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

Efeito da superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis*, na composição de carboidratos de parede celular secundária de plantas transgênicas de tabaco

Gabriela Conti

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2007

Gabriela Conti
Bacharel em Genética

**Efeito da superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis*, na composição de carboidratos de
parede celular secundária de plantas transgênicas de tabaco**

Orientador:

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas

Piracicaba

2007

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

Conti, Gabriela

Efeito da superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis*, na composição de carboidratos de parede celular secundária de plantas transgênicas de tabaco / Gabriela Conti. - - Piracicaba, 2007.

105 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Biossíntese 2. DNA 3. Enzimas 4. Expressão gênica 5. Fumo 6. Parede celular vegetal
7. Plantas transgênicas I. Título

CDD633.71

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

Dedico este trabajo

A mis padres y hermanos, por el incondicional apoyo y estímulo en todas mis iniciativas, por el incesante cariño y fuerzas, que tornaron las distancias imperceptibles...

A mis queridos abuelos, cuyos ideales y enseñanzas han encaminado mis objetivos de vida y han inspirado todas las metas a alcanzar...

AGRADECIMENTOS

Expresso meu imenso agradecimento ao Prof. Dr. Carlos A. Labate por ter me recebido de braços abertos no Laboratório Max Feffer, pela orientação, confiança e apoio ao longo destes anos e pela enorme contribuição à minha formação acadêmica.

À Dra. Daniela Defávani do Nascimento, pela sua fundamental cooperação e apoio para a execução deste trabalho, assim como do carinho e amizade.

A Dra. Mônica T.V. Labate, Dra Ana Letícia Bertolo e MSc Gunta Gutmanis, integrantes de equipe de Biologia Molecular, por toda a ajuda, apoio e sugestões para a execução deste trabalho.

Ao MSc Juliano Bragatto, pela contribuição com a realização das análises químicas em HPLC e pela amizade e companheirismo.

A todos os colegas e amigos do Laboratório Max Feffer, Mayra, Danielle, David, aos meus conterrâneos Esteban e Guillermo, a Simone, Alexander, Kareem, Paola, Matheus, Thiago, Lívia, Edi, Liso e os recentemente chegados Felipe e Ivan. Em especial, agradeço à Gisele e Lília, pelos conselhos e enorme afeto e finalmente, à Fernanda, Eduardo e Felipe, a quem os considero mais três irmãos, pelo companheirismo, amizade e paciência ao longo de toda esta jornada.

Aos inúmeros amigos, que fizeram desta difícil experiência, uma das etapas mais felizes da minha vida. À Camila, Alcione, Berenice, Flávia, Taciana e Mariângela, amigas da república. Aos amigos da ESALQ, Luana, Evandro e Rafael.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Prof. Dr. Murilo de Melo, Profa. Dra. Beatriz Apezatto-da-Glória, Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira e Prof. Dr. Ricardo Kluge. Especialmente à Secretária do Programa, Maria Solizete Granziol Silva, por toda a ajuda brindada.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao apoio financeiro da Companhia Suzano Papel e Celulose.

A todos e cada um dos que de alguma maneira, contribuíram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Parede Celular	16
2.2 Composição química da parede celular.....	17
2.3 Arquitetura da parede celular primária.....	22
2.4 Arquitetura da parede celular secundária	24
2.5 Biossíntese da parede celular.....	24
2.6 Biossíntese de ácido UDP-D-glucurônico	28
2.7 Enzima Mio-inositol Oxigenase	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Clonagem do gene <i>miox2</i>	32
3.2 Sistema de expressão de enzimas recombinantes em <i>E. coli</i>	33
3.2.1 Regulação do promotor araBAD (PBAD).....	34
3.2.2 Descrição do vetor Gateway® pDEST™17.....	34
3.2.3 Reação de recombinação LR	35
3.3 Expressão da enzima MIOX2 em <i>E. coli</i>	37
3.4 Purificação da proteína MIOX2 recombinante.....	38
3.5 Western Blot	39
3.6 Testes de atividade enzimática	40
3.7 Superexpressão da enzima MIOX2 em <i>Nicotiana tabacum</i>	41
3.7.1 Clonagem do gene <i>miox2</i> no vetor pK2WG7.....	41
3.7.1.1 Extração de DNA plasmidial.....	42
3.7.1.2 Reação de Recombinação LR.....	43
3.7.2 Transformação química de <i>E. coli</i> com o vetor pK2WG7/ <i>miox2</i>	43
3.7.3 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com o vetor pK2WG7/ <i>miox2</i>	44
3.7.3.1 Extração DNA plasmidial.....	44
3.7.3.2 Transformação da linhagem EHA 105 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45

3.7.4	Transformação genética de <i>Nicotiana tabacum</i>	46
3.7.4.1	Material vegetal.....	46
3.7.4.2	Preparo do inóculo da linhagem EHA 105 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
3.7.4.3	Transformação de discos foliares de tabaco.....	47
3.8	Regeneração e seleção <i>in vitro</i> de plantas de tabaco transgênicas	47
3.9	Análise das plantas de tabaco transformadas da geração T ₀ por PCR.....	48
3.9.1	Extração de DNA genômico.....	48
3.9.2	Análise por PCR.....	49
3.10	Análise genética das plantas transgênicas da geração T ₁	49
3.11	Análises moleculares das plantas transgênicas de tabaco da geração T ₂	50
3.11.1	<i>Southern blot</i>	50
3.11.2	<i>Northern blot</i>	52
3.11.2.1	Extração de RNA total.....	53
3.11.2.2	Sonda para detecção do transgene <i>miox2</i>	54
3.11.2.3	Sonda para detecção do gene <i>miox2</i> endógeno.....	54
3.11.2.4	Sonda para detecção do RNA ribossômico 18S.....	55
3.11.2.5	Marcação das sondas e Detecção do Sinal.....	55
3.11.3	RT-PCR quantitativa	56
3.12	Análise química dos componentes da parede celular	58
3.13	Delineamento experimental e análises estatísticas	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Expressão do cDNA do gene <i>miox2</i> de em <i>E. coli</i>	63
4.2	Testes de atividade enzimática da MIOX2 <i>in vitro</i>	64
4.3	Clonagem do gene <i>miox2</i> no vetor binário Gateway pK2WG7	66
4.4	Transformação da linhagem de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
4.5	Transformação genética de discos foliares de tabaco via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
4.6	Análise das plantas transformadas por PCR.....	70
4.7	Análise genética das plantas transgênicas	70
4.8	<i>Southern blot</i>	73
4.9	<i>Northern blot</i>	75

4.10	RT-PCR Quantitativa	76
4.11	Análise da composição química dos monossacarídeos, ácidos urônicos e lignina na parede celular secundária	78
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICES.....	96
	ANEXOS.....	98

RESUMO

Efeito da superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis*, na composição de carboidratos de parede celular secundária de plantas transgênicas de tabaco

As paredes celulares vegetais são estruturas essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Além das suas diversas funções biológicas, os componentes polissacarídicos constituintes das paredes celulares (celulose, hemiceluloses e pectinas) são de vital importância como fonte natural de fibras para a nutrição humana e animal e são considerados os principais recursos renováveis do planeta, utilizados como matéria-prima para diversos processos industriais, por exemplo nos processos de produção de polpa celulósica. Todos esses fatores têm despertado grande interesse no estudo da composição e biossíntese das paredes celulares. A biossíntese dos seus polímeros se inicia no citoplasma das células, onde ocorre a formação dos precursores por uma rota metabólica complexa de biossíntese de açúcares-nucleotídeo. O entendimento da regulação dessa rota metabólica é fundamental para modular a dinâmica de biossíntese desses açúcares e assim tentar manipular as propriedades bioquímicas das paredes celulares. Nesse contexto, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* em plantas de *Nicotiana tabacum*. O produto desse gene é a enzima mio-inositol oxigenase (E.C. 1.13.99.1), cuja função é converter o mio-inositol em ácido D-glucurônico, composto central da rota de biossíntese de açúcares-nucleotídeo. Foram determinadas quatro isoformas tecido-específicas para o gene *miox* (*miox1*, *miox2*, *miox4* e *miox5*) em *Arabidopsis*, sendo que a isoforma *miox2* é a predominante em caules. Esse gene foi clonado em trabalhos anteriores realizados no laboratório e no presente trabalho, o cDNA do gene *miox2* foi superexpresso em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) a fim de se avaliar o efeito da superexpressão na composição de carboidratos de parede celular secundária. As linhagens de plantas transgênicas obtidas, não mostraram diferenças visualmente perceptíveis em comparação aos controles, indicando ausência de alterações fisiológicas e morfológicas. Foram quantificados os monossacarídeos de paredes celulares secundárias (arabinose, ramnose, galactose, glicose, xilose, manose), os ácidos urônicos (ácido galacturônico e glucurônico) e as ligninas (solúvel e insolúvel), a partir de tecido xilemático e parênquima medular do caule. A ausência de modificações significativas nas proporções desses metabólitos, indica que as plantas exercem um estrito controle na regulação da biossíntese de paredes celulares secundárias de forma que a superexpressão do gene *miox2* não provocou nenhuma alteração altamente significativa. Outros genes candidatos e os mecanismos envolvidos na sua regulação deverão ser testados quanto ao nível de transcrição, modificações pós-transcricionais e pós-traducionais a fim de entender a regulação do fluxo de carbono para a biossíntese de paredes celulares.

Palavras-chave: Parede celular vegetal; Mio-inositol oxigenase; UDP-açúcares; Superexpressão; Tabaco

ABSTRACT

Effects of overexpression of the *miox2* gene from *Arabidopsis*, in secondary cell-wall carbohydrate composition in transgenic tobacco plants

Cell-walls are essential structures for plant development and growth. Apart from its biological functions, the polyssacharides that make cell-walls (cellulose, hemicellulose and pectins) are the principal natural fibrous materials used for human and animal nutrition. They are also considered the most important renewable resource on earth and their use as industrial raw material is inevitable. An example is the use of wood in the production of pulp and paper. For all these reasons, the study of molecular composition and biosynthesis of plant cell-walls has been a matter of great interest for researchers over the past few years. Cell-wall polyssacharides biosynthesis begins at the cytoplasm, where a pool of UDP-glucose and other activated sugar nucleotide precursors are generated by multiple and complex interconversion reactions. Understanding how cells control the metabolic pathways responsible for sugar nucleotide precursors synthesis, would be a primary requirement for manipulating them in an attempt to generate plants with improved properties for human use. In that context, the aim of this research work was to analyze the effects of *Arabidopsis thaliana miox2* gene overexpression in a plant model system (*Nicotiana tabacum*). The product of *miox2* gene is myo-inositol oxygenase enzyme 2 (E.C.1.13.99.1) which converts D-glucuronic acid, an important sugar nucleotide precursor, from its substrate myo-inositol. Four isoforms of *miox* gene, with apparent tissue specific expression (*miox1*, *miox2*, *miox4* and *miox5*) were already determined, but *miox2* is the one primarily expressed in stems. Its cDNA was cloned from *Arabidopsis thaliana* in previous works and overexpressed in tobacco plants. Five normal transgenic lines were obtained, showing no phenotypically differences relative to the control line. This fact implied that *miox2* overexpression did not alter any physiological nor morphological aspect of plant development. The cell-wall monossacharides (arabinose, rhamnose, galactose, glucose, xylose and mannose), uronic acids (galacturonic and glucuronic acid) and lignins (soluble and insoluble) from stem xylem and parenchymal tissue were quantified. The absence of major changes in any of the compounds measured for the transgenic lines indicated that they were able to adjust their level of carbohydrate composition. Plants seem to regulate the proportions of sugar nucleotide precursors through highly complex metabolic pathways that establish strong compensatory mechanisms. It will be necessary to study other candidate genes and some aspects of their regulation at transcriptional, postranscriptional and postranslational level, as an attempt to understand the cell-wall carbohydrate flux.

Keywords: Plant cell-wall; Myo-inositol oxygenase; UDP-sugars; Overexpression; Tobacco

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A₂₁₅, A₂₆₀ ou A₂₈₀: absorvância a 215, 260 ou 280 nm de comprimento de onda

atm = atmosfera

ATP = adenosina trifosfato

BLAST = *Basic Local Alingment Search Tool*

°C = grau centigrade

cDNA = DNA complementar ao RNA

CTAB = detergente brometo de cetiltrimetilamônio

DEPC = dietilpirocarbonato

DNA = ácido desoxirribonucléico

dNTPs = desoxirribonucleotídeos trifosfato

E.C. = código enzimático

EDTA = ácido etil-diamino-tetracético

g = grama

x g = força centrífuga relativa à aceleração de gravidade

GDP = guanosina difosfato

HCl = ácido clorídrico

H₂O = molécula de água

IUB = International Union of Biochemistry

IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry

kb = quilobase

kDa = quilo Dálton

K_m = constante de Michaelis-Menten

L = litro

LiCl = cloreto de lítio

M = molar

mM = milimolar

MilliQ = água destilada deionizada e filtrada a 0,2 µM

mL = mililitro

mg = miligrama

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

mRNA = RNA mensageiro

NaCl = cloreto de sódio

NCBI = *National Centre for Biotechnology Information*

ng = nanograma

nm = nanômetro

miox = nome do gene

MIOX = nome da proteína

NAD⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo

Na(OH) = hidróxido de sódio

NH₄OH = hidróxido de amônio

O₂ = molécula de oxigênio

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

pb = pares de bases

PCR = reação em cadeia da polimerase

primer = oligonucleotídeo iniciador

p/v = peso por volume

PVP = polivinil pirrolidona

PVDF = poli-viniliden-difluoreto

q.s.p. = quantidade suficiente para

RNA = ácido ribonucléico

rpm = rotações por minuto

RT-PCR = síntese de cDNA por uma transcriptase reversa seguida de PCR.

QTLs = *Quantitative Trait Loci*

SDS = dodecil sulfato sódico

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

Taq = abreviação para *Thermus aquaticus*

Tris = tri-hidroximetil-aminometano

Tween = polixietilen-sorbitan-monolaureto

TBS-T = tampão tris salino-tween

U = unidade de enzima

UDP = uridina difosfato

v/v = volume por volume

μg = micrograma

μL = microlitro

μM = micromolar

α (1-2) = união glicosídica tipo alfa, entre os carbonos um e dois dos respectivos monómeros

β (1-4) = união glicosídica de tipo beta, entre os carbonos um e quatro dos respectivos monômeros

λ = DNA do vírus bacteriófago lambda.

1 INTRODUÇÃO

As paredes celulares vegetais representam a reserva mais abundante de carbono orgânico na natureza e participam no processo de fluxo de carbono através dos diversos ecossistemas.

Os carboidratos estruturais constituintes das paredes celulares das plantas são a principal fonte de matéria-prima para a saúde, nutrição humana e animal. Por constituírem também uma fonte natural de fibras, as paredes celulares são utilizadas comercialmente na produção de manufaturas têxteis, carvão vegetal, biocombustíveis, diversos produtos madeireiros e principalmente na indústria de produção de celulose e papel, fator que motivou o presente trabalho.

A importância biológica, ecológica e econômica, assim como a participação das paredes celulares nos processos metabólicos e morfogenéticos do crescimento e desenvolvimento das plantas, são todos fatores que têm tornado o entendimento da composição química, arquitetura e biossíntese das paredes celulares, um aspecto de interesse crescente nas pesquisas científicas dos últimos anos. Para a indústria de celulose e papel, a manipulação da composição química das paredes celulares influenciaria nas características e propriedades químicas da pasta celulósica e conseqüentemente, na qualidade dos produtos papéis.

Os principais componentes das paredes celulares são de natureza polissacarídica. Assim, as paredes primárias e secundárias são ricas em celulose, hemiceluloses e pectinas (CARPITA; McCANN, 2000). As microfibrilas de celulose estão imersas em uma rede de polissacarídeos complexos que constituem a matriz de hemiceluloses e pectinas. A influência das hemiceluloses do tipo xilanas, junto aos ácidos urônicos constituintes, nas características da pasta celulósica e os produtos papéis, foi estudada pela empresa Suzano Papel e Celulose. Os resultados obtidos revelam que há um potencial muito grande para melhorar a qualidade da fibra de eucalipto através da manipulação dos componentes hemicelulósicos das paredes celulares.

A estrutura bioquímica e a natureza das interações entre estes e outros componentes das paredes celulares têm sido parcialmente esclarecidas, mas ainda existem enormes lacunas no entendimento das diferentes etapas dos processos de biossíntese. Nos últimos anos, as informações oferecidas pelo seqüenciamento de genomas completos (*Arabidopsis Genome Project* 2000) ou projetos de seqüenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), juntamente com as técnicas de genética reversa, engenharia genética e genômica funcional, têm permitido avanços consideráveis na identificação e caracterização dos genes e proteínas envolvidos na

biossíntese de paredes celulares (GIBEAUT, 2000; REITER; VANZIN, 2001; CARPITA et al., 2005; LEROUXEL et al., 2006). A disponibilidade de bases de dados de transcritos de mRNA específicos, mapas de QTLs, bibliotecas de mutantes, etc, e a possibilidade de confrontar informações referentes a transcritos com perfis protéicos e metabólicos, permitirão obter grandes avanços no entendimento global e das diversas etapas da regulação e biossíntese da parede celular.

A biossíntese dos componentes da matriz de hemiceluloses e pectinas se inicia com a formação de precursores monossacarídicos no citoplasma das células. Em seguida, estes precursores são direcionados ao Golgi, onde ocorre a polimerização e diversas modificações, para finalmente serem enviados à parede celular via secreção regulada em vesículas de fusão à membrana plasmática (REITER, 1994). Portanto, muitos dos açúcares precursores de componentes matriciais são formados no espaço subcelular citoplasmático, evidenciando um ponto de partida comum para uma rota de biossíntese complexa. Esses açúcares precursores são ativados pela ligação com grupos nucleotídeo-difosfato do tipo UDP e GDP, constituindo dessa forma os denominados açúcares-nucleotídeo.

O UDP-D-glicose é precursor da biossíntese de celulose, assim como dos demais açúcares-nucleotídeo componentes da matriz de polissacarídeos hemicelulósicos e pécnicos (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977a,b). A interconversão de UDP-D-glicose gera ácido UDP-D-glucurônico, que por sua vez, através de uma complexa rota de interconversão sintetiza os demais UDP-açúcares (UDP-L-arabinose, UDP-D-xilose, ácido UDP-D-galacturônico e UDP-D-apiose). O ácido UDP-D-glucurônico é considerado um intermediário central da biossíntese de precursores de muitos componentes da matriz de hemiceluloses e pectinas (SEITZ et al., 2000). Portanto, a sua biossíntese é considerada uma etapa limitante na formação dos precursores de componentes hemicelulósicos e pécnicos (AMINO et al., 1985). Por este motivo, o conhecimento de sua regulação é de importância fundamental para o controle da biossíntese de componentes da matriz polissacarídica da parede celular.

