**CLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA
A ENZIMA UDP-GLICOSE PIROFOSFORILASE
DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)**

GUNTA GUTMANIS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro – 2003

**CLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA
A ENZIMA UDP-GLICOSE PIROFOSFORILASE
DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)**

GUNTA GUTMANIS

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro – 2003

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

Gutmanis, Gunta

Clonagem do cDNA que codifica a enzima UDP-glicose pirofosforilase de batata (*Solanum tuberosum* L.) / Gunta Gutmanis. - - Piracicaba, 2003.
63 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Batata 2. Bioquímica 3. Biotecnologia de plantas 4. Celulose 5. Clonagem 6. DNA
complementar 7. Enzimas 8. Polissacarídeos I. Título

CDD 633.491

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

Em memória de meus amados pais Ansis e Erna
Gutmanis, pelo amor e carinho dedicados e pela
orientação que deram à minha vida,

DEDICO

Aos meus queridos filhos André e Liane,

OFEREÇO

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 paciente orientação e incondicional assistência;

Ao Dr. David Henry Moon, pelas sugestões e auxílio na área de bioinformática;

A todos os funcionários, pós-graduandos e estagiários do laboratório de Genética Fisiológica, pela constante alegria, amizade e apoio;

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 Companhia Suzano de Papel e Celulose, pelo suporte técnico;

À minha querida irmã Daina Gutmanis, sempre tão presente em minha vida, pelo grande estímulo dado para o progresso em minha carreira;

Ao meu “companheiro de jornada”, Jandi Augusto de Lira, pelo amor dedicado, pelo apoio às minhas decisões, e por compreender a minha ausência.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Enzima UDP-glicose pirofosforilase.....	3
2.2 Biossíntese de componentes da parede celular.....	4
2.3 Métodos de clonagem.....	8
2.4 Clonagem do gene da UGPase.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Pesquisa em bancos de dados.....	11
3.2 Definição dos <i>primers</i> para a ORF.....	13
3.3 Extração de RNA total.....	14
3.4 Purificação de mRNA a partir de RNA total.....	16
3.5 Reação de RT-PCR.....	17
3.6 Clonagem no vetor TOPO.....	18
3.7 Transformação química de células competentes de <i>E. coli</i>	21
3.8 Análise por PCR das colônias transformantes.....	21

3.9	Extração de DNA plasmidial.....	22
3.10	Seqüenciamento de DNA plasmidial.....	22
3.11	Análise do seqüenciamento do plasmídeo.....	23
3.12	Verificação de domínios conservados.....	23
3.13	Extração de DNA genômico.....	24
3.14	PCR com primers específicos para a ORF.....	25
3.15	Análise dos sítios de restrição.....	26
3.16	<i>Southern blot</i>	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Pesquisa em bancos de dados.....	29
4.2	Similaridade entre as UGPases de algumas espécies vegetais.....	29
4.3	Similaridade entre UGPases de alguns cultivares de batata.....	32
4.4	Definição dos <i>primers</i> para a ORF.....	36
4.5	Reação de RT-PCR.....	37
4.6	Análise de colônias transformantes por PCR.....	38
4.7	Seqüenciamento de DNA plasmidial.....	39
4.8	Blast da seqüência do gene com o NCBI.....	42
4.9	Verificação de domínio conservado.....	43
4.10	PCR de DNA genômico de <i>E.grandis</i> com primers de UGPase da batata.	43
4.11	<i>Southern blot</i>	45
5	CONCLUSÕES.....	48
	ANEXOS.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A ₂₆₀ ou A ₂₈₀	Absorbância a 260 ou 280 nm de comprimento de onda
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina sérica bovina
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 desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EC	Código da enzima dado pela <i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
g	Grama
x g	Força Centrífuga Relativa à aceleração padrão de gravidade
gi	<i>GenInfo Identifier</i> (identificador de uma sequência de nucleotídeos)
IUB	<i>International Union of Biochemistry</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
MilliQ	Água destilada deionizada e estéril por filtração a 0,2 µm
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 ⁻⁶ grama)
nm	Nanômetro
Oligo (dT)	Oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli- T)
ORF	Sequência 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>	Oligonucleotídeo iniciador
p/v	Peso por volume
PVP	Polivinilpirrolidone
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Síntese de cDNA por uma transcriptase reversa, seguida de PCR
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>Taq</i>	DNA polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades de enzima
UDP	Uridinedifosfato
UGPase	UDP-glicose pirofosforilase

v/v	Volume por volume
μg	Micrograma (10^{-3} grama)
μl	Microlitro (10^{-3} mililitro)
μM	Micromolar
λ	DNA do fago lambda (marcador de peso molecular)

**CLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA A ENZIMA
UDP-GLICOSE PIROFOSFORILASE DE
BATATA (*Solanum tuberosum* L.)**

Autora: GUNTA GUTMANIS

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

RESUMO

A biotecnologia está revolucionando a atividade humana nas mais diversas áreas. No setor florestal, as novas tecnologias como transgenia, genômica, proteômica e bioinformática, estão sendo rapidamente incorporadas. A associação dessas tecnologias aos programas de melhoramento convencional de árvores pode acelerar o processo de obtenção de árvores com características específicas da madeira para a indústria de papel e celulose. UDP–glicose pirofosforilase (UGPase, EC 2.7.7.9) é uma enzima chave na produção de UDP-glicose, intermediário na interconversão de carboidratos envolvidos em várias funções metabólicas, como síntese de sacarose e de celulose. No presente trabalho, foi clonado o cDNA que codifica a UGPase. Este cDNA foi sintetizado por meio de RT-PCR utilizando-se mRNA extraído de tubérculo de batata (*Solanum*

tuberosum L.). Os *primers* específicos para a ORF do gene da UGPase foram definidos com base em seqüências conservadas entre genes ortólogos, já disponíveis em bancos de dados. O cDNA foi clonado no vetor pENTR-D TOPO e inserido, por meio de transformação química, em células competentes de *Escherichia coli*. O DNA plasmidial foi purificado e após seu sequenciamento, a presença de um inserto de 1402 pb foi confirmada. O alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos com outras UGPases revelou alta homologia a UGPases de batata e de outras espécies vegetais. Na seqüência do cDNA clonado foram identificados sítios de *N*-glicosilação, resíduos lisina e motivos conservados que possivelmente estão relacionados tanto com a capacidade de ligação ao substrato, como com a atividade catalítica da enzima. Também foi realizada uma análise de *Southern blot* para confirmar a presença deste gene no DNA genômico de batata e de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). Posteriormente, o cDNA clonado será utilizado na avaliação do impacto de sua superexpressão na biossíntese de celulose e hemiceluloses e no desenvolvimento de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e de eucalipto.

CLONING OF cDNA ENCODING POTATO (*Solanum tuberosum* L.) UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE

Author: GUNTA GUTMANIS

Adviser: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

SUMMARY

Biotechnology is revolutionizing human activity in several fields. In forestry, new technologies like transgenics, genomics, proteomics and bioinformatics have been quickly consolidated. Associating these technologies with conventional forestry breeding will accelerate the process of obtaining new trees with specific wood properties for the paper and pulp industry. UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase, EC 2.7.7.9) is a key enzyme producing UDP-glucose, an important intermediate in carbohydrate interconversion involved in various metabolic processes like sucrose and cellulose synthesis. In this work, it was cloned the cDNA that encodes UGPase. This cDNA was synthesized through RT-PCR using RNA extracted from potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber. The UGPase primers were designed based on the conserved sequences of orthologous genes, already available in public data banks. The cDNA was cloned into pENTR-D TOPO vector and introduced into *Escherichia coli* competent cells, by chemically transforming. The plasmid DNA was purified and the insert PCR amplified.

The presence of 1402 bp insert was confirmed after sequencing. The alignment of the derived amino acids sequence with other UGPases revealed high homology to UGPases from potato and other plant species. Along the cDNA sequence *N*-glycosylation sites, Lysyl residues and conserved domain were identified, which probably are involved in substrate binding capacity, as well as catalytic activity of the enzyme. *Southern blot* analysis was carried to confirm the presence of this gene in potato and eucalypt (*Eucalyptus grandis*) genomic DNA. The cloned cDNA will be used to evaluate the impact of overexpression on cellulose and hemicelluloses biosynthesis and in the tobacco (*Nicotiana tabacum*) and eucalypt plant development.

1 INTRODUÇÃO

A biossíntese dos polissacarídeos da parede celular é responsável pelo consumo da maior parte do carbono fixado pelas plantas superiores. A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza. Nas árvores, o conteúdo de celulose presente nos vasos lenhosos compreende cerca de 40-50% do peso seco total, sendo o restante composto por hemiceluloses e lignina.

A importância econômica da celulose para o setor florestal tem despertado grande interesse na alteração da sua biossíntese, utilizando técnicas de biologia molecular. A manipulação do fluxo do carbono para a celulose, por sua vez, depende não só do conhecimento das rotas metabólicas responsáveis pela sua síntese, mas também das rotas que competem por carbono nas várias partes da planta, nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Um dos principais substratos utilizados para a síntese dos polissacarídeos da parede celular é a UDP-D-glicose. Entretanto, não está claro quais são as rotas de síntese de UDP-glicose, como também os possíveis intermediários desse processo (Delmer, 1999b; Haigler et al., 2001; Delmer e Haigler, 2002).

A UDP-glicose que serve de matéria prima para a síntese de sacarose e celulose, sendo, portanto, um componente importante na partição do carbono entre os vários compostos. As hemiceluloses em dicotiledôneas são formadas, em grande parte, a partir dos açúcares xilose e glucoronato e, em menor proporção, a partir de glicose e manose (Dalessandro e Northcote, 1977a).

A enzima que catalisa a interconversão de D-glicose em UDP-glicose é a UDP-glicose pirofosforilase (UGPase, EC 2.7.7.9), o que a torna uma enzima chave na síntese de polissacarídeos da parede celular.

Clones de cDNA que codificam UDP-glicose pirofosforilase têm sido isolados a partir de bibliotecas de cDNA obtidas de diversos organismos como, por exemplo, batata (Katsube et al., 1990), fígado bovino (Konishi et al., 1993), 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. A quantidade de informações sobre a seqüência codificadora desta enzima disponíveis nos bancos de dados permite desenhar um par de *primers* que pode ser usado na amplificação dessa seqüência a partir de DNA genômico ou na síntese de cDNA através da reação de RT-PCR.

O objetivo do presente trabalho foi clonar o cDNA que codifica a enzima UDP-glicose pirofosforilase (UGPase, EC 2.7.7.9), que posteriormente será utilizado na avaliação do impacto de sua superexpressão na biossíntese de celulose e hemiceluloses da parede celular e no desenvolvimento de plantas. Primeiramente, serão avaliadas plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*), usadas como sistema modelo para análises preliminares, e em seguida, eucalipto (*Eucalyptus grandis*), visando melhorar as propriedades da fibra e da polpa que afetam a produção e a qualidade do papel destinado a diferentes usos como, por exemplo, impressão ou embalagens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enzima UDP-glicose pirofosforilase

O nome oficial da enzima de código EC:2.7.7.9 é UTP--glicose-1-fosfato uridililtransferase e os nomes alternativos são UDP-glicose pirofosforilase (UDPGP ou UGPase), UDP-glicose difosforilase e Glicose-1-fosfato uridililtransferase. A UGPase catalisa a interconversão de MgUTP + alfa-D-glicose 1-fosfato em UDP-glicose + difosfato (<http://us.expasy.org/enzyme>).

