entre as 10 e 11 horas da manhã. A partir de alíquotas de 50 µg de RNA total, o mRNA foi purificado, conforme descrito no Item 3.2.4. A 1ª fita de cDNA foi sintetizada com este mRNA e com auxílio do kit *SuperScript[™] III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen). Para cada reação foram usados 5 µl de mRNA, 1µl

de *random hexamers* (50 ng/ μ l), 1 μ l *Annealing Buffer* (ambos componentes do kit) e 1 μ l água ultrapura tratada com DEPC (1%). A reação foi incubada a 65°C, por 5 minutos e colocada imediatamente no gelo. A esta reação foram adicionados 10 μ l de 2X *First-Strand Reaction Mix* e 2 μ l *SuperScript III/RNase OUT Enzyme Mix* (componentes do kit). A formulação do *Reaction Mix* inclui 10 mM MgCl₂ e 1 mM de cada dNTP em tampão e a formulação do *Enzyme Mix* inclui uma transcriptase reversa. A reação foi incubada por 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 50°C e 6 minutos a 85°C, seguido de gelo.

b) Definição dos pares de *primers*

O alinhamento da sequência do gene *ugp* clonado de batata (Figura 5), usada neste trabalho, com a sequência parcial do gene *ugp* de tabaco (gi:17402532), disponível no banco de dados do NCBI, realizado com auxílio do programa ClustalW, verifica-se que o grau de similaridade entre as duas sequências é muito alto (Figura 9), o que dificulta a confecção de pares de *primers* específicos para o transgene. *Primers* baseados nas regiões mais divergentes resultariam em *dimers*, que comprometeriam as análises. Desta forma, para a análise de qPCR foram desenhados 3 pares de *primers* (Tabela 1): um par que amplifica uma região específica do gene *ugp* endógeno de tabaco, um par para uma região específica do gene da ubiquitina e um par de *primers* que amplifica uma região específica do terminador 35S, para determinar somente a expressão do gene *ugp* exógeno em plantas de tabaco.

Tabela 1 – Primers utilizados na qPCR, seu tamanho, temperatura de *melting*, porcentagem de citosinas-guaninas e tamanho do produto amplificado; UgpTabQ – *primer* específico para *ugp* endógeno do tabaco; TermQ – *primer* específico para *ugp* exógeno ao tabaco; UbiquQ – *primer* específico para o gene da ubiquitina

<i>Primer</i>		Tam.	Tm °C	CG %	Prod.
UgpTabQL	5' [TCA ATG CCA AGT ATG GAT GC] 3'	20	53,1	45,0	238
UgpTabQR	5' [GCC AAA GCA GGG AAA ACA T] 3'	19	54,0	47,3	
TermQL	5' [GCA GGT CAC TGG ATT TTG GT] 3'	20	55,6	50,0	111
TermQR	5' [GGT TTC GCT CAT GTG TTG AG] 3'	20	54,2	50,0	
UbiquQL	5' [AGA CAT TGA CTG GGA AGA CCA] 3'	21	59,5	47,6	203
UbiquQR	5' [GAG ACG GAG GAC AAG GTG AC] 3'	20	59,7	60,0	

inserto gi 17402532	AAGAAGCTTTTGGACAAACTTGTGCTCCTGAAGCTCAATGGAGGCTTGGGAACAACAATG 300 -----GGCTTGGGAACAACAATG 18 *****
inserto gi 17402532	GGATGCACTGGTCCCAAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGACATTCCCTTGACTTG 360 GGATGCACTGGTCCCAAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGACATTCCCTTGACTTG 78 *****
inserto gi 17402532	ATTGTCAAGCAAATGAGGCCCTCAATGCCAAATTCGGATGCAGTGTCCCTGCTTTTG 420 ATTGTCAAGCAAATGAGGCCCTCAATGCCAAATTCGGATGCAGTGTCCCTGCTTTTG 138 *****
inserto gi 17402532	ATGAATTCGTTCAACACCCATGATGATACACTGAAGATTGTAGAAAAATATGCGAACTCA 480 ATGAATTCGTTCAACACCCATGATGATACACTGAAGATTGTAGAAAAATATGCGAACTCA 198 *****
inserto gi 17402532	AACATTGATATTACATCATTCAATCAGAGCCAGTACCCTCGCCTGGTTACGGAAGACTTT 540 AACATTGATATTACATCATTCAATCAGAGCCAGTACCCTCGCCTGGTTACGGAAGACTTT 258 *****
inserto gi 17402532	GCCCCACTTCCATGCAAAGGCAATTCTGGAAAAGATGGNIGGNACCCTTCANGTCATGGT 600 TCCCCACTTCCATGCAAAGGCAATTCTGGAAAAGATGGATGGTACCCTCCAGGTCATGGT 318 *****
inserto gi 17402532	GATGTTTTCCNTTCTTTGATGAATAGTGGAAAGCTTGGTGCCTACTAACCAGGAAAG 660 GATGTTTTCCNTTCTTTGATGAATAGTGGAAAGCTTGGTGCCTACTAACCAGGAAAG 378 *****
inserto gi 17402532	GAATATGTTTTGTNGCAAATTAAGATACTTGGGTGCCATTGTTGATTGAAAATCTTA 720 GAATATGTTTTGTNGCAAATTAAGATACTTGGGTGCCATTGTTGATTGAAAATCTTA 438 *****
inserto gi 17402532	GATATTGATCTGATCNTAACCAAAATGAGTATGGCATGGAGGTTACTCCCAAACTTTA 780 AAT---CATTTGATCCAAACAAGAAGCAGTATTGCATGGAGGTTACACCAAACTTTA 495 **
inserto gi 17402532	GTTG---TCAAAGGTGGCNCCTTTAATCTCATATGAAGGAAAAGTNCAGCTGCTGGAATA 837 GCTGATGTCAAAGGTGGCACCCTAATCTCATATCAAGGAAAAGTACAGCTTTTGGAAATA 555 * *
inserto gi 17402532	GCACAAGCCNTGATGAACATGTCAATGAATCAAGTCAATTGAAAAATTCAAATTTTC 897 GCACAAGTGCCTGATGAACATGTCAACGAATTCAGTCAATTGAAAAATTCAAATTTTC 615 *****
inserto gi 17402532	AATACCAACAACCTTGTGGGTGAATCTGAGTGCTATTAAAAGACTTGTAGAAGCAGATGCA 957 AACACCAACAACCTTGTGGGTGAACCTGAATGCTATTAAAAGACTTGTAGAAGCAGATGCA 675 **
inserto gi 17402532	CTCAAGATGGAGATTATTCCTCAACCCAAAGGAAGTGGACGGAGTCAAAGTTCTTCAACT 1017 CTCAAGATGGAGATTATTCCTCAACCCAAAGGAAGTGGACGGAGTCAAAGTTCTTCAACT 735 *****
inserto gi 17402532	GAAACTGCTGCCGTGCTGCAATTAAGTTTTTTGACCGGGCAATTGGTGTCTAATGTTCT 1077 GAAACTGCTGCTGCTGCTGCAATTAAGTTTTTTGACCGGGCTAATGGTGTCTAATGTTCT 795 *****
inserto gi 17402532	CGATCTCGTTTCCTTCCCGTGAAAGCAACTTCAGATTGCTCCTGTTGAGTCTGATCTT 1137 CGATCTCGTTTCCTTCCCGTGAAAGCAACTTCAGATCTGCTGCTGTTCCAGTCTGATCTT 855 *****
inserto gi 17402532	TACACCTTGACTGATGAGGGCTATGTTATCCGAAACCCGGCCAGGTGCAATCCATCCAAC 1197 TACACCTTGACTGATGAGGGCTATGTTATCCGAAACCCGGCCAGGTGCAATCCATCCAAC 915 *****
inserto gi 17402532	CCATCCATCGAGTTGGGACCTGAATTCAAGAGGGTGGCCAACTTCTTAGGCCGTTTCAAG 1257 CCAGCTATCGAGTTGGGACCTGAATTCAAGAGGGTGGCCAACTTCTTAGGCCGTTTCAAG 975 ***
inserto gi 17402532	TCTATTCCCAGCATCATTGATCTAGATAGCTTGAAGGTGACCGGTGATGTATGGTTCCGA 1317 TCTATTCCCAGCATCATTGATCTAGATAGCTTGAAGGTGACCGGTGATGTATGGTTCCGA 1035 *****
inserto gi 17402532	TCCGGCGTTACCTTAAAGGGGAAAGTACTGTTGCAGCCAAATCAGGAGTGAAGCTAGAA 1377 TCTGGAGTTACTCTGAAGGGGAAAGTAACTGTTGCTGCCAAATCCGGAGTGAAGCTAGAA 1095 **
inserto gi 17402532	ATTCCAGATGGTGTGCTGTGNNGCCAC----- 1402 ATTCCAGATGGTGTGCTGTGNNGCCAC----- 1128 *****

Figura 9 – Clustal W entre o cDNA do *ugp* clonado da batata e o *ugp* de plantas de tabaco

Os *primers* foram sintetizados pela IDT – *Integrated DNA Technologies*.

A especificidade dos *primers* do gene *ugp* endógeno (amplifica um fragmento de 240 pb) e exógeno (amplifica um fragmento de 109 pb) sintetizados para a qPCR foi verificada através de reações de PCR utilizando-se o DNA genômico total extraído de folhas de plantas de tabaco selvagem e do vetor PENTR/D-TOPO/*ugp* de batata.

As reações foram preparadas conforme indicado no Anexo J, tendo o volume final de 25 µl. A amplificação foi realizada com 5 minutos iniciais a 94°C e 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1,5 minuto a 72°C, seguido de elongação final por 3 minutos a 72°C. O produto da reação de PCR (10 µl de cada reação) e o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega), acrescidos de tampão de amostra Dye IV (Anexo G) foram submetidos à eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão TBE 0,5% (Anexo F) com brometo de etídio (0,01 ng/µl) que permite a visualização das bandas sobre luz ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

c) Reações de PCR Quantitativa

As reações foram preparadas com 12,5 µl de *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG*, 9,5 µl água ultrapura tratada com DEPC, 1 µl cDNA (1ª fita) e 1 µl de cada *primer* 10mM (*forward* e *reverse*). As amostras foram feitas em triplicata e em três diluições (0,5, 10⁻¹ e 10⁻²) para possibilitar a normalização e o cálculo da eficiência do *primer*, respectivamente. Foram utilizados controles para a padronização de cada reação quanto à pureza da amostra (integridade do mRNA e ausência de contaminação com DNA na amostra de mRNA).

A análise foi realizada no aparelho IQ[™] 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio Rad). O perfil térmico das reações foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguidos por 45 ciclos de (95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos), seguidos de finalização com 95°C por 30 segundos e 60°C por 18 minutos.

d) Normalização dos dados obtidos pela análise de PCR Quantitativa

A normalização dos resultados obtidos na quantificação da expressão do transgene relativa à expressão do gene da ubiquitina, realizada através da qPCR, foi feita de acordo com Pfaffl (2001) e Pfaffl; Horgan e Dempfle (2002).

A quantidade de cada cDNA, relativa à quantidade do cDNA da ubiquitina, foi determinada por meio do programa REST© (*relative expression software tool*) e da planilha *Calculation Matrix for PCR Efficiency*, disponível na página <http://rest.gene-quantification.info/>, que utiliza-se da equação:

$$R = \frac{E_{\text{alvo}} (CP_{\text{controle alvo}} - CP_{\text{amostra alvo}})}{E_{\text{refc}} (CP_{\text{controle refc}} - CP_{\text{amostra refc}})}$$

onde:

- R = expressão relativa do gene alvo;
- E_{alvo} = eficiência da PCR com *primers* específicos para o gene alvo;
- E_{refc} = eficiência da PCR com *primers* específicos para o gene de referência (ubiquitina);
- CP = valor do *crossing point* de uma amostra .

3.12 Análise química dos componentes da parede celular primária em plântulas de tabaco e em folhas de eucalipto

A análise química da composição da parede celular primária em plântulas (caulíolo e folíolos juntos) das linhagens homozigotas de tabacos e da linhagem controle Gateway (CG) foi realizada pela determinação dos teores de monossacarídeos (arabinose, ramnose, galactose, glucose, xilose e manose) e ácidos urônicos (ácidos galacturônico e glucurônico) a fim de avaliar-se o efeito da superexpressão do gene *ugp* sobre a biossíntese de celulose e hemiceluloses.

A análise foi realizada considerando-se um grupo de 15 a 20 plântulas de cada genótipo de tabaco (Figura 10), com 4 repetições para cada análise. As plântulas foram obtidas a partir da germinação de sementes da geração T₂ homozigota cultivadas em vasos plásticos de 800 ml de capacidade contendo mistura na proporção 2:1 (v/v) de substrato organomineral (Plantmax HA) e vermiculita (granulação média) e mantidos na câmara de crescimento controlado (Convicon E15) sob regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com fluxo luminoso de 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura de 25°C. As plantas foram irrigadas diariamente alternando-se solução nutritiva (Ouro Verde 1 g/L) com água., até 1 mês após a germinação. Devido à presença de grande quantidade de amido no tecido foliar, as plântulas foram mantidas no escuro por 48 horas antes da coleta, para que houvesse o consumo de todo o amido presente nos tecidos. O material coletado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o momento de ser liofilizado a -50°C. O material liofilizado foi moído no moinho tipo micro-Wiley MA 048 (Marconi).

Figura 10 – Passos da obtenção de plântulas das linhagens de tabaco com transgene *ugp* para a análise da composição química da parede primária: **a)** sementes da geração T₂ cultivadas em vasos na câmara de crescimento; **b)** 7 dias após germinação; **c)** plântulas que foram mantidas 48 horas no escuro e depois colhidas

A mesma metodologia foi aplicada na análise dos componentes da parede primária de folhas da linhagem transgênica de eucalipto e da linhagem do clone 11 (controle selvagem) em fase juvenil, em 9 repetições.

a) Remoção de extrativos

Uma porção de aproximadamente 2 g da massa liofilizada de cada amostra foi submetida à remoção de extrativos solúveis (ácidos resinosos e graxos, ésteres, ceras, substâncias insaponificáveis e coloridas) através de solvente orgânico, em quatro extrações com 8 ml de etanol 80 % (aferido por alcoômetro de Gay Lussac), misturados em vórtex, seguido de banho-maria a 80°C, por 40 minutos, sendo o sobrenadante removido entre cada extração. Em seguida, o material foi lavado três vezes com água ultrapura, centrifugado a 4000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante removido entre cada lavagem. Depois de adicionado 5 ml DMSO (dimetil sulfóxido) 90% para a remoção de resíduos de amido, foi mantido em agitador a 180 rpm à temperatura ambiente por 16 horas, seguido de três lavagens com água iguais às da fase anterior, de acordo com a metodologia descrita por Selvendran e O'Neill (1987). O material foi liofilizado por 48 horas a -50°C.

Para a hidrólise das hemiceluloses adotou-se a metodologia de Dubois et al. (1956). Do resíduo completamente seco foram transferidos 5 mg para tubos Eppendorf (2 ml) aos quais adicionou-se 1,5 ml de TFA (ácido trifluoroacético) 2 M. Após a homogeneização, os tubos foram submetidos à autoclavagem a 120°C por 60 minutos. As amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e depois submetidas à centrifugação (5500 g) por 10 minutos. O volume de 1 ml do sobrenadante de cada amostra foi aplicado no *Speed Vac* (Concentrator 5301 – Eppendorf) a 30°C até a secagem e completa remoção do TFA. O *pellet* foi reservado para a

quantificação da celulose, sendo ressuspendido em 1 ml de água ultrapura e utilizado na quantificação dos monossacarídeos componentes das hemiceluloses da parede primária.

b) Quantificação de monossacarídeos

O precipitado resultante do tratamento com TFA foi utilizado para a quantificação do conteúdo de monossacarídeos via HPAE-PAD (*High Performance Anion Exchange-Pulsed Amperometric Detection*). Os monossacarídeos foram determinados após a quebra dos polímeros de açúcar em monômeros na hidrólise ácida com TFA, descrita acima. Na determinação foram usados 500 µl de cada filtrado, 2 ml de água ultrapura e 500 µl de fucose (padrão interno). A determinação foi feita em cromatógrafo de íons DIONEX ICS 2500, equipado com gradiente de bomba GS50, detector eletroquímico ED50 e amostrador automático AS50. A separação dos carboidratos foi feita em NaOH, em corrida isocrática através de coluna de troca aniônica CarboPac PA10 com guarda-coluna CarboPac PA10 (DIONEX®). Como padrão foi usada uma mistura contendo todos os possíveis carboidratos presentes na amostra (L-arabinose, D-ramnose, D-galactose, D-glucose, D-xilose e D-manose) submetida às mesmas condições das amostras.

c) Quantificação do conteúdo de celulose

O conteúdo de celulose da parede celular primária de plântulas foi determinado pela metodologia segundo TAPPI (1991) e ASTM (2003) utilizando-se o resíduo composto de microfibrilas de celulose, remanescente da centrifugação após a hidrólise ácida com TFA. Esse *pellet* foi submetido à secagem a vácuo no *Speed Vac* (Concentrator 5301 – Eppendorf) à temperatura de 30°C, por 10 horas, seguida de 5 lavagens com água ultrapura para a completa remoção dos resíduos de hemiceluloses. Após nova secagem nas mesmas condições descritas acima, o *pellet* foi submetido à hidrólise com ácido sulfúrico 72% padronizado segundo TAPPI (1996). O conteúdo de glucose nas amostras equivale ao conteúdo de celulose nas mesmas.

d) Quantificação dos ácidos urônicos

Para a análise dos ácidos urônicos, uma mistura padrão contendo ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico foi preparada e submetida às mesmas condições das amostras. As análises foram feitas a partir do mesmo hidrolisado com TFA em cromatógrafo de íons DIONEX ICS 2500. A separação dos ácidos urônicos foi feita através de gradiente de NaOH 100 mM com NaOAc 150 mM, em coluna de troca iônica CarboPac PA10 e guarda-coluna CarboPac PA10 (DIONEX®).

e) Análise estatística

Os valores obtidos para os teores dos componentes da parede celular primária (plântulas e medula caulinar) e secundária (xilema do caule) foram submetidos ao teste estatístico de Dunnett, com auxílio do programa *SAS (Statistical Analysis System)* (2000), para nível de significância estatística de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, comparando-se as médias obtidas em todos os tratamentos com as médias do controle Gateway.

A dispersão dos valores em relação a cada média foi determinada pelo desvio padrão através da equação:

$$S = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

onde: S = desvio padrão; x = valores dos dados; n = número de amostras.