O ácido UDP-D-glucurônico pode ser sintetizado através de duas rotas metabólicas alternativas. A rota de biossíntese *de novo* utiliza como substrato a UDP-D-glicose e a enzima responsável pela interconversão é a UDP-glicose desidrogenase (UGDH) (TENHAKEN; TULKE, 1996). Uma via alternativa converte o substrato mio-inositol em ácido D-glucurônico pela ação da enzima mio-inositol oxigenase (MIOX) (LOEWUS et al., 1973) que é finalmente

conjugado à UDP pela ação sequencial de uma enzima quinase e outra uridiltransferase específica. A modulação do fluxo de metabólitos entre essas duas rotas alternativas seria de importância crucial para o entendimento das etapas biossintéticas subsequentes. Por isso, o objetivo do presente projeto de pesquisa é avaliar o efeito da superexpressão do gene *miox2*, que codifica a enzima Mio-inositol oxigenase 2, quanto à composição dos carboidratos das paredes celulares secundárias em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

O cDNA do gene *miox2* foi clonado em trabalhos anteriores realizados no laboratório, a partir de *Arabidopsis thaliana* (DEFÁVARI-NASCIMENTO, 2005). No presente trabalho de pesquisa, esse gene foi utilizado para a transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Foi selecionada a isoforma *miox2* devido à sua já demonstrada expressão em tecido caulinar e foliar de plantas (KANTER et al., 2005). As plantas de tabaco transgênicas, homozigotas para o transgene *miox2*, foram avaliadas quanto aos níveis de expressão desse. Os efeitos da superexpressão do transgene, na composição dos monossacarídeos, ácidos urônicos e lignina foram avaliados em tecido xilemático e parênquima medular de caules dessas linhagens.

A espécie *Nicotiana tabacum* foi selecionada como sistema modelo, já que apresenta diversas características adequadas para estudos de transformação genética. O tabaco é uma planta herbácea que apresenta crescimento secundário, por essa razão é considerado um sistema adequado para estudos referentes à formação de parede celular secundária. Além disso, a sua manipulação genética é relativamente simples por ser uma planta de fácil regeneração *in vitro*. Assim, a avaliação dos efeitos da superexpressão de genes envolvidos na formação de paredes celulares de tabaco é considerada um ensaio preliminar para tentarmos prever os efeitos da superexpressão desses genes na composição química da madeira de eucalipto. De acordo com esse critério, o objetivo da nossa linha de pesquisa e deste trabalho em particular, é manipular o fluxo de carbono nas plantas para a formação de componentes hemicelulósicos, de forma a melhorar a qualidade das fibras e conseqüentemente as propriedades químicas e físicas da pasta celulósica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parede Celular

A parede celular é uma estrutura rígida que delimita as células de muitos seres vivos, como as plantas verdes, as algas, os fungos e muitas bactérias. Nas plantas verdes ela constitui um compartimento extracelular comum denominado apoplasto, onde ocorre a comunicação intercelular. A parede celular é considerada responsável por funções específicas e essenciais. Possui na sua estrutura, uma enorme variedade de enzimas envolvidas na absorção, transporte e secreção de substâncias. Constitui sítios de atividade lisossômica e digestiva. Cumpre um importante papel na defesa contra agentes patogênicos bacterianos e fúngicos. Recebe e processa sinais provenientes do espaço extracelular transformando-os em informação captada no interior da célula. Por ser uma estrutura rígida, outra das importantes funções da parede celular é delimitar o tamanho do protoplasto e evitar a ruptura da membrana plasmática, devido ao influxo de água na célula. Dado que as migrações celulares não formam parte dos processos de crescimento e desenvolvimento do corpo vegetal, os planos de divisão celular e a deposição ordenada do material das paredes celulares, determina o formato das células e dos órgãos vegetais. A maior parte do carbono fixado na fotossíntese é incorporado nos polímeros constituintes das paredes celulares, razão pela qual são a principal reserva de biomassa do planeta (CARPITA; McCANN, 2000).

As paredes celulares variam amplamente em espessura, dependendo em parte do papel que cada componente celular cumpre na estrutura da planta e no estado de desenvolvimento de cada célula. De acordo com esses critérios, podem-se distinguir dois tipos de paredes celulares. As primeiras camadas de celulose formadas constituem a **parede celular primária** (Figura 1). A região de união entre as paredes primárias de células adjacentes se denomina lamela média (ou substância intercelular). Muitas células depositam material de parede adicional e constituem as **paredes celulares secundárias** (Figura 1). Esse material se deposita em camadas sucessivas, as quais se denominam: S_1 , S_2 e S_3 , uma mais externa, outra intermediária e interna respectivamente. A lamela média é composta principalmente de substâncias pécticas e com frequência é difícil de ser distinguida da parede primária, especialmente em células que desenvolvem escassa parede celular (RAVEN et al., 2001).

Figura 1 – Esquema representativo das paredes primária e secundária. Adaptado de David Webb (TAIZ; ZEIGER, 2004)

2.2 Composição química da parede celular

A parede celular vegetal varia nos diferentes componentes celulares e grupos taxonômicos, mas em termos gerais ela é composta por redes interligadas de carboidratos, proteínas estruturais, substâncias aromáticas (MCCANN; ROBERTS 1991; CARPITA; GIBEAUT, 1993) e diversas enzimas (CASSAB; VARNER 1988).

As macromoléculas de natureza polissacarídica podem ser classificadas nas categorias celulose, hemiceluloses e pectinas. Todas elas são polímeros de monossacarídeos derivados de glicose. Esses monossacarídeos são, na sua maioria aldoses: D-mannose (Man), D-galactose (Gal), D-xilose (Xil), D-apiose (Api), L-arabinose (Ara), L-ramnose (Rha) e L-fucose (Fuc); os ácidos urônicos derivados são ácido D-manurônico (ManA), ácido D-galacturônico (GalA) e ácido D-glucurônico (GlcA) (Figura 2). Os componentes de natureza não polissacarídica são as ligninas (compostos aromáticos) e as proteínas (CARPITA; McCANN, 2000).

Figura 2 – Monossacarídeos componentes das paredes celulares de plantas. Adaptado de Taiz e Zeiger (2000)

O principal carboidrato componente da parede celular é a **celulose**. A celulose é um polissacarídeo fibrilar que representa cerca de 15% a 30% do peso seco das paredes celulares primárias e uma porcentagem maior nas paredes secundárias. O polímero se forma pela união de moléculas de β -glicose através de ligações β (1-4) glicosídicas. A unidade básica do polímero é o dissacarídeo celobiose, cujas unidades de glicose, apresentam um ângulo de rotação de 180° . A estrutura em forma de microfibrila surge da justaposição de aproximadamente 36 cadeias de celulose adjacentes e da formação de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila que se projetam para ambos os lados de cada cadeia (DELMER; AMOR, 1995; SOMERVILLE, 2006) (Figura 3). Cada microfibrila pode conter entre 500 e 14.000 unidades de glicose (BRETT, 2000).

As **hemiceluloses** constituem-se de uma mistura de polissacarídeos heterogêneos. Estes polímeros estabelecem pontes de hidrogênio com as microfibrilas de celulose, associando-as entre si e estabilizando assim, as paredes celulares. Podem ser divididas em três classes principais: xiloglicanos (XyGs), glicomananos, glicoarabinosilanos (GAXs) e outros glicanos (MLG – *Mix-Linked Glycans*) (CARPITA; McCANN, 2000). Apesar de serem formadas por carboidratos diferentes, as hemiceluloses têm algumas características estruturais comuns, importantes na sua função biológica:

- i) As moléculas lineares são formadas pela união de monossacarídeos diversos, através de ligações β (1-4).

- ii) Dessas moléculas lineares podem surgir ramificações muito curtas de alguns resíduos de hexoses, pentoses e ácidos urônicos.
- iii) As hemiceluloses possuem alguma característica estrutural que lhes impede de formar agregados, como ocorre entre as cadeias de celulose.

Figura 3 – Arranjos cristalinos e paracristalinos das cadeias de celulose numa microfibrila (REID, 1997)

Os XyGs são dominantes nas paredes celulares primárias das eudicotiledôneas e algumas monocotiledôneas, com exceção das bromeliáceas, palmáceas, ciperáceas, zingiberáceas e gramíneas. Nesse caso os GAXs são os principais glicanos.

As moléculas de xiloglicanos (XyGs) são cadeias lineares de glicanos que constituem blocos de 6 a 11 resíduos de glicose. Elas apresentam, em sítios regulares, numerosas unidades D-xilosil ligadas à posição O-6 das unidades de glicose. Algumas das unidades xilosil são depois substituídas por L-arabinose ou D-galactose, dependendo da espécie e às vezes, a D-galactose é novamente substituída por L-fucose (Figura 4).

Os glicoarabinoxilanos (GAXs) são moléculas lineares cujo esqueleto é formado por numerosas D-xiloses unidas através de ligações $\beta(1-4)$. A maioria das unidades D-xilose do polímero têm, na posição O-3 ou O-2, uma D-arabinose unida e em algumas unidades de D-xilose se encontra na posição O-2, o ácido D-glucurônico.

Figura 4 – Estrutura de um xiloglicano (REITER 2002)

Nas paredes celulares secundárias de espécies arbóreas dicotiledôneas, os principais componentes hemicelulósicos das paredes celulares secundárias são os xilanos (Figura 5), cuja estrutura química é constituída de cadeias lineares de D-xilose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β (1-4). Na posição O-2 de alguns monômeros aparecem ramificações 4-O-metil- ácido D-glucurônico unidas através de ligações α (1-2).

Figura 5 – Estrutura de um xilano (McNEIL et al., 1984)

A **matriz péctica** ou fração péctica da parede celular é o local onde ocorre a deposição e extensão da rede de celulose e glicanos. Está envolvida no controle da porosidade da parede (WILLATS et al., 2001), regula a adesão célula-célula na lamela média, serve como molécula de reconhecimento e sinalização e permite a união de enzimas à parede celular, entre outras funções conhecidas (BOLWELL, 1993; CARPITA; McCANN, 2000).

A matriz de pectinas é constituída por um grupo de polissacarídeos ácidos, altamente hidratados, ricos em ácido galacturônico (GalA) (WILLATS et al., 2001). O ácido galacturônico se apresenta em duas formas estruturalmente diferentes nos três tipos principais de domínios polissacarídicos que constituem as pectinas: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos-I (RG-I) e ramnogalacturonanos-II (RG-II) (O'NEILL et al., 1989; GOUBET; MOHNEN, 1999).

Modelos estruturais sugerem que as pectinas formam géis como consequência do estabelecimento de redes entre os polissacarídeos e íons Ca^{+2} (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Os HGAs são homopolímeros de α (1-4)-D-GalA e contêm aproximadamente 200 unidades de GalA. Os RG-I são heteropolímeros circulares de unidades repetitivas de dissacarídeos α (1-2)-L-Rha- α (1-4)-D-GalA. Já os RG-II são um tipo de HGAs que possuem a maior diversidade de monossacarídeos e estruturas anexas, incluindo apiose, ácido acético, fucose, xilose, etc. (CARPITA; McCANN, 2000).

A **lignina** é um dos componentes mais característicos das paredes secundárias e a biossíntese da mesma está associada à sua formação ou em resposta a algum dano tissular ou infecção (FUKUDA, 1996). As ligninas são heteropolímeros aromáticos racêmicos complexos, que provêm de três monômeros de álcool hidroxicinâmico, *p*-cumarílico **MH**, *p*-coniferílico **MG** e *p*-sinapílico **MS**, que variam de acordo com o grau de metilação (FREUDENBERG; NEISH, 1968). Quando esses monômeros são incorporados ao polímero, produzem respectivamente unidades *p*-hidroxifenil **H**, guaiacil **G** e siringil **S** de fenilpropanoides.

A quantidade e proporção de ligninas variam de acordo com o táxon, o tipo celular e a camada individual de parede, além de ser altamente influenciada pelas condições ambientais e do desenvolvimento da planta (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). Embora existam algumas exceções, a lignina das angiospermas eudicotiledôneas consiste principalmente de unidades G e S e traços de unidades H. Nas gimnospermas, as ligninas são formadas principalmente de unidades G e baixos níveis de unidades H (BAUCHER et al., 1998).

A síntese de ligninas inicia-se imediatamente com a formação da parede celular secundária. Assim, ambas estruturas primária e secundária ficam impregnadas dessa substância rígida e hidrofóbica, que ligada covalentemente à matriz de polissacarídeos resulta numa estrutura altamente resistente (BARCELÓ-COLL et al., 1984).

A lignina, por estar intimamente associada à celulose e outros polissacarídeos da parede celular secundária, interfere no processo de produção de polpa e papel. Um outro fator importante é que diminui o valor nutricional de pastagens para alimentação de animais (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996).

As paredes celulares das plantas também possuem na sua estrutura básica, redes de proteínas cuja natureza é tão variável quanto as funções que elas realizam. Muitas dessas proteínas são consideradas estruturais (CASSAB, 1998), embora outras cumpram funções

enzimáticas, participando da morfogênese e movimentos das paredes celulares (DARLEY et al., 2001).

As possíveis funções das proteínas da parede celular são sugeridas com base na presença de seqüências repetitivas, localização na planta e padrão morfogênico geral da planta (CASSAB, 1998). Existem quatro classes principais de proteínas estruturais nas paredes celulares, três das quais são nomeadas pelas suas seqüências repetitivas características como: glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) ou extensinas, proteínas ricas em arabinogalactanos (AGPs), proteínas ricas em glicina (GRPs), e ricas em prolina (PRPs). Existe outra classe adicional de proteínas quiméricas, com domínios do tipo extensina.

2.3 Arquitetura da parede celular primária

As paredes celulares primárias estão formadas por duas ou três redes interligadas. A rede fundamental de celulose e glicanos, embebida numa segunda rede de polissacarídeos da matriz péctica e uma terceira rede independente, que consiste de proteínas estruturais ou de componentes fenilpropanóicos.

As paredes celulares das angiospermas têm sido classificadas em dois tipos, de acordo com os arranjos na sua arquitetura (CARPITA; GIBEAUT, 1993). As paredes de tipo I são características da maior parte das espécies monocotiledôneas e eudicotiledôneas, e as paredes de tipo II se encontram exclusivamente em gramíneas (Poales) e grupos próximos.

As paredes celulares de tipo I estão formadas por uma rede de microfibrilas de celulose entrecruzadas com xiloglicanos. Esses últimos podem se ligar fortemente à superfície das microfibrilas de celulose e são de comprimento suficiente para unir duas microfibrilas entre si (MCCANN; ROBERTS, 1991). A ligação XyGs-celulose e XyGs-XyGs, estabelece a separação das microfibrilas e o arranjo espacial final da rede polissacarídica. Essa rede XyG-celulose está embebida numa matriz de polissacarídeos pécticos, que formando pontes cruzadas com Ca^{+} constituem géis (JARVIS, 1984) (Figura 6).

As paredes celulares de tipo II são baseadas na ligação de microfibrilas de celulose e em lugar dos XyGs, os principais polímeros que unem as microfibrilas são os glicoarabinosilanos (GAXs). Células em divisão e alongamento apresentam GAXs altamente ramificados, enquanto células em curso de alongamento e diferenciação apresentam maiores proporções de GAXs não

ramificados (CARPITA; GIBEAUT, 1993). As gramíneas são pobres em pectinas e isso se deve provavelmente à alta ramificação dos GAXs, que oferecem uma matriz adequada para o estabelecimento da rede polissacarídica completa (Figura 6).

Figura 6 – Modelos esquemáticos de paredes celulares de tipo I e II (McCANN; ROBERTS, 1991)

As paredes celulares crescem tanto em espessura quanto em superfície. A extensão da parede é um processo complexo e se encontra sob controle bioquímico do protoplasto. Depende do relaxamento da estrutura da parede (processo influenciado por auxinas e proteínas do tipo expansinas ou endotransglicosilases), do incremento da atividade metabólica em geral, como a síntese protéica, do influxo de água na célula e do aumento da taxa respiratória (RAVEN, 2001). O processo físico de expansão celular deve ocorrer sem perda da integridade mecânica das células provocada pela pressão de turgescência (COSGROVE, 2000).

O crescimento das paredes celulares é um fator determinante da morfogênese das plantas e com base nos mecanismos de deposição dos seus polímeros constituintes, têm sido propostos modelos de sua arquitetura (COSGROVE, 2000; COSGROVE, 2005). Existem células que depositam as suas microfibrilas em arranjos desordenados, formando redes irregulares. Estas células constituem geralmente tecidos de armazenamento, meristemáticos, cali obtidos em cultura de tecidos, etc. As células com funções especializadas na condução, cujo eixo longitudinal é maior que o transversal, depositam as suas microfibrilas internas em sentido perpendicular ao eixo principal do caule (RAVEN, 2001).

2.4 Arquitetura da parede celular secundária

A parede primária é depositada antes e durante o crescimento e expansão da célula vegetal. Uma vez finalizados esses processos, a parede perde extensibilidade. Alguns tipos celulares, por exemplo, as células do xilema (principalmente xilema secundário ou lenho) e as células esclerenquimáticas, uma vez que alcançaram o tamanho adequado, completam as fases de desenvolvimento e diferenciação com a deposição de parede secundária. Tais paredes multilaminares aumentam enormemente a força mecânica e rigidez das células.

A parede secundária é produzida no protoplasto e depositada no interior da parede primária. A sua síntese permite manter fixo o formato final que a célula adquirirá, já que após a sua deposição, a parede perde completamente a extensibilidade apresentando uma estrutura rígida. A deposição começa após a finalização do crescimento celular. As diferentes camadas de parede secundária: S_1 , S_2 e S_3 se distinguem da parede primária pela sua estrutura e composição (Figura 1). A orientação das microfibrilas de celulose pode ter um melhor alinhamento paralelo ao eixo principal da célula e cada camada, S_1 , S_2 e S_3 , possui um alinhamento diferente. Há uma tendência das microfibrilas ficarem paralelas ao eixo principal na medida que as camadas são mais internas. Por outro lado, as paredes destas células geralmente se encontram altamente impregnadas de lignina, que confere maior resistência mecânica, reduz a susceptibilidade a patógenos e dificulta a digestibilidade de material vegetal por animais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As paredes celulares de plantas lenhosas representam a maior proporção de biomassa vegetal e constituem uma imensa reserva de carbono. Além de serem de grande importância prática na nutrição animal e humana são uma importante fonte natural de fibras. Por estes motivos, o estudo da estrutura e rotas de biossíntese da parede celular é de considerável interesse, tanto do ponto de vista básico quanto aplicado (REITER, 2002).