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., 1989a). Em plantas, a UGPase existe na forma de monômero de aproximadamente 50 kDa (Nakano et al, 1989a) e 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).

A ampla distribuição desta enzima na natureza deve-se ao seu papel na síntese de numerosos compostos que requerem a UDP-glicose. A UGPase atua nas vias metabólicas de interconversão de pentose e glucoronato, metabolismo da galactose, metabolismo de nucleotídeos de açúcares e metabolismo do amido e sacarose (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>), que envolve a biogênese da parede celular.

A atividade da UGPase em tubérculos de batata desperta interesse devido à habilidade desta enzima promover o acúmulo de açúcar reduzido durante a estocagem a baixas temperaturas (Spychalla et al, 1994; Ciereszko et al, 2001a). A enzima também

está envolvida com o amadurecimento de frutos como a banana (Pua et al., 2000) e tomate (Picton et al., 1993). Em mamíferos, a UDP-glicose é um importante intermediário na interconversão de carboidratos envolvidos em várias funções metabólicas que dependem do tipo de tecido.

2.2 Biossíntese de componentes da parede celular

A biossíntese da celulose, bem como dos demais componentes da parede celular, como hemiceluloses, pectina e lignina, depende do fornecimento dos açúcares produzidos pela fotossíntese nos cloroplastos. O carbono fixado pela fotossíntese é exportado do cloroplasto para o citoplasma na forma de uma triose-fosfato (DHAP), iniciando uma série de reações metabólicas cuja 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 são preferencialmente utilizados para a síntese de lipídeos, via da pentose fosfato (para a síntese de ácidos nucleicos), glicólise (gerando ATP e piruvato), ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), síntese de aminoácidos, e a via de oxidação dos açúcares, responsáveis pela síntese dos componentes da parede celular.

Os substratos utilizados para a síntese dos polissacarídeos da parede celular são açúcares tais como: UDP-D-glicose, UDP-D-glucoronato, UDP-D-galactose, UDP-D-xilose e UDP-L-arabinose (Reiter e Vanzin, 2001). Nas bactérias a síntese de celulose parece depender apenas da disponibilidade de UDP-glicose para a formação das cadeias de glucanos. Por outro lado, nas plantas superiores a rota de biossíntese da celulose ainda é questionável (Delmer e Haigler, 2002). Os modelos propostos recentemente apresentam fortes indícios de que o açúcar UDP-glicose também é o provável substrato nas plantas. Uma evidência importante está no fato da enzima celulose sintase se associar a UDP-glicose e promover a síntese de celulose *in vitro* (Delmer 1999a). Entretanto, o que não está claro são as rotas de síntese de UDP-glicose, como também os possíveis intermediários desse processo (Delmer, 1999b; Haigler et al., 2001; Delmer e Haigler,

2002). Esses trabalhos mostram a existência de uma inter-relação dos vários substratos envolvidos na síntese da celulose e hemiceluloses, de tal forma que os fluxos de carbono para esses dois compostos é altamente regulado.

A importância metabólica da UGPase na formação de UDP-glicose foi demonstrada em linhagens mutantes de *Dictyostelium discoideum* que tiveram a atividade da UGPase reduzida. A morfogênese de linhagens mutantes foi suspensa em estádios de crescimento que necessitavam a mobilização de estoques de glicogênio em UDP-glicose equivalente ao usado na formação de celulose (Dimond et al, 1976).

As hemiceluloses em dicotiledôneas são formadas, em grande parte, a partir dos açúcares xilose e glucoronato e, em menor proporção, a partir de glicose e manose (Dalessandro e Northcote, 1977a). A biossíntese de UDP-D-xilose é mediada pela enzima UDP-glucoronato descarboxilase (EC 4.1.1.35), a partir de UDP-D-glucoronato (Bar-Peled et al, 2001). O UDP-D-glucoronato pode ser formado por duas vias metabólicas. A primeira consiste da conversão, pela ação da enzima fosfoglucomutase (EC 5.4.2.2), de D-glicose-6-fosfato em D-glicose-1-fosfato, que é convertido em UDP-glicose pela enzima UDP-D-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9). Já a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) é a responsável pela conversão do açúcar UDP-D-glicose em UDP-D-glucoronato. A segunda via de formação do UDP-D-glucoronato corresponde à rota metabólica de oxidação do mio-inositol (Reiter e Vanzin, 2001).

O mio-inositol é formado a partir de glicose-6P, o mesmo precursor de UDP-glicose. Esse composto é um precursor importante para uma série de produtos metabólicos, como fosfatos de inositol, fosfoinositídeos, derivados metilados e conjugados de IAA, e ácido glucurônico. A produção do inositol envolve a síntese de mio-inositol-1-fosfato (Ins-1P) a partir de D-glicose-6P, catalisado pela enzima mio-inositol-3-fosfato sintase (MIPS, EC 5.5.1.4). O inositol-1P produzido é, em seguida, desfosforilado pela enzima inositol monofosfatase (IMP, EC 3.1.3.25) para liberar mio-inositol. Uma vez produzido, o mio-inositol pode seguir várias rotas metabólicas ou ser oxigenado pela enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1), formando ácido

glucurônico (Figura 1). Essa reação é irreversível e o produto formado pode ser diretamente transferido para a síntese da parede celular ou ser fosforilado pela enzima glucoronoquinase (EC 2.7.1.43) e em seguida, desfosforilado pela enzima glucoronato 1-fosfato uridiltransferase (EC 2.7.7.44) (Loewus et al., 1962; Loewus & Murthy, 2000).

Até o momento não é conhecida qual das rotas de síntese do UDP-glucoronato é a mais importante nas plantas. Existem evidências de que as duas vias metabólicas coexistem, variando a importância de cada uma durante o desenvolvimento da planta (Roberts e Loewus, 1973; Dalessandro e Northcote 1977a, 1977b; Witt, 1992).

Vários trabalhos têm demonstrado que a produção de UDP-glucoronato pode ser limitante para o suprimento de precursores da parede celular em desenvolvimento. Portanto, o que se acredita é que a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) é um fator regulador dessa via metabólica (Amino et al 1985, Robertson et al 1995).

Figura 1- Representação esquemática da formação das hemiceluloses, celulose e ácido glucorônico a partir do açúcar glicose 6P e da via de oxidação do mio-inositol. 5.5.1.4, mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS); 3.1.3.25, mio-inositol monofosfatase (IMP); 1.13.99.1, mio-inositol oxigenase; 3.2.1.31, β -glucuronidase; 2.7.1.43, glucoronoquinase; 2.4.1.17, glucuronosil-transferase; 2.7.7.44, glucoronato 1-fosfato uridililtransferase; 5.4.2.2, fosfoglucomutase; 2.7.7.9, UDP-glicose pirofosforilase; 1.1.1.22, UDP-glicose desidrogenase, 4.1.1.35, UDP-glucoronato descarboxilase; 2.4.1.12, celulose sintase

2.3 Métodos de clonagem

O termo clonagem significa a produção de um segmento de DNA, grupo de células ou de indivíduos geneticamente idênticos, por meio de reprodução assexuada, a partir de um ancestral comum. Quando aplicado ao DNA, a clonagem é entendida como a inserção de uma sequência de DNA em uma célula de tal modo que o DNA seja replicado e conservado.

O isolamento e clonagem de um gene individual a partir do genoma tornou-se possível com o advento da tecnologia do DNA recombinante. O procedimento básico de clonagem consiste em extrair e cortar o DNA do genoma doador em fragmentos contendo de um a vários genes e permitir que estes fragmentos sejam inseridos individualmente em pequenas moléculas de DNA de replicação autônoma, chamadas de vetores, que podem ser plasmídeos, fagos, cosmídeos ou cromossomos artificiais de bactérias. O DNA recombinante (molécula vetora e sua inserção) é introduzido em células bacterianas por meio de transformação. Uma vez na célula hospedeira, o vetor irá se replicar, independentemente do cromossomo bacteriano e, com ele, irá replicar o fragmento exógeno resultando em um clone molecular do fragmento de DNA inserido. Após muitos ciclos de multiplicação celular, uma única célula transformada com um único vetor recombinante origina uma colônia com milhões de células, todas portadoras do mesmo vetor recombinante (Sambrook et al., 1989; Foster & Twell, 1996). Geralmente, os vetores possuem genes que conferem resistência a antibiótico o que permite a seleção das células transformadas. Uma coleção de clones de DNA é chamada de biblioteca de DNA que, dependendo da fonte de DNA, pode ser uma biblioteca genômica ou uma biblioteca de cDNA. O uso de cDNA apresenta como vantagem o menor tamanho devido à ausência de íntrons em sua sequência.

Em uma biblioteca, a maioria das colônias será portadora de diferentes inserções clonadas. O clone contendo o gene de interesse, pode ser detectado usando-se uma sonda específica para o DNA ou seu produto protéico, ou verificando-se sua capacidade de

transformar um mutante nulo. O vetor do clone selecionado pode ser extraído e sequenciado e o gene usado na pesquisa de sua função celular.

Uma maneira alternativa para a clonagem, sem a necessidade de construção de bibliotecas e de sondagens, pode ser por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Innis & Gelfand, 1990), utilizando dados de genes já clonados. 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 DNA genômico ou do cDNA, em quantidade suficiente a ser clonada diretamente em um vetor (Scharf et al., 1986; Scharf, 1990).

2.4 Clonagem do gene da UGPase

A seqüência de nucleotídeos de um único cDNA completo que codifica a UGPase em plantas foi clonada pela primeira vez de tubérculos de batata por Katsube et al (1990) que utilizaram uma biblioteca de cDNA previamente elaborada por Nakano et al. (1989b) e sondas de oligonucleotídeos sintetizados com base na seqüência parcial de aminoácidos da enzima. A seqüência de DNA foi determinada pelo método de Sanger. Uma ORF de 1431 pb de início no códon de iniciação ATG e término no códon *nonsense* TAG, foi identificada como a unidade de tradução da UGPase. Com base na seqüência deduzida de aminoácidos (477 resíduos) o peso molecular da enzima foi calculado em 51.783 Da.

Spychalla et al. (1994) utilizou uma biblioteca de expressão de cDNA de tubérculos de batata em fagos, e sonda anti-UGPase policlonal de Sowokinos et al (1993). O maior clone isolado foi subclonado em pUC119 e sequenciado em ambas as direções. O UGPase-cDNA encontrado apresentou 1701 pb e uma ORF de 1431 pb, altamente homólogo ao descrito por Katsube et al. (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 (cv. Lemhi) foi determinada por Borovkov et al. (1997) a partir de biblioteca genômica *λ*FIXII. O gene clonado consiste de uma região estrutural de 6,6kb 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 et al., 1997) revelou apenas poucas diferenças na região codante. Segundo o último autor, as sequências são formas alélicas diferentes em diferentes cultivares, especialmente se a UGPase se apresenta na forma de homodímero, como proposto por Sowokinos et al. (1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pesquisa em bancos de dados

O primeiro passo do processo de clonagem do gene codificador da enzima UGPase foi a realização de uma busca de genes ortólogos (homólogos que apresentam a mesma função em organismos diferentes) no banco de dados do NCBI e KEGG, a partir do código enzimático EC 2.7.7.9.