3.13 Análise química dos componentes da parede celular primária da medula caulinar

A análise química da composição da parede celular primária da medula do caule das linhagens homozigotas de tabaco transgênicas e de controle Gateway (CG) foi realizada pela determinação dos teores de monossacarídeos (arabinose, galactose, glucose, xilose, ramnose e manose) e ácidos urônicos.

A análise foi realizada, considerando-se um grupo de 5 plantas de cada genótipo, com 3 repetições para cada análise, perfazendo 15 análises de cada tipo, por evento. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação como descrito no Item 3.9 até a emissão dos botões florais. Um segmento do caule foi isolado da base próxima ao substrato até a altura de 20 cm. O caule foi lavado com água para a remoção de qualquer detrito e resfriado a 4°C. Após a remoção da casca, as porções de xilema e de medula (Figura 11) foram isoladas uma da outra e congeladas em N₂ líquido, seguido de liofilização a -50°C. O material liofilizado foi moído no Moinho MA 048 (Marconi).

Remoção de extrativos

O material liofilizado e moído de cada amostra de medula foi submetido à remoção de extrativos solúveis através de solventes orgânicos, em bateria de extração *Soxhlet*, em três etapas: a) solução de toluol e etanol na proporção 1:1 (v/v) por 3 horas (7 refluxos por hora); b) etanol

por 3 horas (7 refluxos por hora); c) banho-maria a 90°C por 1 hora, seguida por filtragem em placa porosa. O material livre de extrativos foi seco em estufa a 104°C e resfriado em dessecador antes de ser pesado para obtenção da massa de matéria seca.

Figura 11 – Corte transversal do caule de tabaco. Adaptado de Dop e Gautié (1928)

Para a determinação do teor de monossacarídeos na medula, porções de 5 mg de massa de matéria seca livre de extrativos foram tratadas com 100 µl ácido sulfúrico 72% (24 N) e mantidas em banho-maria a 30°C, por uma hora, com agitação a cada 15 minutos. O ácido foi diluído pela adição de 1,5 ml água ultrapura, sendo em seguida aquecido a 120°C por 1 hora, na autoclave. As amostras foram resfriadas rapidamente no gelo e depois submetidas à centrifugação por 5 minutos, a 15000 g, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi recuperado e utilizado na

determinação do teor de monossacarídeos da medula. Para a análise utilizou-se 100 µl de cada sobrenadante, 3,5 ml de água ultrapura e 400 µl de fucose (padrão interno).

Para a análise dos ácidos urônicos, uma mistura padrão contendo ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico foi preparada e submetida às mesmas condições das amostras. As análises foram feitas a partir do hidrolisado em cromatógrafo de íons DIONEX ICS 2500. A separação dos ácidos urônicos foi feita através de gradiente de NaOH 100 mM com NaOAc 150 mM, em coluna de troca iônica CarboPac PA10 e guarda-coluna CarboPac PA10 (DIONEX®).

3.14 Análise química dos componentes da parede celular secundária do xilema caulinar

A análise química da composição da parede celular secundária do xilema das linhagens homozigotas de tabaco transgênicas e de controle Gateway (CG) foi realizada pela determinação dos teores de lignina insolúvel e solúvel, monossacarídeos e ácidos urônicos.

Para isso, o xilema foi isolado da casca e da medula, submetido à remoção de extrativos, liofilizado e seco, como descrito para a medula no Item 3.13.

A hidrólise dos carboidratos constituintes da parede celular do xilema por meio de ácidos fortes resulta em uma porção determinada como lignina insolúvel, e outra de lignina solúvel, sendo o somatório igual ao teor de lignina total. Para a determinação de lignina no xilema, porções de 50 mg de massa de matéria seca livre de extrativos foram tratadas com 500 µl de ácido sulfúrico 72% (24 N) e mantidas em banho-maria a 30°C, por uma hora, com agitação a cada 15 minutos. O ácido foi diluído pela adição de água ultrapura até o volume de 14 ml, sendo em seguida aquecida a 120°C, por 1 hora, na autoclave. As amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e depois submetidas à filtração com auxílio de bomba de vácuo, copo de filtração e placa porosa com papel de filtro. O resíduo insolúvel filtrado foi seco a 104°C e posteriormente pesado. A quantidade de lignina insolúvel, dada em mg/g de matéria seca, foi determinada pela equação:

$$Li = \frac{R}{P} \times 100$$

onde:

- Li = teor de lignina solúvel (mg/g);
- R = massa seca do resíduo retida pela filtração (mg);
- P = peso inicial da amostra seca (g);
- 100 = fator de diluição da amostra.

O volume do filtrado foi aferido para 100 ml com água ultrapura. Esta solução, chamada de hidrolisado secundário, foi utilizada para verificar-se o teor de carboidratos, o conteúdo de lignina solúvel e de ácidos urônicos. O teor da lignina solúvel, dado em mg/g de matéria seca, foi determinado para o filtrado através de leitura em espectrofotômetro, a 215 e 280 nm, conforme norma TAPPI T 249 cm 85 (TAPPI, 1991), e calculado pela equação:

$$Ls = [(A_{215} \times 4,538) - A_{280}] \times 0,7$$

onde: Ls = teor de lignina solúvel (mg/g);
 A_{215} = absorbância da amostra sob o comprimento de onda de 215 nm;
 A_{280} = absorbância da amostra sob o comprimento de onda de 280 nm;
 4,538 = constante;
 0,7 = fator de diluição da amostra.

Os monossacarídeos foram determinados após a quebra dos polímeros de açúcar em monômeros na mesma hidrólise ácida com ácido sulfúrico 24 N, descrita acima. Na determinação foram usados 500 µl de cada filtrado, 2 ml de água ultrapura e 500 µl de fucose (padrão interno). A medição dos teores dos monossacarídeos e dos ácidos urônicos foi feita da mesma forma que a descrita para a parede primária (Item 3.12 b e d, respectivamente).

3.15 Avaliação morfológica das plantas de tabaco transgênicas

Sementes de 10 linhagens homozigotas de tabaco transgênicas, juntamente com o controle Gateway (planta transformada com o vetor *Gateway* desprovido do cDNA da UGPase de batata), foram cultivadas em vasos plásticos de 8 L de capacidade contendo mistura na proporção 2:1 (v/v) de substrato organomineral (Plantmax HA) e vermiculita (granulação média) e mantidos na casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado, sob regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. As plantas foram irrigadas diariamente alternando-se solução nutritiva (Ouro Verde 1 g/L) com água.

Depois, as linhagens foram avaliadas quanto à altura total da planta, altura média de internós, diâmetro do caule e área foliar total, utilizando 6 plantas de cada linhagem, em estado adulto reprodutivo. A massa seca da raiz foi avaliada em duas plantas de cada linhagem, no estágio juvenil (1,5 mês).

Para a padronização do estágio de desenvolvimento dos tecidos empregou-se o índice plastichron (ERICKSON; MICHELINI, 1957), onde a folha de índice plasticron $PI=0$ foi definida como a primeira folha com comprimento maior que 5 cm, e onde $PI=1$ é a folha imediatamente abaixo da $PI=0$.

A altura das plantas foi determinada pela distância entre a base da planta, próxima ao substrato, até a base da folha $PI=3$. Neste mesmo intervalo foi obtida a altura média de internós. O diâmetro do caule foi calculado a partir do perímetro medido na região intermediária do internó imediatamente abaixo da folha $PI=15$. A área foliar total foi calculada pelo somatório das áreas das folhas $PI=6$ a $PI=15$ (as dez maiores), estimada pelo método não destrutivo descrito por Francis; Rutger; Palmer (1969) que utiliza a equação:

$$Af = C \times L \times 0,6813$$

onde: Af = área foliar (m^2);
 C = comprimento da folha (distância entre o ponto de inserção da folha no caule e a extremidade oposta da mesma);
 L = largura da folha (maior dimensão perpendicular ao eixo do comprimento);
 0,6813 = fator de forma para folhas de tabaco que é média dos fatores obtidos por Romano (2001).

Para a avaliação da massa seca da raiz, foi necessário o uso de substrato peneirado e sem vermiculita, uma vez que as partículas maiores aderem-se firmemente às raízes impossibilitando sua completa remoção sem que haja perda de material. Entretanto, desta forma as plantas não se desenvolveram bem, sendo avaliadas antes de atingirem a fase reprodutiva. As raízes foram lavadas em água corrente e secas em forno a $104^\circ C$ até a estabilização da massa.

Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram analisadas pelo teste de Dunnett, que compara os valores obtidos nos tratamentos com as médias obtidas nos controles, com auxílio do programa SAS (2000), para nível de significância estatística de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção da enzima UGPase recombinante de batata em *E. coli*

4.1.1 Transformação e indução da enzima UGPase em *E. coli*

Para a expressão do gene heterólogo em *E. coli*, utilizou-se o kit *E. coli Expression System with Gateway® Technology* (Invitrogen). Na linhagem integrante do kit a adição de L-arabinose no meio de cultivo induz a expressão do gene inserido sob o controle do promotor *araBAD* (P_{BAD}).

Para isso, o vetor pENTR/D-TOPO®/*ugp* de batata foi sub-clonado no vetor de expressão Gateway pDEST™17, usado na transformação de células competentes de *E. coli* DH5α. No meio seletivo foram selecionados 2 clones de *E. coli* presumidamente transformados que, em seguida, foram analisados por meio de PCR com o par de *primers* específicos para a amplificação da ORF do gene *ugp* de batata. O produto resultante da PCR, visualizado em gel (Figura 12), apresentou tamanho próximo ao esperado (aproximadamente 1400 pb) (KATSUBE et al., 1990) somente para o caso do clone 2.

Figura 12 – Perfil eletroforético do produto da PCR realizada com clones de *E. coli* DH5α portadores do vetor pDEST 17/*ugp* e *primers* específicos para o *ugp* de batata. **pb** peso molecular em pares de bases; **λ** marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); **1** e **2** clones testados

O clone 2, que apresentou o produto de amplificação esperado, foi multiplicado para a extração do plasmídeo que foi em seguida seqüenciado utilizando-se o *primer forward* específico para o promotor T7 e o *primer reverse* específico para a ORF do gene *ugp* de batata. Na seqüência de 860 bases (Figura 13) obtida com o *primer forward* é possível localizar a seqüência de Shine-Dalgarno, o *tag* de 6 histidinas, a seqüência de direcionamento Gateway CACC, seguida imediatamente pelo códon ATG de iniciação do cDNA clonado. No seqüenciamento com o *primer reverse* foi obtida uma seqüência de 863 bases (Figura 14).

A análise pelo programa BlastX do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) das seqüências obtidas pelo seqüenciamento com os *primers forward* e *reverse* permitiu constatar a existência de similaridade entre a seqüência clonada e seqüências do gene *ugp* de diferentes cultivares de batata, com 95 e 97% de identidade, respectivamente. As primeiras 143 bases da seqüência *forward* referem-se à seqüência do vetor pDESTTM17.

A comparação por meio do programa *Blast 2 Sequences* do NCBI das seqüências geradas com o *primer* específico para o promotor T7 ou com o *primer reverse* específico para a ORF do *ugp* de batata, com o cDNA clonado de batata (Figuras 15 e 16), indicou identidade de 94 % para ambas.

Após a verificação da construção por meio do seqüenciamento do vetor recombinante pDEST 17/*ugp*, procedeu-se a transformação da linhagem BL21-AITM de *E. coli*. Três clones da linhagem BL21-AITM recombinantes para o vetor pDEST 17/*ugp* foram utilizados para o experimento de expressão da proteína. A adição de L-arabinose ao meio na fase mid-log de crescimento induziu a produção da proteína exógena UGPase. Amostras do precipitado da cultura de bactérias foram aplicadas no gel de poliacrilamida. A presença da banda relativa à proteína expressa nas amostras induzidas em relação às não induzidas por L-arabinose confirma a expressão da proteína exógena, que tem peso molecular de $\cong$ 54 kDa (Figura 17), semelhante ao tamanho obtido para UGPases de batata e de outras espécies vegetais (Tabela 2), que medem de 51,5 a 52 KDa, acrescido de 2,6 kDa correspondente a *tag* de histidina (vetor pDEST 17 – Invitrogen). Não há diferença visual entre os diferentes clones de BL21-AITM/*ugp* ativados por arabinose no nível de expressão da proteína, ou seja, as três bandas correspondentes à enzima UGPase são bastante semelhantes.

> B-T7

```
CCNCAAACGGTTTTCTCTAGNAAATAATTTTGTTCNNCTTTAAGAAGGAGATATACATATGTNTTCCTA
CCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCCTTC
ACCATGGCTACTGCTGCTACTCTTTCTCCTGCTGATGCCGAAAAGCTCAACAATCTCAAATCTGCCGTCG
CCGGTCTTAATCAAATCAGTGAAAATGAGAAATCTGGATTTATTAACCTTGTCGGTCGCTATCTAAGTGG
AGAAGCGCAACACATTGACTGGAGTAAGATCCAGACGCCAACTGATGAGGTGGTGGTGCCATATGACAAG
TTAGCACCTCTTTCTGAAGATCCCGCAGAGACTAAGAAGCTTTTGGACAACTTGTTGTCCTGAAGCTCA
ATGGAGGCTTGGGAACAACAATGGGATGCACTGGTCCCAAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGAC
ATTCCTTGACTTGATTGTCAAGCAAATTGAGGCCCTCAATGCCAAATTCGGATGCAGTGTCCCCCTGCTT
TTGATGAATTCGTTCAACACCCATGATGATACTGAAGATTGTAGAAAAATATGCGAACTCAAACATTG
ATATTACATACATTCAATCAAGAGCCAGTACCCTCGCCTGGTTACNGAAGAACTTTGCCCCCANTTCCATG
CAAAGGCAATTCTGGAAAAANATGGGATGGTACCCTCCAGGTCATGGGGGATGNTTTTCCCTTCTTTGGA
TGAATAGGGGAAAAGCTTNGATGCCCTACTTACCAANGGGAAGGAATTTTNTTTGTTGNNAAACTCAA
ATAANTNGGGNGCCATTGTT
```

Figura 13 – Sequenciamento do DNA plasmidial de um clone genuíno de *E. coli* portador do vetor pDEST 17/*ugp* originado da batata e o *primer* específico para o promotor T7. Sequência Shine-Dalgarno sublinhada; tag de 6 histidinas sombreada; sequência de direcionamento Gateway CACC em itálico; códon ATG de iniciação do cDNA clonado em negrito e sublinhado

>B-RB

```
TTTNGGGGNANCCGAACCTTGTTTTTATCACAGCACCATCCTGGTTCCTCTAGCTTCACATCCTGATTG
GCTGCTTCCGTCACCTTTCCCTTTAGGGTAACGCCGATCCGAACCATACATCACCGGTCACCTTCNAGC
TATCTAGATCAATGATGCTGGGAATAGACTTGAAACGGCCTAAGAAGTTGGCCACCCTCTTGAATTCAGG
TCCCAACTCGATGGATGGGTGGATGGATTGACCTGGCCGGGTTTCGGATAACATAGCCCTCATCAGTC
AAGGTGTAAAGATCAGACTGAACAAGGAGCAAATCTGAAGTTGCTTTCACGGGAAGGAAACGAGATCGAG
GAACATTAGCACCAATTGCCCGGTCAAAAACTTAATTGCAGCACCGGCAGCAGTTTCAAGTTGAAGAAC
TTTGACTCCGTCCACTTCCTTTGGGTTGGGAATAATCTCCATCTTGAGTGCATCTGCTTCTACAAGTCTT
TTAATAGCACTCAGATTCACCCACAAGTTGTTGGTATTGAAAATTTGAATTTTCAATTGACTTGAATT
CATTGACATGTTTCATCAGGGGCTTGTGCTATTTCCAGCAGCTGTACTTTTCCTTCATATGAGATTAAGGG
GCCACCTTTGACATCAGCTAAAGTTTTGGGAGTAACCTCCATGCAATACTCATTTTTGTTTAGGATCANA
TGATTTAGGATTTTCAAATCAACAATGGCACCNAGTTATCTGAGTTTGCAACAAAGACATATNCCTTNCC
TTTGCTAGAANGGCATCAGNTTNCACATTTCATCAAGAAGGGAAAANTCCCCNNGACNGGAGGGNACAN
TCNNCNTTTNCAAAATGNCNTTN
```

Figura 14 – Sequenciamento do DNA plasmidial de um clone de *E. coli* portador do vetor pDEST 17/*ugp* originado da batata e *primer reverse* específico para a ORF do *ugp* de batata

Score = 1054 bits (548), Expect = 0.0					
Identities = 676/717 (94%), Gaps = 12/717 (1%)					
Strand=Plus/Plus					
Query	144	ATGGCTACTGCTGCTACTCTTTCTCCTGCTGATGCCGAAAAGCTCAACAATCTCAAATCT	203		
Sbjct	1	ATGGCTACTGCTGCTACTCTTTCTCCTGCTGAGTCCGAAAAGCTCAACAATCTCAAATCT	60		
Query	204	GCCGTCGCCGGTCTTAATCAAATCAGTGAAAATGAGAAATCTGGATTTATTAACCTTGTC	263		
Sbjct	61	GCCGTCGCCGGTCTTAATCAAATCAGTGAAAATGAGAAATCTGGATTTATTAACCTTGTC	120		
Query	264	GGTCGCTATCTAAGTGGAGAAGCGCAACACATTGACTGGAGTAAGATCCAGACGCCAACT	323		
Sbjct	121	GGTCGCTATCTAAGTGGAGAAGCGCAACACATTGACTGGAGTAAGATCCAGACGCCAACT	180		
Query	324	GATGAGGTGGTGGTGCCATATGACAAGTTAGCACCTCTTTCTGAAGATCCCGCAGAGACT	383		
Sbjct	181	GATGAGGTGGTGGTGCCATATGACAAGTTAGCACCTCTTTCTGAAGATCCCGCAGAGACT	240		
Query	384	AAGAAGCTTTTGGACAAACTTGTTGTCCTGAAGCTCAATGGAGGCTTGGGAACAACAATG	443		
Sbjct	241	AAGAAGCTTTTGGACAAACTTGTTGTCCTGAAGCTCAATGGAGGCTTGGGAACAACAATG	300		
Query	444	GGATGCACTGGTCCCAAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGACATTCCTTGACTTG	503		
Sbjct	301	GGATGCACTGGTCCCAAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGACATTCCTTGACTTG	360		
Query	504	ATTGTCAAGCAAATTGAGGCCCTCAATGCCAAATTCGGATGCAGTGTTCCCCTGCTTTTG	563		
Sbjct	361	ATTGTCAAGCAAATTGAGGCCCTCAATGCCAAATTCGGATGCAGTGTTCCCCTGCTTTTG	420		
Query	564	ATGAATTCGTTCAACACCCATGATGATACACTGAAGATTGTAGAAAAATATGCGAACTCA	623		
Sbjct	421	ATGAATTCGTTCAACACCCATGATGATACACTGAAGATTGTAGAAAAATATGCGAACTCA	480		
Query	624	AACATTGATATTCATACATTCAATCAAGAGCCAGTACCCTCGCTGGTTACNGAAGAACT	683		
Sbjct	481	AACATTGATATTCATACATTCAATC-AGAGCCAGTACCCTCGCTGGTTACGGAAG-ACT	538		
Query	684	TTGCCCCCANTTCCATGCAAAGGCAATTCTGGAAAAANATGGGATGGTACCCTCCAGGTC	743		
Sbjct	539	TTG-CCCCACTTCCATGCAAAGGCAATTCTGGAAAAGAT--GGNTGGNACCCTTCANGTC	595		
Query	744	ATGGGGGATGNTTTTCCCTTCTTTGGATGAATAGGGGAAAAGCTTNGATGCCCTACTTAC	803		
Sbjct	596	AT-GGTGATG-TTTTCCNTTCTTT-GATGAATAGTGG-AAAGCTTGG-TGCACTACTAAC	650		
Query	804	CAANGGGAAAGGAATTTTNTTTGTTGNNAAACTCAAATAANTNGGGNGCCATTGTT	860		
Sbjct	651	CAAA-GGAAAGGAATATGTTTTTGTTNG-CAAATTAAGATAACTTGGGTGCCATTGTT	705		