2.5 Biossíntese da parede celular

A biossíntese da parede celular em plantas envolve diferentes etapas, tanto ao nível celular quanto ao nível bioquímico e molecular, assim como diversas rotas metabólicas, enzimas, genes estruturais e regulatórios.

Ao nível celular, as paredes se originam a partir das placas celulares durante a telófase do ciclo mitótico. O desenvolvimento da placa celular está associado ao fragmoplasto, estrutura constituída por microtúbulos e pequenas vesículas provenientes do Golgi. A placa celular se forma pela fusão dessas vesículas no centro do plano equatorial do fuso e cresce radialmente até a fusão com a parede da célula-mãe. O Complexo de Golgi é o compartimento intracelular onde se sintetizam e processam grande parte dos componentes da parede celular: polissacarídeos não-celulósicos, proteínas estruturais e um amplo espectro de enzimas. Eles são secretados coordenadamente em vesículas que se fusionam à parede celular em formação (CARPITA; McCANN, 2000). A síntese de polissacarídeos celulósicos ocorre na parte externa da membrana plasmática, pela deposição de microfibrilas de celulose dirigida por complexos enzimáticos multiméricos com forma de “roseta” (MUELLER; BROWN 1980). Estruturas análogas a rosetas têm sido observadas em todos os organismos que sintetizam celulose, e foram usualmente referidos como “complexos terminais” – TCs (BROWN, 1985). Todos eles correspondem ao complexo enzimático celulose sintase. Já foram identificados dez genes *cesA* diferentes em *Arabidopsis thaliana* e *Zea mays* (HOLLAND et al., 2000; RICHMOND; SOMERVILLE, 2000) que codificam para a celulose sintase (Figura 7).

Na biogênese da parede celular, existem muitas enzimas que realizam diversas funções, desde a sua montagem, expansão e degradação até a defesa contra possíveis agentes patogênicos. Nos últimos anos foram identificadas inúmeras enzimas e proteínas estruturais e os seus respectivos genes (RICHMOND; SOMERVILLE, 2001). Os genes relacionados à síntese de parede celular compreendem várias famílias de acordo com a etapa da biossíntese em que eles agem.

Os açúcares utilizados como precursores para a formação de polissacarídeos de parede celular podem ser obtidos pela reutilização de açúcares provenientes de reações de degradação em outras rotas metabólicas da célula. Nesta rota de recuperação é de fundamental importância a ação sequencial de (C-1) quinases e nucleotídeo-difosfato pirofosforilases.

Os açúcares nucleotídeo do tipo UDP-açúcares são considerados precursores de praticamente todos os polímeros constituintes das paredes celulares. A UDP-D-glicose é o principal substrato para a síntese de celulose (Figura 7) (DELMER; AMOR, 1995; AMOR et al., 1995; DELMER 1999). As reservas de UDP-D-glicose para a biossíntese de componentes de parede celular provém de rotas alternativas (Figura 7): 1) através da ação da enzima sacarose

sintase (SuSy), que converte UDP e sacarose em frutose e UDP-D-glicose; ou 2) pela ativação de D-glucose-1-P (por ação da enzima UDP-glicose pirofosforilase, UGP) (JOSHI et al., 2004).

A UDP-D-galactose é gerada independentemente, a partir de UDP-D-glicose, pela ação da epimerase (UGE) (MAITRA; ANKEL, 1971) e é imediatamente transferida para o interior do sistema de endomembranas onde será utilizada para a biossíntese de RG-I, RG-II e xiloglicanos.

Os demais açúcares-nucleotídeos componentes da parede celular são sintetizados a partir de um precursor comum, o ácido UDP-D-glucurônico (cuja formação está abordada no item 2.6), através de uma complexa série de epimerizações, descarboxilações e rearranjos diversos (Figura 7) (REITER; VANZIN, 2001; SEIFERT, 2004).

O ácido UDP-D-glucurônico pode ser convertido em ácido UDP-D-galacturônico (FEINGOLD; AVIGAD, 1980), precursor importante de polissacarídeos da matriz pectica. Para isso, a enzima UDP-glucuronato epimerase (GAE) é responsável pela reação de interconversão do ácido UDP-D-galacturônico (REITER; VANZIN, 2001).

O ácido UDP-glucurônico pode também ser descarboxilado pela enzima UDP-D-xilose sintase (UXS) para formar UDP-D-xilose (FEINGOLD; AVIGAD, 1980; BAR-PELED et al., 2001). Foi determinada também uma enzima UDP-apiose/UDP-xilose sintase bifuncional, que sintetiza quantidades equimolares de UDP-D-apiose e UDP-D-xilose, a partir do ácido UDP-D-glucurônico (MATERN; GRISEBACH, 1977).

A GDP-D-manose é sintetizada a partir de D-frutose-6-fosfato pela ação sequencial de três enzimas: uma isomerase, uma fosfomutase e uma pirofosforilase. Uma vez formada, a GDP-D-manose é convertida em GDP-L-fucose por ação da GMD2 (GDP-D-manose desidratase), cujos genes têm sido identificados pelos mutantes *mur1* (BONIN et al., 1997) e a epimerase-redutase bifuncional GER1 (BONIN; REITER, 2000). A GDP-L-galactose e GDP-L-gulose são sintetizadas também a partir de GDP-manose pela ação de enzimas GDP-manose epimerases (GME) (Figura 7).

Os UDP e GDP-açúcares sintetizados no citoplasma, destinados à formação de componentes hemicelulósicos e pectinas das paredes celulares, são imediatamente transportados para o interior do retículo endoplasmático com auxílio de enzimas transportadoras específicas, ainda não caracterizadas (Figura 7). Uma vez no interior do sistema de endomembranas, continuam sofrendo modificações até constituir polímeros complexos. Estes são liberados ao

Csl (RICHMOND; SOMERVILLE, 2001), que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de cadeias de polissacarídeos hemicelulósicos.

A identificação e estudo da localização subcelular, modo de ação e regulação desses genes é um grande desafio para se conseguir controlar o metabolismo de biossíntese da parede celular durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (LEROUXEL et al., 2006).

2.6 Biossíntese de ácido UDP-D-glucurônico

Até o momento têm sido estudadas duas vias alternativas à síntese de ácido UDP-glucurônico a partir de glucose-6-P (SEITZ et al., 2000) (Figura 7). A primeira via enzimática denomina-se Via de Oxidação dos Açúcares-Nucleotídeo (SNOP, *Sugar Nucleotide Oxidation Pathway*). A enzima UDP-glucose desidrogenase e uma uridiltransferase são as responsáveis pela conversão do açúcar UDP-D-glucose em ácido UDP-D-glucurônico (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977) (Figura 7).

A UDP glucose desidrogenase é a enzima chave da via SNOP. É uma enzima dependente de NAD⁺. Tanto a uridiltransferase que constitui a UDP-glucose quanto a desidrogenase, sofrem retroinibição, o que significa que são fortemente inibidas pelos produtos da reação. Além disso, estas enzimas sofrem inibição por certos produtos derivados do ácido UDP-glucurônico, como a UDP-D-xilose (FEINGOLD, 1982). O requerimento de NAD⁺ e as restrições cinéticas impostas pelos produtos inibidores são aspectos muito importantes nesta via de síntese de ácido UDP-glucurônico.

Já a via de Oxidação do Mio-Inositol (MIOP, *Myo Inositol Oxidation Pathway*) foi proposta por Loewus et al. (1973). Esta via metabólica não requer síntese de UDP-glucose nem redução acoplada a NAD⁺, para a síntese de ácido UDP-glucurônico. Este fato permitiu inferir que a oxidação da UDP-glucose, a retroinibição exercida pelos produtos da reação (como a UDP-xilose) e a restrição cinética imposta pela dependência de NAD⁺, resultariam da MIOP como rota alternativa de biossíntese de ácido UDP-glucurônico e seus produtos derivados, como hemiceluloses e pectinas constituintes da parede celular (ROSENFELD et al., 1978; LOEWUS; LOEWUS, 1973; 1983).

A conversão do mio-inositol livre em ácido UDP-D-glucurônico é catalisada por três enzimas: mio-inositol oxigenase (MIOX), glucuronoquinase (GAK) e glucuronato-1-P-

uridiltransferase (UAP) (Figura 7). Até o momento, não se sabe ao certo qual das rotas de síntese do ácido UDP-D-glucurônico é a preferencial em plantas. Há evidências de que as duas vias metabólicas coexistem, variando a importância de cada uma durante o desenvolvimento da planta (ROBERTS; LOEWUS, 1973; DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977a, b; SEITZ et al., 2000).

2.7 Enzima Mio-inositol Oxigenase

A enzima Mio-inositol, cujo n° E.C. 1.13.99.1, pode também ser denominada Inositol-oxigenase ou meso-inositol oxigenase (MIOX). A MIOX catalisa a primeira reação da rota de oxidação do mio-inositol: $\text{mio-inositol} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ácido D-glucurônico} + \text{H}_2\text{O}$, tendo como cofator o ferro (KOLLER et al., 1976). A enzima catalisa a clivagem do anel de mio-inositol através da sua atividade monoxidase. A clivagem ocorre pelo mecanismo de transferência de um átomo de oxigênio ao anel mio-inositol. A enzima é de considerável interesse fisiológico, pois catalisa o primeiro passo na rota de degradação do mio-inositol. Em animais, regula os níveis de mio-inositol principalmente em células hepáticas. Pacientes diabéticos apresentam alterações consideráveis nos níveis de mio-inositol e por isso, acredita-se que a função da enzima MIOX pode ser um fator importante na sintomatologia da doença (WINEGRAD, 1987).

A MIOX foi purificada pela primeira vez a partir de extratos de rim de rato (CHARALAMPOUS, 1959) e posteriormente purificada a partir de extratos de rim de porco por Reddy et al. (1981a; 1981b), que a caracterizaram quanto a sua estrutura como sendo uma enzima monomérica de 65 kDa. Arner et al. (2001) foram os primeiros a clonar o gene *miox* de porco (*Sus scrofa*). O cDNA, obtido de uma biblioteca completa de cDNA de rim de porco, possui uma região aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) de 849 pb e o peso molecular correspondente à sequência de aminoácidos traduzida de 32,7 kDa. Esses dados foram confirmados por SDS-PAGE e análises de espectrometria de massas.

Em plantas, a MIOX foi purificada pela primeira vez por Koller et al. (1976), a partir de extratos de plântulas de aveia, sendo que depois de três anos a enzima foi purificada também por esse grupo, a partir de rim de rato (KOLLER; HOFFMAN-OSTENHOF, 1979). Recentemente, Lorence et al. (2004) demonstraram que em *Arabidopsis thaliana*, a enzima MIOX é representada por quatro regiões abertas de leitura, correspondentes a uma família de proteínas. Este grupo clonou o cDNA, de 957 pb, que codifica a MIOX do cromossomo 4 de *A. thaliana* (*miox4*). Eles

superexpressaram o cDNA do gene *miox4* em plantas de *Arabidopsis* e observaram aumentos de duas a tres vezes nas proporções de ácido ascórbico de plantas transgênicas, confirmando a participação dessa enzima em uma das rotas de biossíntese de vitamina C (LOEWUS et al., 1962; SMIRNOFF et al., 2001).

Para a biossíntese de ácido L-ascórbico, o mio-inositol é convertido pela enzima MIOX em ácido D-glucurônico. A enzima glucuronato redutase converte o ácido D-glucurônico em ácido L-gulônico, a aldono lactonase converte o L-gulonato em L-gulono-1,4-lactona e finalmente, a gulono-1,4- lactonae desidrogenase sintetiza o ácido L-ascórbico (SMIRNOFF et al., 2001) (Figura 8). O ácido ascórbico é considerado um importante agente antioxidante pela sua contribuição à redução do dano provocado pela ação de espécies reativas de oxigênio nos organismos. Incrementos de ácido ascórbico nas plantas seriam de grande utilidade para se obter fenótipos com senescência tardia.

Figura 8 – Papel da MIOX na biossíntese de ácido L-ascórbico (KANTER et al., 2004). 1) glucuronato-1P uridil-transferase; 2) glucurono-quinase; 3) glucuronato-redutase; 4) aldono-lactonase; 5) gulono-1,4- lactona-desidrogenase.

Kanter et al. (2003) purificaram, clonaram e sequenciaram a enzima inositol oxigenase de *Cryptococcus neoformans*, e dois anos depois, estudaram quatro ORFs correspondentes ao gene *miox* de *Arabidopsis thaliana* (*miox1*, *miox2*, *miox4* e *miox5*) (KANTER et al., 2005). Eles clonaram as quatro seqüências e quantificaram a sua expressão tecido-específica com auxílio da análise de PCR quantitativo. Observaram que o gene de maior expressão em tecido radicular,

caulinar e foliar corresponde à sequência do gene *miox2*. As sequências de *miox4* e *miox5* foram encontradas em maiores proporções nos botões florais de *Arabidopsis*. Estudos de repressão da expressão via *knock-out* dos genes *miox1* e *miox2* permitiram observar reduções drásticas na incorporação de ^3H -inositol em plantas transgênicas (LORENCE et al., 2004). Nessas plantas não foi possível observar modificações nas proporções de monossacarídeos derivados do ácido glucurônico, indicando redundância nas funções das diversas proteínas MIOX de plantas, além da rota alternativa SNOP.

O conhecimento da regulação da expressão da enzima mio-inositol oxigenase seria de grande utilidade para fornecer ferramentas de controle do processo de biossíntese de polissacarídeos da parede celular. O nosso grupo de pesquisa pretende esclarecer alguns dos mecanismos de modulação dos padrões normais de expressão de genes envolvidos na biossíntese de precursores de parede celular e conseqüentemente, na proporção dos metabólitos resultantes. Neste trabalho analisou-se o efeito da superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana*, na composição de carboidratos de parede celular, em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem do gene *miox2*

O gene *miox2* que codifica a enzima Mio-inositol oxigenase (E.C. 1.13.99.1) foi previamente clonado de *Arabidopsis thaliana* (DEFÁVARI-NASCIMENTO, 2005). A sequência nucleotídica com nº de acesso no NCBI: NM127538, corresponde à sequência expressa de *Arabidopsis thaliana*, foi obtida a partir da análise de blastX (ALTSCHUL et al., 2001) da sequência do gene *miox* de *Sus scrofa* (ARNER et al., 2001). Esse gene disponível no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO® (Figura 9) da Invitrogen, foi utilizado nos experimentos de transformação genética de plantas de tabaco e nos experimentos de expressão heteróloga em *E. coli*.

Figura 9 – Detalhe dos sítios de restrição e clonagem do vetor de entrada pENTR™/D-TOPO®

O vetor TOPO® possui uma extremidade coesiva única de sequência GTGG 5'-OH e outro extremo cego. A enzima Topoisomerase I do vírus Vaccinia, ligada covalentemente às sequências específicas CCCTT 3'-OH (Figura 10) catalisa a formação dos enlaces fosfodiéster requeridos para incorporar os fragmentos de cDNA provenientes da reação RT-PCR. Os fragmentos são inseridos no vetor de acordo com a localização da sequência de direcionamento GTGG-5' e pela localização da sequência de quatro bases (CACC) na extremidade 5'- do *primer* F. A sequência CACC no *primer* F permite que o cDNA obtido na reação RT-PCR contenha uma região complementar à sequência GTGG 5'-OH do vetor TOPO®. O cDNA do gene *miox2* foi clonado no vetor de acordo com a orientação das regiões complementares.

Figura 10 – Esquema do mecanismo de inserção direcional de fragmentos de DNA obtidos por PCR no vetor TOPO

3.2 Sistema de expressão de enzimas recombinantes em *E. coli*

A sequência clonada no vetor TOPO foi subclonada no vetor pDEST™17 de expressão em *E. coli* (*E. coli* Expression System with Gateway® Technology, da Invitrogen), a fim de se obter a enzima em quantidades suficientes para ser purificada e posteriormente avaliada quanto à atividade catalítica *in vitro*.

O princípio de expressão desse sistema Gateway se baseia no sistema de expressão pET, originariamente desenvolvido por Studier et al. (1990). A alta taxa de atividade e especificidade da RNA polimerase do vírus do bacteriófago T7 é utilizada nesse sistema para regular a expressão de genes heterólogos em bactérias *E. coli* portadoras da sequência promotora T7 (ROSENBERG et al., 1987; GROODBERG; DUNN, 1988). A linhagem utilizada como hospede para os genes regulados pela enzima RNA polimerase T7 foi a BL21-AI™ One Shot® Chemically Competent *E. coli* que contém uma inserção cromossômica do gene que codifica a RNA polimerase T7 (T7 RNAP) situada no *locus araB* do operon *araBAD*, sob o controle do promotor *araBAD*. A indução e ativação do cassete de expressão são feitas com auxílio do substrato L-arabinose (LEE, 1980; LEE et al., 1987).

3.2.1 Regulação do promotor araBAD (PBAD)

O promotor pode ser regulado positiva e negativamente na linhagem *E. coli* BL21-AI™ *One Shot*® pelo produto do gene *araC* (OGDEN et al., 1980; SCHELEIF, 1992). AraC é um regulador da transcrição capaz de se ligar à L-arabinose. Na ausência deste substrato, o dímero AraC se liga à molécula de O₂ e ao sítio I₁ do cassete *araBAD*, formando um *loop* de DNA de 210 pb. Neste caso, a transcrição de *araC* é inibida pela região I₂. Em presença de L-arabinose o dímero AraC se liga às regiões I₁ e I₂ e a formação do *loop* de 210 pb permite a ligação do AMPc à sequência CAP. Dessa forma, o promotor P_{BAD} é ativado para iniciar a transcrição do gene de interesse (Figura 11).

Figura 11 – Mecanismo de regulação do cassete *araBAD*

3.2.2 Descrição do vetor Gateway® pDEST™17

O sistema Gateway de clonagem utiliza a recombinação do sítio específico do vírus bacteriófago λ (LANDY, 1989) como método de inserção de fragmentos de DNA de interesse. Por meio deste sistema, a sequência do gene *miox2* foi subclonada no vetor de destino pDEST™17 (Figura 12). O vetor pDEST™17 possui na sua região de recombinação o promotor T7, uma sequência RBS (*Ribosome Binding Sequence*) ou sequência de Shine-Dalgarno (para iniciação da tradução), um códon de iniciação ATG, uma cauda de 6 histidinas (6x His *tag*) na

região N-terminal (para a purificação da proteína recombinante), as seqüências de recombinação de sítio específico *attR1* e *attR2*, responsáveis pela inserção direcional do gene *miox2*. Entre estes sítios estão o gene *Cm^R* (de resistência a Cloramfenicol) e o gene letal *ccdB* e no interior da região de recombinação se encontra uma seqüência terminadora T7. O gene de resistência à ampicilina permite a seleção exclusiva de clones recombinantes contendo o vetor pDESTTM17. A seqüência pBR322 é a origem de replicação do plasmídeo e a seqüência *ROP* ORF interage com pBR322 para obtermos baixos números de cópias do vetor no interior das células bacterianas.