NCBI

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) é um centro de informação biotecnológica, criado pelo governo americano em 1988, que gera bancos de dados de domínio público com acesso via Internet através da página eletrônica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, desenvolve programas para a análise de dados, como BLAST e ORF *Finder*, e mantém intercâmbio de dados com outros centros de pesquisa internacionais através de atualizações diárias, o que faz com que esses bancos estejam em constante crescimento.

Algumas das opções de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) utilizadas foram:

- a. **BlastN**: confronta a sequência de nucleotídeos a ser analisada contra as sequências de nucleotídeos disponíveis na base de dados do NCBI.
- b. **BlastX**: confronta a sequência de nucleotídeos a ser analisada contra as sequências de proteínas disponíveis na base de dados do NCBI.

- c. **Blast 2 Sequences**: faz a análise comparativa de alinhamento múltiplo de duas ou mais seqüências de nucleotídeos ou proteínas.

KEGG

A Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto – KEGG (Kanehisha et al, 2002) – através da página eletrônica <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>, apresenta um sistema de busca com diversas alternativas. Permite a procura de vias metabólicas e regulatórias a partir de nomes de vias, produtos ou códigos (número EC), ou ainda, permite a comparação de uma seqüência ao seu banco de dados.

CLUSTAL W

A similaridade entre diferentes seqüências de aminoácidos e entre suas respectivas seqüências de nucleotídeos, obtidas no NCBI ou KEGG, foi examinada através do programa Clustal W (1.82). O programa Clustal W *Multiple Sequence Alignments* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) produz alinhamento biologicamente significativo de diversas seqüências de DNA ou de proteínas, calcula o melhor pareamento para as seqüências escolhidas e as alinha de forma que as similaridades e diferenças possam ser observadas (Thompson et al, 1994).

Alguns termos utilizados na busca em bancos de dados e em seus programas são:

- a. **GI number** (*GenInfo Identifier*): identificador único para cada seqüência de nucleotídeos, independente de atualizações, representado por um número inteiro simples. Se uma seqüência difere da outra por apenas um par de bases, as duas possuirão diferentes gi(s), apesar de possuírem, por exemplo, o mesmo número de acesso.
- b. **Accession**: número de acesso direto de uma seqüência de nucleotídeos ao GenBank. As letras indicam em qual centro a seqüência foi submetida. O complemento, separado do número de acesso por um ponto, indica qual é a versão (atualização).
- c. **Protein id**: código similar ao número de acesso dado para seqüências de proteínas.

- d. **formato FASTA**: é o modelo padrão usado na comparação de uma determinada sequência com sequências do banco de dados através do alinhamento da mesma. A primeira linha, indicada pelo sinal > (maior que), é a identificação da sequência. O texto é apresentado sem formatação (ou *courier new* 10), com quebra de linhas, contendo no máximo 80 caracteres por linha e obedecendo ao código padrão IUPAC/IUB (Anexo A e B) de representação de aminoácidos e ácidos nucleicos.
- e. **E-value** (*Expect value*): este número indica a probabilidade de que alinhamentos com esta qualidade possam ser obtidos ao acaso em um banco de dados no mesmo tamanho do utilizado na pesquisa. O número indicado corresponde à potência de 10. Por exemplo, 5e-23 significa uma probabilidade de 5×10^{-23} . Quanto mais próximo de zero for o *E-value*, mais significativo é o alinhamento entre as sequências. O cálculo do *E-value* leva em consideração o comprimento da sequência em questão, portanto, para sequências curtas, como no caso de *primers*, o valor de *E-value* pode ser alto para sequências virtualmente idênticas.
- f. **Bit Score**: é uma medida de similaridade entre uma consulta e o resultado da busca em uma base de dados. Essa medida é citada próxima ao *E-value*. O *Bit Score* é inversamente proporcional aos valores de *E-value*.

3.2 Definição dos *primers* para a ORF

Os *primers* que flanqueiam a ORF do gene que codifica a UGPase, utilizados na reação de RT-PCR, foram definidos com auxílio do programa Clustal W, através do alinhamento de sequências de 21 nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de genes ortólogos, considerando a necessidade de se usar *primers* degenerados (Lee & Caskey, 1990). A clonagem do gene que codifica a UGPase foi feita com o auxílio do Sistema Gateway™ de clonagem da Invitrogen (Karimi, et al, 2002). Desta forma, a sequência de direcionamento CACC do sistema Directional TOPO® foi adicionada à extremidade 5' do *Forward Primer*. Com a ajuda da página eletrônica http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi verificou-se a viabilidade destes

primers relacionada à porcentagem de C/G, temperatura de anelamento (T_m) e ausência de auto-complementariedade. Estes *primers* foram submetidos à confirmação de identidade com auxílio do programa BlastN – opção *Search for Short Nearly Exact Matches*, no banco de dados do NCBI e sintetizados pela Invitrogen.

3.3 Extração de RNA total

Para extração de RNA total utilizou-se o método de Salzman et al. (1999), a partir de tubérculo de batata, conforme descrição abaixo.

3.3.1 Preparo de material livre de RNase

Para evitar a degradação do RNA por RNases, todas as soluções e reagentes foram preparados com água previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) na concentração de 1%, por 16 horas a 37°C, seguida de autoclavagem (120°C, 1 atm, 20 minutos). Com a mesma finalidade, todo material plástico utilizado foi tratado através de uma sequência de lavagens com SDS 2% por 2 horas a 70°C, álcool comercial por 20 minutos, e H_2O_2 3% por mais 20 minutos. Dois enxágües finais com H_2O DEPC 0,01%, por 20 minutos, foram feitos antes da autoclavagem. A vidraria e porcelanas utilizadas foram esterilizadas a seco, a 200°C, por 6 horas. A cuba de eletroforese e seus componentes foram lavados com SDS 0,1% e enxaguados com água livre de RNase.

3.3.2 Extração de RNA

O tecido vegetal (2 g de tubérculo de batata) foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado foi transferido a um tubo de centrífuga (50 ml) contendo 10 ml de tampão de extração de RNA (Anexo C), seguido de agitação em vórtex, por 1 minuto. A esse material adicionou-se igual volume de CIA (24:1 v/v). Esse foi, então, agitado a 200 rpm, 25°C, por 20 minutos, antes da

centrifugação a 16.000 x g, por 10 minutos, a 4°C. A fase superior foi cuidadosamente transferida para novo tubo. Essa extração com CIA foi repetida mais duas vezes para a remoção completa do material de interfase. Ao sobrenadante final, já em novo tubo, adicionou-se 2 volumes do homogenato de etanol absoluto e 0,1 volume de homogenato de NaCl 5M, para precipitação por 16 horas, a -20°C.

Após nova centrifugação a 16.000 x g, por 10 minutos, a 4°C, o precipitado foi ressuspensionado em 10 ml de água tratada com DEPC, seguido de centrifugação por 5 minutos a 20.000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual adicionou-se 10 ml de fenol tamponado (pH=8,0): clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Após agitação por 10 minutos, à temperatura ambiente, e depois centrifugado a 13.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente, a fase superior foi transferida cuidadosamente para novo tubo. A etapa anterior foi repetida mais uma vez. Ao sobrenadante adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M, seguida de precipitação, por 16 horas, a 4°C.

Depois da centrifugação a 16.000 x g, por 15 minutos, a 4°C, o precipitado foi ressuspensionado em 500 µl água milliQ tratada com DEPC. Após centrifugação adicional, o volume da amostra foi elevado para 1ml com água milliQ tratada com DEPC. A esse se adicionou 333 µl de LiCl 8 M. A precipitação foi feita a 4°C, por pelo menos 3 horas, antes da centrifugação a 12.000 x g, por 20 minutos, a 4°C. O precipitado foi lavado com 400 µl de etanol 80%, preparado em água DEPC, centrifugado a 12.000 x g, 4°C, por 10 minutos e seco sobre papel absorvente, antes de ser ressuspensionado em 50 µl de água tratada com DEPC.

3.3.3 Quantificação de RNA

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

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

onde: **A₂₆₀** é a absorbância da amostra sob o comprimento de onda de 260 nm; **Fc** é o fator de conversão no qual 1 unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg RNA/ml (Sambroock et al., 1989); **Fd** corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, no caso, 200 (4 µl de amostra em 800 µl água DEPC); o resultado da multiplicação é dividido por mil para obter-se a concentração em µg/µl.

A qualidade do RNA foi analisada com base na relação A_{260}/A_{280} , onde valores maiores que 1,6 indicam boa qualidade do RNA extraído. A qualidade também foi observada após desnaturação, através de eletroforese em gel de 1,5% agarose em tampão TAE 1 X (Anexo D) (Sambroock et al., 1989).

3.4 Purificação de mRNA a partir de RNA total

O RNA mensageiro (mRNA) foi purificado a partir do RNA total utilizando-se o kit Dynabeads[®] mRNA Purification (Dyna), seguindo as recomendações do fabricante. O uso desse kit baseia-se no pareamento de bases entre resíduos poli A 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.

Ao RNA total, numa diluição de 80 µg em 100 µl de água milliQ tratada com DEPC, acrescentou-se 100 µl de tampão de ligação (*Binding Buffer*) (Anexo E). A amostra 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 é 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 e 80 ng 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 F), com auxílio do MPC, 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 RNase. A quantidade de mRNA purificado foi verificada por meio de espectrofotometria ($A_{260\text{nm}}$ e $A_{280\text{nm}}$) e a qualidade por meio de eletroforese em gel de 1% agarose (Sambrook et al, 1989).

3.5 Reação de RT-PCR

A reação de RT-PCR (síntese de cDNA sobre um molde de mRNA realizada pela enzima transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR, reação em cadeia da polimerase) foi realizada utilizando-se amostra de mRNA extraído da batata e *primers forward* e *reverse* específicos para a UGPase, 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) fornecida pelo kit, 20 µl mRNA, 1 µl de cada *primer* 10 µM, 1 µl RT/ Platinum[®] *Taq* e água MilliQ estéril 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), 38 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 65°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1,5 minuto (alongamento), seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72°C.