Figura 15 – Alinhamento pelo programa *Blast 2 Sequences* (NCBI) entre a sequência obtida do vetor pDEST 17/*ugp* com o *primer forward* e o inserto no vetor pENTR/D-TOPO[®]/*ugp* de batata

Score = 1206 bits (627), Expect = 0.0 Identities = 733/776 (94%), Gaps = 11/776 (1%) Strand=Plus/Minus				
Query	49	TCTAGCTTCACATCCTGATTGGCTGCTTCCGTCACCTTCCCCTTTAGGGTAACGCCGGA	108	
Sbjct	1376	TCTAGCTTCAC-TCCTGATTGGCTGCAACAGTCACTTCCCCTTTAGGGTAACGCCGGA	1318	
Query	109	TCCGAACCATACATCACCGGTCACCTTCNAGCTATCTAGATCAATGATGCTGGGAATAGA	168	
Sbjct	1317	TCCGAACCATACATCACCGGTCACCTTCAAGCTATCTAGATCAATGATGCTGGGAATAGA	1258	
Query	169	CTTGAAACGGCCTAAGAAGTTGGCCACCTCTTGAATTCAGGTCCCAACTCGATGGATGG	228	
Sbjct	1257	CTTGAAACGGCCTAAGAAGTTGGCCACCTCTTGAATTCAGGTCCCAACTCGATGGATGG	1198	
Query	229	GTTGGATGGATTGACCTGGCCGGGTTTCGGATAACATAGCCCTCATCAGTCAAGGTGTA	288	
Sbjct	1197	GTTGGATGGATTGACCTGGCCGGGTTTCGGATAACATAGCCCTCATCAGTCAAGGTGTA	1138	
Query	289	AAGATCAGACTGAACAAGGAGCAAATCTGAAGTTGCTTTCACGGGAAGGAAACGAGATCG	348	
Sbjct	1137	AAGATCAGACTGAACAAGGAGCAAATCTGAAGTTGCTTTCACGGGAAGGAAACGAGATCG	1078	
Query	349	AGGAACATTAGCACCAATTGCCCGGTCAAAAACTTAATTGCAGCACCGGCAGCAGTTTC	408	
Sbjct	1077	AGGAACATTAGCACCAATTGCCCGGTCAAAAACTTAATTGCAGCACCGGCAGCAGTTTC	1018	
Query	409	AAGTTGAAGAACTTTGACTCCGTCCACTTCCTTTGGGTTGGGAATAATCTCCATCTTGAG	468	
Sbjct	1017	AAGTTGAAGAACTTTGACTCCGTCCACTTCCTTTGGGTTGGGAATAATCTCCATCTTGAG	958	
Query	469	TGCATCTGCTTCTACAAGTCTTTTAATAGCACTCAGATTCACCCACAAGTTGTTGGTATT	528	
Sbjct	957	TGCATCTGCTTCTACAAGTCTTTTAATAGCACTCAGATTCACCCACAAGTTGTTGGTATT	898	
Query	529	GAAAATTTTGAATTTTCAATTGACTTGAATTCATTGACATGTTTCATCAGGGGCTTGTGC	588	
Sbjct	897	GAAAATTTTGAATTTTCAATTGACTTGAATTCATTGACATGTTTCATCANGGGCTTGTGC	838	
Query	589	TATTTCCAGCAGCTGTACTTTTCCTTCATATGAGATTAAGGGCCACCTTTGACATCAGC	648	
Sbjct	837	TATTTCCAGCAGCTGNACTTTTCCTTCATATGAGATTAAGNGCCACCTTTGA---CAAC	781	
Query	649	TAAAGTTTTGGGAGTAACCTCCATGCAATACTCATTTTTGTTTAGGATCANATG---ATT	705	
Sbjct	780	TAAAGTTTTGGGAGTNACCTCCATGCCATACTCAATTTGGTTANGATCAGATGAATATC	721	
Query	706	TAGGATTTTCAAATCAACAATGGCA-CCNAGTTATCTGAGTTTGCAACAAAGACATATNC	764	
Sbjct	720	TAAGATTTTCAAATCAACAATGGCACCAAGTTATCTTAATTTGCNACAAAACATATTC	661	
Query	765	CTTNCCTTT-GCTAGAANGGCATC-AGNTTNCATATTCATC-AAGAAGGGAAAA	817	
Sbjct	660	CTTNCCTTTGGTTAGTAGTGACCAAGCTTCCACTATTCATCAAAGAANGGAAAA	605	

Figura 16 – Alinhamento pelo programa *Blast 2 Sequences* (NCBI) entre a sequência obtida do vetor pDEST 17/*ugp* com o *primer reverse* e o inserto no vetor pENTR/D-TOPO®/*ugp* de batata

Figura 17 – SDS-PAGE de 3 clones recombinantes de *E. coli* BL21 para o vetor pDEST 17/*ugp*. **PM** marcador de peso molecular protéico *SDS-Page Standards – Broad Range* (Bio-Rad); **KDa** peso molecular expresso em quilodaltos; **NI** cultura não induzida por L-arabinose e **A** cultura induzida por L-arabinose. A seta indica a banda com a proteína UGPase exógena expressa

Tabela 2 – Peso molecular e número de aminoácidos de UGPases de origem vegetal com acesso no Swiss-Prot (<http://ca.expasy.org/sprot/>)

Acesso	Espécie	PM (kDa)	AA
P19595	<i>Solanum tuberosum</i>	51,874	477
Q5F1U6	<i>Solanum tuberosum</i>	51,874	477
Q5F1U8	<i>Solanum tuberosum</i>	51,830	477
Q84UG7	<i>Solanum tuberosum</i>	51,858	477
Q84UG8	<i>Solanum tuberosum</i>	51,936	477
Q84UG9	<i>Solanum tuberosum</i>	51,850	477
P57751	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51,920	470
Q9M9P3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51,738	469
Q9LKG7	<i>Astragalus membranaceus</i>	51,550	471
Q19TV8	<i>Cucumis melo</i>	52,062	476
Q43772	<i>Hordeum vulgare</i>	51,644	473
O64459	<i>Pyrus pyrifolia</i>	51,845	471

4.1.2 Sequenciamento da enzima UGPase recombinante purificada

Os *spots* correspondentes à enzima UGPase de batata foram excisados do gel e digeridos enzimaticamente. Os peptídeos eluídos foram injetados no espectrômetro de massa LC/MS/MS. Através dos espectros produzidos no sequenciamento dos peptídeos, foram geradas as seqüências de aminoácidos utilizadas na identificação da proteína que elas representam. As seqüências foram analisadas contra o banco de dados SwissProt utilizando-se a ferramenta BlastP do NCBI. Foram detectados 12 peptídeos que apresentaram alta similaridade à UGPase de batata, alto grau de identidade com o número de acesso P19595 correspondente à UGPase de *Solanum tuberosum* (Tabela 3), chegando a cobrir mais de 30% da proteína (Figura 18).

Os resultados obtidos pelo sequenciamento dos peptídeos através da espectrometria de massa confirmam que a proteína de aproximadamente 54 kDa produzida pela indução com L-arabinose, refere-se à proteína UGPase de batata, correspondente ao cDNA clonado.

4.2 Clonagem do cDNA do *ugp* no vetor binário e transformação genética de tabaco

O vetor pENTR/D-TOPO[®]/*ugp* de batata foi sub-clonado no vetor binário pK7WG2D para transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α . Os clones recombinantes resistentes ao meio seletivo foram testados por PCR. O plasmídeo pK7WG2D/*ugp*, foi extraído e utilizado para a transformação química da linhagem desarmada EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*. A confirmação da inserção do plasmídeo nos clones de *A. tumefaciens* que cresceram em meio seletivo foi obtida por meio da PCR com o par de *primers* específicos para a ORF do *ugp* de batata. O produto resultante da PCR, visualizado em gel (Figura 19), apresentou tamanho próximo ao esperado (aproximadamente 1400 pb) (KATSUBE et al., 1990) em 4 dos 6 clones testados. Como controle positivo utilizou-se o cDNA do gene *ugp* de batata.

A transformação genética de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana) foi realizada por meio de infecção de aproximadamente 500 discos foliares (Figura 20), previamente desinfestados, com um clone de *A. tumefaciens* recombinante, contendo o vetor Gateway pK7WG2D/*ugp* derivado da batata, seguida da indução de formação de *calli* e da cultura *in vitro* até a regeneração de brotos (geração T₀). O controle negativo, constituído de discos foliares não inoculados, não formaram *calli*, confirmando a eficiência do agente seletivo (canamicina).

Tabela 3 – Peptídeos obtidos a partir da proteína expressa em *E. coli*, identificados pela espectrometria de massa, e sua identidade à UGPase do acesso P19595

	Peptídeo	Tam.	M / Z	Carga	PM Obs.	PM Calc.	Identidade
1	SAVAGLNQISESRK	14	730.4	2	1458.784	1458.779	11/11 (100%) 11/14 (78%) *
2	LAPLSEDPAETKK	13	466.947	3	1397.818	1397.74	13/13 (100%)
3	NGLTFLDLIVK	11	616.878	2	1231.74	1231.718	11/11 (100%)
4	YANSNIDIHTFNQHQIPR	18	723.347	3	2167.018	2167.056	16/18 (88%)
5	GKEYVVFVANSNDNLGAIVTLK	20	718.064	3	2151.169	2151.158	19/20 (95%)
6	GGTLISYVSK	10	512.785	2	1023.554	1023.56	7/7 (100%) 7/10 (70%) *
7	MEIIPNPK	8	471.275	2	940.534	940.505	8/8 (100%)
8	VLQLTTVAGAAIK	13	642.852	2	1283.688	1283.781	11/13 (84%)
9	VTTAVWFGSGVTLK	14	733.398	2	1464.78	1464.798	12/14 (85%)
10	SGFINLVAK	9	481.763	2	961.51	961.56	7/7 (100%) 7/9 (77%) *
11	VQLLEIAQVPKEHVGEFK	18	694.007	3	2079.136	2079.136	16/18 (88%)
12	VANFLAK	7	388.732	2	775.448	775.459	5/5 (100%) 5/7 (71%) *

* Indica a real identidade, menor que a obtida pelo programa BlastP, pois este exclui automaticamente os resíduos não coincidentes localizados nas extremidades dos peptídeos.

```

>gi|136739|sp|P19595| UDP-glucose pyrophosphorylase [Solanum tuberosum]

1  matattlspa daeklennlks avaglnqise neksgfinlv grylsgeaqh idwskiqtp
61  devvvpdkl aplsedpaet kklldklvvl klngglgttm gctgpksvie vrngltfldl
121 ivkqiealna kfgcsvplll mnsfnthddt lkivekyans nidihtfnqs qyprlvtedf
181 aplpckgnsd kdgwyppghg dvfpplmnsd kldallakgk eyvfvansdn lgaivdlkil
241 nhlllnkney cmevtpktla dvksgtlisy egkvqlleia qvpdehvnef ksiefkifn
301 tnnlwnlsa ikrlveadal kmeiipnpke vdgkvqlle taagaaikff draiganvpr
361 srflpvkats dlllvqsdly tltdegyvir nparsnpsnp sielgpefk vanflgrfks
421 ipsiidldsl kvtdgdvwfsg gvtlkgkvtv aaksgvklei pdgaviankd ingpedi

```

Figura 18 – Distribuição dos peptídeos obtidos (sombreados) pela espectrometria de massa a partir da proteína expressa em *E. coli* ao longo do acesso P19595 (UGPase de *Solanum tuberosum*)

Figura 19 – Perfil eletroforético do produto da PCR realizada com diferentes clones de *A. tumefaciens* transformados com o vetor pK7WG2D/*ugp* (batata). λ marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); **pb** tamanho expresso em pares de bases; **1-6** produtos da PCR ; **+** controle positivo. O produto de amplificação de 1.400 pb corresponde ao gene *ugp* de batata

Figura 20 – Diferentes etapas no processo de obtenção de plantas transgênicas de tabaco; **a)** discos foliares de tabaco recém inoculados; **b)** formação de *calli*; **c)** brotações em meio de alongamento; **d)** broto enraizado; **e)** brotos transferidos para vasos cobertos por plástico; **g)** plântulas em vasos na câmara de crescimento

4.2.1 Seleção por PCR de plantas de tabaco transformadas

Os brotos enraizados foram avaliados quanto à presença do transgene por meio de PCR realizada utilizando-se o DNA genômico total extraído de folhas e par de *primers* específico ao gene *nptII*. A Figura 22 ilustra o perfil eletroforético de parte de um total de 40 plantas que apresentaram produto de amplificação de 700 pb correspondente ao gene *nptII*.

Figura 21 – Perfil eletroforético de algumas linhagens de tabaco transgênicas (**1, 4, ... 32**) para o gene *ugp* de batata apresentando o produto de amplificação de aproximadamente 700 pb correspondente ao gene *nptII*. **PM** marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas); **pb** tamanho expresso em pares de bases; **WT** linhagem selvagem; **CG** controle Gateway; **⊕** DNA plasmidial do vetor binário Gateway utilizado como controle positivo da PCR

4.2.2 Obtenção da geração T₁ das linhagens transgênicas de tabaco e análise genética quanto ao padrão de segregação

As quarenta plantas T₀, que tiveram a confirmação da presença do transgene pela análise de PCR foram cultivadas na casa de vegetação, autofecundadas (Figura 22) e suas sementes (progênie T₁) coletadas e avaliadas quanto ao padrão de segregação para resistência à canamicina (Figura 23). Através do teste de χ^2 (Tabela 4) verificou-se que dez plantas apresentaram segregação mendeliana do tipo 3:1 estatisticamente significativa ($\chi^2 \leq 3,84$), considerando-se o nível de significância de 5% e 1 grau de liberdade. Não foram escolhidas as linhagens com segregação significativa para o tipo 3:1 em que o número de sementes germinadas foi baixo e/ou que apresentaram valor significativo também para outro tipo de segregação.

Figura 22 – Plantas de tabaco na casa de vegetação. **a)** plantas jovens recém transferidas; **b)** plantas em estado juvenil; **c)** plantas adultas com proteção para garantir a autofecundação e coleta de sementes

Figura 23 – Avaliação do padrão de segregação quanto à resistência à canamicina em sementes de tabaco T₀. **a)** placa com 100 sementes; **b)** plântulas com 30 dias de semeadura sensíveis à canamicina; **c)** plântulas com 30 dias de semeadura com segregação mendeliana tipo 3 resistentes: 1 sensível à canamicina; **d)** plântulas com 30 dias de semeadura 100% resistentes à canamicina

4.2.3 Obtenção da geração T₂ das linhagens de tabaco transgênicas e análise do padrão de segregação

Dez plântulas (denominadas A a J) de cada um dos dez genótipos que apresentaram segregação mendeliana do tipo 3:1 na geração T₁, hemizigotas para o transgene, foram transferidas para vasos e mantidas na casa de vegetação. As progênes destas plantas (geração T₂), obtidas por autofecundação, foram avaliadas quanto ao padrão de segregação de resistência à canamicina para a identificação de plantas T₁ homozigotas. Entre as dez plantas de cada genótipo, segundo o teste de χ^2 ($\chi^2 \leq 3,84$), pelo menos uma gerou sementes 100 % resistentes à canamicina, considerando-se o nível de significância de 5% e 1 grau de liberdade (Tabela 5), sendo, portanto, homozigota para o transgene.