Figura 12 – Esquema representativo do vetor Gateway[®] pDESTTM17 (Invitrogen)

O cDNA do gene *miox2*, inicialmente clonado no vetor de entrada TOPO foi subclonado no vetor pDESTTM17 por uma reação de recombinação sítio específica, denominada Reação LR.

3.2.3 Reação de recombinação LR

A tecnologia Gateway[®] utiliza o sistema de recombinação sítio específica do vírus bacteriófago λ . Este sistema permite ao vírus se integrar no genoma de *Escherichia coli* para iniciar dessa forma a via lisogênica (PTSHANE, 1992). A integração do bacteriófago λ no genoma de *E. coli* ocorre através de uma recombinação intermolecular de DNA mediada por um

conjunto de proteínas de recombinação pertencentes tanto ao fago λ quanto à bactéria. Essa tecnologia criou um sistema de vetores binários portadores de sítios de recombinação – *att sites*, nos locais de inserção de fragmentos de DNA exógenos. Dessa forma, com auxílio dessa técnica, a sequência de cDNA do gene *miox2* foi inicialmente clonada no vetor de entrada p/ENTR™ D/TOPO® foi subclonada no vetor de destino pDEST™17 através de uma reação de recombinação denominada “*LR Recombination Reaction*”. O *mix* de enzimas que catalisa essa reação é o “*LR Clonase™ Enzyme mix*”, composto de duas enzimas, a *Integrase* (Int) e *Excisionase* (Xis) do bacteriófago λ , e do *Integration Host Factor* (IHF) de *Escherichia coli*. A reação LR catalisa a recombinação entre um substrato portador de sítios *attL* (vetor de entrada) com um substrato portador de sítios *attR* (vetor de destino) para criar um vetor de expressão, portador de sítios *attB* (Figura 13).

A reação de recombinação de sítio específico *attL1* x *attR1* e *attL2* x *attR2* permitiu inserir o cDNA na orientação correta. O gene letal *ccdB* e o gene de resistência a cloramfenicol Cm^R localizados entre as sequências *attL1* e *attL2*, auxilia na seleção negativa das colônias portadoras do plasmídeo, mas que não inseriram o cDNA após a reação LR, em bactérias *E. coli* DH5 α ™.

Figura 13 – Esquema da reação de recombinação LR

A reação de recombinação foi preparada de acordo com as normas do fabricante (Invitrogen). Assim, 300 ng do vetor de entrada pENTR/D-TOPO recombinante já purificado, foram combinados a 300 ng do vetor Gateway pDEST™17 de destino, aos quais adicionou-se 4 μL do tampão “5X *LR Clonase™ Reaction*” e tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5) suficiente para completar o volume final de 16 μL . Em seguida, adicionou-se 4 μL do *mix* enzimático “*LR Clonase™*”. A reação foi mantida por 2 horas a 25°C. Após esse período adicionou-se 2 μL de proteinase K (2 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) à reação, que foi mantida por 10 minutos a 37°C. Essa reação de recombinação foi utilizada para a transformação da linhagem DH5 α de *E. coli*

para manutenção do vetor pDEST™17 recombinante, a ser utilizado nos experimentos de expressão heteróloga.

3.3 Expressão da enzima MIOX2 em *E. coli*

A linhagem de *E. coli* BL21-AI™*One Shot*® foi utilizada nos experimentos de expressão da proteína recombinante. Essa linhagem foi transformada com o vetor pDEST™17 recombinante por choque térmico. 10 ng do de plasmídeo recombinante purificado foi adicionado a 50 L de suspensão de células bacterianas competentes fornecidas pelo kit “*E. coli Expression System with Gateway*® *Technology*” da Invitrogen. A suspensão de células bacterianas, acrescidas do vetor pDEST™17 recombinante foram incubadas em gelo por 30 minutos. O tubo foi então transferido rapidamente para 42°C por 30 segundos e novamente para gelo. Em seguida, acrescentou-se a suspensão de 250 µL de meio de recuperação S.O.C. (ANEXO A). As células foram então mantidas por uma hora a 37°C sob agitação (200 rpm) antes de serem plaqueadas em meio LB seletivo sólido (ANEXO B), acrescido de ampicilina (100 mg L⁻¹) e mantidas a 37 °C. Os clones recombinantes foram selecionados após 16 hs e purificados em meio LB sólidos, acrescido de ampicilina (100 mg L⁻¹) para serem utilizados nos experimentos de expressão heteróloga.

Foi realizado um teste preliminar de indução da expressão com L-arabinose 0,2% (p/v), a fim de se selecionar o clone recombinante de maior eficiência para expressão da proteína MIOX. Quatro colônias, selecionadas ao acaso, foram cultivadas separadamente em 5 mL de meio LB líquido, acrescido de ampicilina (100 mg L⁻¹), e mantidas a 37°C até atingirem a densidade ótica (600 nm) de 0,4. Em seguida, iniciou-se a indução da expressão da enzima recombinante pela adição de L-arabinose 0,2 % (p/v) ao meio de cultura. As bactérias induzidas foram mantidas a 37°C, sob agitação constante (200 rpm). Após esse período, alíquotas de 500 µL foram coletadas para análise e centrifugadas a 10.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 80 µL de tampão 1X SDS-PAGE (ANEXO C). Após fervura das amostras, uma amostra (30 µL) foi aplicada em gel de poliacrilamida (LAEMMLI 1970) (ANEXO D) para análise por SDS-PAGE. Como marcador de peso molecular utilizou-se o *Broad-Range* – SDS-PAGE *Standard* (BIO-RAD). Após a corrida, por 5 horas a 80 V em cuba de eletroforese contendo os tampões superior e inferior (ANEXO E), o gel foi fixado por uma hora com uma

solução fixadora [ácido acético 1% (v/v)] e corado com *Coomassie Blue* G250, sob agitação (50 rpm) por 16 hs.

O clone que apresentou maior nível de expressão foi selecionado e cultivado novamente em 10 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 mg L^{-1}) até atingir a densidade ótica (600 nm) de 0,6 a 1. Uma alíquota (1 mL) desse pré-inóculo foi transferida para um tubo Erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 mg L^{-1}). Essa cultura foi mantida a 37°C sob agitação constante (200 rpm) até que atingisse a densidade ótica (600 nm) de 0,4. Nesse momento adicionou-se a L-arabinose 0,2% (p/v) para a indução da expressão da proteína recombinante. Depois de três horas de indução, os 50 mL de cultura bacteriana induzida foram centrifugados ($10.000 \times g$) a 4°C e o precipitado, imediatamente congelado em N_2 líquido e armazenado em freezer a -80°C até o momento da purificação da proteína.

3.4 Purificação da proteína MIOX2 recombinante

Para purificar a enzima MIOX2 foi utilizado o kit *ProBond™ Purification System* (Invitrogen). O kit fornece uma coluna de purificação com a resina *ProBond™* contendo partículas de níquel, metal quelador responsável pela separação da proteína recombinante. A sequência de 6 resíduos de histidina (6xHis-tag) (BUSH et al., 1991), ligados à enzima recombinante, permite a sua retenção por afinidade enquanto as outras proteínas da bactéria são eluídas. Os anéis de imidazol dos resíduos de histidina se ligam ao níquel e ficam retidos nas partículas junto à proteína MIOX, que é retida e posteriormente purificada.

A enzima recombinante foi eluída da coluna realizando lavagens com tampões de eluição contendo Imidazol. Um dos precipitados congelados a -80°C , provenientes dos inóculos de 50 mL de meio LB, foi ressuspensionado em 3 mL de tampão de lise 1X [NaH_2PO_4 (100 mM) e Tris-HCl (10 mM) em pH 8,0], sempre trabalhando em câmara fria a 4°C . Esses 3 mL de suspensão bacteriana foram macerados com ajuda de almofariz e pistilo e colocados em tubos Falcon™, aos quais adicionou-se mais 2 mL desse mesmo tampão, 50 μL de PMSF (100 mM), 50 μL de lisozima (100 mg mL^{-1}), 3,3 μL de β -mercaptoetanol, 5 μL de RNase, 5 U de DNase juntamente com 10 μL do tampão da enzima 10X. A solução foi mantida em câmara fria e no gelo por 30

minutos, antes de ser submetida a 3 ciclos de 10 segundos cada de sonicações de alta intensidade em gelo.

O lisado inicial foi então centrifugado (10.000 xg) por 15 minutos e o sobrenadante, transferido para a coluna de purificação *ProBond™* previamente equilibrada com tampão de lise 1X. O lisado misturado à resina foi deixado por uma hora no interior da câmara fria sob agitação sincronizada (50 rpm) para completa associação da proteína recombinante à resina. Após esse período o homogeneizado foi deixado sedimentar por 10 minutos antes de percolar o tampão de lise 1X. Em seguida iniciou-se a lavagem pela adição de 10 mL de tampão de lavagem [NaH_2PO_4 (100 mM) e Tris-HCl (10 mM) em pH 6,3]. Após sedimentação da resina, seguida de percolação da solução de lavagem, procedeu-se a eluição da proteína recombinante num gradiente de concentrações crescentes de Imidazol no tampão de eluição. A primeira eluição foi realizada com 6 mL de tampão de eluição I [NaH_2PO_4 (100 mM), Tris-HCl (10 mM) e Imidazol (50 mM) em pH 8,0]. A solução percolada foi recuperada em tubo Falcon™, para armazenamento em câmara fria e gelo. Foram realizadas quatro eluições adicionais com 6 mL de tampões da mesma composição, mas com concentrações de Imidazol de 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM e pH 6,3. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI 1970) e por *Western Blot* a fim de confirmar a identidade da proteína MIOX2 recombinante.

3.5 *Western Blot*

Após análise por SDS-PAGE, o gel contendo as proteínas foi lavado com tampão de transferência (ANEXO F) as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (6,5 cm x 9,0 cm), previamente lavada com metanol com auxílio de uma cuba eletroforética de transferência da BIO-RAD utilizando o tampão de transferência (ANEXO F). Essa transferência foi realizada em câmara fria a 4°C por 16 horas a 20 V. Após esse período a membrana foi deixada à temperatura ambiente para secagem completa. Em seguida, procedeu-se a uma série de duas lavagens da mesma com auxílio de um hibridizador (*Hibridiser* HB-2B da Techne). Após lavagem, a membrana foi mantida em contato com 10 mL de solução bloqueadora [leite em pó desnatado 5% (p/v) em tampão TBS-T] por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação constante (60 rpm) em hibridizador. Após descarte da solução bloqueadora, adicionou-se 10 mL da solução bloqueadora acrescida de 10 ng (em diluição 1:40.000) do anticorpo [anticorpo MIOX de rato

(MMIOX), fornecido pelo Dr. Ryan J. Arner, da *Pennsylvania State University*]. Após uma hora à temperatura ambiente sob agitação constante (60 rpm) em garrafa de hibridização, a membrana foi lavada três vezes em intervalos de dez minutos sob agitação constante, com 10 mL de solução TBS-T (ANEXO G). Após lavagem do anticorpo, adicionou-se 15 mL de solução bloqueadora contendo 4 ng do anticorpo (*Anti-rabbit Ig. Horshradish – Peroxidase linked whole antibody from donkey*, Amersham Biosciences). Após uma hora à temperatura ambiente, a membrana foi novamente lavada 3 vezes, em intervalos de dez minutos com a mesma solução TBS-T, para retirada do excesso do anticorpo e de remanescentes de proteínas do leite presentes no líquido bloqueador. A membrana foi transferida para um saco plástico e o excesso de solução TBS-T, retirado com auxílio de uma régua.

A detecção foi realizada com auxílio do kit ECL +*Plus – Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences) de acordo com as normas do fabricante. A membrana foi incubada com uma solução luminescente (400 µL de solução A e 10 µL de solução B) fornecida pelo *kit*, por 5 minutos. O excesso de solução luminescente foi retirado também com régua e saco plástico, selado antes de se proceder à exposição da membrana em contato com o filme de raio X (AGFA – ORTHO CP-G *Plus – Medical X-Ray Film*).

3.6 Testes de atividade enzimática

A proteína MIOX2 purificada a 4°C foi submetida a testes de atividade enzimática. Frações de 6 mL da proteína purificada com tampão de eluição acrescido de 300 mM de Imidazol e pH 8,0, foram quantificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) utilizando-se como padrão a proteína lisozima (E.C. 3.2.11.7) purificada de clara de ovo (Sigma®) em concentrações crescentes de (10, 25, 50 e 100) ng.

Para o ensaio enzimático, a fração de proteína purificada foi mantida à temperatura ambiente após adição de sulfato de amônio ferroso (100 mM) e DL-cisteína (200 mM). Imediatamente após esse período, 10 alíquotas de 200 µL da fração de proteína purificada foram transferidos para novos tubos aos quais, adicionou-se diferentes concentrações de mio-inositol num gradiente de (5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 100) mM. À amostra controle (0 mM) não adicionou-se o mio-inositol. As reações foram preparadas no tampão de reação [TrisHCl (50 mM), EDTA 5% (p/v), glutathione reduzida 10% (p/v) e pH 7,2] em um volume final de 1 mL. As

amostras foram preparadas. A reação enzimática foi realizada por 15 minutos e 30°C e paralisada em seguida por fervura de três minutos.

As concentrações de ácido D-glucurônico, produto final da reação enzimática, foram determinadas via *High Performance Anion Exchange – Pulsed Amperometric Detection* – HPAE-PAD, de acordo com a metodologia de Fardim e Duram (2001) e com auxílio do equipamento ICS 2500 HPLC Dionex[®] e colunas de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA10 (2 x 250 mm). Para o cálculo das concentrações, utilizou-se uma curva padrão com ácido D-glucurônico (Sigma[®]).

3.7 Superexpressão da enzima MIOX2 em *Nicotiana tabacum*

Após caracterização da enzima MIOX2 recombinante *in vitro*, iniciou-se os experimentos de transformação genética de plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1. A transformação genética foi realizada para avaliarem-se os efeitos da superexpressão desse gene em plantas de tabaco, na composição de carboidratos da parede celular secundária.

3.7.1 Clonagem do gene *miox2* no vetor binário pK2WG7

O cDNA do gene *miox2*, isolado e clonado a partir de *Arabidopsis thaliana*, foi utilizado para transformar plantas de tabaco. Para isso, o cDNA inicialmente clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO[®] (Invitrogen), foi subclonado em um vetor binário pK2WG7 de Gateway[®] Technology, da Invitrogen, específico para transformação de plantas. O vetor utilizado foi o plasmídeo (Figura 14).

- Sm/SpR, gene de resistência a espectinomicina, expresso unicamente em bactérias.
- LB, *left border*, sequência de 25pb na região esquerda do T-DNA.
- Kan^R, gene de resistência à canamicina ou neomicina fosfotransferase II (*nptII*). Marcador de seleção regulado transcricionalmente pelos promotores e terminadores nopalina sintase (*nos*).
- *pro35S*, promotor 35S, de ação constitutiva forte em plantas, originário do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV).
- *attR2*, *attachment site* R2, sequência responsável pela recombinação sítio específica (PTASHNE, 1992; LANDY, 1989).
- Cm^R-*ccdB*, gene de resistência a cloramfenicol (Cm^R) e gene *ccdB*, letal para células não resistentes (BERNARD; COUTURIER, 1992) utilizado na seleção negativa.
- *attR1*, *attachment site* R1.
- *ter35S*, sequência de terminação da transcrição 35S, proveniente do vírus CaMV.
- RB, *right border*, sequência de 25 pb na região direita do T-DNA.
- Os sítios de restrição enzimática sublinhados são sítios únicos e aqueles não sublinhados são múltiplos.

Figura 14 - Representação esquemática dos principais componentes da região do T-DNA no vetor de destino Gateway pK2WG7 da Invitrogen.

O vetor de destino pK2WG7 possui na região do T-DNA (Figura 14) um gene de resistência à kanamicina (*nptII*) que permite a seleção em plantas. A sua transcrição está regulada pelas seqüências promotoras e terminadoras da transcrição eucariota *nos* (nopalina sintase). A região promotora e terminadora da transcrição do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S, permite a expressão forte dos genes inseridos entre os sítios *attR*.

3.7.1.1 Extração de DNA plasmidial

O vetor binário pk2WG7, gentilmente fornecido pelo grupo do Dr. Dirck Inzé, da Universidade de Ghent, Bélgica, foi extraído de um clone de bactérias *E. coli* DB3.1TM resistentes aos efeitos do gene *ccdB*, cuja proteína CcdB interfere com a DNA girase de *E. coli* (BERNARD; COUTURIER, 1992) e interrompe o crescimento de outras linhagens como a DH5αTM e TOP10, entre outras que são sensíveis. Essa linhagem *E. coli* DB3.1TM (Invitrogen) possui uma mutação no gene *gyrase* (*gyrA462*), que confere resistência aos efeitos letais dessa proteína CcdB (BERNARD; COUTURIER, 1992; BERNARD et al., 1993).

A purificação do vetor binário pK2WG7 foi feita a partir de uma colônia isolada proveniente do plaqueamento do clone original em meio LB sólido (ANEXO B). Essa colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido (ANEXO B) por 16 horas a 37°C sob agitação constante (200 rpm). O DNA plasmidial foi extraído com auxílio do *kit* QIAprep® *Spin Miniprep* da QIAGEN, segundo as normas do fabricante. O protocolo de extração do *kit* se baseia em uma modificação da técnica de lise alcalina, seguida da ligação do DNA plasmidial a uma resina de troca iônica QIAGEN que elimina o RNA, as proteínas, os pigmentos e as impurezas de baixo peso molecular.

Para a extração do DNA plasmidial, as colônias selecionadas foram ressuspensas em 250 µL dos tampões P₁ e P₂, mais 350 µL do tampão N₃, todos fornecidos pelo *kit*. Depois de centrifugação por 10 minutos (15.000 xg), os sobrenadantes foram transferidos para as colunas de troca iônica QIAprep® e centrifugados por um minuto. Após a lavagem com 0,5 mL de tampão PB e centrifugação de um minuto a (10.000 xg), o mesmo procedimento foi feito com 0,75 mL de tampão PE (ambos os tampões fornecidos pelo *kit*). O DNA plasmidial purificado foi eluído com 50 µL de tampão EB (10 mM Tris HCl e pH 8,5) e centrifugação (15.000 xg) por um minuto. Os plasmídios foram verificados e quantificados por eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com brometo de etídio 0,1% (p/v).