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

3.6 Clonagem no vetor TOPO

O produto de amplificação da reação de RT-PCR anterior foi clonado no vetor pENTR TOPO[®] (Figuras 2 e 3) utilizando-se o kit pENTR Directional TOPO[®] Cloning (Invitrogen). 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:

- *rrnB* T2 sequência de terminação de transcrição: bases 268-295
- *rrnB* T1 sequência de terminação de transcrição: bases 427-470

- sítio *primer* M13 *forward* (-20): bases 537-552
- *attL1* (fita complementar): bases 569-668
- sítio específico único da enzima de restrição *NotI* (5'...GC[^]GGCCGC...3')
- sítio 1 de reconhecimento TOPO[®]: bases 680-684
- sequência de sobreposição (*overhang*): bases 685-688
- sítio 2 de reconhecimento TOPO[®]: bases 689-693
- 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
- gene de resistência à canamicina para seleção em *E. coli*: bases 974-1783
- origem de replicação (*ori*) pUC: bases 1904-2577

Figura 2- 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

Figura 3- Sequência de DNA do vetor pENTR-D TOPO compreendida entre os sítios de anelamento dos *primers* universais M13 *forward* e *reverse*. A bases em negrito correspondem aos sítios 1 e 2 de reconhecimento TOPO, e as em itálico à sequência de sobreposição. Estão indicados os sítios específicos únicos das enzimas de restrição *Asc*I e *Not*I, e as sequências para recombinação *att*L1 e *att*L2

3.7 Transformação química de células competentes de *E. coli*

O vetor pENTR TOPO[®] recombinante foi inserido em células de *E. coli* One Shot[®] TOP10 quimicamente competentes (Invitrogen), via transformação química. A mistura de 3 µl da reação TOPO Cloning com 25 µl de *E. coli* foi incubada em gelo por 5 minutos seguido de choque térmico a 42°C por 30 segundos, retornando ao gelo por mais 5 minutos. Às células recombinantes acrescentou-se 250 µl de meio de cultura SOC (Invitrogen) (Anexo J). Essas foram então incubadas a 37°C, em agitador orbital (150 rpm), por 1 hora, antes de serem plaqueadas em meio LB sólido (Anexo K) seletivo, ou seja, acrescido de 50 µg/ml de canamicina. Os transformantes foram visualizados após um período de incubação de 16 horas, a 37°C.

3.8 Análise por PCR das colônias transformantes

A análise de colônias transformantes foi realizada por meio de reação de PCR, utilizando-se um inóculo de cada colônia resistente ao meio seletivo, juntamente com os *primers* correspondentes à UGPase e reagentes *Taq* Gen da Biosystems, conforme Anexo I. O inóculo da colônia foi adicionado à reação de PCR, com auxílio de um palito estéril, sob fluxo laminar. Uma incubação a 94°C, por 10 minutos, foi programada inicialmente no termociclador a fim de lisar as células e inativar 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). O produto de PCR (10 µl de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de 1% de agarose e as bandas visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/µl) sobre luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989).

3.9 Extração de DNA plasmidial

Para confirmar a autenticidade desses clones recombinantes, extraiu-se o DNA plasmidial da colônia transformada utilizando-se Plasmid Mini Kit da 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 K) 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 x 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 (Anexos L, M e N), seguida pela ligação do DNA plasmidial à resina de troca-aniônica Qiagen previamente equilibrada com tampão QBT (Anexo O). RNA, proteínas, pigmentos e impurezas de baixo peso molecular são removidos por meio de 4 lavagens com tampão QC (Anexo P) de média salinidade. O DNA é eluído pelo tampão QF (Anexo Q) 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 (Promega) como padrão de peso molecular. As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/µl) sobre luz ultravioleta.

3.10 Seqüenciamento de DNA plasmidial

O seqüenciamento 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 3100, 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 µl de TRR Mix, 3,2 pmoles de *primer* M13 *forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') ou *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 6 µl 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 µl. O programa apresentou 40 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.11 Análise do seqüenciamento do plasmídeo

A seqüência de nucleotídeos obtida do seqüenciamento do plasmídeo foi comparada com dados genéticos no *GenBank* por meio do programa BlastX (Altschul et al., 1997), que permite a procura de uma proteína a partir de uma seqüência de nucleotídeos, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. 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 decrescentes de *Bit Score*. À medida que o valor do *Score* decai (e o correspondente *E-value* aumenta), menor é o grau de homologia.

O resultado do seqüenciamento também foi confrontado com a seqüência da ORF da UGPase de batata através do programa Blast 2 Sequences, disponível no mesmo *site*.

3.12 Verificação de domínios conservados

As proteínas podem conter de um a vários domínios, cada um com uma função e origem evolutiva diferentes. A seqüência de nucleotídeos obtida pôde ser comparada à base de dados CDD (*Conserved Domain Database*) por meio dos *web sites* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml> ou <http://pfam.wustl.edu/> - *Protein search*.

O programa Pfam (Bateman et al., 2002) versão 10.0 contém modelos para 6.190 famílias de proteínas, baseados em seqüências de proteínas dos bancos de dados Swissprot e SP-TrEMBL.

O retorno da consulta pode conter símbolos que indicam se o *Score* é bom quando comparado a outros membros da família Pfam. O símbolo **!!** sinaliza um alinhamento altamente significativo e, portanto, indica que a seqüência é membro da família de proteínas (Pfam) citada. O valor *E* é uma medida mais quantitativa da significância estatística, sendo que, quanto menor o valor *E*, maior a semelhança.

3.13 Extração de DNA genômico

O DNA genômico total foi extraído de folhas de batata e de eucalipto por meio do método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). 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 α -mercaptoetanol (Anexo R), previamente aquecido (65°C), agitadas em vórtex e deixadas 15-20 minutos a $55-60^{\circ}\text{C}$, com homogeneização suave em intervalos de 5 minutos. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos, e em seguida, adicionou-se 600 μl de CIA. As amostras foram homogeneizadas invertendo-se os tubos 25 vezes e centrifugadas a $18.000 \times g$, a 4°C , 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, porém sem β -mercaptoetanol. Foram feitas duas extrações adicionais com 600 μl de CIA, como descrito acima, para completa remoção da interface.

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

O precipitado foi lavado com 600 µl de etanol 70%, e mantido a -20°C por 20 minutos, antes da centrifugação por 15 minutos, a 4°C, a 18.000 x g. Após secagem, o precipitado foi ressuspensionado em 30 µl de tampão TE (Anexo S) acrescido de 10 µg de RNase e mantido a 37°C, por 1 hora.

A qualidade e a quantidade de DNA foi verificada por meio de eletroforese. 5-10 µl da amostra foram aplicados em gel de agarose a 1% e as bandas visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/µl) sobre luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989).

3.14 PCR com *primers* específicos para a ORF

Com a finalidade de se verificar a autenticidade dos *primers* sintetizados específicos para a ORF do gene que codifica a UGPase, foi realizada a reação de PCR utilizando-se o DNA genômico total de batata e de eucalipto e os *primers* correspondentes à UGPase, conforme indicado no Anexo I, para um volume final de 50µl de reação. A amplificação do DNA de batata foi realizada 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. Já amplificação do DNA de eucalipto foi realizada com 2 minutos iniciais a 96°C, 3 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 42°C e 2 minutos a 72°C, mais 30 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C.

O produto de PCR (10 µl de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de 1% de agarose e as bandas visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/µl) sobre luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989).

3.15 Análise dos sítios de restrição

Para a análise de *Southern blot* o DNA genômico total foi digerido com uma enzima de restrição que não reconhece sítios internos à ORF da UGPase e outro que reconhece. Com o auxílio do *web site* <http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html> – *New England Biolabs NEBcutter* – opção “List 0 cutters” definiu-se quais as enzimas que poderiam ser utilizadas.

3.16 *Southern blot*

Para a análise de *Southern blot* (Southern, 1975; Sambrook et al., 1989), 20 µg de DNA genômico de batata e de eucalipto foram digeridas com as enzimas de restrição *Pst*I e *Hind*III (Invitrogen), em excesso (50 unidades), de acordo com recomendações do fabricante, a 37°C, por 16 horas. O DNA digerido foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetado de amônia e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto. As amostras foram deixadas a –20°C por 24-72 horas. Após a centrifugação a 18.000 x 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 (Anexo S). A este volume adicionou-se 8 µl de sacarose 40% para aumentar a densidade da amostra a ser submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5 X (Anexo G) e contendo brometo de etídio (0,01 µg/ml). Como marcador de peso molecular foi utilizado 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen). 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 depurinação, 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 intercaladas com enxágües em água MilliQ estéril.

A transferência por capilaridade do DNA do gel para a membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia) foi carregada pela solução de transferência 20 X SSC (Anexo T) por 16 horas, de acordo com Sambrook et al. (1989). O DNA foi fixado à membrana por meio de aquecimento (80°C) em forno, por duas horas.

O produto da reação de RT-PCR purificado com auxílio do kit Concert™ Nucleic Acid Purification System (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante, foi utilizado como sonda para hibridização na análise de *Southern blot*. A sonda foi marcada de forma não radioativa, com auxílio do kit *Gene Images™ random prime labelling module* (Amersham Pharmacia Biotech), segundo normas do fabricante.

Todos os passos da hibridização foram realizados no forno de hibridização. A membrana foi umedecida com 50 ml de 5 X SSC (Anexo T) à temperatura de 55°C, durante 30 minutos. Essa solução foi substituída por 20 ml de solução de pré-hibridização (Anexo U), onde a membrana foi deixada por pelo menos 1 hora, a 55°C. A hibridização se deu por 16 horas após a adição da sonda marcada à solução de pré-hibridização. As lavagens de pós-hibridização da membrana foram realizadas com 100 ml de solução I (1 X SSC; SDS 0,1% p/v) e 100 ml de solução II (0,5 X SSC; SDS 0,1% p/v), a 55°C, por 15 minutos cada.

A detecção dos pontos de hibridização foi realizada com auxílio do kit de detecção “*Gene Images CDP-Star detection module*”, da Amersham Pharmacia Biotech. Após as lavagens pós-hibridização, a membrana foi mantida em solução bloqueadora (45 ml Buffer A (Anexo V); 1/10 v/v agente bloqueador de detecção fornecido pelo kit) por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo *antifluorescein-AP conjugate* diluído (1:5000) em 25 ml Buffer A + BSA 0,5% p/v, a temperatura ambiente, por 1 hora. O excesso de anticorpo foi removido com três lavagens com 100 ml de solução de lavagem (300 ml Buffer A + TWEEN-20 0,3% v/v), de 10 minutos cada. Em capela de fluxo laminar, a membrana foi colocada sobre um plástico, e sobre ela distribuiu-se homogeneamente 300 µl do reagente de detecção,

fornecido pelo kit. A reação se deu durante 5 minutos. O excesso de líquido foi retirado com auxílio de uma régua, antes da selagem das bordas do saco plástico.

Numa câmara escura, um filme de autoradiografia foi exposto sobre a membrana hibridizada, mantida na ausência de luz no interior de um cassete de Raios X. A sensibilização do filme ocorre devido à reação luminosa resultante da oxidação do luminol (CDP-Star) em contato com a membrana hibridizada. O tempo de exposição do filme foi variável, iniciando-se com 30 segundos. Após a exposição, o filme foi revelado manualmente em câmara escura 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pesquisa em bancos de dados

Pelas buscas nos bancos de dados genéticos do NCBI e KEGG foi possível obter uma relação de organismos cujo gene que codifica a enzima UGPase já foi seqüenciado. Este gene foi encontrado em uma ampla gama de organismos, desde bactérias até mamíferos. Em plantas, o gene já foi seqüenciado em *Amorpha fruticosa*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Musa acuminata*, *Oryza sativa*, *Pyrus pyrifolia* e *Solanum tuberosum*, entre outras espécies.