Tabela 4 – Padrão de segregação da expressão do gene nptII na progênie dos transformantes primários de tabaco e teste de χ^2 (nível de significância de 5% e 1 grau de liberdade); **sombreado** planta hemizigota (segregação 3:1 na progênie com valor estatisticamente significativo pelo teste do χ^2 (>3,84)) selecionada para próxima etapa

Nº	Res.	Sens.	Total	χ^2 3:1	Nº	Res.	Sens.	Total	χ^2 3:1
1	197	71	268	0,318	21	141	47	188	0,000
2	211	24	235	27,406	22	282	9	291	74,485
3	188	33	221	11,947	23	13	23	36	29,037
4	201	71	272	0,176	24	161	49	210	0,311
5	216	43	259	9,741	25	131	24	155	7,486
6	220	73	293	0,001	26	263	0	263	87,667
7	240	22	262	38,519	27	130	31	161	2,834
8	218	80	298	0,541	28	88	30	118	0,011
9	268	31	299	34,142	29	24	7	31	0,097
10	198	94	292	8,055	30	240	71	311	0,781
11	226	53	279	5,363	31	1	0	1	0,333
12	182	66	248	0,344	32	233	82	315	0,179
13	179	67	246	0,656	33	301	27	328	49,187
14	149	54	203	0,278	34	270	22	292	47,507
15	297	7	304	83,526	35	256	61	317	5,604
16	0	298	298	894,000	36	310	22	332	59,775
17	177	70	247	1,470	37	298	16	314	66,348
18	149	62	211	2,163	38	80	28	108	0,049
19	262	18	280	51,505	39	13	23	36	29,037
20	236	15	251	48,448	40	9	1	10	1,200

Tabela 5 – Padrão de segregação da expressão do gene nptII na geração T2 de plantas transgênicas de tabaco determinado pelo número de brotações resistentes e sensíveis à canamicina; **sombreado** linhagem homozigota (valor estatisticamente significativo pelo teste do χ^2 , com nível de significância de 5% e 1 grau de liberdade) selecionada para as análises químicas e moleculares

Planta	Res.	Sens.	Total	χ^2	100%	Planta	Res.	Sens.	Total	χ^2	100%
1 A	201	68	269	17,190		13 A	120	40	160	10,000	
1 B	182	60	242	14,876		13 B	241	2	243	0,016	
1 C	174	0	174	0,000		13 C	121	40	161	9,938	
1 D	300	0	300	0,000		13 D	196	50	246	10,163	
1 E	211	78	289	21,052		13 E	218	0	218	0,000	
1 F	294	0	294	0,000		13 F	288	0	288	0,000	
1 G	298	0	298	0,000		13 G	206	70	276	17,754	
1 H	291	1	292	0,003		13 H	198	62	260	14,785	
1 I	130	48	178	12,944		13 I	212	6	218	0,165	
1 J	293	1	294	0,003		13 J	174	1	175	0,006	
4 A	209	83	292	23,592		14 A	238	0	238	0,000	
4 B	295	0	295	0,000		14 B	215	9	224	0,362	
4 C	248	20	268	1,493		14 C	179	4	183	0,087	
4 D	198	85	283	25,530		14 D	253	4	257	0,062	
4 E	214	58	272	12,368		14 E	108	43	151	12,245	
4 F	201	67	268	16,750		14 F	206	73	279	19,100	
4 G	185	73	258	20,655		14 G	245	25	270	2,315	
4 H	270	0	270	0,000		14 H	202	74	276	19,841	
4 I	221	75	296	19,003		14 I	219	77	296	20,030	
4 J	210	71	281	17,940		14 J	208	80	288	22,222	
6 A	222	65	287	14,721		24 A	162	44	206	9,398	
6 B	180	107	287	39,892		24 B	238	0	238	0,000	
6 C	187	89	276	28,699		24 C	191	58	249	13,510	
6 D	135	112	247	50,785		24 D	188	50	238	10,504	
6 E	233	4	237	0,068		24 E	70	3	73	0,123	
6 F	155	99	254	38,587		24 F	285	0	285	0,000	
6 G	163	35	198	6,187		24 G	163	47	210	10,519	
6 H	226	59	285	12,214		24 H	204	78	282	21,574	
6 I	130	50	180	13,889		24 I	211	62	273	14,081	
6 J	171	121	292	50,140		24 J	175	48	223	10,332	
8 A	104	70	174	28,161		30 A	85	28	113	6,938	
8 B	218	6	224	0,161		30 B	200	74	274	19,985	
8 C	144	19	163	2,215		30 C	222	138	360	52,900	
8 D	158	55	213	14,202		30 D	205	76	281	20,555	
8 E	125	97	222	42,383		30 E	211	82	293	22,949	
8 F	188	2	190	0,021		30 F	118	61	179	20,788	
8 G	126	56	182	17,231		30 G	229	75	304	18,503	
8 H	97	33	130	8,377		30 H	214	10	224	0,446	
8 I	219	1	220	0,005		30 I	62	10	72	1,389	
8 J	20	7	27	1,815		30 J	129	45	174	11,638	
12 A	156	56	212	14,792		32 A	246	0	246	0,000	
12 B	177	63	240	16,538		32 B	281	0	281	0,000	
12 C	113	45	158	12,816		32 C	232	0	232	0,000	
12 D	212	69	281	16,943		32 D	215	67	282	15,918	
12 E	261	9	270	0,300		32 E	214	0	214	0,000	
12 F	214	72	286	18,126		32 F	184	43	227	8,145	
12 G	223	0	223	0,000		32 G	285	1	286	0,003	
12 H	193	66	259	16,819		32 H	182	0	182	0,000	
12 I	231	64	295	13,885		32 I	222	66	288	15,125	
12 J	293	0	293	0,000		32 J	226	0	226	0,000	

4.3 Análise molecular das plantas transgênicas de tabaco

4.3.1 Análise de *Southern blot*

A análise de *Southern blot* foi realizada a partir do DNA genômico extraído de folhas das dez linhagens de tabaco transgênicas homozigotas para o gene de interesse (T₂), além do controle Gateway (CG) (planta transformada com o vetor *Gateway* desprovido do cDNA da UGPase de batata) e da linhagem selvagem (WT), utilizada como controle negativo. O DNA foi digerido com a enzima *Hind*III, que não cliva a sequência do gene marcador *nptII*, alvo da sonda.

Na Figura 24 é possível observar-se o perfil eletroforético das diferentes linhagens de tabaco transgênicas resultante da hibridização com a sonda do gene *nptII*, em relação aos controles.

Figura 24 –*Southern blot* do DNA genômico de plantas de tabaco digeridos com a enzima de restrição *Hind*III e hibridizados com a sonda do gene *nptII*; **WT** linhagem selvagem; **CG** controle Gateway; **1-32** linhagens transgênicas para o gene *ugp* de batata. Na linha inferior está o número de bandas de cada perfil eletroforético

O número de bandas presente em cada linhagem e sua distribuição na membrana obtida pela análise de *Southern blot* dá uma indicação do número de cópias do transgene inserido no

genoma, além de caracterizar o número de eventos de transformação. Desta forma, as linhagens 12J, 24F, 30H e 4H têm um inserto, as linhagens 1D, 14A, e 8I têm dois insertos, e as linhagens 6E e 13F têm três e quatro insertos, respectivamente. A linhagem 32B (sem banda na Figura 24) foi mantida, pois sofreu hibridização pela sonda em outra análise de *Southern blot* (não apresentada aqui devido ao intenso *back-ground*), além de amplificar corretamente na reação de PCR com *primers* específicos para o gene *nptII* (Item 4.2.1) e de apresentar padrão de segregação de resistência à canamicina adequado nas gerações testadas (Itens 4.2.2 e 4.2.3).

O padrão de bandas (número e altura) nas linhagens 12J e 4H foi o mesmo, como também, nas linhagens 14A e 8I. Isso sugere que cada par de linhagens pode ter se originado do mesmo evento de transformação. Assim, realizou-se uma análise adicional de *Southern blot* com outra enzima de restrição, no caso, a *EcoRI* que não cliva o gene *nptII*. As bandas resultantes da hibridização com a sonda do gene *nptII* (Figura 25) indicam semelhança entre as plantas, podendo ser consideradas como originárias do mesmo evento de transformação. De qualquer forma, como as linhagens apresentam desenvolvimento diferencial, foram incluídas nas análises de PCR quantitativo e análises químicas.

Figura 25 – Análise de *Southern blot* a partir do DNA genômico de plantas de tabaco transgênicas, digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e hibridizado com sonda do *nptII*; círculos e quadrados indicam linhagens supostamente originadas do mesmo evento de transformação

4.3.2 Análise por PCR Quantitativa

A quantificação de transcritos do gene de interesse foi realizada através da análise por PCR Quantitativa (qPCR) tendo o transcrito do gene constitutivo da ubiquitina como padrão interno na normalização dos dados. Durante os 45 ciclos de amplificação na qPCR, a eficiência da reação com o par de *primers* do gene da ubiquitina, do *ugp* da batata e do tabaco foram, respectivamente, 1,77, 1,87 e 1,78.

A análise mostrou que todas as linhagens T₂ de tabaco apresentaram expressão do gene *ugp* exógeno. Dentre as linhagens transgênicas, a 12J apresentou o menor nível de expressão do gene *ugp* exógeno. Desta forma, ela foi escolhida como a linhagem de referência sendo atribuído o valor = 1, a partir do qual foram determinados os demais. Assim, o nível de expressão do gene *ugp* exógeno nas linhagens 1D, 13F, 24F e 32B, foi relativamente superior ao nível de expressão da linhagem de referência (Figura 26). Nas outras linhagens, o nível de expressão foi mais próximo ao nível de expressão na linhagem de referência. Entretanto, as diferenças observadas entre os níveis de expressão do gene *ugp* exógeno não foram estatisticamente significativas pelo teste de Tukey.

Para a análise do nível de expressão do gene *ugp* endógeno, a linhagem de referência foi a do controle Gateway, sendo a ela atribuído o valor = 1. Nas linhagens 4H, 8I, 12J, 14A e 30H a expressão endógena foi menor do que no controle Gateway, com diferença estatisticamente significativa para o nível de 1% pelo teste de Tukey (Figura 27). Nas demais linhagens transgênicas, o nível de expressão foi semelhante ao do controle (próximo a 1).

Por outro lado, as linhagens com menor expressão do gene *ugp* exógeno, com exceção de uma delas (6E), também expressaram menos o gene *ugp* endógeno, sugerindo que nessas linhagens algum mecanismo de regulação atuou sobre a expressão desse gene, tanto endógeno, quanto exógeno.

Seria interessante saber qual o nível de expressão total do gene *ugp*, ou seja, do endógeno mais o exógeno. No entanto, estes valores não podem ser somados pois as referências de cada um são diferentes e os valores atribuídos são relativos. Para isso seria necessário outro par de *primers* comum aos dois, específico tanto para o gene *ugp* de tabaco como da batata. Os valores também não podem ser comparados no sentido de se verificar se a expressão do gene exógeno foi maior ou menor que a do endógeno.

Figura 26 – Expressão do gene *ugp* exógeno no caule das plantas transgênicas (1-32) de tabaco, relativa à expressão do gene *ugp* exógeno na linhagem 12J, à qual atribuiu-se o valor = 1. A expressão da ubiquitina foi usada como controle interno. Valores são médias com desvio-padrão para n = 3. **a, b** Agrupamento das médias através do teste Tukey a 5% de probabilidade

Figura 27 – Expressão do gene *ugp* endógeno no caule das plantas transgênicas (1-32) de tabaco, relativa à expressão do gene *ugp* endógeno na linhagem do controle Gateway (CG), à qual atribuiu-se o valor = 1. A expressão da ubiquitina foi usada como controle interno. Valores são médias com desvio-padrão para n = 3. **a, b** Agrupamento das médias através do teste Tukey a 1% de probabilidade

4.4 Análise química das plantas transgênicas de tabaco

As plantas transgênicas homozigotas de tabaco portadoras do gene *ugp* clonado de batata (geração T₂) e uma linhagem do controle Gateway (CG) foram avaliadas quanto à composição química da parede celular primária e secundária.

Para a análise da parede primária foram utilizadas plântulas com 1 mês pós-germinadas e porções da medula, e para a análise da parede secundária foram utilizadas as porções do xilema do caule coletadas das mesmas plantas, em fase reprodutiva.

4.4.1 Análise química da parede celular primária em plântulas

A análise química da parede celular primária foi realizada pela avaliação dos teores de monossacarídeos, celulose e ácidos urônicos, via HPAE-PAD, em amostras de plântulas (caulíolo e folíolos juntos). Os dados obtidos indicam que a transformação genética causou alterações estatisticamente significativas no metabolismo (Figura 28). Houve redução nos teores de arabinose, galactose, glucose, xilose, manose, celulose, e ácido galacturônico significativa para o nível de 1% pelo teste de Dunnett. A redução foi significativa para o nível de 5% nos teores de ramnose somente em uma linhagem. Quanto aos teores de ácido glucurônico há uma pequena variação, embora não significativa entre as linhagens transgênicas e a controle. Por outro lado, há um aumento no teor de glucose nas linhagens 4H e 12J, e de galactose na linhagem 6E, com diferenças significativas para o nível de 1% pelo teste de Dunnett.

Considerando os grupos de componentes da parede celular primária (Tabela 6), a análise química das plântulas apontou redução significativa para o nível de 1% na quantidade total de monossacarídeos (em 3 linhagens), na quantidade de ácidos urônicos totais (2) e aumento na proporção entre hexoses e pentoses (4 linhagens), em comparação ao controle Gateway.

4.4.2 Análise química da parede celular primária na medula caulinar

A Figura 29 mostra que a superexpressão do gene *ugp* também alterou o metabolismo do tecido medular das plantas transgênicas em relação ao controle. Acréscimos significativos pelo teste de Dunnett foram observados para o conteúdo de arabinose, ramnose, galactose, glucose,

xilose, manose e ácidos galacturônico e glucurônico. As reduções observadas nas linhagens 4H, 8I, 12J e 30H não foram estatisticamente significativas pelo teste de Dunnett.

Pela análise conjunta dos componentes da parede celular primária da medula (Tabela 7) observou-se um aumento no teor total de monossacarídeos (significativo para o nível de 1% em 5 linhagens) e ácidos urônicos totais (significativo para o nível de 5% em 6 linhagens) e redução na proporção entre hexoses e pentoses (significativo para o nível de 1% em 7 linhagens), em relação ao controle Gateway.

O acúmulo de arabinose e de ácido glucurônico também foi obtido por Nascimento (2005) na expressão antisense do gene *miox* em plantas transgênicas de tabaco. Porém nesse trabalho o caule não foi separado em xilema e medula. Mas, como a medula mostra-se mais sensível às alterações metabólicas, muito provavelmente as alterações na composição química do caule devem ter ocorrido na medula, da mesma forma que na superexpressão do *ugp*.

4.4.3 Análise química da parede celular secundária no xilema caulinar

As análises químicas do tecido xilemático foram realizadas pelas determinações dos teores de lignina solúvel e insolúvel, via espectrofotometria, e do conteúdo dos monossacarídeos (arabinose, ramnose, galactose, glucose, xilose e manose) e ácidos urônicos, via HPAE-PAD. A análise química indica que a superexpressão do gene *ugp* não alterou tanto o metabolismo no tecido xilemático como observado para a parede primária da medula e. A Figura 30 mostra que para algumas linhagens transgênicas houve aumento significativo para o nível de 1% pelo teste de Dunnett, em relação ao controle Gateway, nos teores de manose e de lignina insolúvel. Em alguns casos houve aumento significativo para o nível de 5% no teor de lignina solúvel e ácido galacturônico, ou redução no teor de galactose. Quanto aos teores de arabinose, glucose, xilose e ácido glucurônico não houve alterações estatisticamente significativas.

A análise química da parede secundária no xilema do caule não mostrou diferenças significativas quando se considerou os conteúdos totais dos monossacarídeos e ácidos urônicos (Tabela 8). A relação entre hexoses e pentoses não se alterou, mas aumentos no teor de lignina total foram significativos para o caso de 3 linhagens transgênicas em relação ao controle Gateway.

Figura 28 – Conteúdo dos monossacarídeos (arabinose, ramnose, galactose, glucose, xilose e manose), celulose e ácidos urônicos (galacturônico e glucurônico) analisados da parede celular primária de PLÂNTULAS de linhagens transgênicas de tabaco portadoras do gene *ugp* clonado de batata (1-32) em relação à linhagem transgênica do controle Gateway (CG). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca com desvio padrão para n = 4. ** Variação significativa para $p < 0,05$ em relação ao CG; *** Variação significativa para $p < 0,01$ em relação ao CG

Figura 29 – Conteúdo dos monossacarídeos (arabinose, ramnose, galactose, glucose, xilose e manose) e ácidos urônicos (galacturônico e glucurônico) analisados da parede celular primária da MEDULA de linhagens transgênicas de tabaco portadoras do gene *ugp* clonado de batata (1-32) em relação à linhagem transgênica do controle Gateway (CG). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca com desvio padrão para n = 15. ** Variação significativa para $p < 0,05$ em relação ao CG; *** Variação significativa para $p < 0,01$ em relação ao CG

Figura 30 – Conteúdo dos monossacarídeos (arabinose, galactose, glucose, xilose e manose), ligninas (insolúvel e solúvel) e ácidos urônicos (galacturônico e glucurônico) analisados da parede celular secundária do XILEMA de linhagens transgênicas de tabaco portadoras do gene *ugp* clonado de batata (1-32) em relação à linhagem transgênica do controle Gateway (CG). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca com desvio padrão para n = 15. ** Variação significativa para p<0,05 em relação ao CG; *** Variação significativa para p<0,01 em relação ao CG

Tabela 6 – Composição da parede celular primária de PLÂNTULAS transgênicas de tabaco (**1-32**) portadoras do gene *ugp* clonado de batata e de uma linhagem do controle Gateway (**CG**) quanto ao conteúdo total de monossacarídeos, total de ácidos urônicos e proporção entre hexoses e pentoses (**Hexs./Pents.**). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca; ** e *** Variação significativa para $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente, em relação ao CG

Linhagem	Monossacarídeos	Ács. Urônicos	Hexs./Pents.
CG	52,3	56,9	1,7
1D	45,6 ***	50,5 ***	1,8
4H	52,6	55,1	1,9 ***
6E	54,8	55,4	1,9 ***
8I	48,6	53,7	1,8
12J	53,8	58,3	1,9 ***
13F	48,9	52,7	1,7
14A	46,1 **	55,4	1,9 ***
24F	44,2 ***	50,4 ***	1,7
30H	46,4 **	52,7	1,7
32B	45,6 ***	52,7	1,8

Tabela 7 – Composição da parede celular primária da MEDULA do caule de linhagens transgênicas de tabaco (**1-32**) portadoras do gene *ugp* clonado de batata e de uma linhagem do controle Gateway (**CG**) quanto ao conteúdo total de monossacarídeos, total de ácidos urônicos e proporção entre hexoses e pentoses (**Hexs./Pents.**). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca; ** e *** Variação significativa para $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente, em relação ao CG

Linhagem	Monossacarídeos	Ács. Urônicos	Hexs./Pents.
CG	328,3	44,5	9,2
1D	409,6 ***	57,9 **	7,2 ***
4H	315,2	48,5	10,6
6E	408,8 ***	60,2 **	7,2 ***
8I	358,6	47,9	8,1
12J	349,2	53,6	8,3
13F	459,2 ***	73,6 **	6,6 ***
14A	407,8 ***	61,6 **	7,3 ***
24F	391,9 **	63,2 **	7,6 ***
30H	341,1	46,8	6,2 ***
32B	379,0 ***	53,8 **	7,5 ***

Tabela 8 – Composição da parede celular secundária do XILEMA do caule de linhagens transgênicas de tabaco (**1-32**) portadoras do gene *ugp* clonado de batata e de uma linhagem do controle Gateway (**CG**) quanto ao conteúdo total de monossacarídeos, total de ligninas, total de ácidos urônicos e proporção entre hexoses e pentoses (**Hexs./Pents.**). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca, exceto Hexs/Pents.; ** e *** Variação significativa para $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente, em relação ao CG

Linhagem	Monossacs.	Ligninas	Ács. Urônicos	Hexs./Pents.
CG	671,2	216,2	17,6	2,4
1D	673,3	218,9	17,6	2,4
4H	672,0	221,4	17,5	2,4
6E	672,7	230,8 **	16,3	2,5
8I	674,9	230,6 **	18,1	2,4
12J	676,8	224,7	17,0	2,4
13F	676,4	218,5	18,0	2,4
14A	667,8	227,2	18,2	2,4
24F	676,4	226,6	19,6	2,4
30H	671,2	216,6	16,9	2,5
32B	682,5	234,4 ***	17,6	2,4

A comparação entre os resultados obtidos da análise química dos diferentes materiais de tabaco e também de eucalipto é discutida adiante, no Item 4.10.