3.7.1.2 Reação de Recombinação LR

O cDNA do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* inicialmente clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO®, foi subclonado no vetor binário pK2WG7 através de uma reação de recombinação sítio específica de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen) (ver item 3.2.3).

3.7.2 Transformação química de *E. coli* com o vetor pK2WG7/*miox2*

Após a reação de recombinação LR, 25 µL de células da linhagem DH5α de *E. coli* quimicamente competentes “*Library Efficiency*® DH5α™” (Invitrogen) foram utilizados na transformação por choque térmico (HOLSTERS et al., 1978). Às células adicionou-se 1 µL da reação de recombinação LR, que foram mantidas em gelo por 30 minutos, antes da transferência

para 42°C por 30 segundos. Após o choque térmico, as células foram mantidas no gelo por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 450 µL de meio de recuperação S.O.C. (ANEXO A) às células transformadas que foram mantidas a 37°C por uma hora sob agitação constante (200 rpm), antes de serem plaqueadas em meio LB sólido acrescido de espectinomicina (100 mg L⁻¹).

As colônias transformantes, portadoras do vetor Gateway recombinante (pK2WG7/*miox2*), foram analisadas por reação de PCR, com *primers* específicos para o transgene *miox2 forward primer* 5'-ATGACTATTCTTGTGAACA-3' e *reverse primer* 5'-TC ACCATTTTAGTTTCGCCG-3'.

Para um volume final de 25 µl adicionou-se 2,5 µL de tampão 10X (200 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM de KCl), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 200 µM de cada dNTP (A, T, C, G) 100 mM, 1 unidade da enzima *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 50 pmol de cada *primer*, 3 µL de inóculo de colônia e água MilliQ autoclavada suficiente para completar o volume final de 25 µl de reação.

O programa utilizado na amplificação por PCR foi de: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por dois minutos seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 92°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C. Após os 35 ciclos, realizou-se um ciclo adicional de extensão por 7 minutos. O produto de amplificação de 960 pb, correspondente à ORF do gene *miox2*, foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) em tampão TBE 0,5 X (ANEXO H) por 30 minutos a 75 V. As bandas foram coradas com brometo de etídio (0,01 µg.mL⁻¹) e visualizadas em luz UV.

3.7.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor pK2WG7/*miox2*

O vetor pK2WG7/*miox2* contendo o gene *miox2* de *A. thaliana* foi purificado a partir de células recombinantes da linhagem DH5α de *E. coli* selecionados em meio LB contendo espectinomicina (100 mg mL⁻¹) (ver item 3.7.1) e mantidos em glicerol a -80°C para propagação do plasmídeo.

3.7.3.1 Extração DNA plasmidial

A linhagem de *E. coli* DH5α recombinante, previamente analisada por PCR foi estriada em meio LB sólidos, acrescido de espectinomicina (100 mg L⁻¹). Após um período de 16 horas a

37°C, uma colônia isolada foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo meio LB líquido acrescido de espectinomicina (100 mg L⁻¹) e mantido por 16 horas sob agitação constante (200 rpm) a 37°C. O DNA plasmidial foi extraído a partir de 3 mL de cultura bacteriana com auxílio do kit “QIAprep[®] Spin Miniprep” da QIAGEN, segundo descrito no item 3.7.1.1.

As amostras foram verificadas e quantificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X (ANEXO H) a 75 V. As bandas foram coradas com brometo de etídio (0,01 ng/μL) e visualizadas sobre luz UV.

3.7.3.2 Transformação da linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*

Uma colônia da linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 desarmada, obtida a partir do plaqueamento do estoque em glicerol 25 % (v/v), mantida a -80°C em meio AB sólido (ISHIDA et al., 1996) (ANEXO K), foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio AB líquido (ANEXO K) e mantida a 28 °C sob agitação constante (200 rpm) por 48 hs. Após esse período, 1 mL desse pré-inóculo foi transferido para frasco Erlenmeyer com 50 mL de meio AB líquido. Essa suspensão bacteriana foi mantida a 28°C por 48 hs sob agitação constante (200 rpm) até atingir a OD_{600 nm} = 0,8. As células bacterianas foram centrifugadas (3.000 xg) por 10 minutos a 4°C e submetidas a 3 lavagens sucessivas em: 30 mL de Hepes (1 mM, pH 7,0), 30 mL de água MilliQ e 30 mL de Hepes (1 mL pH 7,0) acrescido de glicerol 10 % (v/v), por centrifugações (3.000 xg, 10 minutos e 4°C) e ressuspensão do pellet. O pellet resultante das lavagens foi ressuspensionado em 500 μL de Hepes (1 mM pH 7) acrescido de glicerol 10% (v/v). A uma alíquota de 80μl dessa suspensão bacteriana, adicionou-se 200 ng do plasmídeo recombinante pK2WG7/*miox2* purificado. Essa suspensão foi então transferida para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm de intervalo entre eletrodos). Em seguida, aplicou-se um pulso elétrico de 2,5 kV no eletroporador “Gen Pulser[®] Electroporator”, da BIO-RAD. Após o pulso elétrico, adicionou-se às amostras 250 μL de meio de recuperação S.O.C. líquido (ANEXO A). As células eletroporadas foram então mantidas por 2 horas, a 28°C, antes de serem plaqueadas em meio seletivo AB sólido contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹). Após 72 horas a 28°C, os clones da linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor Gateway recombinante pK2WG7/*miox2* selecionados em meio AB acrescido de espectinomicina foram analisados por PCR utilizando-se os *primers* específicos para o gene *miox2* de *A. thaliana*, *forward primer* 5’-

ATGACTATTCTTGTGAACA-3' e *reverse primer* 5'-TCACCATTTTAGTTTCGCCG-3'. Os componentes da reação de PCR estão especificados no ANEXO J. O programa utilizado para amplificação foi de um pré-ciclo de 10 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C. Após os 35 ciclos realizou-se uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X (ANEXO H), corado com brometo de etídio (0,01 ng μL^{-1}) visualizado sobre luz UV a 75 V por 30 minutos.

3.7.4 Transformação genética de *Nicotiana tabacum*

3.7.4.1 Material vegetal

Plantas jovens de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) foram utilizadas nos experimentos de transformação genética com o gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* clonado no vetor binário Gateway pK2WG7/*miox2*. A técnica utilizada para este propósito foi a de infecção de discos foliares via *Agrobacterium tumefaciens* descrita por Horsch et al. (1985).

3.7.4.2 Preparo do inóculo da linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*

Uma colônia isolada de um clone da linhagem EHA 105 recombinante, portadora do vetor binário Gateway pK2WG7/*miox2* e outra da linhagem controle, resultante da transformação com o vetor binário pK2WG7 vazio ou seja, desprovido do transgene de interesse, foram transferidas em separado, para frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio AB acrescido de espectinomicina (100 mg L^{-1}), que foram mantidos a 28 °C por 24 horas, sob agitação constante (200 rpm). A construção do vetor gateway desprovida do transgene, utilizada na transformação da linhagem de *Agrobacterium* EHA 105 desarmada foi utilizada nos experimentos de transformação para obtenção de “plantas transgênicas controles”.

Após esse período, alíquotas de 1 mL foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio AB líquido acrescido de espectinomicina (100 mg L^{-1}). As suspensões bacterianas foram então mantidas a 28°C por 24 horas sob agitação constante (200 rpm) até atingirem a densidade ótica a 600nm de 0,6 a 0,7. As suspensões foram imediatamente centrifugadas (6.000 xg) durante 10 minutos e os *pellets* bacterianos, ressuspensos em 50 mL de meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem sacarose (ANEXO L).

3.7.4.3 Transformação de discos foliares de tabaco

Para os experimentos de transformação genética de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens* foram coletadas folhas de plantas de tabaco jovens cultivadas em câmara de crescimento, sob condições controladas de fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro), fluxo luminoso ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura (25°C). Em fluxo laminar, as folhas foram desinfetadas por uma série de lavagens: uma rápida (30 segundos) imersão em etanol 70% (v/v), seguido de outra com hipoclorito de sódio 1% (v/v) contendo 0,05% de Tween 20 durante 5 minutos e três lavagens posteriores com água MilliQ autoclavada. Após ligeira secagem sobre papel de filtro, discos foliares de 1 cm de diâmetro, cortados com auxílio de um cortador metálico e distribuídos em placas de Petri estéreis, contendo 10 mL de suspensão de *Agrobacterium* previamente centrifugada e ressuspensa em meio MS foram mantidos por 5 minutos sob agitação manual. Após a infecção, os discos foliares foram transferidos para papel de filtro estéril para retirada do excesso de inóculo, antes de serem transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (ANEXO L) acrescido de vitaminas; 1 mg L^{-1} de bensilaminopurina – BAP (citocinina) e 1 mg L^{-1} de ácido naftalenoacético – ANA (auxina). Os discos foliares foram então mantidos nesse meio de cocultivo a 26°C . Após 48 horas, foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS acrescido de 200 mg L^{-1} de cefotaxima e 100 mg L^{-1} de canamicina.

3.8 Regeneração e seleção *in vitro* de plantas de tabaco transgênicas

A regeneração de plantas de tabaco a partir de discos foliares foi realizada pela transferência dos explantes para diferentes meios de cultura MS, ou seja com variações nas concentrações de fitorreguladores de forma a direcionar o desenvolvimento e morfogênese de tecidos vegetais até a obtenção de uma planta completa.

Os discos foliares foram inicialmente mantidos em placas de Petri contendo meio de cultivo MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de vitaminas, 1 mg L^{-1} de ácido naftalenoacético – ANA (auxina), 1 mg L^{-1} de bensilaminopurina – BAP (citocinina) e os antibióticos cefotaxima e canamicina. Este meio permitiu a formação de cali. Uma vez formados, os cali foram transferidos para frascos do tipo Magenta contendo o mesmo meio MS sólido, até a

formação de brotos, que foram então transferidos após alongamento para novo meio MS desprovido de fitorreguladores, de forma a estimular a formação de raízes. Os brotos que enraizaram foram transferidos para vasos, contendo substrato orgânico mineral (*Plantmax*) e vermiculita em proporção 1: 1 (v:v). Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento sob condições controladas de fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro), fluxo luminoso ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e temperatura (25°C) e posteriormente transferidos para casa de vegetação.

3.9 Análise das plantas de tabaco transformadas da geração T_0 por PCR

3.9.1 Extração de DNA genômico

Discos foliares de 3 cm de diâmetro das plantas transformadas da geração T_0 , foram coletados e mantidos a -80°C para serem utilizados na extração de DNA genômico pelo método descrito por Doyle e Doyle (1987). A técnica de extração se fundamenta no uso do brometo de cetil-trimetil-amônio (CTAB) que funciona como agente caotrópico. As subseqüentes extrações com clorofórmio retêm o material lipídico, ficando na interfase o material das paredes celulares, enquanto o DNA permanece dissolvido na fase aquosa.

Na primeira etapa de extração o tecido vegetal foi macerado em cadinhos, com auxílio de nitrogênio líquido até a formação de um pó, de forma que as paredes e as membranas das células sejam lisadas mecanicamente. O material macerado foi ressuspensionado em tampão de extração (ANEXO M) em pH 8,0.

Após a ressuspensão do material, realizou-se um passo de desproteinização, por extração com solventes orgânicos, clorofórmio e álcool isoamílico, 24:1 (v/v), seguido de centrifugação ($10.000 \times g$) para separação da fase orgânica da aquosa. As proteínas, desnaturadas pelos solventes, permaneceram na interfase e o DNA se manteve na fase aquosa. Logo após a etapa de desproteinização o DNA foi precipitado com etanol 70% (v/v), ressuspensionado em tampão Tris-EDTA acrescido de RNase. Após 30 minutos a 37°C , foi mantido a 4°C .

O DNA genômico foi verificado quanto à integridade e quantificado estimativamente por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X (ANEXO H) a 75 V, por 30 minutos, corado com brometo de etídio ($0,01 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) a 75 V por 30 minutos e visualizado sobre luz UV.

3.9.2 Análise por PCR

O DNA genômico das plantas de tabaco regeneradas *in vitro* foi utilizado na análise por PCR com os *primers* específicos para o gene *nptII*, *forward primer* 5'-GCTTGGGTGGAGAG GCTATT-3' e *reverse primer* 5'-GCGATACCGTAAAGCACGAG-3'. O programa de amplificação utilizado foi o de 1 ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 60°C (anelamento) e 1,5 minuto a 72°C (extensão). O produto resultante da reação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), em tampão TBE 0,5X (ANEXO H), a 75 V por 30 minutos, corado com brometo de etídio (0,01 ng μL^{-1}) e visualizado sobre luz UV.

3.10 Análise genética das plantas transgênicas da geração T₁

O objetivo desta etapa do trabalho foi de selecionar as plantas da geração T₀ que apresentem uma única inserção do transgene através do padrão de segregação da progênie quanto ao caráter de resistência ao antibiótico canamicina, conferida pelo gene *nptII*, presente no T-DNA incorporado no processo de transformação. A segregação Medeliana para um alelo dominante em um único local do genoma das plantas ocorre na proporção 3:1. Assim, as plantas cujas sementes germinadas apresentam segregação de 3 resistentes: 1 sensível foram selecionadas para serem propagadas em casa de vegetação.

As sementes resultantes da autofecundação das plantas regeneradas *in vitro* foram coletadas e armazenadas em estufa a 37°C para secagem. Em seguida, foram desinfetadas por sucessivas lavagens: de imersão rápida (30 segundos) em etanol 70% (v/v), outra com hipoclorito de sódio (1%) por 10 minutos seguido de 3 lavagens de 10 minutos cada, em água MilliQ autoclavada. Após secagem, foram semeadas em placas de Petri contendo meio MS sólido sem sacarose acrescido de canamicina (100 mg L^{-1}), utilizada como agente seletivo dos transformantes.

Para cada genótipo, semeou-se 3 placas de Petri, cada uma contendo aproximadamente 100 sementes, totalizando assim 300 indivíduos por genótipo. As placas foram mantidas por um mês em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura (25°C), umidade e fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro). Após esse período, realizou-se a contagem do

número de sementes resistentes e sensíveis ao agente seletivo. Os valores obtidos foram então submetidos ao teste χ^2 para determinação do padrão de segregação tipo 3:1. Os genótipos que apresentaram padrões de segregação tipo 2:1, 15:1 e 1:0, indicativas de homozigose letal, presença de duas cópias independentes e presença de duas cópias ligadas respectivamente, foram desconsiderados.

Os testes de χ^2 foram realizados conforme fórmula abaixo com um grau de liberdade e 5% de probabilidade ($\chi^2=3,84$).

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

Onde: **Or:** Número observado de plântulas resistentes

Er: Número esperado de plântulas resistentes

Os: Número observado de plântulas sensíveis

Es: Número esperado de plântulas sensíveis

As plântulas que apresentaram o padrão de segregação de 3R : 1S foram mantidas em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura (25°C), fotoperíodo (16 hs de luz e 8 hs de escuro) e luminosidade (item 3.7), até se obterem plantas adultas da geração T₁, que foram novamente autofecundadas. As sementes de 10 plantas da geração T₂ foram novamente avaliadas para seleção dos genótipos não segregantes. A ausência de segregação na geração T₂ indica homozigose para o gene de interesse.

3.11 Análises moleculares das plantas transgênicas de tabaco da geração T₂

3.11.1 *Southern blot*

Plantas adultas da geração T₂, pertencentes às linhagens transgênicas homozigotas para o gene *miox2* (SM 1-7), às linhagens homozigotas controle para o vetor Gateway (CG 1-3) e uma planta da linhagem selvagem (WT) foram utilizadas para as análises.

O DNA genômico foi extraído a partir de 2 g de tecido foliar pelo método do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) descrito no item 3.9.1.

Cada amostra de DNA (10 µg) foi submetida à digestão com as enzimas de restrição *Hind*III e *Eco*RI (Invitrogen) separadamente. As reações foram mantidas a 37°C por 16 horas e posteriormente precipitadas pela adição de 1/10 do volume total de acetato de amônia e 2,5 vezes o volume total de etanol absoluto. As amostras foram deixadas a -20°C por 24 horas. Após centrifugação (14.000 xg) por 40 minutos a 4°C, o precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 70% (v/v), seguido de centrifugação e secagem, antes de ser ressuspensionado em 40 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5). Os fragmentos de digestão foram então separados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídio (0,01 ng.µL⁻¹) em tampão TBE 0,5X (ANEXO H). Como marcador de peso molecular utilizou-se o *Gene Ruler*TM 1 kb DNA *Ladder* (Fermentas). O gel foi submetido a uma corrente de 35V por 15 horas e fotografado juntamente com uma régua visível sobre luz UV, que permite correlacionar a altura da banda obtida ao peso molecular do marcador.

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

Após lavagem, o DNA foi transferido do gel para a membrana de *nylon Hybond-N+* (Amersham Biosciences) por capilaridade utilizando-se a solução de transferência 20X SSC (ANEXO N) por 16 horas, de acordo com Sambrook et al. (1989). O DNA foi fixado à membrana por aquecimento a 80°C durante 2 horas.

Como sonda para hibridização utilizou-se o produto da reação de PCR do plasmídeo *Gateway pK2WG7* com os *primers* específicos para o gene *nptII forward* (5'-GCTTGGGTGGAGAGGCTATT-3') e *reverse* (5'-GCGATACCGTAA AGCACGAG-3'). A reação foi feita como descrito no item 3.8.2 e o produto foi purificado com auxílio do *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN). Para a purificação foram adicionados 5 volumes de tampão PB fornecido pelo *kit* a um volume (42 µL) de reação de PCR. A amostra foi aplicada na coluna *QIAquick* disposta num tubo coletor e centrifugada (13.000 xg) por um minuto à temperatura ambiente. O percolato foi descartado e a coluna lavada com 750 µL de tampão PE, também fornecido pelo *kit*, acrescido de etanol e centrifugado a (13.000 xg) por um minuto à temperatura ambiente. Realizou-se uma centrifugação adicional da coluna para total remoção do etanol

residual. A coluna foi então disposta em um tubo *eppendorf* de 1,5 mL antes da eluição do DNA com 30 μL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,5) por centrifugação (13.000 $\times g$) por 1 minuto à temperatura ambiente. O DNA purificado foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) e coloração com brometo de etídio (0,09 ng μL^{-1}).