4.2 Similaridade entre as UGPases de algumas espécies vegetais

Foi feita uma análise comparativa através do programa Clustal W entre as seqüências completas de aminoácidos da UGPase de algumas espécies vegetais encontradas durante a busca do EC 2.7.7.9 no NCBI: *Solanum tuberosum* (batata) (gi|218001|dbj|BAA00570.1|), *Arabidopsis thaliana* (gi|15237947|ref|NP_197233.1|), *Oryza sativa* (arroz) (gi|15823775|dbj|BAB69069.1|), *Musa acuminata* (banana) (gi|6625908|gb|AAF19422.1|AF203909_1), *Hordeum vulgare* (cevada) (gi|1212996|emb|CAA62689.1|), *Amorpha fruticosa* (gi|17026394|gb|AAL33919.1|) e *Pyrus pyrifolia* (pera asiática) (gi|19911799|dbj|BAB88218.1|) (Figura 4).

CLUSTAL W (1.82) alinhamento múltiplo de seqüências

```

gi|15823775|      -----MAVTADVKLEGLRAATDKLDQISENEKSGFTSLVSRYLSGEAEQIEWSKIQTPT 54
gi|1212996|      ---MAAAVAADSKI DGLRD AVAKLGEISENEKAGFISLVSRYLSGEAEQIEWSKIQTPT 57
gi|6625908|      -----MADAKIAKLQS AVAELNQISENEKSGFISLVSRYLSGEAEQIEWSKIQTPT 51
gi|218001|      MATATTLSPADAEKLNKLSAVAGLNQISENEKSGFINLVGRYLSGEAQHIDWSKIQTPT 60
gi|15237947|     -----MAATATEKLPQLKS AVDGLTMSENEKSGFINLVSRYLSGEAQHIEWSKIQTPT 54
gi|17026394|     -----MAATATDNKLSNLSAVAGLNQISENEKSGFINLVSRYLSGEAQHVEWSKIQTPT 55
gi|19911799|     -----MATGVIDKLSHVATLSQISENEKNGFINLVARSVSGEAQHVDWSKIEPT 51
                  :  * : . * :***** **.*.* :*****:::*****:**

gi|15823775|      DEVVVPYDTLSAAPEDLNETKLLDKLVVL KNGGIGTTMGCTGPKSVIEVRNGFTFLDL 114
gi|1212996|      DEVVVPYDTLAPPEDLDAMKALLDKLVVL KNGGIGTTMGCTGPKSVIEVRNGFTFLDL 117
gi|6625908|      DEVVVPYDTLSPPEDLEATKLLDKLAVL KNGGIGTTMGCTGPKSVIEVRNGFTFLDL 111
gi|218001|      DEVVVPYDKLAPLSEDP AETKLLDKLVVL KNGGIGTTMGCTGPKSVIEVRNGLTFLDL 120
gi|15237947|     DEIVVPYDKMANVSEDA SETKYLLDKLVVL KNGGIGTTMGCTGPKSVIEVRDGLTFLDL 114
gi|17026394|     DEVVVPYESLAPTPDGSSEVKSLLDKLVVL KNGGIGTTMGCTGPKSVIEVRDGLTFLDL 115
gi|19911799|     DEVVVPHAGLEPAPKDTAEIKALLDKLVVL KNGGIGTTMGCTGPKSVIEVRDGLTFLDL 111
                  **:***: : . . . * ***** *****:*****:*****

gi|15823775|      IVIQIESLNKKYGCN VPLLMLNSFNTHDDTQKIVEKYSNSNI EIHTFNQSQYPRIVTEDF 174
gi|1212996|      IVIQIESLNKKYGCS VPLLMLNSFNTHDDTQKIVEKYSNSNI EIHTFNQSQYPRIVTEDF 177
gi|6625908|      IVIQIESLNKKYGCN VPLLMLNSFNTHDDTQKIVEKYANSNI EIHTFNQSQYPRIVMEDF 171
gi|218001|      IVQIEALNAKF GCSVPLLMLNSFNTHDDTLKIVEKYANSNI DIHTFNQSQYPRIVTEDF 180
gi|15237947|     IVIQIENLNNKYNCKVPLVLMNSFNTHDDTQKIVEKYTKSNVDIHTFNQSKYPRVVDEF 174
gi|17026394|     IVIQIENLNSKYGSN VPLLMLNSFNTHDDTQKIIIEKYKNSNI QIHTFNQSQYPRLVVDDF 175
gi|19911799|     IVMQIEHLNDFGSSVPLLMLNSFNTHDDTQKIVEKYSKANVQIHTFNQSQYPRLVVDDF 171
                  ** *** * * : . . . ***** ***** :*:***:*****:*****:***

gi|15823775|      LPLPSKKGKTGKD GWYPPGHG DVFPS LNNSG KLDTLAQGKEYVFVANSNIGAIVDLKIL 234
gi|1212996|      LPLPSKKGQTG KD GWYPPGHG DVFPS LNNSG KLDTLQSQKEYVFVANSNIGAIVDLKIL 237
gi|6625908|      QPLPSKGHAGKD GWYPPGHG DVFPS LMNSG KLDALLSQKEYVFVANSNIGAIVDLKIL 231
gi|218001|      APLPCKGNNSG KD GWYPPGHG DVFPS LMNSG KLDALLA KGEYVFVANSNIGAIVDLKIL 240
gi|15237947|     VPWPSKKGTD KD GWYPPGHG DVFPS LMNSG KLDALISQKEYVFVANSNIGAIVDLKIL 234
gi|17026394|     LPLPSKGHTG KD GWYPPGHG DVFPS LNSNG KLDALLSQKEYVFVANSNIGAIVDLKIL 235
gi|19911799|     TPLPSKKGQTG KD GWYPPGHG DVFPS LKNSG KLDLLSQGREYVFVANSNIGAIVDLKIL 231
                  * *.**:::***** ***** :*:***:*****:*****:***

```

Figura 4 Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos da enzima UGPase de *Oryza sativa* (gi|15823775|), *Hordeum vulgare* (gi|1212996|), *Musa acuminata* (gi|6625908|), *Solanum tuberosum* (gi|218001|), *Arabidopsis thaliana* (gi|15237947|), *Amorpha fruticosa* (gi|17026394|) e *Pyrus pyrifolia* (gi|19911799|), através do programa ClustalW. Os asteriscos indicam resíduos idênticos, dois pontos indicam substituições conservadas, um ponto indica variação em uma ou mais seqüências e os traços indicam os intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento

gi 15823775	NHLIHNQNEYQMEVTPKTLADVKGGLISYEGRVQLLEIAQVPDEHVNFEFKSIEKFKIFN	294
gi 1212996	NHLIHNQNEYQMEVTPKTLADVKGGLISYEGRVQLLEIAQVPDEHVNFEFKSIEKFKIFN	297
gi 6625908	NHLINNQNEYQMEVTPKTLADVKGGLISYEGRVQLLEIAQVPDAHVNFEFKSIEKFKIFN	291
gi 218001	NHLILNKNEYQMEVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFEFKSIEKFKIFN	300
gi 15237947	KHLIQNKNEYQMEVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFEFKSIEKFKIFN	294
gi 17026394	NHLVKNKNEYQMEVTPKTLADVKGGLISYEGRVQLLEIAQVPDEHVNFEFKSIEKFKIFN	295
gi 19911799	HHLIKNKNEYIMEVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPEEHVNFEFKSIEKFKIFN	291
	:**:*:*:*** *****:*****: ** *****	
gi 15823775	TNNLWVNLKAIKRLVEAALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIRFFEKAGINVPR	354
gi 1212996	TNNLWVNLKAIKRLVDAEALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIRFFEKAGINVPR	357
gi 6625908	TNNLWVNLKAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIRFFDHAGINVPR	351
gi 218001	TNNLWVNLKAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIRFFDRAIGANVPR	360
gi 15237947	TNNLWVNLKAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIRFFDINAGINVPR	354
gi 17026394	TNNLWVNLKAIKRLVEADALKTEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIRFFDKAGINVPR	355
gi 19911799	TNNLWVNLKAIKRLVDAALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIRFFDINAGINVPR	351
	*****:*:*:*:*:*** *****:***:*** *****	
gi 15823775	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLVDG-FVIRNPARTNPSNPSIELGPEFKKVANFLARFKS	413
gi 1212996	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLVDG-YVIRNPARYKPSNPSIELGPEFKKVANFLARFKS	416
gi 6625908	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYMLVDG-FVIRNKARTNPSNPSIELGPEFKKVANFLSRFKS	410
gi 218001	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSIELGPEFKKVANFLGRFKS	420
gi 15237947	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLVDG-FVTRNKARTNPTNPAIELGPEFKKVASFILSRFKS	413
gi 17026394	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLEDG-FVIRNKARANPENPTVELGPEFKKVSNFLSRFKS	414
gi 19911799	ARFLPVKATSDLLLVKSDLYNVRDG-FVIRNKLRRDPQNPPIIQLGPEFKKVDDFLSRFKS	410
	:*****:***:*	
gi 15823775	IPSEIVELDTLKVSGDVWFGSGVTLKGKVTITAKSG-KLEIPDGAVIENKDIINGPEDL	469
gi 1212996	IPSEIVELDSLKVSGDVWFGSGVTLKGNVTIAAKAGVKLEIPDGAVIENKDIINGPEDI	473
gi 6625908	IPSEIVELDSLKVSGDVWFGSGVTLKGNVIAAKSGVKLEIPDGAVIENKDIINGPEDI	467
gi 218001	IPSEIIDLDSLKVSGDVWFGSGVTLKGKVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDIINGPEDI	477
gi 15237947	IPSEIVELDSLKVSGDVWFGSGVTLKGKVTIVANAGTKLEIPDNAVLENKDIINGPEDL	470
gi 17026394	IPSEIVELDSLKVAGDVWFGSGIILKGKVSIVAKPGVKLEIPDGAVIANKEINGPEDL	471
gi 19911799	IPSEILLECDGLRVGDGIWFGSGIKLKGNVHCSVSSEMLNIPDNITILRE-----	458
	***:::*	

Figura 4 Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos da enzima UGPase de *Oryza sativa* (gi|15823775|), *Hordeum vulgare* (gi|1212996|), *Musa acuminata* (gi|6625908|), *Solanum tuberosum* (gi|218001|), *Arabidopsis thaliana* (gi|15237947|), *Amorpha fruticosa* (gi|17026394|) e *Pyrus pyrifolia* (gi|19911799|), através do programa ClustalW. Os asteriscos indicam resíduos idênticos, dois pontos indicam substituições conservadas, um ponto indica variação em uma ou mais seqüências e os traços indicam os intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento

Pela análise verificou-se a ocorrência de alinhamento biologicamente significativo entre as UGPases dessas espécies 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.

A sequência deduzida de aminoácidos de enzimas bacterianas são 30-40% mais curtas do que UGPase de eucariotos, mas suas propriedades catalíticas e regulatórias são semelhantes (Hossain et al., 1994). A alta identidade entre UGPase de cevada e as correspondentes proteínas de outros tecidos vegetais e animais, mas não de bactéria, sustenta uma visão mais recente (Hossain et al., 1994) de que genes de UGPase de eucariotos e procariotos ramificaram-se em um estágio evolutivo bem recente. Por outro lado, os genes podem ter evoluído independentemente por meio de convergência evolutiva a partir de diferentes proteínas progenitoras (Eimert et al., 1996).