4.5 Avaliação morfológica das plantas de tabaco transgênicas

As plantas transgênicas cultivadas sob condições normais não apresentaram anomalias fenotípicas visíveis (Figura 31) sendo indistinguíveis quanto ao controle Gateway (CG). A superexpressão do gene *ugp*, clonado a partir de tubérculos de batata, não causou alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas transgênicas de tabaco. Todas apresentaram inflorescências no tempo esperado e produziram sementes viáveis.

Na linhagem 4H foram observadas reduções na altura total e na altura média de internós, para o nível de significância de 1% pelo teste de Dunnett, em relação ao controle (Figura 32). Como esta variação ocorreu somente nesta linhagem, e as demais nem ao menos apontaram uma tendência, a redução nestas duas variáveis pode ser mais um efeito do local de inserção do transgene no genoma desta linhagem em particular, do que do efeito do transgene em si.

Figura 31 – Fenótipo de uma linhagem do controle Gateway (CG) e linhagens transgênicas de tabaco portadoras do gene *ugp* clonado de batata (1-32), todas em estágio reprodutivo

Figura 32 – Altura (cm), área foliar (cm²), altura média dos internós (cm), diâmetro do caule (cm) e massa seca da raiz (g/planta) das linhagens transgênicas de tabaco portadoras do gene *ugp* clonado de batata (1-32) em relação à linhagem do controle Gateway (CG). Valores são médias com os respectivos desvios-padrão para n = 6 (exceto para raiz) e n = 2 (raiz); ** Variação significativa para p<0,05 em relação ao CG; *** Variação significativa para p<0,01 em relação ao CG

A linhagem 4H é aquela que supostamente se originou do mesmo evento de transformação que a linhagem 12J, verificado pela análise de *Southern blot* (Item 4.3.1). No entanto, visto essas diferenças significativas na altura da planta e na altura média de internós, além das diferenças observadas nas análises químicas dos componentes da parede celular, conclui-se que são linhagens originadas de eventos diferentes. A semelhança no padrão de bandas nas duas análises de *Southern blot* pode ser explicada pela proximidade do local de inserção do transgene no genoma da planta. Desta forma, a sonda hibridiza o mesmo fragmento de DNA obtido pela ação das enzimas de restrição.

Quanto às outras duas linhagens, a 8I e 14A, que supostamente se originaram de um mesmo evento de transformação, não expressaram diferentemente o gene *ugp* exógeno e endógeno, nem apresentaram diferenças morfológicas entre si. Mas pela análise química percebe-se que são diferentes. Na análise química da medula, a linhagem 14A teve seis componentes com diferença estatisticamente significativa para o nível de 1%, enquanto que a linhagem 8I teve apenas um, e só para o nível de 5% de significância. Nas plântulas ocorreu o mesmo. Cinco componentes da linhagem 14A tiveram diferença estatisticamente significativa, contra dois componentes da linhagem 8I. É possível que estas duas linhagens também se originaram de eventos de transformação diferentes.

Não houve variação significativa entre as linhagens transgênicas e o controle quanto à área foliar ou diâmetro do caule. Quanto à massa seca das raízes, as linhagens 14A e 30H apresentaram os valores médios bem superiores (65,2% e 47,8%, respectivamente) ao valor médio do controle Gateway. No entanto, não se pode afirmar que estas sejam diferenças significativas, pois as análises da massa das raízes foram obtidas apenas de 2 repetições devido à grande dificuldade de remoção completa do substrato.

Reduções nas taxas de crescimento considerando-se a altura da planta e o diâmetro do caule foram observadas por Coleman e colaboradores (2007) em um híbrido de *Populus* que superexpressa a UGPase. Estas plantas apresentaram folhas em maior número, porém menores, e os caules apresentaram broto apical alongado. Estes mesmos autores, em 2006 obtiveram resultados opostos com a superexpressão dos genes *ugp* e *SuSy* (sucrose sintase) em tabaco. Aí, houve um aumento significativo na altura das plantas em várias linhagens transformadas individualmente e em todas de transformação dupla (efeito aditivo).

Portanto, os dados obtidos quanto aos efeitos da superexpressão do *ugp* sobre a altura da planta são conflitantes: aqui não houve alteração, em *Populus* houve redução (COLEMAN et al., 2007) e em tabaco (COLEMAN et al., 2006) houve aumento significativo. Mais estudos são necessários para compreender como é que ocorre a regulação e quais os fatores que determinam as alterações morfológicas.

4.6 Clonagem do cDNA codificador da enzima UGPase de eucalipto

4.6.1 Verificação da presença do gene *ugp* em eucalipto através de *Southern blot*

A hibridização do DNA genômico do clone 11 (linhagem selvagem) de *E. grandis*, digerido com as enzimas de restrição *HindIII* e *PstI* (que não clivam a ORF do gene *ugp* de batata), com o cDNA do *ugp* de batata resultou na presença de duas e cinco bandas, respectivamente (Figura 33). Primeiramente, a presença de bandas confirma a presença do gene que codifica a UGPase, semelhante ao que codifica a enzima em batata, no DNA genômico de eucalipto.

Esse padrão de bandas na análise de *Southern blot* pode ser devido à presença de íntrons no gene de interesse, que possuam sítios internos de restrição específicos para as enzimas *HindIII* e *PstI*, não visualizados no mapa dos sítios de restrição no caso da ORF do *ugp* de batata (<http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html> – *New England Biolabs NEBcutter* – opção *List 0 cutters*).

A presença de várias bandas também pode ser um indício da ocorrência de isoformas da enzima UGPase, ou de polimorfismo alélico do gene (SOWOKINOS, THOMAS; BURRELL, 1997). A hipótese de um único gene *ugp* em *E. grandis* é discutível visto que Caldas (2007) localizou nesta espécie, por meio da SAGE, dois transcritos relacionados à UGPase. Além disso, na análise proteômica do tecido cambial de *E. grandis*, Celedón et al. (2007) também identificaram diferentes *spots* identificados como isoformas da UGPase.

Figura 33 – Análise de *Southern blot* do DNA genômico de eucalipto (*Eg*) digerido com as enzimas de restrição *HindIII* e *PstI*. O produto da reação de PCR do cDNA do gene *ugp* de batata foi utilizado como sonda

4.6.2 Definição dos *primers* que abrangem a ORF de *ugp* de eucalipto

Até o momento, a sequência que codifica a UGPase de eucalipto ainda não foi depositada nos bancos de dados de acesso público. Pela análise comparativa através do programa ClustalW entre as sequências completas de aminoácidos da UGPase de algumas espécies vegetais encontradas no NCBI verificou-se a ocorrência de alinhamento biologicamente significativo entre as UGPases o que indica que a enzima é altamente conservada evolutivamente. Porém, as extremidades N e C terminais não são conservadas, o que dificulta a confecção de um par de *primers* que pudesse ser utilizado na amplificação do gene independentemente da espécie vegetal.

Desta forma, optou-se pela busca de ESTs (*expressed sequence tags*) de eucalipto ou por gi(s) (*number of general identification*) de sequências codificadoras da UGPase em espécies arbóreas. Foram localizados 4 ESTs de eucalipto (gil103475065, gil103476123, gil103480111 e gil103479065), todos extraídos do xilema de *Eucalyptus gunnii*. Estas sequências foram usadas no programa BlastX no NCBI para verificar-se o grau de identidade dessas com outras UGPases e qual a região de correspondência. As sequências de 521 pb iniciais dos 3 primeiros ESTs (Figura 34) são absolutamente idênticas entre si, e apresentam alinhamento biologicamente

significativo à UGPase de diversas espécies como, por exemplo, *Bambusa oldhamii* (gblAAO48422.1), *Oryza sativa* (gblEAZ21506.1) e *Arabidopsis thaliana* (gblAAK32773.1|AF361605_1), todos com grau de identidade de 88%. Esta sequência compreende a região C terminal da UGPase (Figura 35), mas não a N terminal. Desta forma, os ESTs de *E. gunnii* foram usados para desenhar o *primer reverse*.

O quarto EST (CT985449), pelo programa BlastX, tem similaridade com a região situada entre os resíduos 121 e 446 do total de 473 aa da UGPase de melão (*Cucumis melo*). Como essa sequência não abrange nenhuma das duas extremidades, foi desconsiderada.

Na busca pela sequência codificadora da UGPase em espécies arbóreas localizou-se um EST (gil52127390) extraído do embrião de noqueira (*Juglans regia*) (Figura 36). Esta sequência foi usada no programa BlastX no NCBI para se verificar a identidade com sequências ortólogas da UGPase. A sequência que mostrou o melhor alinhamento foi da enzima UGPase de batata (*Solanum tuberosum* - gblAAB71613.1), com grau de identidade de 83%, englobando a extremidade N terminal da proteína (Figura 37). Esta mesma sequência da noqueira foi submetida à ferramenta ORF *Finder* da página do NCBI que localiza as possíveis ORFs em uma sequência de nucleotídeos. A maior (615 pb) tem o início na base 148 (Figura 38), semelhante ao resultado obtido pelo BlastX. Portanto, o EST de noqueira apresenta uma sequência que corresponde à região 5' da ORF do *ugp* e pôde ser usada como referência para definir o *primer forward*.

O *primer reverse* foi definido pela sequência complementar aos 21 nucleotídeos que antecedem e incluem o códon de terminação TAG (sublinhado na Figura 34). O *primer forward* foi definido pela sequência de 17 nucleotídeos a partir do códon de iniciação ATG (sublinhado na Figura 36) e pela adição da sequência de direcionamento CACC do sistema Directional TOPO® à extremidade 5'.

Pela avaliação deste par de *primers* quanto à formação de auto-complementariedade (*dimers*), através do programa disponível na página eletrônica [http://www.operon.com/bioinformatics – oligo analysis & plotting tool](http://www.operon.com/bioinformatics-oligo-analysis-plotting-tool), verificou-se que havia a possibilidade de formação de *dimers* de até 6 bases tanto no *primer forward* entre si como entre o *primer forward* com o *reverse*.

>gi|103475065|gb|CT981449.1|CT981449 CT981449 Eucalyptus gunnii
differentiating xylem AFOCEL clone 832 Eucalyptus gunnii cDNA, mRNA sequence,
847 letters

CGGTTGTTAACTTAAAGGCAATTAAAAGGCTTGTCGAAGCTCAAGCTCTTAAGATGGAGATCATTCCTAA
TCCAAAGGAAGTGGATGGAATTAAAGTTCTGCAGCTAGAAACTGCAGCTGGTGCAGCAATCAAGTTCTTT
GACAATGCTATTGGCATCAATGTACCTCGGTTCGAGGTTCCCTCCAGTGAAAGCAACTTCAGATCTGCTTC
TTGTTTCAGTCCGATCTTTATACTCTGGTGGATGGTTTTGTTGAACGAAACAAGGCTAGAACAAATCCCTC
AAATCCTTCAATCGAATTGGGCCCCGAGTTTAAAGAAGGTTGGCAATTTCTTGAGCAGATTTAAGTCAATT
CCCAGCATTATTGAGCTTGATAGCCTGAAGGTGTCTGGTGATGTATGGTTTGGCACTGGCATTACTCTCA
AGGGAAAGGTGACCATTGCTGCAAAACCTGGGGTTAAGCTGGAAATTCCTGATGGGGTGGTGCTGGAAAA
CAAGGAAATCCATGGCCCTGAGGACCTCTAGAGTCACCACCTTGGTTTTCCAGAAGGAAACATATTGAGAG
TAGTATTTGATCTTGTACTGGAGACCCCGAGTATGTTGGTGTAATCTTTACATATTTGGTTAGGTAAATA
AGTGGACAATTCCGTTTGAAGCATCTTAACCCGAACCTTGGGAAGGCGAGGATTTTACAATTTTGCTTGT
TTGAAAAGAGAGTGAGAAACGCTGCCTAAACCAGTGAGGTCATTTAAATGTGCCGTCTGCTCTTTCTGCTG
TATAAGTATTGTTGAATGCCAACTCTGCATGTCGGTCTTATGTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

>gi|103476123|gb|CT982507.1|CT982507 CT982507 Eucalyptus gunnii
differentiating xylem AFOCEL clone 832 Eucalyptus gunnii cDNA, mRNA sequence,
851 letters

CGGTTGTTAACTTAAAGGCAATTAAAAGGCTTGTCGAAGCTCAAGCTCTTAAGATGGAGATCATTCCTAA
TCCAAAGGAAGTGGATGGAATTAAAGTTCTGCAGCTAGAAACTGCAGCTGGTGCAGCAATCAAGTTCTTT
GACAATGCTATTGGCATCAATGTACCTCGGTTCGAGGTTCCCTCCAGTGAAAGCAACTTCAGATCTGCTTC
TTGTTTCAGTCCGATCTTTATACTCTGGTGGATGGTTTTGTTGAACGAAACAAGGCTAGAACAAATCCCTC
AAATCCTTCAATCGAATTGGGCCCCGAGTTTAAAGAAGGTTGGCAATTTCTTGAGCAGATTTAAGTCAATT
CCCAGCATTATTGAGCTTGATAGCCTGAAGGTGTCTGGTGATGTATGGTTTGGCACTGGCATTACTCTCA
AGGGAAAGGTGACCATTGCTGCAAAACCTGGGGTTAAGCTGGAAATTCCTGATGGGGTGGTGCTGGAAAA
CAAGGAAATCCATGGCCCTGAGGACCTCTAGAGTCACCACCTTGGTTTTCCAGAAGGAAACATATTGAGAG
TAGTATTTGATCTTGTACTGGAGACCCCGAGTATGTTGGTGTAATCTTTACATATTTGGTTAGGTAAATA
AGTGGACAATTCCGTTTGAACATCTTAACCCGAACCTTGGGAAGGCGAGGATTTTACAATTTTGCTTGT
TTGAAAAGAAAGTGAGAAACGCTGCCTAAACCAGTGAGGTCATTTAAATGTGCCGTCCGCTCTTTCTGCT
GTAAAGTATTGTTGGATTGCCAACTCCTGCATGTCGTTCTTATGTTCCAAAACAAAAAATAAAAGAGA
AAAAAGGAAAA

>gi|103480111|gb|CT986196.1|CT986196 CT986196 Eucalyptus gunnii
differentiating xylem AFOCEL clone 832 Eucalyptus gunnii cDNA, mRNA sequence,
835 letters

CGGTTGTTAACTTAAAGGCAATTAAAAGGCTTGTCGAAGCTCAAGCTCTTAAGATGGAGATCATTCCTAA
TCCAAAGGAAGTGGATGGAATTAAAGTTCTGCAGCTAGAAACTGCAGCTGGTGCAGCAATCAAGTTCTTT
GACAATGCTATTGGCATCAATGTACCTCGGTTCGAGGTTCCCTCCAGTGAAAGCAACTTCAGATCTGCTTC
TTGTTTCAGTCCGATCTTTATACTCTGGTGGATGGTTTTGTTGAACGAAACAAGGCTAGAACAAATCCCTC
AAATCCTTCAATCGAATTGGGCCCCGAGTTTAAAGAAGGTTGGCAATTTCTTGAGCAGATTTAAGTCAATT
CCCAGCATTATTGAGCTTGATAGCCTGAAGGTGTCTGGTGATGTATGGTTTGGCACTGGCATTACTCTCA
AGGGAAAGGTGACCATTGCTGCAAAACCTGGGGTTAAGCTGGAAATTCCTGATGGGGTGGTGCTGGAAAA
CAAGGAAATCCATGGCCCTGAGGACCTCTAGAGTCACCACCTTGGTTTTCCAGAAGGAAACATATTGAGAG
TAGTATTTGATCTTGTACTGGAGACCCCGAGTATGTTGGTGTAATCTTTACATATTTGGTTAGGTAAATA
AGTGGACAATTCCGTTTGAAGCATCTTAACCCGAACCTTGGGAAGGCGAGGATTTTACAATTTTGCTTTG
TTGAAAAGAGAGTGAGAAACGCTGCCTAAACCAGTGAGGTCATTTAAATGTGCCGTCTGCTCTTTCTGCTG
TATAATTTTGGTGAATGCCAACTCTGCCTGTTCTGCTCTTATGTTGCCAAATACCATAAAAAATAA

Figura 34 – ESTs do xilema de eucalipto (*Eucalyptus gunnii*) disponíveis no banco de dados do NCBI, que apresentam similaridade à sequência codificadora da enzima UGPase (BlastX). Os códons terminais do *ugp* em cada EST estão sublinhados


```

>gb|AA048422.1| UDP-glucose pyrophosphorylase [Bambusa oldhamii]
Length=473
Score = 303 bits (775), Expect = 4e-81
Identities = 152/171 (88%), Positives = 164/171 (95%), Gaps = 0/171 (0%)
Frame = +3

Query 6 VNLKAIKRLVEAQALKMEIIPNPKEVDGIKVLQLETAAGAAIKFFDNAIGINVPRSRFLP 185
Sbjct 303 VNLKAIKRLVEA+ALKMEIIPNPKEVDG+KVLQLETAAGAAI+FF+ AIGINVPRSRFLP 362

Query 186 VKATSDLLLQSDLYTLVDGFVERNKARTNPSNPSIELGPEFKKVGNFLSRFKSIPSIIE 365
Sbjct 363 VKATSDLLLQSDLYTLVDGFVIRNPARANPANPSIELGPEFKKVANFLARFKSIPSIVE 422

Query 366 LDSLKVSGDVWFGTGITLKGKVTIAAKPGVKLEIPDGVVLENKEIHGPEDL 518
Sbjct 423 LDSMKVSGDVWFGSGITLKGKVTISAKSGVKLEIPDGTVLENKDINGPEDL 473