A sonda foi marcada de forma não radioativa com auxílio do kit *Gene ImagesTM Alkphos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), segundo normas do fabricante. Para isso, 1 μL do produto da reação de PCR (aproximadamente 100 ng) diluído em 9 μL de água MilliQ autoclavada, foi desnaturado a 98°C por 7 minutos e transferido imediatamente para gelo onde permaneceu por 5 minutos antes da adição de: 10 μL de *Reaction Buffer*, 2 μL de *Labelling Reagent* e 10 μL de *Linker* diluído em água MilliQ 1:4 (v/v) todos eles fornecidos pelo *kit*. Esse mix foi então mantido a 37°C por 30 minutos. Todos os passos subsequentes foram realizados com auxílio de uma garrafa de hibridização *Hibridiser HB-2B* (Techne).

A membrana foi colocada na garrafa de hibridização à qual adicionou-se o tampão de hibridização (ANEXO O) pré-aquecido a 55°C. Após 15 minutos, adicionou-se a sonda já marcada. Após 16 horas a 55°C, a membrana foi lavada duas vezes com tampão de lavagem I (ANEXO P) por 10 minutos a 55°C no hibridizador, seguidas de duas lavagens de 5 minutos cada, com o tampão de lavagem II (ANEXO Q) à temperatura ambiente.

Após as lavagens de pós-hibridização, a membrana foi colocada sobre um plástico e sobre ela foram distribuídos homogeneamente 400 μL do reagente de detecção fornecido pelo *kit*. Após 5 minutos, o excesso do líquido de detecção foi removido com auxílio de uma régua e as bordas do saco plástico seladas. Em câmara escura, um filme de auto-radiografia foi exposto sobre a membrana hibridizada, mantida na ausência de luz no interior de um cassete de raios X. O tempo de exposição do filme foi de aproximadamente 5 horas. Após a exposição, o filme foi revelado manualmente em câmara escura na seguinte sequência de lavagens: 4 minutos em solução reveladora GBX diluída (Kodak), 1 minuto em água, 15 minutos em solução fixadora GBX diluída (Kodak) seguida de lavagem em água por 15 minutos.

3.11.2 *Northern blot*

Os padrões de expressão do transgene *miox2* de *Arabidopsis thaliana*, do gene *miox* endógeno de tabaco reativo ao RNA ribossômico 18S foram analisados por *Northern blot* a

partir do tecido foliar e caulinar das linhagens homozigotas de tabaco transgênicas (SM), controle Gateway (CG) e da linhagem selvagem (WT).

3.11.2.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído pelo método TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) a partir de discos foliares e amostras de caules das linhagens homozigotas de tabaco transgênico e controles. Amostras (100 mg) do material vegetal foram pulverizadas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos em 1 mL de TRIzol[®] Reagent. Após adição de 200 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados por inversão durante 15 segundos e mantidos por 2 ou 3 minutos à temperatura ambiente, antes das amostras serem centrifugadas por 15 minutos (12.000 xg) a 4°C. Em seguida, à fase aquosa ser transferida para outro tubo, acrescentou-se 500 µL de álcool isopropílico. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (12.000 xg) por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v) e centrifugado (7.500 xg) por 5 minutos a 4°C. Após secagem por 10 minutos, foi ressuscitado em 50 µL de água tratada com DEPC 0,1% (v/v). A quantificação das amostras de RNA foi realizada por espectrofotometria, sendo a concentração calculada, para uma cubeta de 10 mm, através da seguinte fórmula:

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

Sendo: **A₂₆₀**: absorvância da amostra sobre o comprimento de onda de 260^{nm}.

Fc: fator de conversão, no qual 1 unidade de absorvância a 260^{nm} corresponde a 40 µg de RNA mL⁻¹ (SAMBROOK et al., 1989).

Fd: fator de diluição da amostra de leitura, no caso 200 [4 µL de amostra em 800 µL de água tratada com DEPC 0,01% (p/v)].

1000: fator de correção para obtenção de concentração em µg mL⁻¹.

A qualidade de cada amostra de RNA foi verificada com base na relação $A_{260}^{nm}/A_{280}^{nm}$, sendo que valores entre 1,6 e 2, indicam boa qualidade do RNA extraído e também pelo perfil eletroforético de 1 µg de amostra a 75 V por 30 minutos em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X (ANEXO R) (SAMBROOK et al., 1989).

As amostras foram então subaliquotadas em frações de 45 µg, precipitadas com 2,5 volumes de acetato de amônio (7,8 M) e pH 5,3 junto com 2 volumes de etanol absoluto e armazenadas a -80°C até o momento do uso, quando foram submetidas a centrifugação (16.000 xg) por 40 minutos a 4°C. Em seguida o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) seguido de centrifugação (12.000 xg) por 15 minutos a 4°C e secagem de 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado diretamente em 17 µL do tampão de amostra para RNA (SAMBROOK et al., 1989) (ANEXO S) antes de ser submetido à eletroforese a 75V por 60 minutos em gel desnaturante de agarose 1% (p/v) em tampão MOPS 10X contendo formaldeído 12,3 M (HAMES; HIGGINS, 1995) (ANEXO T). O RNA foi transferido para membrana de *nylon Hybond-N+* (Amersham Biosciences) seguindo a mesma metodologia utilizada para o *Southern blot*. A membrana foi submetida a secagem a 80°C por 2 horas.

3.11.2.2 Sonda para detecção do transgene *miox2*

Como sonda para detecção do transgene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* utilizou-se o produto da reação de PCR do plasmídeo *Gateway pK2WG7* com o *forward primer* 5'-TCCGCAAAAATCACCAGTCT-3' e *reverse primer* 5'-TGGTTTTAGGTCACTGGACG-3', específicos para o terminador 35S, com temperatura de anelamento de 60°C, em termociclador da *Applied Biosystems – GeneAmp® PCR System 9700*. O produto foi purificado com auxílio do kit *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN) de acordo com o procedimento utilizado no item 3.11.1.

3.11.2.3 Sonda para detecção do gene *miox* endógeno

A sonda para detecção do gene *miox* endógeno de tabaco foi preparada por uma reação de RT-PCR a partir do RNA mensageiro de folhas de tabaco, com auxílio do kit *SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen). Para cada reação adicionou-se 25 µL de 2X *Reaction Mix* contendo 0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO₄, 10 µg de mRNA, 0,2 µM de *primers* específicos para o gene *miox* de tabaco, cuja sequência foi obtida do RNA mensageiro de tabaco disponível no NCBI (nº de acesso AF154639), *forward primer* 5'-GGGAAAATCCAAGACACCAA-3' e *reverse primer* 5'-GCAGCATAAGGAAGAGGAGGT-3', juntamente

com 1 μ L de RT-*Platinum*[®] *Taq Mix* e água milliQ autoclavada, até completar o volume final de 50 μ L por reação.

O programa utilizado para a reação de amplificação foi de 1 ciclo de 15 minutos a 50°C para síntese do cDNA, seguido de 38 ciclos de 15 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C. O produto da reação de RT-PCR foi purificado do gel de agarose low-melting, com auxílio do *kit QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN) de acordo com o procedimento utilizado no item 3.11.1.

3.11.2.4 Sonda para detecção do RNA ribossômico 18S

A fim de realizar uma quantificação relativa e uniforme das amostras de RNA transferidas para a membrana de *nylon Hybond-N+* foi utilizada uma sonda de DNA (600 pb) complementar ao RNA ribossômico 18S de ervilha fornecida gentilmente pelo Dr. Eric Lam da *State University of New Jersey*.

3.11.2.5 Marcação das sondas e Detecção do Sinal

As sondas foram marcadas de forma não radioativa com auxílio do *kit Gene Images*TM *Alkphos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), segundo procedimento do item 3.10.1.

A hibridização foi realizada à temperatura de 55°C, em forno de hibridização *Hibridiser* HB-2B (Techne) da mesma forma que no item 3.10.1.

A detecção dos pontos de hibridização foi realizada com auxílio do *kit* de detecção *Gene Images*TM *Alkphos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences) como já descrito no item 3.10.1.

As etapas de hibridização, marcação e detecção, foram repetidas três vezes, uma vez com cada sonda. A primeira sonda utilizada foi a correspondente à expressão do gene *miox2* de *A. thaliana*, a segunda sonda utilizada foi a correspondente ao gene *miox2* de tabaco (gene endógeno) e a última foi a sonda para detecção de RNA ribossômico 18S.

Entre cada hibridização a membrana foi submetida a lavagens com 100 mL de tampão Tris-HCl 100 mM acrescido de SDS 1% por uma hora a 60°C, seguida de três lavagens adicionais de 10 minutos cada, a 60°C, com 60 mL de tampão Tris-HCl 100 mM.

3.11.3 RT-PCR quantitativa

Os padrões de expressão do transgene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* nas plantas de tabaco transgênicas e controles, foram verificados por análise de RT-PCR quantitativa. Esta técnica se baseia no uso de um corante fluorescente específico que se incorpora na dupla fita de DNA, produzido e monitorado em cada ciclo de amplificação. A técnica permite determinar com alta sensibilidade o nível relativo de transcritos de genes específicos e genes de expressão constitutiva, inclusive os de baixa expressão, que apresentam quantidades de RNA mensageiro insuficientes para detecção por *Northern blot*.

Amostras de RNA total extraído a partir de tecido caulinar (100 mg) das plantas de tabaco controle e homozigotas para o transgene de interesse, com auxílio do reagente TRIzol[®] da Invitrogen (ver item 3.10.2.1), foram utilizadas para as análises de RT-PCR quantitativa.

A quantidade e qualidade das amostras de RNA total extraídas foram verificadas por leitura em espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose 1 % como descrito no item 3.10.2.1.

A partir de amostras de 75 µg de RNA total, procedeu-se à obtenção do RNA mensageiro com auxílio do *Dynabeads[®] mRNA Purification Kit* (Dyna), conforme recomendações do fabricante. A metodologia desse *kit* baseia-se no pareamento de bases entre resíduos poli A da extremidade 3' da maioria dos mRNAs e resíduos *oligo* dT covalentemente ligados à superfície dos *Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅*. Assim, outros tipos de RNAs desprovidos de resíduos poli A não apresentam complementaridade aos *Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅* e são facilmente eliminados. Para isso, as amostras de 75 µg de RNA total ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação (ANEXO V) foram aquecidas a 65 °C por 2 minutos para quebra das estruturas secundárias. Nesse intervalo, 200 µL (1 mg) de *Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅* foram transferidos do estoque para um tubo *eppendorf*, para serem lavados duas vezes com auxílio do *Dyna MPC[®]-S*, um concentrador de partículas magnético. Após lavagem com tampão de ligação, os *oligos (dT)₂₅* foram ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação (ANEXO U) e adicionados às amostras

de 75 µg de RNA já ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação. A amostra de RNA complexada aos *oligo* (dT)₂₅, foi mantida sob agitação constante por 5 minutos à temperatura ambiente com auxílio de um agitador *sample mixer* (Dyna) que acompanha o *kit*. Uma vez homogeneizadas, as amostras foram colocadas no concentrador de partículas. O sobrenadante foi removido depois de 30 segundos, e o precipitado, lavado com 200 µL de tampão de lavagem B (ANEXO V). Todas as lavagens foram realizadas com auxílio do concentrador magnético, sempre descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo o material precipitado por magnetismo.

Ao final das lavagens, o RNA mensageiro foi eluído pela adição de 20 µL de Tris-HCl 10 mM ao material precipitado e mantido a 65°C por 2 minutos. Os tubos foram imediatamente transferidos para o concentrador magnético *Dyna MPC*[®]-S e o RNA mensageiro eluído, transferido para novos tubos eppendorf livres de RNases.

O cDNA foi obtido a partir do RNA mensageiro purificado, com auxílio do *kit SuperScript*[™] III *First-Strand Synthesis Supermix* RT-PCR (Invitrogen) segundo normas do fabricante. Para isso, 6 µL das amostras de RNA mensageiro foram misturadas a 1 µL de *Random Hexamers primers* e 1 µL de tampão de anelamento, ambos fornecidos pelo *kit*. As reações foram mantidas a 65°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para gelo por um minuto. Após breve centrifugação, adicionou-se 10 µL do *mix 2X First-Strand Reaction* e 2 µL de *mix* enzimático *SuperScript*[™] III/*RNaseOUT*[™]. As reações (20 µL) foram centrifugadas brevemente e em seguida mantidas por 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 50°C seguidos de 5 minutos a 85°C.

As reações de amplificação foram realizadas com auxílio do termociclador *iQ*[™]5 *Multicolor Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD) e do programa *iQ*[™] 5 *Optical System Software* (Version 2.0) (BIO-RAD).

Três pares de *primers* foram utilizados para as análises. Um par, específico para o gene *miox* endógeno de tabaco, já discriminado no item 3.11.2.3. Outro par de *primers*, específicos para o transgene *miox2* de *A. thaliana*, descritos por Kanter et. al. (2005): *forward primer* 5'-TGATATGAATTTCTTGGGCCATT-3' e *reverse primer* 5'-ATCTTGTTAAGTTTTCCATAC TCTTCC-3' e um terceiro par de *primers* específicos para o gene da ubiquitina de expressão constitutiva: *forward primer* 5'-AGACATTGACTGGGAAGACCA-3' e *reverse primer* 5'-GAG ACGGAGGACAAGGTGAC-3'. O nível de expressão do gene da ubiquitina foi utilizado como referência na normalização dos dados.

Para cada reação utilizou-se 12,5 µL do *mix Platinum*[®] SYBR[®] *Green qPCR Supermix-UDG*, 1 µL de cada *primer* (10 µM), 1 µL de cDNA e água MilliQ autoclavada para completar o volume final de 25 µL de reação.

O programa utilizado no termociclador foi de um ciclo inicial de 15 minutos a 95°C, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C. Todas as reações foram preparadas em triplicata para cada um dos pares de *primers*.

A eficiência dos *primers* foi calculada utilizando-se diluições da concentração inicial do cDNA (1/2, 1/10 e 1/100) de uma das plantas transgênicas. Essas diluições foram preparadas para estabelecer uma curva padrão que relaciona a quantidade inicial de cDNA nas diluições e o Ct (*Threshold Cycle*), ciclo no qual são detectados aumentos significativos na emissão de fluorescência. Para o cálculo da eficiência dos *primers* utilizou-se o software REST[©] (PFAFFL et al., 2002) e para normalização dos dados utilizou-se o modelo matemático que determina o nível de transcritos de um determinado gene de interesse relativo à expressão de um gene de referência (PFAFFL, 2001).

3.12 Análise química dos componentes da parede celular

O efeito da superexpressão do transgene *miox2* nas rotas de biossíntese de celulose e hemiceluloses nas linhagens transgênicas de tabaco foram avaliados pela análise química dos componentes das paredes celulares dessas plantas em relação às controles. Plantas adultas da geração T₂, pertencentes às linhagens transgênicas homozigotas para o gene *miox2* (SM), às linhagens controle Gateway (CG) e plantas da linhagem selvagem (WT), foram utilizadas para as análises.

Sementes das plantas homozigotas foram semeadas em vasos contendo substrato organo-mineral (*Plantmax*) e vermiculita em proporção (v:v). As sementeiras foram mantidas por duas semanas em câmara de crescimento (CONVIRON E15) sob condições controladas de fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro), fluxo luminoso (250 µmol m⁻² s⁻¹) e temperatura (25°C). Após esse período, as plântulas foram transferidas individualmente para vasos pequenos (1 L) e mantidas em câmara de crescimento sob as mesmas condições, onde permaneceram por mais duas semanas antes de serem transplantadas para vasos maiores (3 L) e transferidas para casa de

vegetação onde foram distribuídas de forma aleatória. A irrigação foi realizada com regas diárias com água e intercaladas com regas com solução nutritiva (*Plantmax*) três vezes por semana.

As plantas foram mantidas até o início da fase reprodutiva, aproximadamente 90 dias depois do início da germinação. Nesse momento amostras de 25 cm de caule (região próxima à base) foram coletadas. A casca foi removida manualmente e descartada. O tecido xilemático e o parênquima medular foram separados cuidadosamente, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e liofilizados por 24 horas em câmara de liofilização a -50°C . Em seguida, os tecidos secos foram moídos em moinho tipo micro-wiley MA 048 (Marconi™) e a serragem transferida para plataforma de extração *Soxhlet* onde se realizou a remoção dos extrativos (compostos solúveis em solventes orgânicos como ácidos graxos, resinas, ceras, ésteres, etc).

A remoção de extrativos foi realizada em duas etapas, sendo a primeira uma remoção com uma mistura de toluol/etanol (v:v) durante 4 horas e a segunda com etanol 95% (v/v) por outras 4 horas. As amostras foram mantidas a 104°C por aproximadamente 8 horas a fim de retirar a umidade para obtenção do peso de matéria seca.

O material seco, após a remoção dos extrativos, foi submetido a um processo de hidrólise ácida. Esse tratamento provoca a quebra de ligações glicosídicas em carboidratos complexos, liberando os monossacarídeos constituintes dos polímeros de paredes celulares e do protoplasto. A solução resultante da hidrólise contém as unidades de açúcares, ácidos urônicos e a fração de lignina solúvel. O resíduo sólido obtido após a retirada do ácido foi considerado lignina residual (insolúvel), cujas quantidades foram determinadas por pesagem após a secagem a 104°C .

A hidrólise ácida foi realizada segundo a metodologia descrita por Effland (1977). Para isso, parte (54 mg) da amostra moída e seca, foi transferida para tubo Falcon™ (15 mL) ao qual adicionou-se 500 μL de H_2SO_4 (24 N). A amostra foi então mantida a 30°C por uma hora, sob agitação manual realizada com auxílio de um bastão de vidro a intervalos de 15 minutos. Em seguida adicionou-se 14 mL de água MilliQ a fim de ajustar a concentração do ácido sulfúrico para 0,86 N. As amostras foram autoclavadas (120°C ; 1 atm) por 1 hora e imediatamente transferidas para gelo a fim de se paralisar o processo de hidrólise.

O resíduo proveniente do processo de autoclavagem foi filtrado em membrana de 47 mm (GF-92 Schleicher e Schüll), acoplada a copo de filtração com placa porosa, com auxílio de kitassato associado a uma bomba de vácuo. O resíduo sólido resultante dessa filtração

corresponde à lignina solúvel, que foi determinada por pesagem após secagem por 8 horas a 104°C.