4.3 Similaridade entre UGPases de alguns cultivares de batata

A falta de alinhamento das extremidades das sequências de aminoácidos de diferentes espécies vegetais levou à escolha de uma única espécie, *Solanum tuberosum* (batata), da qual foram selecionados os gi(s) (*number of general identification*) que apresentavam a sequência completa (*complete cds*) para a UGPase (Tabela 1), relacionados a diferentes cultivares da espécie. As sequências deduzidas dos 477 aminoácidos da UGPase de batata de cada gi foram utilizadas na busca de similaridade através do programa Clustal W (Figura 5).

Entre os diferentes gi(s) de batata originados de diferentes cultivares da espécie *Solanum tuberosum* encontrou-se também um alinhamento biologicamente significativo, com diferença em apenas 14 dos 477 aminoácidos, e com melhor alinhamento nas extremidades N e C terminais.

Tabela 1. Relação de gi(s) do GenBank para a UGPase de diferentes cultivares de batata

Número de Acesso ao GenBank	GI	Protein id	Cultivar
D00667.1	218001	BAA00570.1	Danshaku-Imo ⁽¹⁾
Z18924.1	21599	CAA79357.1	Desiree ⁽²⁾
U20345.1	1388021	AAB71613.1	Lemhi ⁽³⁾
AY082617.1	28863903	AAL99192.1	Snowden ⁽⁴⁾
AY082618.1	28863905	AAL99193.1	ND860-2 ⁽⁴⁾
AY082619.1	28863907	AAL99194.1	Russet Burbank-1 ⁽⁴⁾
AY082620.1	28863909	AAL99195.1	Norchip ⁽⁴⁾
AY082621.1	28863911	AAL99196.1	Redsen ⁽⁴⁾
AY082622.1	28863913	AAL99197.1	BelRus ⁽⁴⁾
AY082623.1	28863915	AAL99198.1	Russet Burbank-2 ⁽⁴⁾

Referências: (1) Katsube et al., 1990; (2) Spsychalla et al., 1994; (3) Borovkov et al., 1997; (4) Sowokinos et al.¹, 2002.

¹ SOWOKINOS, J.R.; VIGDOROVICH, V.; ABRAHAMSEN, M.S. Molecular cloning and sequence anomalies of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNAs from cold-sweetening-sensitive and resistant potatoes. Trabalho não publicado.

Figura 5- Alinhamento obtido pelo programa ClustalW, das seqüências deduzidas de aminoácidos da enzima UGPase de diferentes cultivares de *Solanum tuberosum* (batata): Lemhi (**gi|1388021|**), Norchip (**gi|28863909|**), BelRus (**gi|28863913|**), Redsen (**gi|28863911|**), Russet Burbank-2 (**gi|28863915|**), Danshaku-Imu (**gi|218001|**), Desiree (**gi|21599|**), ND860-2 (**gi|28863905|**) , Russet Burbank-1 (**gi|28863907|**) e Snowden (**gi|28863903|**). Os asteriscos indicam resíduos idênticos, dois pontos indicam substituições conservadas e um ponto indica variação em uma ou mais seqüências

gi 1388021	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 28863909	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGRVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 28863913	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 28863911	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 28863915	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 218001	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 21599	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 28863905	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 28863907	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
gi 28863903	NHLILNKNEYCMVTPKTLADVKGGLISYEGKVQLLEIAQVPDEHVNFKSIEKFKIFN	300
*****:*****		
gi 1388021	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 28863909	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 28863913	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 28863911	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 28863915	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 218001	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 21599	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 28863905	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 28863907	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
gi 28863903	TNNLWVNLSAIKRLVEADALKMEIINPKVDGKVLQLETAAGAAIKFFDRAIGANVPR	360
*****:*****		
gi 1388021	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 28863909	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 28863913	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 28863911	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 28863915	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 218001	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 21599	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 28863905	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 28863907	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
gi 28863903	SRFLPVKATSDLLLVQSDLYTLTDEGYVIRNPARNPSNPSELGPEFKKVFANFLGRFKS	420
*****:*****		
gi 1388021	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 28863909	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 28863913	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 28863911	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 28863915	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 218001	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 21599	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 28863905	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 28863907	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
gi 28863903	IPSIIDLDLKV/TGDVWFGSGVTLKGVTVAAKSGVKLEIPDGAVIANKDINGPEDI	477
*****:*****		

Figura 5- Alinhamento, obtido pelo programa ClustalW, das seqüências deduzidas de aminoácidos da enzima UGPase de diferentes cultivares de *Solanum tuberosum* (batata): Lemhi (gi|1388021|), Norchip (gi|28863909|), BelRus (gi|28863913|), Redsen (gi|28863911|), Russet Burbank-2 (gi|28863915|), Danshaku-Imu (gi|218001|), Desiree (gi|21599|), ND860-2 (gi|28863905|), Russet Burbank-1 (gi|28863907|) e Snowden (gi|28863903|). Os asteriscos indicam resíduos idênticos, dois pontos indicam substituições conservadas e um ponto indica variação em uma ou mais seqüências

4.4 Definição dos *primers* para a ORF

A similaridade entre as seqüências de aminoácidos permitiu a confecção de um par de *primers* que pôde ser utilizado na amplificação do gene UGPase da batata, independentemente do tipo de cultivar. Esses *primers* foram definidos por meio do alinhamento entre os 21 nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de dez gi(s) de batata, com auxílio do programa Clustal W (Figura 6).

EXTREMIDADES 5'			
gi 21599		ATGGCTACTGCTGCTACTCTT-----	21
gi 28863903		ATGGCTACTGCTGCTACTCTT-----	21
gi 28863905		ATGGCTACTGCTGCTACTCTT-----	21
gi 28863906		ATGGCTACTGCTGCTACTCTT-----	21
gi 28863911		ATGGCTACTGCTACTACTCTT-----	21
gi 28863915		ATGGCTACTGCTACTACTCTT-----	21
gi 28863909		ATGGCTACTGCTACTACTCTT-----	21
gi 28863913		ATGGCTACTGCTACTACTCTT-----	21
gi 218001		ATGGCTACTGCTACTACTCTT-----	21
gi 1388021		ATGGTCACTGCTACTACTCTT-----	21
**** *			
EXTREMIDADES 3'			
gi 1388021		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 218001		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 21599		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 28863913		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 28863903		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 28863909		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 28863905		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 28863906		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 28863911		AATGGACCTGAGGATATATAG	21
gi 28863915		AATGGACCTGAGGATATATAG	21

Figura 6 Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das extremidades 5' e 3' dos diferentes gi(s) de batata por meio do programa ClustalW, para a definição do par de *primers* específico para a UGPase. Os asteriscos indicam resíduos idênticos em todas as seqüências

No alinhamento das extremidades 5', as 5ª e 6ª bases diferiram apenas para o gi|1388021|. Como estas duas bases encontram-se invertidas em relação às demais seqüências pode ter havido um artifício de sequenciamento. Desta forma, esta diferença não foi considerada. A 13ª base também variou, porém, em um número maior de seqüências. Assim, nesta posição, o *Primer Sense* foi confeccionado com 50% de adenina e 50% de guanina, indicadas pela letra R (purina). Já no caso do *Primer Antisense*, o alinhamento das extremidades 3' foi perfeito. A seqüência de direcionamento CACC do sistema Directional TOPO® foi adicionada à extremidade 5' do *PrimerSense*. Portanto, os *primers* sintetizados foram:

Primer Sense → 5' **CACCATGGCTACTGCTR**CTACTCTT 3'

Primer Antisense → 5' CTATATATCCTCAGGTCCATT 3'

Pelo programa Primer3 verificou-se a viabilidade destes *primers*. A única desvantagem encontrada foi a temperatura de anelamento (Tm) muito baixa (53 e 54°C), o que não prejudica seu funcionamento.

A especificidade dos *primers* foi confirmada com auxílio do programa *Nucleotide Blast* (*Search for short nearly exact matches*) no banco de dados do NCBI, uma vez que se encontrou 100% de identidade ao gene de interesse da batata.

4.5 Reação de RT-PCR

O mRNA, purificado a partir de RNA total de batata, foi utilizado na reação de RT-PCR com *primers* específicos para a ORF da UGPase. O produto de amplificação de 1,4 kb, correspondente à ORF da UGPase, foi visualizado por meio de eletroforese (Figura 7).

Figura 7 Perfil eletroforético do produto de RT-PCR obtido com *primers* específicos para amplificar o gene da UGPase (1,4 kb) de *Solanum tuberosum* (*St*). A primeira canaleta (ë) corresponde ao marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* - Invitrogen

4.6 Análise de colônias transformantes por PCR

Os fragmentos obtidos na reação de RT-PCR foram clonados ao vetor pENTR-D TOPO[®]. O vetor recombinante foi utilizado na transformação de células quimicamente competentes da linhagem de *E. coli* TOP10, da Invitrogen. As células transformadas foram selecionadas em meio LB sólido acrescido de canamicina, após um período de 16 horas, a 37°C, e submetidas à confirmação da presença do transgene, via PCR, na presença de *primers* específicos para a ORF.

O produto de amplificado na reação PCR correspondente a aproximadamente 1,4 kb foi obtido somente para o caso do clone nº 2 (Figura 8).

Figura 8 Perfil eletroforético obtido na análise dos clones transformantes. A primeira canaleta corresponde ao marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* – Invitrogen (L). A sexta e sétima canaletas correspondem ao produto de PCR dos clones 1 e 2, respectivamente

4.7 Sequenciamento de DNA plasmidial

O DNA plasmidial extraído do clone (2) que amplificou corretamente na análise de clones transformantes foi sequenciado nos dois sentidos utilizando-se o par de *primers* universais M13. As seqüências parciais obtidas e alinhadas por meio do programa Blast 2 Sequences (página eletrônica do NCBI) resultaram em uma seqüência consenso. Nesta seqüência foi possível reconhecer as bases correspondentes ao DNA do inserto e, na sua extremidade 5', as bases correspondentes ao DNA plasmidial. O inserto clonado apresentou 1402 pb, sendo que 12 delas não foram identificadas, e a proteína deduzida, 467 aminoácidos. 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 et al. (1997) e Sowokinos et al. (2002). No sequenciamento não consta a série de bases do DNA plasmidial adjacente à extremidade 3' do inserto e portanto, o sequenciamento não abrangeu toda a seqüência

compreendida entre os sítios de anelamento dos *primers* M13. Desta forma, o tamanho menor (-32 pb) encontrado não significa necessariamente que o inserto não esteja completo. A sequência consenso do inserto e a correspondente sequência deduzida de aminoácidos, de acordo com o código IUPAC (Anexo A), encontram-se na Figura 9.

Estudos anteriores sobre UGPase de tubérculos de batata permitiram a identificação de três resíduos de lisina no interior da estrutura protéica que são críticos para a catálise (K³⁶⁷) e para a ligação do substrato (K²⁶³ e K³²⁹) pirofosfato e/ou á-D-glicose 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 (K²⁹¹, K³⁵⁷, K³⁹⁶) (Konishi et al., 1993), duas são encontradas na sequência protéica de *Saccharomyces cerevisiae* (K²⁸⁰, K³⁸⁸) (Daran et al., 1995), e pelo menos uma (K²⁸⁷) é conservada na sequência de *E. coli* (Hossain et al., 1994). O cDNA aqui clonado tem resíduos lisina em posições idênticas (K²⁶³, K³²⁹, K³⁶⁷) às citadas para a batata.