```

Figura 35 – BlastX no NCBI para o EST CT981449.1 de *E. gunnii* com alinhamento da UGPase de bambu (*Bambusa oldhamii*) e identidade de 88%, incluindo a extremidade C terminal da proteína

```

>gi|52127390|gb|CV198553.1|CV198553 CGF1003975_F04 Seed coat from mid-season
walnut embryos collected Aug 1 Juglans regia cDNA clone WSC0012_IIIF_F04 5',
mRNA sequence
GGGAATCAGAAACGATATCTCCCAGACTCCCCTTCAGTTCACCTCTTTCCTTTCTAGAAGA
TAATCTCTCTCTCTCTAATCCTCTCCTTTCTTTGAGCTCTCGATCTTCCGGTTTGCTGTT
TAGATTGAAGCTTTGAATTTGTGAGTAATGCTGCGCTGGACTCAACCACATCAGCGAGAATGAG
GAGAAGCTCAATAACCTCAAATCTGCTGTCTGCTGGACTCAACCACATCAGCGAGAATGAG
AAAACCGGGTTCGTCAACCTCGTCGCTCGCTATCTCAGCGCGCAAGCGCAACACGTGGAA
TGGAGTAAGATCCAGACCCCTACTGATGAAGTAGTGGTTCCTTATGAGAGCTTGGCACCC
GCTCCGCATGATCCTGTGGAGACGAAGAAGCTGTTGGACAAACTTGTGTGCTAAAGCTT
AATGGAGGTCTGGGGACAACAATGGGTTGTACTGGGCCCAAGTCTGTCTATTGAAGTTCGG
AACGGGATGACATTTCTTGACTTGATTGTCATCCAGATTGAGAATCTCAATTCAAAGTAT
GGGTGCAATGTTCCATTGCTTCTAATGAACTCGTTCAACACTCACGATGATACATTGAAG
ATTGTGGAAAAATACTCTAGCTCAAACATTGAAATTCATACTTTTAATCAGAGCCAGTAT
CCTCGTCTTGTGTTGATGACTTTAGCCCACTGCCTAGCANAGGACAGACTGACAAGGAT
GGATGGTATCCTGATGGCCATGGTGATGTGTTCCCATCGCTG

```

Figura 36 – EST do embrião de nozeira (*Juglans regia*), disponível no banco de dados do NCBI, que apresenta similaridade à sequência codificadora da enzima UGPase. Em destaque está o códon inicial do *ugp* (extremidade 5')

```

>gb|AAB71613.1|  UDP-glucose pyrophosphorylase [Solanum tuberosum]
Length=477

Score = 309 bits (791),  Expect = 1e-82
Identities = 171/206 (83%), Positives = 188/206 (91%), Gaps = 0/206 (0%)
Frame = +1

Query 145  VMAAATLSAADA EKLNNLKS AVAGLNHISENEKTGFVNLVARYLSGEAQHVEWSKIQTPT 324
          ++ A TLS ADAEKLNNLKS AVAGLN ISENEK+GF+NLV RYLSGEAQH++WSKIQTPT
Sbjct 1    MVTATTLSPADAEKLNNLKS AVAGLNQISENEKSGFINLVGRYLSGEAQHIDWSKIQTPT 60

Query 325  DEVVVVPYESLAPAPHD PvetkkllldklvvlklnngglgttMGCTGPKSVIEVRNGMTFLDL 504
          DEVVVVPY+ LAP DP ETKKLLDKLVVLKLNGLGTTMGCTGPKSVIEVRNG+TFLDL
Sbjct 61   DEVVVVPYDKLAPLSEDPAETKLLDKLVVLKLNGLGTTMGCTGPKSVIEVRNGLTFLDL 120

Query 505  IVIQIENLNSKYGCNVPLLLMNSFNTHDDTLKIVEKYSSSNIIEHTFNQSQYPRLVVDFF 684
          IV QIE LN+K+GC+VPLLLMNSFNTHDDTLKIVEKY++SNI+IHTFNQSQYPRLV +DF
Sbjct 121  IVKQIEALNAKF GCSVPLLLMNSFNTHDDTLKIVEKYANSNIDIHTFNQSQYPRLVTEDF 180

Query 685  SPLPSXGQTDKDGWYPDGHGDVFP SL 762
          +PLP G + KDGWYP GHGDVFP SL
Sbjct 181  APLPCKGNSGKDGWYPPGHGDVFP SL 206

```

Figura 37 – Alinhamento encontrado pelo BlastX no NCBI entre o EST de noqueira (gil52127390) e a UGPase de batata (*Solanum tuberosum*) (gblAAB71613.1), com identidade de 83%, englobando a extremidade N terminal da proteína, mas não a C terminal

```

148 atggctgccgccactttgagcgtgctgatgccgagaagctcaat
M A A A T L S A A D A E K L N
193 aacctcaaactctgctgctggactcaaccacatcagcgagaat
N L K S A V A G L N H I S E N
238 gagaaaaccgggttcgtcaacctcgtcgtcgtatctcagcggc
E K T G F V N L V A R Y L S G
283 gaagcgcaacacgtggaatggagtaagatccagacccctactgat
E A Q H V E W S K I Q T P T D
328 gaagtagtggttccttatgagagcttggcaccgcgtccgcgatgat
E V V V P Y E S L A P A P H D
373 cctgtggagacgaagaagctgttggacaaacttggtgtgctaaag
P V E T K K L L D K L V V L K
418 cttaatggaggtctggggacaacaatgggttgactgggcccaag
L N G G L G T T M G C T G P K
463 tctgtcattgaagttcgaacgggatgacatttcttgacttgatt
S V I E V R N G M T F L D L I
508 gtcattccagattgagaatctcaattcaaagtatgggtgcaatggt
V I Q I E N L N S K Y G C N V
553 ccattgcttctaataactcgttcaacactcacgatgatacattg
P L L L M N S F N T H D D T L
598 aagattgtgaaaaatactctagctcaaacattgaaattcatact
K I V E K Y S S S N I E I H T
643 tttaatcagagccagtatcctcgtcttgttgatgacttttagc
F N Q S Q Y P R L V V D D F S
688 ccactgcctagcanaggacagactgacaaggatggatggtatcct
P L P S X G Q T D K D G W Y P
733 gatggccatggtgatgtgttcccatcgctg 762
D G H G D V F P S L

```

Figura 38 – Parte da ORF do gene *ugp* de noqueira obtida pelo programa ORF Finder para o EST gil52127390

Devido a esta dificuldade, acrescida da ausência de seqüências alternativas que pudessem ser usadas, optou-se pela clonagem em duas etapas. Na primeira, o cDNA foi obtido pela transcrição reversa utilizando-se um par de *primers* sem a seqüência Gateway CACC (onde o *dimer* formado seria menor). Uma vez isolado, o cDNA pôde ser amplificado inserindo-se a seqüência de direcionamento necessária para este sistema de clonagem. Os *primers* específicos definidos para clonagem e a amplificação da ORF do *ugp* de eucalipto foram os seguintes: *forwad* 1 [5' ATGGCTGCCGCCACTTT 3'], *forwad* 2 [5' CACCATGGCTGCCGCCACTTT 3'] e *reverse* [5' CTAGAGGTCCTCAGGGCCATG 3']

4.6.3 Síntese do cDNA do *ugp* de eucalipto

Na reação de RT-PCR utilizou-se o mRNA obtido a partir de RNA total extraído da raiz de eucalipto, o kit *SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq* (Invitrogen), e *primers* específicos para a ORF da UGPase de eucalipto. O produto resultante da amplificação (Figura 39) apresentou altura de banda coerente à esperada que é de aproximadamente 1.400 pb (KATSUBE et al., 1990).

Figura 39 – Perfil eletroforético do produto da RT-PCR do mRNA da região cambial de eucalipto com *primers* específicos para o *ugp* de eucalipto. **PM** marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* (Fermentas); **pb** peso molecular em pares de bases; **1** produto da RT-PCR

O cDNA obtido na reação de RT-PCR foi clonado no vetor pENTR/D-TOPO[®]. O vetor recombinante foi utilizado na transformação de células quimicamente competentes da linhagem de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Os clones selecionados em meio LB sólido acrescido de canamicina foram submetidos à confirmação da transformação, via PCR com *primers* específicos

para a ORF, onde o produto amplificado corresponde a aproximadamente 1,4 kb.

4.7 Clonagem do cDNA do gene *ugp* no vetor binário e transformação genética de plantas de eucalipto

O vetor pENTR/D-TOPO[®]/*ugp* de eucalipto foi sub-clonado no vetor binário pK7WG2D para transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α . Os clones recombinantes foram selecionados em meio LB contendo espectinomicina e os clones resultantes testados por meio de PCR. O plasmídeo pK7WG2D/*ugp*, foi extraído e utilizado para a transformação química de da linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*. A confirmação da inserção do plasmídeo nos clones de *A. tumefaciens* que cresceram em meio seletivo foi obtida por meio da PCR com o par de *primers* específicos para a ORF do *ugp* de eucalipto onde o tamanho do produto amplificado foi de 1,4 kb, correspondente ao esperado.

A transformação genética de eucalipto (clone 11) foi realizada em três experimentos por meio de infecção de ~15.000 folíolos, mantidos em cultura *in vitro*, com um clone de *A. tumefaciens* EHA105 recombinante, contendo o vetor Gateway pK7WG2D/*ugp* derivado de eucalipto, seguido de indução de formação de *calli* e obtenção de brotos enraizados (Figura 40).

O controle negativo (~800 folíolos não inoculados) não formou *calli*, confirmando a eficiência do agente seletivo (canamicina), e o controle positivo (~600 folíolos inoculados) formou *calli*, confirmando a eficiência do meio de cultura desprovido de canamicina.

4.7.1 Avaliação das plantas de eucalipto transformadas por PCR

Os brotos enraizados foram avaliados quanto à presença do transgene por meio de PCR. A PCR foi realizada utilizando-se um pedacinho de tecido foliar obtido ainda na fase de cultura de tecidos, par de *primers* específico ao gene *nptII* e o kit *Extract-N-Amp[™] Plant PCR* (Sigma).

No entanto, no perfil eletroforético, a maioria dos brotos, que apresentou o produto de amplificação obtido pela reação de PCR de tamanho correto (700 pb), na verdade era “falso positivo”, provavelmente devido à contaminação da reação por *Agrobacteria* remanescente na cultura de tecidos. Isso foi verificado por meio de novas reações de amplificação e pela análise de *Southern blot*.

4.8 Análise de *Southern blot* das plantas transgênicas de eucalipto

A análise de *Southern blot* foi realizada a partir do DNA genômico extraído de folhas de eucalipto transgênicas (T₀) para o gene de interesse, e da linhagem selvagem (clone 11), utilizada como controle negativo, digeridos com a enzima *Hind*III, que não cliva a sequência do gene *nptII*, gene marcador alvo da sonda.

Na Figura 41 é possível observar-se que no perfil eletroforético apenas uma linhagem de eucalipto, que apresentou produto de amplificação correto na PCR, obteve banda pela hibridização com a sonda para o gene *nptII*. Isso indica que, em relação ao controle, apenas esta linhagem incorporou efetivamente em seu genoma o transgene *ugp* clonado do próprio eucalipto, e provavelmente uma única cópia.

4.9 Análise química dos componentes da parede celular de folhas de eucalipto transgênico

A planta transgênica de eucalipto portadora do gene *ugp* clonado do próprio eucalipto (geração T₀) e uma linhagem do clone 11 (eucalipto selvagem), utilizada como controle, foram avaliadas em 9 repetições, quanto à composição química da parede celular primária.

A análise química de folhas jovens da planta transgênica indica que a superexpressão do gene *ugp* alterou seu metabolismo em relação à planta controle. Na Tabela 9 nota-se que ocorreu acréscimo estatisticamente significativo para o nível de 1%, pelo teste de Dunnett, nos teores de arabinose, ramnose, galactose, glucose, xilose, manose, lignina solúvel e ácido galacturônico. O aumento foi significativo para o nível de 5% no teor de ácido glucurônico. Houve redução no teor de celulose e aumento de lignina insolúvel, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas pelo teste de Dunnett.

Figura 40 – Diferentes estádios no processo de obtenção de plantas transgênicas de eucalipto; **a)** brotações do clone 11 (eucalipto selvagem) mantidas *in vitro*; **b)** brotações recém-sonicadas sendo infectadas por *A. tumefaciens*; **c)** folíolos retirados das microestacas infectadas; **d)** controle negativo composto por folíolos não transformados; **e)** início da formação de *calli*; **f)** placas para indução de brotação na câmara de crescimento; **g)** brotações; **h)** alongamento de brotos; **i)** broto enraizado transferido para vaso coberto por plástico para garantir o controle da umidade; **j)** planta em vasos sem proteção, na câmara de crescimento; **k)** planta jovem na casa de vegetação

Figura 41 – *Southern blot* do DNA genômico de plantas de eucalipto digerido com a enzima de restrição *HindIII* e hibridizado com sonda do gene *nptII*; Ø controle negativo (clone 11); ⊕ controle positivo (planta de tabaco transgênica para o gene *nptII*; 1 e 2 linhagens transgênicas para o gene *ugp* de eucalipto

Tabela 9 – Conteúdo de monossacarídeos, lignina, ácidos urônicos e celulose da parede celular primária de FOLHAS de eucalipto de uma linhagem selvagem (**Clone 11**) e de uma linhagem transgênica (**Euc *ugp***) portadora do gene *ugp* clonado da mesma espécie. Valores são médias (n = 9) expressas em mg/g de matéria seca. * Variação significativa para $p < 0,05$ em relação ao clone 11; ** Variação significativa para $p < 0,01$ em relação ao clone 11

Componentes		Clone 11	Euc <i>ugp</i>
Monossacarídeos	Arabinose	25,68	29,08 **
	Ramnose	8,54	11,20 **
	Galactose	23,40	28,53 **
	Glicose	185,71	97,37 **
	Xilose	20,27	17,26 **
	Manose	1,67	2,13 **
	Total	265,27	185,58 **
Ligninas	Insolúvel	139,56	144,00
	Solúvel	124,88	150,84 **
	Total	264,44	294,84 **
Ácidos Urônicos	Galacturônico	22,18	28,13 **
	Glucurônico	0,73	0,79 *
	Total	22,91	28,92 **
Celulose		133,93	130,03
Hexoses / Pentoses		4,77	3,01 **

Considerando-se os grupos de componentes da parede primária da folha de eucalipto observa-se que houve redução no teor total de monossacarídeos e na proporção entre hexoses e pentoses, e aumento no teor total de lignina e de ácidos urônicos, todos ao nível de significância de 1 %, pelo teste de Dunnett.

4.10 Comparação entre os diferentes materiais analisados quimicamente

As alterações nas plantas transgênicas, tanto de tabaco, como de eucalipto, em relação aos controles, verificadas através das análises químicas estão resumidas na Figura 42. Observa-se que em todos os materiais analisados (plântula, medula e xilema de tabaco e folha de eucalipto)

ocorreram alterações estatisticamente significativas em relação aos seus controles. No entanto, a tendência de aumento, redução ou de manutenção, para cada um dos componentes não foi a mesma em todos os materiais.

De um modo geral, na parede primária das plântulas de tabaco, os conteúdos de cada um dos monossacarídeos, da celulose e do ácido galacturônico sofreram redução em relação ao controle Gateway. Na medula, que também é parede primária, ocorreu o inverso. Os conteúdos de cada um dos monossacarídeos e dos ácidos urônicos sofreram acréscimos em relação ao controle Gateway, sendo algumas variações altamente significativas estatisticamente. Resultado semelhante ao da medula foi obtido para a parede primária de folhas de eucalipto, com a exceção de que houve redução nos teores de glucose e xilose nas folhas.

A diferença encontrada entre a parede primária das plântulas e a parede primária da medula do caule de tabaco e de folhas de eucalipto pode ser causada por uma regulação diferenciada relacionada com o estágio de desenvolvimento. Entretanto, dados obtidos por Celedón et al. (2007) mostram que uma das isoformas putativas da UGPase não tem nível de expressão (volume do *spot*) significativamente diferenciado entre as três idades analisadas (6 meses, 3 e 6 anos) de *E. grandis*, sugerindo que o nível de sua expressão não está relacionado com a idade da planta. Por outro lado, pode ser que a divergência entre os estádios de desenvolvimento dos materiais analisados em tabaco é proporcionalmente maior do que entre as idades submetidas à análise proteômica no eucalipto.

Na parede secundária do xilema, a tendência foi de redução nos teores de arabinose, galactose e de ácido glucurônico, e de acréscimo nos demais componentes, apesar das variações não serem significativas.

Portanto, a superexpressão do gene *ugp* teve reflexos diferenciados, dependente do tecido considerado. Comparando-se os quatro materiais analisados, as diferenças em relação aos controles foram mais significativas no tecido medular do caule, e as diferenças menos significativas foram encontradas no tecido xilemático. Esse fato é interessante, pois sugere que a planta, de alguma forma, tende a manter inalterada a proporção entre os componentes da parede celular secundária, encontrada em células diferenciadas, lignificadas e naquelas que sofreram morte celular programada. Yong et al. (2005) já citaram que as plantas parecem possuir a capacidade de se ajustar aos efeitos decorrentes de possíveis alterações na biossíntese dos

monossacarídeos componentes da parede celular através da modulação da expressão gênica. A regulação pode estar sendo coordenada por fatores de transcrição como os da família MYB e LIM (PAUX et al., 2005) ou proteínas regulatórias da família 14.3.3 (ALEXANDER; MORRIS, 2006), mantendo as proporções inalteradas. A parede celular primária, característica de células em crescimento e não lignificadas, parece estar mais sujeita aos efeitos da superexpressão do gene *ugp*.

As hemiceluloses nas dicotiledôneas são formadas, em grande parte, a partir de xilose e ácido glucurônico e, em menor proporção, a partir de glucose e manose (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977). A xilose é o principal componente de polissacarídeos da parede celular vegetal que incluem xiloglucanos na parede primária e xilanas na parede secundária de dicotiledôneas (BINDSCHEDLER et al., 2005). Assim, pode-se afirmar que houve incremento no conteúdo de hemiceluloses tanto na medula de tabaco, como nas folhas de eucalipto. O aumento do conteúdo de hemiceluloses, indicado pelo aumento significativo daqueles quatro componentes e pela redução na proporção entre hexoses e pentoses, ou seja, aumento das pentosanas, é a alteração que se esperava principalmente para o xilema, o que seria benéfico economicamente para a indústria de papel e celulose. As hemiceluloses permitem a inserção de moléculas de água nas regiões cristalinas das fibras diminuindo a energia consumida no refino da polpa. O aumento do conteúdo de hemiceluloses, que formam ligações entre as fibras, também pode beneficiar a qualidade do papel que se torna mais resistente ao rasgo (LIMA et al., 2003). Mas no xilema só houve aumento significativo no conteúdo de manose, sem alteração na proporção entre hexoses e pentoses, nem no conteúdo total de ácidos urônicos. Talvez, este objetivo possa ser atingido por meio da superexpressão do gene dirigido por um promotor tecido específico, no caso o xilema, que é onde se busca alterar a composição.