A solução obtida após a filtragem é denominada de hidrolisado secundário. Nele se encontra a lignina solúvel que foi determinada por espectrofotometria a 215 nm e 280 nm segundo a metodologia TAPPI T259 um-75 (TAPPI, 1991b). O hidrolisado secundário foi utilizado também para determinação do conteúdo de monossacarídeos e ácidos urônicos via *High Performance Anion Exchange – Pulsed Amperometric Detection* – HPAE-PAD, de acordo com a metodologia de Fardim e Duram (2001) e com auxílio do equipamento ICS 2500 HPLC Dionex[®] e colunas de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA10 (2 x 250 mm).

Para determinação dos monossacarídeos foram construídas as curvas de concentração de acordo com os padrões L-arabinose, D-galactose, D-glicose, D-xilose, D-manose e D-rhamnose, todos da Sigma[®].

Já para determinação dos ácidos urônicos, construiu-se uma curva de concentração para cada ácido, utilizando-se os padrões de ácido D-glucurônico (Sigma[®]) e D-galacturônico (Fluka[®]).

3.13 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada considerando-se 9 tratamentos (5 linhagens transgênicas para o gene *miox2* de *Arabidopsis*; 3 linhagens transgênicas controle do vetor gateway “vazio” e 1 linhagem selvagem não transformada) com 5 repetições (plantas) para cada genótipo. Todas as análises de composição química de parede celular foram realizadas em triplicata para cada tratamento. O teste de *Dunnnett* foi utilizado nas análises estatísticas, com auxílio do *SAS Software* (2000) ao nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência correspondente ao cDNA do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana*, clonada no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO®, foi determinada a partir de uma sequência ortóloga de *Sus scrofa* (ARNER et al., 2001) (Figura 15).

LOCUS	NM_127538	1212 bp	mRNA	linear	PLN 20-AUG-2002
DEFINITION	Arabidopsis thaliana chromosome 2 CHR2v07142002 genomic sequence.				
ACCESSION	NM_127538				
VERSION	NM_127538.1 GI:18399157				
SOURCE	Arabidopsis thaliana (thale cress)				
ORGANISM	Arabidopsis thaliana				

Figura 15 – Dados da sequência do mRNA do gene *miox2* de *Arabidopsis* utilizados para realizar a clonagem (DEFÁVARI-NASCIMENTO, 2005)

Essa sequência, com número de acesso no banco de dados do NCBI: NM_127538, foi posteriormente clonada por Lorence et al. (2004) e Kanter et al., (2005) sendo que o seu nome foi modificado para *Myo Inositol Oxigenase 2* ou *miox2* (Figura 16).

LOCUS	NM_127538	1318 bp	mRNA	linear	PLN 20-APR-2007
DEFINITION	Arabidopsis thaliana MIOX (MYO-INOSITOL OXYGENASE 2) (MIOX2) mRNA, complete cds.				
ACCESSION	NM_127538				
VERSION	NM_127538.3 GI:145360118				
SOURCE	Arabidopsis thaliana (thale cress)				
ORGANISM	Arabidopsis thaliana				

Figura 16 – Dados atualizados no NCBI da sequência de mRNA *miox2* de *Arabidopsis thaliana*

Para a clonagem do gene no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO® da Invitrogen, utilizou-se a sequência correspondente à região aberta de leitura (954 pb) (Figura 17), com auxílio da ferramenta do NCBI, ORF *Finder* descrito em Defáviri-Nascimento (2005).

Os *primers* utilizados para a clonagem foram determinados com base na região aberta de leitura de 954 pb, através do programa *Primer 3* (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) (DEFÁVARI-NASCIMENTO, 2005) (Figura 18).

1 atgactattcttgttgacacatttggcttcctgattccaagagtggat
M T I L V E H F V P D S R V D
46 gaaaagaagtgatagaggagggataaataattggtgttgat
E K K V I E E R D N E L V L D
91 ggagggttttgggttccaaaatcaaaggaaacgatgcattcgat
G G C F V V P K S K E T D A F D
136 gctcctctgatatgaatttcttggtggcattccttcagggtattgatg
A P D M N F L G H S F R D Y E
181 aatggtgaaagcgagagacaacaaggtgttgaggaattttacagg
N G E S E E R Q Q G V E E F Y R
226 atgcaacacattcaccagacctatgactttgtgaagaagatgagg
M Q H I H Q T Y D F V K K M R
271 aaagagtatggaaaacttaacaagatggaatgagtatatgggaa
K E Y G K L N K M E M S I W E
316 tgttgtgagttattgaacaatgtgttgatgaagcgatccggat
C C E L L N N V V D E S D P D
361 cttgatgagcctcaaattcaacaccttctccaaaccgctgaagcc
L D E P Q I Q H L L Q T A E A
406 attcgaagggaactatcccgacgaagattggctccatctcactgcc
I R R D Y P D E G D W L H L T A
451 ctaatccatgatcttggcaaggttctccttctgccagaattcggg
L I H D L G K V L L L P E F G
496 ggtcttccccagctgggtgcgtgctgcgatacatttccagttgga
G L P Q W A V V G D T F P V G
541 tgtaccttcgactcagccaatattcaccacaagtatttcaaagga
C T F D S A N I H H K Y F K G
586 aaccatgatatacaacaacccaaagatacaacacaaaataggagt
N H D I N N P K Y N T K N G V
631 tacactgaaggatgtggtttagacaatgttctcatgctatgggg
Y T E G C G L D N V L M S W G
676 catgacgactacatgtatttgggtgctcaagaagaagtgacgacc
H D D Y M Y L V A K K N G T T
721 ctctctcagctgggtctcttcattattcgatattcctctttat
L P H A G L F I I R Y H S F Y
766 ccattgcacaaggcaggccttcacacacattgtaacgatgag
P L H K A G A Y T H L M N D E
811 gacagagatgatctcaagtggtccatgtcttcaataaataatgac
D R D D L K W L H V F N K Y D
856 ctatacagtaagacaaagttctggtagatgtcgaaacaagtgaag
L Y S K S K V L V D V E Q V K
901 ccttactacatttcactcatcaacaagtatttccggcgaaacta
P Y Y I S L I N K Y F P A K L
946 aaatggtga 954
K W *

Figura 17 – Sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos deduzida do mRNA do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* (DEFÁVARI-NASCIMENTO, 2005).

[illegible]

Figura 18 – Sequências dos *primers* desenhados com base nas regiões 5' e 3' da ORF, para a clonagem do cDNA de *miox2* de *Arabidopsis thaliana* no vetor de entrada TOPO®

4.1 Expressão do cDNA do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* em *E. coli*

O cDNA do gene *miox2* de *Arabidopsis*, clonado no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO®, foi seqüenciado a fim de se verificar a sua similaridade com a seqüência depositada no banco de dados do NCBI.

Como a análise de BLAST realizada mostrou valores de similaridade superiores a 93% (DEFÁVARI-NASCIMENTO, 2005) o cDNA foi então subclonado no vetor de expressão Gateway® pDEST™17 e imediatamente utilizado para transformar a linhagem de *E. coli* BL21-AI™One Shot® por choque térmico, para expressão da proteína recombinante.

As frações da proteína recombinante purificada, eluídas da coluna de purificação de proteínas fornecidas pelo kit *ProBond™ Purification System* (Invitrogen), foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 19A). As bandas referentes à proteína MIOX2 apresentam peso molecular de aproximadamente 45 kDa. Para identificar de maneira específica a proteína recombinante MIOX2 purificada, foram realizadas análises de imunomarcação por *Western Blot* (Figura 19B).

Figura 19 – **A** Eletroforese em gel SDS-PAGE e **B** *Western Blot* de frações da eluição da proteína MIOX2 recombinante (indicado pelas setas), expressa na linhagem de *E. coli* BL21-AI™One Shot® e purificada em colunas *ProBond™* (Invitrogen). **PM**: marcador de peso molecular em kDa *Broad Range – SDS-PAGE Standards* (BIO-RAD) **1**: fração de eluição com 50 mM de Imidazol e pH 8,0; **2**: fração de eluição com 100 mM de imidazol e pH 6,3; **3**: fração de eluição com 200 mM de Imidazol e pH 6,3; **4**: fração de eluição com 500 mM de Imidazol e pH 6,3

A imunomarcação permitiu confirmar a identidade da MIOX2 purificada nas frações eluídas. Na primeira fração (fração 1) da figura 19A, as análises revelam a presença de outras proteínas de diferente peso molecular. Essas bandas adicionais foram também detectadas pela marcação com anticorpo (Figura 19B), podendo corresponder a produtos de degradação da proteína MIOX2 purificados pela presença da cauda de 6 histidinas na sua seqüência de aminoácidos ou alternativamente, como foi também observado por Arner et al. (2001), a proteína MIOX2 recombinante forma corpos de inclusão insolúveis. Por este motivo, foi selecionada uma nova faixa de concentrações de imidazol, a fim de se encontrar a mais adequada para melhorar a eficiência de purificação da enzima de interesse, estabelecendo assim que 300 mM é o valor da concentração de imidazol ideal para a purificação da MIOX2 (Figura 20).

Figura 20 – **A** Eletroforese em gel SDS-PAGE e **B** Western blot de frações da eluição de MIOX2 recombinante, expressa em bactérias *E. coli* BL21-AI™One Shot® e purificada em colunas ProBond™ (Invitrogen). As concentrações de Imidazol testadas foram (250; 300; 400 e 500) mM

4.2 Testes de atividade enzimática da MIOX2 *in vitro*

Os resultados obtidos a partir das análises de cinética da enzima MIOX2 recombinante, permitiram verificar a sua atividade *in vitro* pela produção de ácido glucurônico, após incubação com o substrato mio-inositol.

A enzima mostrou atividade catalítica à temperatura de 30°C, apresentando valores de $K_m = 59,03$ mM, calculados por análises de regressão segundo a equação de Lineweaver-Burk (Figura 21). A atividade catalítica da enzima MIOX2 foi determinada em outras espécies, apresentando grandes variações nos valores de K_m , segundo o organismo e método utilizado. Charalampous et al. (1958) obtiveram valores de K_m de 22 mM a 43 mM, em ensaios de atividade enzimática com MIOX purificada de extratos de fígado de rato. A atividade da MIOX

foi também testada em extratos brutos de plântulas de aveia e com valores de $K_m = 4,3$ mM (KOLLER et al., 1976). Já, os testes de atividade enzimática realizados por Arner et al. (2001), o valor de K_m encontrado para a enzima MIOX2 recombinante clonada a partir de fígado de porco (*Sus scrofa*) e posteriormente expressa e purificada em *E. coli* foi de 5,9 mM. Os valores de K_m são altamente variáveis em relação ao organismo de origem da MIOX recombinante. A enzima clonada de fígado de rato, por exemplo, apresentou valores de $K_m = 24,7$ mM enquanto que em humanos esse valor foi de 5,8 mM (ARNER et al., 2004).

É possível que o elevado K_m observado para a enzima MIOX2 seja devido a uma perda de atividade durante as análises, em função de algum tipo de inibição ou mesmo pela degradação da proteína. Deve ser considerado também, que a atividade catalítica foi determinada somente para a isoforma MIOX2, que pode diferir das demais isoformas.

Figura 21 – Parâmetros cinéticos da oxidação do mio-inositol pela enzima MIOX recombinante. **A** As concentrações de mio-inositol variaram de 5 mM até 100 mM e o ácido D-glucurônico foi determinado por HPAE-PAD de acordo com a metodologia mencionada no item 3.5. **B** Análise de regressão pela equação de Lineweaver–Burk

A confirmação da atividade catalítica da enzima MIOX2 recombinante oriunda de *Arabidopsis thaliana* permitiu a continuidade dos experimentos de transformação de plantas, via superexpressão do cDNA do gene *miox2* em *Nicotiana tabacum*.

4.3 Clonagem do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* no vetor binário Gateway pK2WG7

Logo após a reação de recombinação sítio específica, em que o gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* foi subclonado no vetor binário pK2WG7, procedeu-se à transformação da linhagem DH5 α TM quimicamente competente de *E. coli* (*Library Efficiency*[®] DH5 α TM, Invitrogen). A verificação da clonagem foi realizada por PCR de oito clones bacterianos que se desenvolveram em meio seletivo contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹) e *primers* específicos para o transgene *miox2*. Pela figura 22, observa-se a presença de um produto de amplificação correspondente a aproximadamente 1 kb, tamanho esperado para o cDNA da *miox2* inserido no vetor binário. Um dos clones recombinantes foi purificado em meio seletivo e mantido em glicerol (25%) a -80°C, para ser utilizado para a propagação do plasmídeo recombinante.

Figura 22 – Perfil electroforético dos produtos de amplificação das colônias de *E. coli* DH5 α TM com os *primers* *miox2*. Com exceção da colônia 6, as demais colônias (1-5; 7 e 8) são recombinantes; PM= marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen); pb = pares de bases

4.4 Transformação da linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

O DNA plasmidial recombinante purificado a partir do clone de DH5 α TM selecionado em espectinomicina, foi utilizado para transformação da linhagem desarmada EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*. Os clones de *Agrobacterium* que se desenvolveram em meio seletivo AB agar contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹) foram também analisados por PCR, a fim de se verificar a inserção do cDNA *miox2*. Assim, alguns clones resultantes da transformação com o vetor recombinante (pK2WG7/*miox2*), controle (pK2WG7) vazio, ou seja, desprovido do transgene. Os *primers* utilizados para as amplificações foram os *primers* *miox2* e *nptII*, respectivamente (Figura 23). As diferenças entre o tamanho dos produtos das reações de

amplificação confirmam os tamanhos esperados, de aproximadamente 1 kb para os fragmenos obtidos da amplificação com os *primers* da *miox2* e de 700 pb para os *primers* específicos para o gene *nptII*.

Figura 23 - Perfil eletroforético obtido da análise por PCR de colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com o vetor pK2WG7 recombinante e o vetor pK2WG7 desprovido do gene *miox2*. PM, marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen); SM, produto da PCR do DNA plasmidial pK2WG7 recombinante purificado com os *primers* *miox2*; Colônias (1-4) amplificaram com os *primers* para o gene *miox2*; CG, produto da PCR do DNA do plasmidio pK2WG7 desprovido do gene *miox2* purificado e amplificado com os *primers* *nptII*; Colônias 5 e 6 amplificaram com os *primers* para o gene *nptII*; pb, pares de bases

4.5 Transformação genética de discos foliares de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*

Os experimentos de transformação dos discos foliares de tabaco, foram realizados com duas linhagens de *A. tumefaciens*. Uma transformada com o vetor recombinante pK2WG7/*miox2* e outra com o vetor pK2WG7, desprovido do gene *miox2*, utilizado como controle. O objetivo deste controle foi o de discriminar os possíveis efeitos secundários no crescimento e desenvolvimento das plantas, oriundos dos genes presentes na região do T-DNA. Após o período de co-cultivo, os discos foliares foram transferidos para meio MS acrescido de cefotaxima e canamicina. A cefotaxima é um bacteriostático que foi utilizado para restringir o desenvolvimento da *Agrobacterium*. Já a canamicina foi utilizada como agente seletivo das plantas transgênicas portadoras de gene *nptII* e portanto, resistentes aos efeitos letais do antibiótico. No caso dessa construção gênica, o gene *nptII* começa a se expressar em plantas pela ação da sequência promotora *nos*, da nopalina sintase. Os fitohormônios ANA (0,1 mg L⁻¹) e BAP (1 mg L⁻¹), uma auxina e outra citocinina, induziram a formação de cali depois de aproximadamente 30 dias. Os discos não inoculados (controle negativo) morreram rapidamente

evidenciando assim o efeito inibitório da canamicina no crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais. Os cali produziram brotações pela diferenciação de algumas das suas células que após um período de alongamento foram transferidas para meio de enraizamento (Figura 24A-E).

Durante a etapa de alongamento, uma das plântulas do experimento controle desenvolveu uma estrutura floral, inclusive antes de ser transferida para meio de enraizamento (Figura 24F). Este fato demonstra a instabilidade genética e fisiológica das plantas obtidas por regeneração *in vitro*. Por esse motivo, as plantas regeneradas *in vitro* foram conduzidas até a terceira geração através de autofecundação e seleção dos segregantes, para obtenção de linhagens homozigotas estáveis para o gene de interesse.

Após o desenvolvimento vigoroso das raízes, 78 plântulas (41 e 37) provenientes dos experimentos de transformação com os vetores binários recombinantes (pK2WG7/*miox2*) e controle (pK2WG7/vazio) respectivamente, foram transferidas para vasos e mantidas em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura (25°C), umidade e luminosidade (fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro). Essas plantas foram mantidas por um período de 10 dias de aclimação (Figura 25A), antes de serem transferidas para casa de vegetação (Figura 25B), em vasos de 3 L. Após 3 meses, no início da fase reprodutiva, as inflorescências foram protegidas com sacos de papel *kraft*, a fim de se evitar a dispersão do pólen, favorecendo assim a autofecundação (Figura 25C).

Figura 24 - Regeneração *in vitro* de plantas de tabaco por seleção em meio de cultura seletivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de vitaminas, fitorreguladores: BAP (1 mg L^{-1}), ANA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e cefotaxima (200 mg L^{-1}). **A**, discos foliares de tabaco em co-cultivo com *Agrobacterium* recombinantes; **B**, cali de tabaco; **C**, brotações dos cali selecionados; **D**, alongamento dos caules; **E**, emissão de raízes; **F**, formação de uma flor no estadio de alongamento dos caules

Figura 25 – Plantas transformadas e controles. **A**, plântulas de tabaco se aclimatando em câmara de crescimento. **B**, plantas de tabaco em casa de vegetação, em fase juvenil de desenvolvimento; **C**, planta de tabaco em fase adulta reprodutiva, com inflorescência protegida

4.6 Análise das plantas transformadas por PCR

Do total de 78 plantas obtidas na casa de vegetação, 46 mostraram produto de amplificação por PCR com os *primers* específicos para o gene *nptII*, de 700 pb. Desse total, 26 correspondem ao experimento de superexpressão da *miox2* (SM) e 20 ao controle Gateway (CG). Utilizou-se como controle negativo o DNA genômico de plantas de tabaco da linhagem selvagem (WT) e como controle positivo uma amostra de DNA do vetor binário recombinante pK2WG7/*miox2* purificado (Figura 26). Baseado no perfil eletroforético da análise por PCR, a eficiência de transformação foi de aproximadamente 60%.