A sequência deduzida de aminoácidos da UGPase de batata aqui obtida contém dois sítios putativos de *N*-glicosilação (Figura 9) 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 sequência 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-glicose para a biossíntese de componentes da parede celular, incluindo β -glucanos e celulose (Kleczkowski, 1994).

A partir da comparação das sequências de aminoácidos da UGPase de plantas, animais e fungos, Flores-Díaz et al (1997) localizaram três motivos conservados. Os motivos foram definidos como sendo regiões com pelo menos 11 resíduos exatamente iguais ao longo de 30 resíduos consecutivos. Na proteína deduzida a partir do cDNA clonado foram encontradas três sequências (91-122, 194-224, 338-367) (Figura 9) semelhantes aos motivos registrados por Flores-Díaz et al. e em posições praticamente idênticas (90-121, 193-223, 337-366).

```

ATGGCTACTGCTGCTACTCTTTCTCCTGCTGAGTCCGAAAAGCTCAACAATCTCAAATCT 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

GATGAGGTGGTGGTGCATATGACAAGTTAGCACCTCTTTCTGAAGATCCCGCAGAGACT 240
D E V V V P Y D K L A P L S E D P A E T 80

AAGAAGCTTTTGGACAACTTGTGTCTGAAGCTCAATGGAGGCTTGGGAACAACAATG 300
K K L L D K L V V L K L N G G L G T T M 100

GGATGCACTGGTCCCAAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGACATTCCCTGACTTG 360
G C T G P K S V I E V R N G L T F L D L 120

ATTGTCAAGCAAATTGAGGCCCTCAATGCCAAATTCGGATGCAGTGTCCCTGCTTTTG 420
I V K Q I E A L N A K F G C S V P L L L 140

ATGAATTCGTTCAACACCCATGATGATACACTGAAGATTGTAGAAAATATGCGAACTCA 480
M N S F N T H D D T L K I V E K Y A N S 160

AACATTGATATTCATACATTCAATCAGAGCCAGTACCCTCGCCTGGTTACGGAAGACTTT 540
N I D I H T F N Q S Q Y P R L V T E D F 180

GCCCCACTTCCATGCAAAGGCAATTCTGGAAGATGGNTGGNACCTTCANGTCATGGT 600
A P L P C K G N S G K D G W X P S X H G 200

GATGTTTTCCNTTCTTTGATGAATAGTGAAGCTTGGTGCACACTAACCAGGAAAG 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

GATATTCATCTGATCNTAACCAGAAATGAGTATGGCATGGAGGTNACTCCCAAACTTTA 780
D I H L I X T K I E Y G M E V T P K T L 260

GTTGTCAAAGGTGGCNCCTTTAATCTCATATGAAGGAAAAGTNCAGCTGCTGGAATAGCA 840
V V K G G X L I S Y E G K V Q L L E I A 280

CAAGCCNTGATGAACATGTCAATGAATCAAGTCAATTGAAAAATTCAAATTTTCAAT 900
Q A X D E H V N E F K S I E K F K I F N 300

ACCAACAACCTTGTGGGTGAATCTGAGTGCTATTAAAAGACTTGTAGAAGCAGATGCACTC 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

ACTGCTGCCGGTGTGCAATTAAGTTTTTTGACCGGCAATTGGTGTCTAATGTTCTCTGA 1080
T A A G A A I K F F D R A I G A N V P R 360

TCTCGTTTCTTCCCGTGAAAGCAACTTCAGATTGCTCCTTGTTCAGTCTGATCTTTAC 1140
S R F L P V K A T S D L L L V Q S D L Y 380

ACCTTGACTGATGAGGGCTATGTTATCCGAAACCCGGCCAGGTGCAATCCATCCAACCCA 1200
T L T D E G Y V I R N P A R S N P S N P 400

TCCATCGAGTTGGGACCTGAATTCAAGAGGTGGCCAACTTCTTAGGCCGTTTCAAGTCT 1260
S I E L G P E F K R V A N F L G R F K S 420

ATTCCAGCATCATTGATCTAGATAGCTGAAGGTGACCGGTGATGTATGGTTCGGATCC 1320
I P S I I D L D S L K V T G D V W F G S 440

GGCGTTACCCTAAAGGGGAAAGTACTGTTGCGCCAAATCAGGAGTGAAGCTAGAAATT 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 9- 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 destacados em amarelo, 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 em azul

4.8 Blast da sequência do gene com o NCBI

A análise da sequência consenso por meio do programa BlastX revelou alta homologia (valor E = 0.0) com UGPases de diferentes cultivares de batata (Katsube et al., 1990; Spychalla et al., 1994, Borovkov et al., 1997; Sowokinos et al., 2002), bem como de outras espécies vegetais (Tabela 2).

Tabela 2. Homologia encontrada entre a sequência de nucleotídeos do cDNA clonado e dados genéticos no GenBank através do programa BlastX

Sequência	Score	Valor E	Identidade *
UGPase <i>Solanum tuberosum</i> gi 136739	816	0.0	90%
UGPase <i>Solanum tuberosum</i> gi 1388021	815	0.0	90%
UGPase <i>Solanum tuberosum</i> gi 322794	815	0.0	90%
UGPase <i>Solanum tuberosum</i> gi 28863913	813	0.0	90%
UGPase <i>Solanum tuberosum</i> gi 28863903	813	0.0	90%
UGPase <i>Solanum tuberosum</i> gi 28863909	807	0.0	89%
UGPase <i>Amorpha fruticosa</i> gi 17026394	692	0.0	77%
UGPase <i>Musa acuminata</i> gi 12585489	689	0.0	77%
UGPase <i>Oryza sativa</i> gi 15823775	686	0.0	78%
UGPase <i>Hordeum vulgare</i> gi 6136111	684	0.0	77%
UGPase <i>Arabidopsis thaliana</i> gi 15237947	682	0.0	76%
UGPase <i>Pyrus pyrifolia</i> gi 6136112	673	0.0	77%
UGPase <i>Nicotiana tabacum</i> gi 17402533	660	0.0	92%
UGPase <i>Pyrus pyrifolia</i> gi 19911799	626	e-178	72%

* Identidade dada pela porcentagem de aminoácidos idênticos.

4.9 Verificação de domínio conservado

A proteína deduzida a partir da sequência consenso de nucleotídeos do cDNA clonado de batata foi analisada quanto à presença de domínios funcionais através do programa Pfam. Observou-se que a proteína possui um único domínio conservado e completo, localizado entre os resíduos 32 e 445 (Figura 10) idêntico ao domínio encontrado para as UGPases de batata disponíveis nos bancos de dados. A sequência foi identificada como pertencente à família de proteínas UDPGP (UDP-glicose pirofosforilases) com *Score* igual a 824.3, o que quer dizer que a comparação é altamente significativa.

Model	Seq- from	Seq- to	HMM- from	HMM- to	Score	E- value	Alignment	Description
!! UDPGP	32	445	1	480	824.3	5.3e-245	glocal	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase

O diagrama abaixo representa a extensão do domínio UDPGP em verde, mostrando a posição dos resíduos 32 e 445 na sequência total da proteína.

Figura 10- Representação diagramática da extensão do domínio UDPGP (em verde) em relação à sequência deduzida a partir do cDNA codificador da UGPase de batata, obtida no programa Pfam. A figura é idêntica à de diferentes gi(s) da enzima em batata

4.10 PCR de DNA genômico de *E.grandis* com *primers* de UGPase da batata

Foi realizada a reação de PCR utilizando-se DNA genômico de *E. grandis* e par de *primers* específicos para o gene da UGPase definidos a partir de sequências do gene

em batata. A amplificação resultou em dois fragmentos, um de 1,3 kb e outro de 0,7 kb (Figura 11), aproximadamente. O tamanho do maior fragmento obtido é próximo ao esperado (1,4 kb) para cds encontrado entre cultivares de batata (Katsube et al., 1990; Spsychalla et al., 1994; Sowokinos et al., 2002) e em outras espécies vegetais. Porém, é bem menor ao gene intercalado por íntrons (6,6 kb) de batata (Borovkov et al., 1997). O fragmento menor pode ter sido resultante de uma amplificação inespecífica.

O resultado obtido indica que o gene que codifica a UGPase está presente no genoma de eucalipto e que este pode ser amplificado por meio de PCR mesmo com os *primers* desenhados para a batata. Entretanto, as condições de amplificação precisam ser aprimoradas.

Figura 11- Perfil eletroforético do produto de PCR obtido na amplificação de DNA genômico de *Eucalyptus grandis* (**Eg**) com *primers* específicos para amplificar

o gene da UGPase em batata. A primeira canaleta (ø) corresponde ao marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* - Invitrogen

4.11 *Southern blot*

As enzimas escolhidas para a digestão de DNA genômico da batata e de eucalipto foram a *Pst*I, uma vez que esta enzima encontra-se na relação de enzimas que não clivam a ORF das seqüências de vários gi(s) que contêm o gene da UGPase de batata, utilizados nas análises, e *Hind*III, que cliva a ORF duas ou três vezes, dependendo da seqüência.

Na Figura 12 é possível observar que a sonda produziu oito bandas no DNA genômico de *S. tuberosum* digerido com a enzima de restrição *Hind*III, e quatro bandas no digerido com *Pst*I. 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 *Hind*III e *Pst*I, não visualizados no padrão de digestão simulado para a ORF.

A presença de várias bandas também pode ser um indício da ocorrência de isoformas da enzima UGPase. Segundo Sowokinos et al., (1997) as seqüências encontradas em diferentes cultivares podem representar um polimorfismo alélico no gene, especialmente se a UGPase é codificada por um único gene em batata (Borovkov et al., 1986). O indicativo de que a UGPase se apresenta na forma de homodímero, como proposto por Sowokinos et al. (1993), reforça a idéia de polimorfismo alélico.

Também, a inibição *antisense* da expressão do gene que codifica a UGPase em tubérculos de batata levou a um decréscimo tanto dos níveis de mRNA como de proteína em todos os tecidos estudados de batata (Zrenner et al., 1993). Isto sugere ou a presença de um único gene *Ugp* em batata, ou a presença de uma família de genes que produzem transcritos altamente homólogos.

Eimert et al (1996) também concluíram que a UGPase é codificada por um único gene em cevada. No entanto, a hipótese de um único gene é difícil de se ajustar às evidências dadas pelo polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP)

que indicam a presença de pelo menos três genes codando UGPase em cevada (Kleinhofs, citado por Eimert et al., 1996).

A presença de bandas na análise de *Southern blot* com DNA genômico de *E. grandis* indica que um gene que codifica a UGPase, semelhante ao que codifica a enzima em batata, está presente em seu genoma. Esta evidência é reforçada pelo fato de se ter obtido produto amplificado na reação de PCR descrita anteriormente.

Figura 12- Análise de *Southern blot* do DNA genômico de *Solanum tuberosum* (**St**) e de *Eucalyptus grandis* (**Eg**) parcialmente digeridos com as enzimas de restrição *Hind*III e *Pst*I. O produto da reação de RT-PCR da UGPase de batata foi utilizado como sonda

5 CONCLUSÕES

A amplificação do produto de RT-PCR de *S. tuberosum* com o par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) gerou um fragmento de aproximadamente 1.400 pares de bases correspondente à ORF que codifica a UGPase.

A ligação do produto de RT-PCR ao plasmídeo pENTE/D-TOPO e posterior transformação de células TOP10 permitiu a obtenção de clones contendo o cDNA para a UGPase.

A sequência de aminoácidos deduzida do cDNA clonado é altamente homóloga à UGPase de diferentes cultivares de batata e de outras espécies vegetais.

ANEXOS

ANEXO A. Código IUPAC de uma e de três letras para os aminoácidos

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

ANEXO B. Nomenclatura IUB de bases em sequência de ácidos nucleicos

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

ANEXO C. Tampão de Extração de RNA

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>
Tiocianato de guanidina	4 M
Tris-HCl	0,1 M
Citrato de sódio stock 0,5M	25 mM
N-lauryl sarcosine stock 10%	0,5%
PVP	1%
2-mercaptoetanol	200 µl
H ₂ O DEPC 0,1%	q.s.p. 10 ml

ANEXO D. Tampão TAE 1 X