Percebe-se que há correlação entre a superexpressão do *ugp* e as alterações na composição química dos componentes da parede celular detectadas pela análise química das plantas. As linhagens transgênicas de tabaco que tiveram maior nível de expressão do gene *ugp* exógeno e endógeno foram 1D, 13F, 24F e 32B, além da 6E, que teve igual nível de expressão do gene *ugp* endógeno (Figuras 26 e 27). São exatamente estas cinco linhagens, mais a linhagem 14A, que tiveram um número maior de diferenças estatisticamente significativas na medula caulinar (Figura 42).

As plantas da linhagem 4 H, que se mostraram morfológicamente diferentes das demais, devido à redução na altura da planta e altura média de internós, apresentaram reduções nos teores de arabinose, galactose, glucose, xilose e ácido glucurônico na medula, mesmo que não significativas, mas não observadas nas demais linhagens. Como já foi mencionado anteriormente, estas alterações parecem ser mais um efeito do local de inserção do transgene no genoma desta linhagem em particular, do que do efeito do transgene em si.

No xilema de tabaco e nas folhas de eucalipto ocorreu elevação no teor de lignina. Este fato sugere que, embora a síntese de lignina aconteça em outra rota metabólica, em que não há participação direta da UGPase, o aumento da sua expressão reflete além da rota de interconversão de nucleotídeo-açúcares. Hu e colaboradores (1999) já haviam notado que a repressão da biossíntese de lignina promove o acúmulo de celulose e correspondente crescimento em árvores. Dos dados obtidos aqui, excluindo-se a análise das plântulas, em que se mediu os teores de celulose, não se pode concluir se houve alteração nos teores de celulose nos materiais analisados porque a glucose não é componente exclusivo da celulose.

Os teores totais de monossacarídeos mostraram-se em menores quantidades nas plântulas, intermediárias na medula de tabaco e folhas de eucalipto e maiores no xilema. O inverso foi observado para os teores de ácidos urônicos. Os menores níveis foram encontrados na parede secundária do xilema, ao passo que na parede primária foi encontrado o dobro. A proporção de pentosanas foi bem maior no xilema do que na medula.

Devido a alguns imprevistos encontrados durante a execução deste projeto de pesquisa, determinadas etapas previstas ainda estão em andamento, especialmente no que se refere à superexpressão do *ugp* no eucalipto.

Material	Linh.	Monossacarídeos						Celulose	Ligninas		Ácidos Urônicos		Totais			Hexoses/ Pentoses
		Arabinose	Ramnose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose		Insolúvel	Solúvel	Galact.	Glucur.	Monossac	Ligninas	ÁcsUrôns	
TABACO	Plântula	1D	-	-	- **	-	- **	-			- **	-	- **		- **	+
		4H	-	-	-	+	+	-			-	0	+		-	+
		6E	+	+	+	+	+	-			-	0	+		-	+
		8I	0	+	-	-	- *	-			-	-	-		-	+
		12J	-	+	+	+	+	+			+	0	+		+	+
		13F	-	-	-	0	-	-			-	-	-		-	0
		14A	-	+	- *	- **	- **	- **			-	0	- *		-	+
		24A	- **	- *	- **	-	- **	- **			- **	-	- **		- **	0
		30H	- *	-	- **	-	- *	-			-	-	- *		-	0
		32B	-	-	- **	-	- **	- *			-	-	- **		-	+
	Medula	1D	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	-
		4H	-	+	-	-	-	+			+	-	-		+	+
		6E	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	-
		8I	+	+	-	+	+	+			+	0	+		+	-
		12J	+	+	-	+	+	+			+	+	+		+	-
		13F	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	-
		14A	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	-
		24A	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	-
		30H	+	-	-	+	+	+			+	+	+		+	-
		32B	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	-
	Xilema	1D	-		-	+	+	+	+	-	0	-	+	+	0	0
		4H	-		- *	-	+	+	+	-	0	0	+	+	-	0
		6E	-		-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
		8I	-		-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	0
		12J	-		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	0
		13F	-		-	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0
		14A	0		-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	0
		24A	+		+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0
		30H	-		- *	+	-	-	+	+	-	-	0	+	-	+
		32B	-		-	+	0	-	+	-	+	-	+	+	0	0
EUC.	Folha	14(11)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-

+

 aumento em relação ao conteúdo no controle Gateway

-

 redução em relação ao conteúdo no controle Gateway

0

 conteúdo igual ao do controle

*

 diferença estatisticamente significativa (p<5%) pelo teste de Dunnett

**

 diferença estatisticamente significativa (p<1%) pelo teste de Dunnett

Figura 42 – Alterações nas plantas transgênicas *ugp*, em relação aos controles, verificadas pelas análises químicas

5 CONCLUSÕES

- A análise química indica que houve alteração na partição do carbono na biossíntese dos carboidratos da parede celular primária de plântulas e da medula caular, e da parede secundária do xilema de tabaco como consequência da modulação do gene da UDP-glucose pirofosforilase.
- A alteração na partição de carbono foi mais significativa na medula do caule de tabaco, com aumento nos teores de arabinose, ramnose, galactose, glucose, xilose, manose e ácidos galacturônicos, resultando na redução na proporção entre hexoses e pentoses.
- Não foram detectadas alterações morfológicas nas plantas de tabaco transgênicas.
- A planta de eucalipto, transgênica para o gene *ugp*, sofreu alteração no metabolismo das hemiceluloses das folhas, havendo acréscimo significativo nas concentrações de arabinose, ramnose, galactose, manose, lignina solúvel e ácidos urônicos, e redução significativa nos teores de glucose e xilose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, R.D.; MORRIS, P.C. A proteomic analysis of 14-3-3 binding proteins from developing barley grains. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 6, p. 1886-1896, 2006.

ALLONA, I.; QUINN, M.; SHOOP, E.; SHOOP K.; ST CYR, S.; CARLIS, J.; RIEDL, J.; RETZEL, E.; CAMPBELL, M.M.; SEDEROFF, R.; WHETTEN R.W. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 16, p. 9693-9698, 1998.

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

ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.185, 1996.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E 1758-01. Annual Book of ASTM Standards: Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography.**, West Conshocken: ASTM International, 2003. v. 11.05

BERTOLO, A.L.F. **Alteração da composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, pela modulação da expressão do gene *uxs* que codifica a enzima UDP-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35).** 2007. 142 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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, n. 5922, 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**, v. 72, p. 51-56, 1992. Disponível em: <http://digital.library.okstate.edu/oas/>. Acesso em: 25 jan. 2008.

BINDSCHEDLER, L.V.; WHEATLEY, E.; GAY, E.; COLE, J.; COTTAGE, A.; BOLWELL, G.P. Characterisation 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.

BLEE, K.A.; WHEATLEY, E.R.; BONHAM, V.A.; MITCHELL, G.P.; ROBERTSON, D.; SLABAS, A.R.; BURRELL, M.M.; WOYTASZEK, P.; BOLWELL, G.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**, New York, v. 212, p. 404-415, 2001.

BOROVKOV, A.Y.; McCLEAN, P.E.; SECOR, G.A. Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphorylase. **Gene**, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 293-297, 1997.

BOROVKOV, A.Y.; McCLEAN, P.E.; SOWOKINOS, J.R.; RUUD, S.H.; SECOR, G.A. Effect of expression of UDP-glucose pyrophosphorylase ribozyme and antisense RNAs on the enzyme activity and carbohydrate composition of field-grown transgenic potato plants. **Journal of Plant Physiology**, Wollgrasweg, v.147, n.6, p.644-652, 1996.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel **Bracelpa News**, ano XIII, nº 666 (19 de dezembro de 2007). Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra/index.html>>. Acesso em: 7 jan. 2008.

BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdh* de soja, que codifica a enzima UDP-glucose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BRETT, C.T. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition and integration into the cell wall. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 199, p. 161-199, 2000.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.; SANTOS, H.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12 (Edição Especial), p. 137-162, 2000.

BUDAR, F.; THIA-TOONG, L.; MONTAGU, M.VAN; HERNALSTEENS, J.P. *Agrobacterium*-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single mendelian factor. **Genetics**, Baltimore, v. 114, n. 1, p. 303-313, 1986.

CALDAS, D.G.G. **Análise do transcrito da região cambial de *Eucalyptus grandis* e a identificação de genes diferencialmente expressos em árvores juvenis e adultas**. 2007. 152 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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.

CAVALCANTI, G. R. A. Identificação das principais espécies de *Eucalyptus* existentes no Brasil. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 149-169, 1963.

CELEDÓN, P.A.F.; ANDRADE, A.; MEIRELES, K.G.X.; CARVALHO, M.C.C.G.; CALDAS, D.G.G.; MOON, D.H.; CARNEIRO, R.T.; FRANCESCHINI, L.M.; ODA, S.; LABATE, C.A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2258-2274, 2007.

CHAFFEY, N. (Ed.) **Wood formation in trees: cell and molecular biology techniques**. London; New York: Taylor & Francis, 2002, 364 p.

CHEN, R.Z.; ZHAO, X.; SHAO, Z.; WEI, Z.; WANG, Y.; ZHU, L.; ZHAO, J.; SUN, M.; HE, R.; HE, G. Rice UDP-glucose pyrophosphorylase 1 is essential for pollen callose deposition and its cosuppression results in a new type of thermosensitive genic male sterility. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 3, p. 847-861, 2007b.

CHEN, R.Z.; ZHAO, X.; SHAO, Z.; ZHU, L.L.; HE, G.C. Multiple isoforms of UDP-glucose pyrophosphorylase in rice. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 129, n. 4, p. 725-736, 2007a.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CID, L.P.B.; MACHADO, A.C.M.G.; CAVALHEIRA, S.B.R.C.; BRASILEIRO, A.C.M. Plant regeneration from seedlings of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 17-23, 1999.

CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H.; HURRY, V.; KLECZKOWSKI, L.A. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. **Planta**, New York, v. 212, n. 4, p. 598-605, 2001.

CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H.; KLECZKOWSKI, L.A. Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, n. 3, p. 343-353, 2005.

CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H.; KLECZKOWSKI, L.A. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**, London, v. 354, pt. 1, p. 67-72, 2001.

CIERESZKO, I.; KLECZKOWSKI, L.A. Expression of several genes involved in sucrose/starch metabolism as affected by different strategies to induce phosphate deficiency in *Arabidopsis*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 27, n. 2, p. 147-155, 2005.

CIERESZKO, I.; KLECZKOWSKI, L.A. Phosphate deficiency-dependent upregulation of UDP-glucose pyrophosphorylase genes is insensitive to ABA and ethylene status in *Arabidopsis* leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 28, n. 5, p. 387-393, 2006.

COLEMAN, H.D.; CANAM, T.; KANG, K-Y.; ELLIS, D.D.; MANSFIELD, S.D. Over-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase affects carbon allocation in hybrid poplar. In: IUFRO Tree Biotechnology Congress, 2007, Azores. **IUFRO Tree Biotechnology Abstracts**, Azores, 2007. S VI.4.

- COLEMAN, H.D.; ELLIS, D.D.; GILBERT, M.; MANSFIELD, S.D. Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 87-101, 2006.
- CONTI, G. **Efeito da superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis*, na composição de carboidratos de parede celular secundária de plantas transgênicas de tabaco.** 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.
- DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Possible control sites of polysaccharide synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.) **Planta**, Berlin, v.134, n. 1, p.39-44, 1977.
- DARAN, J.M.; DALLIES, N.; THINES-SEMPOUX, D.; PAQUET, V.; FRANCOIS, J. Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 233, n. 2, p. 520-530, 1995.
- DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis in developing cotton fibers. *In*: BASRA, A.S. (Ed.) **Cotton Fibers**. New York: Hayworth/Food Sci. Press, 1999b. p.85-102.
- DELMER, D.P. Cellulose synthesis: Exciting times for a difficult field. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.245-276, 1999a.
- DELMER, D.P.; HAIGLER, C.H. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. **Metabolic Engineering**, San Diego, v.4, p.22-28, 2002.
- DELMER, D.P.; STONE, B.A. Carbohydrates. *In*: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Ed.) **The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1988. v. 14, p. 373-420.
- DEROLES, S.C.; GARDNER R.C. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, New York, v.11, p.355-364, 1988.
- DIMOND, R.L.; FARNSWORTH, P.A.; LOOMIS, W.F. Isolation and characterization of mutations affecting UDPG pyrophosphorylase activity in *Dictyostelium discoideum*. **Developmental Biology**, San Diego, v.50, p.169-181, 1976.
- DOBLIN, M.S.; KUREK, I.; JACOB-WILK, D.; DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1407-1420, 2002.
- DOP, P.; GAUTÍÉ, A. **Manuel de technique botanique: histologie et microbie végétales**. 2.ed. Paris: Lamarre, 1928. 594 p.

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

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, St. Louis, v.19, p.11-15, 1987.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A. ; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EIMERT, K.; VILLAND, P.; KILIAN, A.; KLECZKOWSKI, L.A. Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues. **Gene**, Amsterdam, v. 170, n. 2, p. 227-232, 1996.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt Domestication and Breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1993, p. 228-246, 288 p.

ELDRIDGE, K.G. Breeding systems, variation and genetic improvement of tropical eucalypts. In: BURLEY, J.; STYLES, B.T. **Tropical Trees: variation, breeding and conservation**. London: Academic Press, 1976. 243p.

ERICKSON, R.O.; MICHELINI, F.J. The plastichron index. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 44, n. 4, p. 297-305, 1957.

FARROKHI, N.; BURTON, R.A.; BROWNFIELD, L.; HRMOVA, M.; WILSON, S.M.; BACIC, A.; FINCHER, G.B. Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 145-167, 2006.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 45, p. 22-30, 1992.

FERREIRA, M. Escolha de Espécies de Eucalipto. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, v.47, p.1-30, 1979.

FLORES-DIAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; PERSSON, B.; POLLESELLO, P.; MOOS, M.; von EICHEL-STREIBER, C.; THELESTAM, M.; FLORIN, I. Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, n. 38, p. 23784-23791, 1997.

FRANCIS, C.A.; RUTGER, J. N.; PALMER, A.F.E. A rapid method for plant leaf area estimation in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, 5, p. 537-539, 1969.

FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, p. 1-11, 1989.

FUKUDA, H. Tracheary element differentiation. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1147-1156, 1997.

FUKUDA, H. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 299-345, 1996.

GEISLER-LEE, J. .; GEISLER, M.; COUTINHO, P.M.; SEGERMAN, B.; NISHIKUBO, N.; TAKAHASHI, J.; ASPEBORG, H.; DJERBI, S.; MASTER, E.; ANDERSSON-GUNNERAS, S.; SUNDBERG, B.; KARPINSKI, S.; TEERI, T.T.; KLECZKOWSKI, L.A.; HENRISSAT, B.; MELLEROWICZ, E.J. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 3, p. 946-962, 2006.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.; CARNEIRO, R.; DEFAVARI, V.; LABATE, M.; LABATE, C.A. Transformação genética do eucalipto. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 18-22, 2002 b.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFAVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, n. 1, p. 97-102, 2002 a.

GUTMANIS, G. **Clonagem do cDNA que codifica a enzima UDP-glucose pirofosforilase de batata (*Solanum tuberosum* L.)**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

HAIGLER, C.H.; IVANOVA-DATCHEVA, M.; HOGAN, P.S.; SALNIKOV, V.V.; HWANG, S.; MARTIN, K.; DELMER, D.P. Carbon partitioning to cellulose synthesis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1-2, p. 29-51, 2001.

HO, C.K.; CHANG, S.H.; TSAI, J.Y.; TSAI, C.J.; CHIANG, V.L.; CHEN, Z.Z. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus calmadulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, n. 9, p. 675-680, 1998.

HOPKINS, W.G. **Introduction to Plant Physiology**. New York: John Willey & Sons, 1995. 464p.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLTZ, 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.

HOSSAIN, S.A.; TANIZAWA, K.; KAZUTA, Y.; FUKUI, T. Overproduction and characterization of recombinant UDP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli* K-12. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 115, p.965-972, 1994.

HU, W-J.; HARDING, S.A.; LUNG, J.; POPKO, J.L.; RALPH, J.; STOKKE, D.D.; TSAI, C.J.; CHIANG, V.L. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 808-812, 1999.

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.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1976, 777 p.

JOSHI, C.P.; BHANDARI, S.; RANJAN, P.; KALLURI, U.C.; LIANG, X.; FUJINO, T.; SAMUGA, A. Genomics of cellulose biosynthesis in poplars. **New Phytologist**, Oxford, v. 164, p. 53-61, 2004.

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

KATSUBE, T.; KAZUTA, Y.; MORI, H.; NAKANO, K.; TANIZAWA, K.; FUKUI, T. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 108, n. 2, p. 321-326, 1990.

KATSUBE, T.; KAZUTA, Y.; TANIZAWA, K.; FUKUI, T. Expression in *Escherichia coli* of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA from potato tuber and functional assessment of the five lysyl residues located at the substrate-binding site. **Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 35, p. 8546-8551, 1991.

KAZUTA, Y.; OMURA, Y.; TAGAYA, M.; NAKANO, K.; FUKUI, T. Identification of lysyl residues located at the substrate-binding site in UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: affinity labeling with uridine di- and triphosphopyridoxals. **Biochemistry**, Washington, v. 30, p. 8541-8545, 1991.

KLECZKOWSKI, L.A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1507-1515, 1994.

KLECZKOWSKI, L.A., GEISLER, M., CIERESZKO, I., JOHANSSON, H. UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 912-918, 2004.

KLECZKOWSKI, L.A.; MARTZ, F.; WILCZYNSKA, M. Factors affecting oligomerization status of UDP-glucose pyrophosphorylase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 24, p. 2815-2821, 2005.

KONISHI, Y.; TANIZAWA, K.; MUROYA, S.; FUKUI, T. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and affinity labeling of bovine liver UDP-glucose pyrophosphorylase. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 114, p. 61-68, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEV-YADUN, S. Induction of sclereid differentiation in the pith of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 281, p. 1845-1849, 1994.

LI, L.; LU, S.; CHIANG, V. A genomic and molecular view of wood formation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 215-233, 2006.

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

LIMA, D.U.; OLIVEIRA, R.C.; BUCKERIDGE, M.O. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 367-373, 2003.

LIMA, W. P. **Impacto Ambiental do Eucalipto**. São Paulo: EDUSP, 2ª edição, 1993, 301 p.

MARTZ, F.; WILCZYNSKA, M.; KLECZKOWSKI, L.A. Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase. **Biochemical Journal**, London, v. 367, p. 295-300, pt. 1, 2002.