<i>Componente</i>	<i>Quantidade</i>
Tris base	4,84 g
Ácido acético glacial	1,14 ml
EDTA 0,5 M pH 8.0	2 ml
Ajustar pH 8.0	
Água destilada	q.s.p. 1 L

ANEXO E. 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 MilliQ tratada com DEPC	q.s.p. 4 ml
Autoclavar	

ANEXO F. 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 MilliQ tratada com DEPC	q.s.p. 4 ml
Autoclavar	

ANEXO G. Tampão TBE 0,5 X (Sambroock et al, 1989)

<i>Componente</i>	<i>Quantidade</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 H. Tampão da amostra (Dye IV - Sambroock et al, 1989)

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

ANEXO I. Master Mix para PCR

<i>Componente</i>		<i>Concentração final</i>
Água MilliQ estéril		q.s.p. 50 µl
Tampão de reação 10 X		5,0 µl
MgCl ₂		1,5 – 2,5 mM
dNTPs	A	200 µM
	C	200 µM
	G	200 µM
	T	200 µM
PrimerSense		50 pmoles
PrimerAntisense		50 pmoles
DNA		q.s.p. 100 ng
Taq polimerase (5U/µl)		1 U

ANEXO J. Meio 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
Glicose	20 mM
Água MilliQ	q.s.p. 1 L

ANEXO K. Meio LB

<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 MilliQ	q.s.p. 1 L

ANEXO L. Tampão P1 (conforme protocolo do Plasmid Mini Kit da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	10 mM
Água MilliQ	q.s.p. 1 L
Ajustar pH 8.0 com HCl	
RNase (depois de autoclavar)	100 µg/ml

ANEXO M. Tampão P2 (conforme protocolo do Plasmid Mini Kit da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
NaOH	200 mM
SDS	1%
Água MilliQ estéril	q.s.p. 1 L

ANEXO N. Tampão P3 (conforme protocolo do Plasmid Mini Kit da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Acetato de potássio	3,0 M
Ajustar pH 5.5 com ácido acético glacial	
Água MilliQ estéril	q.s.p. 1 L
Esterilizar por filtração (milipore 0,2 µm)	

ANEXO O. Solução QBT (conforme protocolo do Plasmid Mini Kit da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Ajustar pH 7.0	
Isopropanol puro	15%
Triton® X-100	0,15%
Água MilliQ	q.s.p. 1 L
Esterilizar por filtração (milipore 0,2 µm)	

ANEXO P. Solução QC (conforme protocolo do Plasmid Mini Kit da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
NaCl	1,0 M
MOPS	50 mM
Ajustar pH 7.0	
Isopropanol puro	15%
Água MilliQ	q.s.p. 1 L
Esterilizar por filtração (milipore 0,2 µm)	

ANEXO Q. Solução QF (conforme protocolo do Plasmid Mini Kit da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
NaCl	1,25 M
Tris-HCl	50 mM
Ajustar pH 8.5 com HCl	
Isopropanol puro	15%
Água MilliQ	q.s.p. 1 L
Esterilizar por filtração (milipore 0,2 µm)	

ANEXO R. Tampão de Extração de DNA (conforme 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 MilliQ estéril	q.s.p.

ANEXO S. Tampão TE

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM
Água MilliQ	q.s.p.

ANEXO T. Solução 20 X SSC (conforme protocolo Hybond da Amersham Pharmacia)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
NaCl	3 M
Na ₃ Citrate dihidratado	0,3 M
Ajustar pH 7.0	
Água MilliQ	q.s.p. 1 L

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

ANEXO U. Solução de pré-hibridização para *Southern blot* (conforme protocolo Hybond da Amersham Pharmacia)

<i>Componente</i>	<i>Quantidade</i>
Dextran sulfato de sódio	1% (p/v)
Agente bloqueador de marcação (kit)	1 ml
SDS	0,1% (p/v)
Solução 5 X SSC	q.s.p. 20 ml

ANEXO V. Buffer A (conforme protocolo Hybond da Amersham Pharmacia)

<i>Componente</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris base	100 mM
NaCl	300 mM
Ajustar pH 9.0	
Água MilliQ	q.s.p. 400 ml

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- AMINO, S.; TAKEUCHI, Y.; KOMAMINE, A. Changes in enzyme activities involved in formation and interconversion of UDP-sugars during the cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. **Physiologia Plantarum**, v.64, n.1, p.111-117, 1985.
- BAR-PELED, M.; GRIFFITH, C.L.; DOERING, T.L. Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: The pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.21, p.12003-12008, Oct. 2001.
- BATEMAN, A.; BIRNEY, E.; CERRUTI, L.; DURBIN, R.; ETWILLER, L.; EDDY, S.R.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOWE, K.L.; MARSHALL, M.; SONNHAMMER, E.L.L. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.1, p.276-280, Jan. 2002.
- BOROVKOV, A.Y.; MCCLEAN, P.E.; SECOR, G.A. Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphorylase. **Gene**, v.186, n.2, p.293-297, Feb. 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**, v.147, n.6, p.644-652, Mar. 1996.
- 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**, v.212, n.4, p.598-605, Mar. 2001b
- 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*. **The Biochemical Journal**, v.354, p.67-72, Feb. 2001a.
- DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Changes in enzymatic activities of nucleoside diphosphate sugar interconversions during differentiation of cambium to xylem in sycamore and poplar. **The Biochemical Journal**, v.162, p.267-279, 1977b.
- DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Possible control sites of polysaccharide synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.) **Planta**, v.134, p.39-44, 1977a.
- DARAN, J.M.; DALLIES, N.; THINES-SEMPOUX, D.; PAQUET, V.; FRANÇOIS, J. Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v.233, n.2, p.520-530, Oct. 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**, 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**, v.4, p.22-28, 2002.

- DIMOND, R.L.; FARNSWORTH, P.A.; LOOMIS, W.F. Isolation and characterization of mutations affecting UDPG pyrophosphorylase activity in *Dictyostelium discoideum*. **Developmental Biology**, v.50, p.169-181, 1976.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.
- 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**, v.170, n.2, p.227-232, May 1996.
- 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. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.38, p.23784-23791, Sep. 1997.
- FOSTER, G.D.; TWELL, D. (Eds.) **Plant gene isolation: principles and practice**. New York: Chichester/ John Wiley, 1996, cap.4
- 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**, v.47, p.29-51, 2001.
- HERTZBERG, M.; ASPEBORG, H.; SCHRADER, J.; ANDERSSON, A.; ERLANDSSON, R.; BLOMQVIST, K.; BHALERAO, R.; UHLEN, M.; TEERI, T.T.; LUNDEBERG, J.; SUNDBERG, B.; NILSSON, P.; SANDBERG, G. A transcriptional roadmap to wood formation. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.25, p.14732-14737, Dec. 2001.
- HOSSAIN, S.A.; TANIZAWA, K.; KAZUTA, Y.; FUKUI, T. Overproduction and characterization of recombinant UDP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli* K-12. **The Journal of Biochemistry**. 115, p.965-972, 1994.

- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of 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.1.
- KANEHISA, M.; GOTO, S.; KAWASHIMA, S.; NAKAYA, A. The KEGG databases at GenomeNet. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.1, p.42-46, Jan. 2002.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v.7, n.5, p.193-195, May 2002.
- KATSUBE, T.; KAZUTA, Y.; MORI, H., NAKANO, K., TANIZAWA, K.; FUKUI, T. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing. **The Journal of Biochemistry**, 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**, v.30, n.35, p.8546-8551, Sep. 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**, v.30, p.8541-8545, 1991.
- KLECZKOWSKI, L.A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1507-1515, Dec. 1994.
- KONISHI, Y.; TANIZAWA, K.; MUROYA, S.; FUKUI, T. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and affinity labeling of bovine liver UDP-glucose pyrophosphorylase. **Journal of Biochemistry**, v.114, p.61-68, 1993.
- LEE, C.C.; CASKEY, C.T. cDNA cloning using degenerate primers. 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.6.

- LOEWUS, F.A.; KELLY, S.; NEUFELD, E.F. Metabolism of *myo*-inositol in plants: conversion to pectin, hemicellulose, D-xylose, and sugar acids. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.48, p.421-425, 1962.
- LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. *Myo*-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v.150, p.1-19, 2000.
- 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**, v.106, p.691-695, 1989b.
- NAKANO, K.; OMURA, Y.; TAGAYA, M.; FUKUI, T. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: purification and characterization. **The Journal of Biochemistry**, v.106, n.3, p.528-532, 1989a.
- PENG, H.L.; CHANG, H.Y. Cloning of human liver UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA by complementation of the bacterial *galU* mutation. **FEBS Letters**, v.329, p.153-158, 1993.
- 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**, v.23, p.193-207, 1993.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, v.127, p.1513-1523, Dec. 2001.
- 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**, v.27, n.12, p.1151-1159, 2000.
- REITER, W.D.; VANZIN, G.F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, v.47, n.1-2, p.95-113, 2001.

- ROBERTS, R.M.; LOEWUS, F. The conversion of D-glucose-6-[¹⁴C] to cell wall polysaccharide material in *Zea mays* in the presence of high endogenous levels of *myo*-inositol. **Plant Physiology**, v.52, p.646-650, 1973.
- ROBERTSON, D.; BEECH, I.; BOLWELL, G.P. Regulation of the enzymes of UDP-sugar metabolism during differentiation of french bean. **Phytochemistry**, v.39, n.1, p.21-28, 1995.
- SALZMAN, R.A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.17, p.11-17, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (Eds.) **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SCHARF, S.J.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. **Science**, v.233, p.1076-1078, Sep. 1986.
- 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.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, 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**, v.101, 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**, v.113, n.2, p.511-517, Feb. 1997.

- 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 biosynthesis gene in potato tubers. **Journal of Plant Physiology**, 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**, v.46, p.261-288, 1995.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.
- 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**, v.217, n.1, p.26-30, May 1989.
- WITT, H.J. UDP-glucose metabolism during differentiation and dedifferentiation of *Riella helicophylla*. **Journal of Plant Physiology**, v.140, p.276-281, 1992.
- ZRENNER, R.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. **Planta**, v.190, n.2, p.247-252, 1993.