MASS, C.; SCHAAL, S.; WERR, W. A feedback control element near the transcription start site of the maize *Shrunken* gene determines promoter activity. **EMBO Journal**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 3447-3452, 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.J.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1-2, p. 239-274, 2001.

MENG, M.; GEISLER, M.; JOHANSSONA, H.; MELLEROWICZ, E.J.; KARPINSKI, S.; KLECZKOWSKI, L.A. Differential tissue/organ-dependent expression of two sucrose- and cold-responsive genes for UDP-glucose pyrophosphorylase in *Populus*. **Gene**, Amsterdam, v. 389, n. 2, p. 186-195, 2007

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A.M.; TULIERES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 25, n. 2, p. 207-212, 1998.

MORRIS, C.R.; SCOTT, J.T.; CHANG, H-M.; SEDEROFF, R.R.; O'MALLEY, D.; KADLA, J.F. Metabolic Profiling: a new tool in the study of wood formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 1427-1434, 2004.

MULLINS, K.V.; LLEWELLYN, D.J.; HARTNEY, V.J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E.S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus calmadulensis*. **Plant Cell Reports**, Canberra, v. 16, n. 11, p. 787-791, 1997.

MURASHIGE, T.; SHOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NAKANO, K.; MORI, H.; FUKUI, T. Molecular cloning of cDNA encoding potato amyloplast α -glucan phosphorylase and the structure of its transit peptide. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.106, p.691-695, 1989.

NAKANO, K.; OMURA, Y.; TAGAYA, M.; FUKUI, T. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: purification and characterization. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 106, n. 3, p. 528-532, 1989.

NASCIMENTO, D.D. **Clonagem do cDNA que codifica a enzima Mio-Inositol oxigenase (EC 1.13.99.1) de *Arabidopsis thaliana* e modulação da expressão do gene via anti-sense em plantas de *Nicotiana tabacum* L.** 2005. 96 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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, n. 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 Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.77, n.6, p.3346-3350, 1980.

OH, S.; PARK, S.; HAN, K.H. Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 393, p. 2709-2722, 2003.

PARK, J.-Y.; CANAM, T.; KANG, K.-Y.; ELLIS, D.D.; MANSFIELD, S.D. Over-expression of an arabidopsis family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. **Transgenic Research**, April 06, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/y242371x42223501/>>. Acesso em: 24 jan. 2008.

PAUX, E.; CAROCHA, V.; MARQUES, C.; de SOUSA, A.M.; BORRALHO, N.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. **New Phytologist**, Oxford, v. 167, n. 1, p. 89-100, 2005.

PAUX, E.; TAMASLOUKHT, M'B.; LADOUCHE, N.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, p. 263-280, 2004.

PENG, H.L.; CHANG, H.Y. Cloning of human liver UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA by complementation of the bacterial *galU* mutation. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v.329, n. 1-2, p.153-158, 1993.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

- PICTON, S.; GRAY, J.; BARTON, S.; ABUBAKAR, U.; LOWE, A.; GRIERSON, D. cDNA cloning and characterization of novel ripening-related mRNAs with altered patterns of accumulation in the ripening inhibitor (rin) tomato ripening mutant. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 193-207, 1993.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1513-1523, 2001.
- PRYOR, L.D. **The Biology of Eucalypts**. London: Edward Arnold, 1976. 82p.
- PUA, E.C.; LIM, S.S.W.; LIU, P.; LIU, J.Z. Expression of a UDPglucose pyrophosphorylase cDNA during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 27, n. 12, p. 1151-1159, 2000.
- RANIK, M.; MYBURG, A.A. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. **Tree Physiology**, Victoria, v. 26, n. 5, p. 545-556, 2006.
- 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. Structure, synthesis and function of the plant cell wall. In: MEYEROWITZ, E.M.; SOMERVILLE, C.R. (Eds.) **Arabidopsis**. New York: Cold Spring Harbor, 1994. p. 955-988.
- REITER, W.D.; VANZIN, G.F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.47, n.1-2, p.95-113, 2001.
- REPETTO, O.; BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, n. 3, p. 555-567, 2003.
- ROEBEN, A.; PLITZKO, J.M.; KÖRNER, R.; BÖTTCHER, U.M.K.; SIEGERS, K.; HAYER-HARTL, M.; BRASHER, A. Structural basis for subunit assembly in UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 364, n. 4, p. 551-560, 2006.
- ROGERS, L.A.; CAMPBELL, M.M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, Oxford, v. 164, p. 17-30, 2004.
- ROMANO, M.R. **Análise de crescimento, produção de biomassa, fotossíntese e biossíntese de aminoácidos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expressam o gene Lhcb1*2 de ervilha**. 2001. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

ROSENBERG, A.H., LADE, B.N., CHUI, D.-S., LIN, S.-W., DUNN, J.J., AND STUDIER, F.W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. **Gene**, Amsterdam, v.56, n.1, p.125-135, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.

SCARPELLA, E.; MEIJER, A.H. Pattern formation in the vascular system of monocot and dicot plant species. **New Phytologist**, Oxford, v. 164, n. 2, p. 209-242, 2004.

SCHARF, S.J. Cloning with PCR. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.) **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, cap.11.

SCHARF, S.J.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. **Science**, Washington, v. 233, p. 1076-1078, 1986.

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

SEIFERT, G.J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. **Current Opinion in Plant Biology**, London, vol. 7, n. 3, p. 277-284, 2004.

SELVENDRAN, R.R.; O'NEILL, M.A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v. 32, p. 25-153, 1987.

SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J.P.; MARQUE, C.; TEULIERES, C.; BOUDET, A.M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 295, p. 285-290, 1996.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S.; YOUNGS, H. Towards a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, Washington, v. 306, p. 2206-2211, 2004.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, p. 503-517, 1975.

SOWOKINOS, J.R., SPYCHALLA, J.P., DESBOROUGH, S.L. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. IV. Purification, tissue localization, and physicochemical properties of UDP-glucose pyrophosphorylase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 3, p. 1073-1080, 1993.

SOWOKINOS, J.R.; THOMAS, C.; BURRELL, M.M. Pyrophosphorylases in potato. V. Allelic polymorphism of UDP-glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 2, p. 511-517, 1997.

SOWOKINOS, J.R.; VIGDOROVICH, V.; ABRAHAMSEN, M. Molecular cloning and sequence variation of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNAs from potatoes sensitive and resistant to cold sweetening. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 8, p. 947-955, 2004.

SPYCHALLA, J.P.; SCHEFFLER, B.E.; SOWOKINOS, J.R.; BEVAN, M.W. Cloning, antisense RNA inhibition, and the coordinated expression of UDP-glucose pyrophosphorylase with starch biosynthetic genes in potato tubers. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.144, n.4-5, p.444-453, 1994.

STAEHELIN, L.A.; MOORE, I. The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.261-288, 1995.

STERKY, F.; BHALERAO, R.R.; UNNEBERG, P.; SEGERMAN, B.; NILSSON, P.; BRUNNER, A.M.; CHARBONNER-CAMPAA, L.; JONSSON LINDVALL, J.; TANDRE, K.; STRAUSS, S.H.; SUNDBERG, B.; GUSTAFSSON, P.; UHLÉN, M.; BHALERAO, R.P.; NILSSON, O.; SANDBERG, G.; KARLSSON, J.; LUNDEBERG, J.; JANSSON, S. A *Populus* expressed sequence tag resources for plant functional genomics. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 38, p. 13951-13956, 2004.

STUDIER, F.W., ROSENBREG, A. H.; DUNN, J. J.; AND DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.185, p.60-89, 1990.

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**, London, v.189, n.1, p.113-130, 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão. In:_____. **Fisiologia vegetal**. Tradução de E.R. Santarém et al. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339-364.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T249 cm-85**: carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography. Atlanta, 1991. 1v.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T222 om-88**: acid insoluble lignin wood and pulp. Atlanta, 1996. 1v.

TAYLOR, N.G.; GARDINER, J.C.; WHITEMAN, R.; TURNER, S.R. Cellulose synthesis in the *Arabidopsis* secondary cell wall. **Cellulose**, Dordrecht, v. 11, n. 3-4, p. 329-338, 2004.

THODEN, J.B.; HOLDEN, H.M. The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase. **Protein Science**, Woodbury, v. 16, p. 432-440, 2007.

TREXLER, M. C.; FAETH, P. E.; KRAMER, J. M. **Forestry as a response to a global warming: an analysis of the Guatemala agroforestry and carbon sequestration project**. Washington: World Resources Institute, 1989. 66 p.

TRUGILHO, P.F.; LIMA, J.T.; MENDES, L.M. Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de *Eucalyptus saligna*. **Cerne**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 1-152, 1996.

TURNER, S. R.; TAYLOR, N.; JONES, L. Mutations of the secondary cell wall. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 209-219, 2001.

VALLA, S.; COUCHERON, D.H.; FJAERVIK, E.; KJOSBAKKEN, J.; WEINHOUSE, H.; ROSS, P.; AMIKAM, D.; BENZIMAN, M. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 217, n. 1, p. 26-30, 1989.

WHETTEN, R.W.; MACKAY, J.J.; SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 585-609, 1998.

WILLATS, W.G.T.; McCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1-2, p. 9-27, 2001.

YE, Z-H. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.53, p. 183-202, 2002.

YONG, W.D.; LINK, B.; O'MALLEY, R.; TEWARI, J.; HUNTER, C.T.; LU, C.A.; LI, X.M.; BLEECKER, A.B.; KOCH, K.E.; McCANN, M.C.; McCARTY, D.R.; PATTERSON, S.E.; REITER, W.D.; STAIGER, C.; THOMAS, S.R.; VERMERRIS, W.; CARPITA, N.C. Genomics of plant cell wall biogenesis. **Planta**, New York, v. 221, n. 6, p. 747-751, 2005.

ZHANG, Y.; SEDEROFF, R.; ALLONA, I. Differential expression of genes encoding cell wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly pine trees. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, n. 7, p. 457-466, 2000.

ZHENG, H.Y. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 183-202, 2002.

ZRENNER, R.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. **Planta**, New York, v. 190, n. 2, p. 247-252, 1993.

ANEXOS

ANEXO A – Código IUPAC de uma e de três letras para aminoácidos

<i>Códigos</i>			<i>Resíduo</i>			<i>Códigos</i>			<i>Resíduo</i>		
A	Ala	alanina				P	Pro	prolina			
B	Asx	aspartato or 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 indeterminado			

ANEXO B – Tampão TAE 1 X

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
Tris base	4,84 g
Ácido acético glacial	1,14 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	2 ml
Água ultrapura	q.s.p. 1 L
Ajustar pH 8,0	

ANEXO C – Mix para visualização de RNA em gel

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
MOPs 10X	0,75 µl
Formaldeído 37%	1,50 µl
Formamida	3,75 µl
Brometo de etídio	0,50 µl
Dye	1,00 µl
Amostra de RNA	1,00 µg

ANEXO D – Tampão de Ligação (*Binding buffer*) para purificação de mRNA (de acordo com kit Dynabeads[®] mRNA Purification da Dynal)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
LiCl	1,0 M
EDTA	2 mM
Água ultrapura tratada com DEPC	q.s.p. 4 ml
Autoclavar	

ANEXO E – Tampão de Lavagem B para purificação de mRNA (de acordo com kit Dynabeads® mRNA Purification da Dynal)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
LiCl	0,15 M
EDTA	1 mM
Água ultrapura tratada com DEPC	q.s.p. 4 ml
Autoclavar	

ANEXO F – Tampão TBE 0,5 X (SAMBROOCK; FRITSCH; MANIATIS, 1989)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
Tris base	5,4 g
Ácido bórico	2,75 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	2 ml
Água destilada	q.s.p. 1 L

ANEXO G – Tampão da Amostra (Dye IV – SAMBROOCK; FRITSCH; MANIATIS, 1989)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final (p/v)</i>
Sacarose	40%
Azul de bromofenol	0,25%
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 1 ml

ANEXO H – Meio de cultura SOC

<i>Componente</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
Glucose	20 mM
Água ultrapura	q.s.p. 1 L

ANEXO I – Meio de cultura LB (LURIA-BERTANI)

<i>Componente</i>	<i>p/v (%)</i>
Bacto triptona	1,0
Bacto extrato de levedura	0,5
NaCl	1,0
Ágar bacteriológico (para meio sólido)	1,0
Ajustar pH 7,0	
Água ultrapura	q.s.p. 1 L

ANEXO J – Master Mix para PCR

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>	
Tampão de reação 10 X	2,5 µl	
MgCl ₂	1,5 – 2,5 mM	
dNTPs	A	200 µM
	C	200 µM
	G	200 µM
	T	200 µM
<i>Primer forward</i>	50 pmoles	
<i>Primer reverse</i>	50 pmoles	
DNA	q.s.p. 100 ng	
<i>Taq</i> polimerase (5U/µl)	1 U	
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 25 µl	

ANEXO K – Tampões P1, P2 e P3 (conforme protocolo do *Plasmid Mini kit* da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>
Tampão P1	
Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
Água ultrapura	q.s.p. 1L
Ajustar pH 8,0 com HCl	
RNase (depois de autoclavar)	100 µg/ml
Tampão P2	
NaOH	200 mM
SDS	1% (p/v)
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 1L
Tampão P3	
Acetato de potássio	3,0 M
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 1L
Ajustar pH 5,5 com ácido acético glacial	
Filtrar (Millipore 0,2 µm)	

ANEXO L – Solução QBT (conforme protocolo do *Plasmid Mini Kit* da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>		
	QBT	QC	QF
NaCl	750 mM	1,0 M	1,25 M
MOPS	50 mM	50 mM	
Tris-HCl			50 mM
Ajustar pH	7,0	7,0	8,5
Isopropanol puro	15 % (v/v)	15 % (v/v)	15 % (v/v)
Triton® X-100	0,15 % (v/v)		
Água ultrapura	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L
Esterilizar por filtração (milipore 0,2 µm)			

ANEXO M – Tampão 2X SDS-PAGE

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris-HCl pH 6,8	0,125 M
Glicerol (100 %)	20 %
SDS	0,04 g/ml
β-mercaptoetanol	0,4 %
Azul de Bromofenol	1 %
Água ultrapura	q.s.p. 50 ml

Obs: A solução 1 X SDS-PAGE foi obtida pela diluição da solução 2 X SDS-PAGE em água ultrapura.

ANEXO N – Gel de poliacrilamida 12% (LAEMMLI, 1970)

<i>Componentes / Gel</i>	<i>Running</i> (12%)	<i>Stacking</i> (4%)
Stock Acrilamida 30% /Bis 2,67%	4ml	750µl
Água MilliQ	3,35ml	3,05ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,50ml	-
0,5M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25ml
Persulfato de amônio 10%	50µL	25µL
Temed **	10µL	10µL
Volume Final	10ml	5ml
** Adicionar ao gel em leve agitação (na capela) e verter o gel imediatamente.		
Tampões	Inferior	Superior
Tris-HCl	25 mM	25 mM
Glicina	192 mM	192 mM
SDS		0,1 % (p/v)
pH	8,3	8,3

ANEXO O – Comassie Blue R250 0,25%

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Comassie blue	0,25% (p/v)
Ácido acético	10 % (v/v)
Metanol	45% (v/v)
Água ultrapura	q.s.p. 1 L

ANEXO P – Soluções para preparo de DNA plasmidial (método MiniPrep)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Solução I	
glucose	50 mM
Tris HCl	25 mM
EDTA	10 mM
água ultrapura	q.s.p.
Ajustar pH 8,0. Autoclavar e manter a 4 °C.	
Solução II	
NaOH	0,2N
SDS	1% (p/v)
água ultrapura	q.s.p.
Solução III	
acetato de potássio	3 M
ácido acético glacial	11,5% (v/v)
água ultrapura	q.s.p.
Não autoclavar. Estocar a 4 °C.	

ANEXO Q – Meio de cultura AB (ISHIDA et al., 1996)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
glucose	5,0 g
K ₂ HPO ₄	3,0 g
NaH ₂ PO ₄	1,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g
KCl	0,15 g
CaCl ₂	0,01 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,5 mg
Água ultrapura	q.s.p. 1L
Ajustar pH 6,6	
Agar bacteriológico (p/ meios sólidos)	10 g
Espectinomicina	100 mg

ANEXO R – Meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) para regeneração de tabaco (CC: co-cultivo; C: indução de *calli*; A: alongamento; R: enraizamento.)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>			
Macronutrientes (g/L)				
KNO ₃	1,90			
NH ₄ NO ₃	1,65			
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44			
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37			
KH ₂ PO ₄	0,17			
Na/FeEDTA (mg/L)				
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	41,2			
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8			
Micronutrientes (mg/L)				
MnSO ₄ .1H ₂ O	16,90			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60			
H ₃ BO ₃	6,20			
KI	0,83			
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25			
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025			
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025			
Sacarose	2 %			
Agar (em meios sólidos)	0,8 %			
Ajustar pH 5,7 e autoclavar. * são adicionados filtrados.				
Vitaminas (mg/L) *				
Ácido nicotínico (B3)	0,50			
Piridoxina (B6)	0,50			
Tiamina (B1)	0,10			
Pantotenato de cálcio (B5)	0,10			
	CC	C	A	R
Fitorreguladores (mg/L) *				
ANA (auxina)	0,1	0,1		
BAP (citocinina)	1,0	1,0		
Antibióticos (mg/L) *				
Cefotaxima		200	200	200
Canamicina		50	25	25
Tampão MES pH 6,0 (g/L) *	136,64			

ANEXO S – Tampão de Extração de DNA (DOYLE; DOYLE, 1987)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
NaCl	1,4 M
Tris-HCl pH 8,0	100 mM
EDTA pH 8,0	20 mM
PVP-40	1%
CTAB	2%
β-mercaptoetanol	0,2% - 1%
H ₂ O ultrapura autoclavada	q.s.p.

ANEXO T – Solução de hibridização para *blotting* (conforme protocolo *Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* da Amersham Biosciences)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
NaCl	0,5 M
<i>Blocking reagent</i>	4 % (w/v)
<i>Hybridization buffer</i>	q.s.p. 20 ml

ANEXO U – Primeiro tampão de lavagem para *blotting*

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Urea	2 M
SDS	0,1 % (p/v)
Na Phosphate pH 7,0	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1 mM
<i>Blocking reagent</i>	0,2 % (p/v)
água tratada com DEPC 0,1%	q.s.p. 200 ml

ANEXO V – Segundo tampão de lavagem para *blotting*

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris base	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	2 mM
água tratada com DEPC 0,1%	q.s.p. 200 ml
Ajusta pH 10,0. Não armazenar.	