Figura 26 – Perfil eletroforético das PCR do DNA genômico de 12 plantas selecionadas *in vitro* em meio seletivo contendo canamicina. (1-5) não apresentaram produto de amplificação; (6-12) apresentaram produto de amplificação de 700 pb, com os *primers* específicos para o gene *nptII*. λ marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen). C(+) controle positivo, C(-) controle negativo

4.7 Análise genética das plantas transgênicas

As progênes dos transformantes primários (T_0) previamente analisados por PCR, que apresentaram produto de amplificação de 700 pb, com os *primers* do gene *nptII*, foram analisadas quanto ao padrão de segregação para o caráter de resistência à canamicina em meio seletivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem sacarose e acrescido de canamicina (100 mg L^{-1}) (Figura 27). Os transformantes que apresentaram padrão de segregação Mendeliana, ou seja de 3 plantas resistentes para 1 sensível, significativo a 5% considerando as análises estatísticas realizadas através do teste χ^2 . As plântulas que germinaram foram consideradas resistentes e sensíveis as que morreram após a germinação, as sementes que não germinaram, foram desconsideradas na contagem.

Figura 27 – Progênie das plantas de tabaco germinando em placa de Petri com meio MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de canamicina (100 mg L^{-1}). A placa à esquerda mostra sementes que germinaram e expressam o gene *nptII* na proporção 3:1 A placa da direita não apresenta germinação e corresponde ao controle negativo (linhagem selvagem não transformada)

Os resultados obtidos da contagem das sementes resistentes e sensíveis à canamicina estão apresentados na Tabela 1. Do total das plantas analisadas, selecionou-se 7 linhagens (SM1 a SM7) do experimento de superexpressão da *miox2* e 3 linhagens (CG1 a CG3) do controle Gateway, que apresentaram padrão de segregação 3:1.

Tabela 1 – Padrão de segregação das plantas transgênicas de tabaco SM e CG para o caráter de resistência a canamicina. O res. e O sens. = número observado de plântulas resistentes e sensíveis a canamicina, respectivamente; E resis. e E sens.= número esperado de plântulas resistentes e sensíveis a canamicina, respectivamente; GL= número de graus de liberdade. (*) valores significativos a 5% de probabilidade para segregação 3:1, segundo teste de significância χ^2 . As plantas selecionadas estão em negrito (continua)

num.	O res.	O sens.	Total	E res.	E sens.	$\chi^2=3,84(1GL)$
SM 6	236	232	468	351	117	150,71
SM 11	299	82	381	285,75	95,25	2,46*
SM 15	267	104	371	278,25	92,75	1,82*=SM1
SM 18	275	34	309	231,75	77,25	32,29
SM 24	226	78	304	228	76	0,07*=SM6
SM 26	223	76	299	224,25	74,75	0,03*
SM 27	277	93	370	277,5	92,5	0,01*=SM7
SM 29	168	74	242	181,5	60,5	4,02
SM 30	246	125	371	278,25	92,75	14,95
SM 31	248	34	282	211,5	70,5	25,2
SM 32	215	78	293	219,75	73,25	0,41*=SM2
SM 35	284	115	399	299,25	99,75	3,11*
SM 36	271	67	338	253,5	84,5	4,83
SM 41	222	85	307	230,25	76,75	1,18*
SM 44	291	162	453	339,75	113,25	27,98

Tabela 1 – Padrão de segregação das plantas transgênicas de tabaco SM e CG para o caráter de resistência a canamicina. O res. e O sens. = número observado de plântulas resistentes e sensíveis a canamicina, respectivamente; E resis. e E sens.= número esperado de plântulas resistentes e sensíveis a canamicina, respectivamente; GL= número de graus de liberdade. (*) valores significativos a 5% de probabilidade para segregação 3:1, segundo teste de significância χ^2 . As plantas selecionadas estão em negrito

(conclusão)

num.	O res.	O sens.	Total	E res.	E sens.	$\chi^2=3,84(1GL)$
SM 49	180	104	284	213	71	20,45
SM 51	311	112	423	317,25	105,75	0,49*=SM3
SM 60	283	100	383	287,25	95,75	0,25*=SM4
SM 61	149	54	203	152,25	50,75	0,28*
SM 62	280	93	373	279,75	93,25	0,01*
SM 64	227	17	244	183	61	42,32
SM 66	297	2	299	224,25	74,75	94,4
SM 68	168	58	226	169,5	56,5	0,05*=SM5
SM 63	99	28	127	95,25	31,75	0,59*
SM 65	262	52	314	235,5	78,5	11,93
SM 76	299	50	349	261,75	87,25	21,2
CG 10	205	141	346	259,5	86,5	45,78
CG 13	139	55	194	145,5	48,5	1,16*
CG 16	112	30	142	106,5	35,5	1,14*
CG 18	378	3	381	285,75	95,25	119,13
CG 19	426	3	429	321,75	107,25	124,43
CG 20	434	25	459	344,25	114,75	93,6
CG 24	78	50	128	96	32	0,01*=CG1
CG 28	57	21	78	58,5	19,5	0,15*
CG 31	342	0	342	256,5	85,5	114
CG 30	350	116	466	349,5	116,5	0,01*=CG2
CG 36	243	89	332	249	83	0,58*
CG 43	119	5	124	93	31	29,08
CG 45	206	28	234	175,5	58,5	21,2
CG 46	236	86	322	241,5	80,5	0,50*
CG 48	249	87	336	252	84	0,14*=CG3
CG 52	306	108	414	310,5	103,5	0,26*
CG 58	71	23	94	70,5	23,5	0,01*
CG 70	197	72	269	201,75	67,25	0,45*
CG 73	425	32	457	342,75	114,25	78,95

As plantas das linhagens transgênicas homozigotas para os transgenes (*miox2* e *nptII*), selecionadas com base no padrão de segregação genética, não apresentaram anomalias fenotípicas visíveis, sendo os eventos SM indistinguíveis dos CG assim como da linhagem selvagem WT (Figura 28). A superexpressão do gene *miox2* não provocou alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas de tabaco, assim como observado em experimentos de modulação via *antisense* da expressão do gene *miox2* realizados anteriormente no laboratório não mostraram alterações perceptíveis (DEFÁVARI-NASCIMENTO, 2005). Resultados similares foram obtidos por Kanter et al. (2005) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis*. Nesse caso, a expressão dos genes *miox1*, *miox2* e *miox5*, bloqueadas separadamente via *knock-out*, também não causaram efeitos que comprometessem a viabilidade e desenvolvimento das plantas.

Figura 28 – Fenótipo das plantas transgênicas homozigotas para o transgene *miox2* (SM1, SM2, SM3, SM4, SM5, SM6, SM7) e das plantas transgênicas (CG1, CG2 e CG3) em relação à planta selvagem

4.8 Southern blot

A análise das plantas homozigotas da geração T₂ por *Southern Blot* (SOUTHERN, 1975) foi realizada a fim de se verificar a integração estável dos transgenes no genoma das plantas de tabaco. A hibridização da sonda preparada a partir da sequência do gene *nptII* em fragmentos de DNA de diferentes tamanhos permitiu verificar a independência de cada evento de transformação assim como o número de inserções do transgene no genoma das plantas. Para a digestão do DNA genômico das plantas de tabaco da geração T₂ homozigotas, utilizou-se as enzimas *HindIII* e *EcoRI* separadamente. De acordo com as análises realizadas no programa *NEBcutter* versão 1.0

(VINCZE et al., 2003) a sequência do gene *nptII* utilizada como sonda não apresenta sítios de restrição para nenhuma das enzimas utilizadas.

Pela análise de *Southern blot* das amostras digeridas com *HindIII*, observa-se ausência de bandas no caso da planta de tabaco selvagem, que não hibridizou com a sonda do gene *nptII*, enquanto que todas as linhagens transgênicas SM e controles gateway CG apresentaram uma ou mais bandas (Figura 29), confirmando assim a integração do transgene no genoma dessas plantas. Algumas das linhagens (CG1, SM1, SM6, SM7 e SM5) apresentaram mais de uma banda, indicando que a inserção ocorreu em mais de um local no genoma.

Figura 29 – *Southern blot* do DNA genômico das plantas homozigotas da geração T₂ das linhagens transgênicas (SM), controle gateway (CG) e selvagem (WT), após digestão com a enzima de restrição *HindIII* e hibridização com sonda do gene *nptII*; kb = peso molecular em kilobases

As linhagens transgênicas (SM1, SM6 e SM7) e as (SM2 e SM4) apresentaram um padrão de digestão e hibridização muito semelhantes com a enzima de restrição *HindIII*. Por essa razão, realizou-se uma segunda análise de *Southern blot*, por digestão do DNA genômico dessas plantas SM1, SM2, SM4, SM6 e SM7 com enzima de restrição *EcoR1*, para verificar se realmente essas plantas são oriundas de eventos independentes de transformação. Pela análise de *Southern* realizada após a digestão com a enzima *EcoR1* (Figura 30) podemos afirmar que efetivamente, SM1, SM6 e SM7 pertencem ao mesmo evento de transformação e por isso duas delas (SM6 e SM7) foram desconsideradas para as análises subsequentes.

Figura 30 – *Southern blot* do DNA genômico das plantas de tabaco T₂ das linhagens SM1, SM6, SM7, SM2 e SM4 após digestão com enzima de restrição EcoRI e hibridização com sonda do gene *nptII*; kb = peso molecular em kilobases

4.9 Northern blot

As análises de *Northern blot* das plantas homozigotas transgênicas foram realizadas a partir do RNA total extraído de folhas e caules de tabaco, a fim de se verificar o nível de expressão do transgene *miox2* de *Arabidopsis* em relação ao gene *miox* endógeno do tabaco. Para isso, realizaram-se hibridizações sucessivas com sondas específicas para tais mRNAs. A sonda específica para a região terminadora 35S, que hibridiza unicamente com a seqüência do transgene, foi utilizada para verificação dos níveis de expressão do gene *miox2*. A sonda específica para o gene *miox* de tabaco utilizada foi o produto da amplificação de RNA mensageiro de tabaco por RT-PCR, com os *primers* de uma seqüência de RNA mensageiro de tabaco disponível no NCBI (nº de acesso AF154639) com grau de identidade de 72% em relação à seqüência da *miox2* de *Arabidopsis* (APÊNDICE A). As quantidades relativas de RNA total foram determinadas através da hibridização com uma sonda específica para uma região do RNA ribossômico 18S de tabaco.

Os níveis de expressão do gene *miox* endógeno do tabaco foram praticamente imperceptíveis em ambos os tecidos analisados, folha e caule, sugerindo que é um gene de muito baixa expressão em tabaco, como também foi observado por Defávári-Nascimento (2005). A sonda para o terminador 35S não hibridizou de forma visível com nenhuma das linhagens testadas, inclusive depois de várias repetições sob as mesmas condições experimentais e mudando certos parâmetros como as temperaturas e tempos de hibridização. Os resultados da hibridização da membrana com a sonda de 18S ribossômico mostrou que a quantidade e

qualidade das amostras de RNA total extraídas estavam boas e uniformes e deveriam ser suficientes para as análises de *Northern blot* (APÊNDICE B).

Resultados obtidos por Bertolo (2006) e Coleman et al. (2006) demonstram que a atividade do promotor 35S, embora sendo um promotor de expressão constitutiva, apresenta variação específica de tecido, já que nos respectivos trabalhos, foram detectados diferentes níveis de transcritos por PCR quantitativa (q-PCR) em tecido foliar e caulinar, para os genes das enzimas UDP-xilose desidrogenase (UXS) e UDP-glicose pirofosforilase (UGPase) respectivamente.

Como os resultados obtidos pelas análises de *Northern blot* não foram elucidativos, realizaram-se análises de expressão pela técnica de PCR quantitativa (q-PCR) que oferece maior sensibilidade para a detecção de genes de baixa expressão.

4.10 RT-PCR Quantitativa

Os níveis de expressão do gene *miox2* em tecido caulinar das linhagens selvagem WT, controle Gateway (CG) e transgênicas (SM) foram determinados por PCR quantitativa (q-PCR). *Primers* específicos para essa finalidade, já discriminados no item 3.11.3 de Material e Métodos, foram utilizados nas reações de amplificação. Os níveis de expressão foram normalizados com relação à expressão do gene da ubiquitina, utilizado como referência de acordo com Pfaffl (2002).

Pela normalização dos dados obtidos com tecido caulinar das análises de q-PCR, ilustrados na Figura 31, pode ser observado que as linhagens transgênicas SM1, SM2 e SM4 apresentaram maiores níveis de expressão do gene *miox2* em relação aos controles, com destaque para a linhagem SM2. Os níveis de expressão nos caules de plantas SM3 e SM5 foram praticamente imperceptíveis, tanto para o transgene como para o gene endógeno, assim como as plantas pertencentes à linhagem selvagem (WT) e aos controles Gateway (CG).

Figura 31 – Níveis de transcritos do *miox2* de *Arabidopsis thaliana* e do *miox* endógeno de tabaco, avaliados em tecido caulinar das linhagens transgênicas relativos aos controles Gateway e WT. Os valores são médias e desvios padrão relativos ao nível de transcritos dos controles aos quais atribuiu-se o valor = 1 em escala logarítmica

Os resultados dessa análise mostram também que a superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis* levou a uma modulação do nível de expressão desse gene nas linhagens transgênicas em relação aos controles, uma vez que este é bastante variável entre as linhagens transgênicas. A variabilidade no nível de expressão do gene *miox2* parece ser resultado da instabilidade e pronta degradação do mRNA ou de mecanismos de silenciamento gênico decorrentes do local de inserção do transgene. Em experimentos de transformação genética, a ocorrência de silenciamento gênico pode ser induzida pelo próprio transgene, como resultado de silenciamento transcricional –TGS ou pós-transcricional – PTGS (CARTHREW, 2001). O TGS resulta da metilação de seqüências promotoras e o PTGS de metilação de seqüências codificantes (MUSKENS et al., 2000) ou da degradação do RNA mensageiro. Os transgenes inseridos em cópias múltiplas parecem silenciar mais eficientemente a sua expressão (MUSKENS et al., 2000). O silenciamento da expressão de transgenes foi observado pela primeira vez em plantas de petúnia transgênicas para o gene da chalcona sintase, que bloquearam a própria expressão e a do gene endógeno (NAPOLI et al., 1990). Esse fenômeno foi denominado “co-supressão”. Já Mishiba et al. (2005), estudando o fenômeno de silenciamento gênico em plantas de *Gentiana triflora* transgênicas para um gene *MADS-box* sob o controle do promotor 35S oriundo do vírus do mosaico da couve-flor, demonstraram que as regiões promotoras apresentavam altas taxas de

metilação de citosinas pela técnica de seqüenciamento genômico bissulfeto (FROMMER et al., 1992). Já que o promotor 35S é uma seqüência de origem viral, Napoli et al. (1990) sugeriram que a sua inserção no genoma de plantas poderia causar respostas de silenciamento via co-supressão da expressão dos transgenes.

Outra razão a ser considerada para se explicar à ausência de expressão do transgene, no caso das linhagens SM3, SM5 e mesmo na linhagem SM4, é a possibilidade de formação de estruturas secundárias no RNA mensageiro, que poderiam afetar sua estabilidade ou acessibilidade do processo de tradução.

A variação nos níveis de expressão do transgene nas cinco linhagens SM avaliadas, poderiam resultar de mecanismos de silenciamento induzidos por cromatina (MEYER, 1995). Dependendo do local de inserção do transgene, o grau de condensação da cromatina, determinado pelo nível de acetilação de histonas pode dificultar a transcrição.

Todos esses ou algum dos fatores mencionados anteriormente podem ter contribuído para o comportamento das plantas de tabaco em relação às taxas de expressão variáveis do transgene *miox2*.

4.11 Análise da composição química dos monossacarídeos, ácidos urônicos e lignina na parede celular secundária

Amostras de tecido caulinar das plantas homozigotas transgênicas de tabaco (geração T₂) foram avaliadas quanto à composição química de monossacarídeos, ácidos urônicos e lignina de parede celular secundária em relação aos controles Gateway (CG) e às plantas selvagens (WT). A concentração dos monossacarídeos e ácidos urônicos foi avaliada por HPAE-PAD e está apresentada nos gráficos abaixo expressos em mg g⁻¹. Os teores de lignina solúvel e insolúvel estão também apresentados nas mesmas unidades de concentração.

Os resultados das análises estão apresentados nas Figuras 32 e 33, para composição de monossacarídeos em tecido xilemático de caule e tecido parenquimático de medula caulinar respectivamente. Já a composição de ácidos urônicos, foi avaliada para o tecido xilemático e parenquimático dos caules (Figura 34). O conteúdo de lignina solúvel e insolúvel foi determinado por espectrofotometria (Figura 35).

A composição de monossacarídeos de tecido xilemático caulinar das linhagens transgênicas SM (1-5) não apresentou variações estatisticamente significativas em relação aos respectivos controles (Figura 32).

Figura 32 – Composição dos monossacarídeos (Ara, Gal, Gli, Xil, Man [mg g^{-1}]) da parede celular secundária do tecido xilemático, de caules das plantas de tabaco transgênicas (SM1-SM5) relativa aos controles CG e WT. Valores são médias e desvio padrão. *Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade segundo teste de *Dunnnett*

No caso do tecido parenquimático medular, as linhagens transgênicas apresentaram algumas diferenças relativas aos controles CG e WT (Figura 33). As concentrações de arabinose e glicose, na linhagem SM1 (evento que apresentou alta taxa de expressão do transgene *miox2*) são superiores e estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade. Já na linhagem

SM4 ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo de ramnose e galactose e a linhagem SM5 apresentou aumentos estatisticamente significativos nas concentrações de xilose.

Figura 33 – Composição dos monossacarídeos [Ara, Rha, Gal, Gli, Xil, Man (mg g⁻¹)] da parede celular em tecido parenquimático medular de caules das plantas de tabaco transgênicas (SM 1-5), em relação aos controles CG e WT. Valores são médias e desvios padrão. *Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade segundo teste de *Dunnett*

As concentrações de ácidos urônicos (ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico) no tecido xilemático e parênquima medular estão apresentados na Figura 34. No caso de tecido xilemático, as concentrações observadas são inferiores às encontradas para o parênquima medular. Essas diferenças evidenciam a participação do ácido galacturônico na formação de componentes da matriz péctica, abundante em tecidos primários. Já o conteúdo de ácido glucurônico não variou de forma significativa com relação ao tecido utilizado nas análises. Embora a concentração desse tenha sido superior em tecido xilemático pois participa como

constituente das ramificações das cadeias de xiloglicanas e xilanas das paredes celulares secundárias.

As variações encontradas nas linhagens transgênicas em relação aos controles não foram consideradas estatisticamente significativas. Esses resultados juntamente com os obtidos da análise da composição dos monossacarídeos, sugerem que a modulação da expressão do gene *miox2* não resultou em alterações nas proporções de precursores monossacarídicos da parede celular secundária.

O conteúdo de lignina solúvel e insolúvel (Figura 35), determinado segundo metodologia citada no item 3.11 apresentou pequenas variações. Unicamente a linhagem SM3 demonstrou diminuição estatisticamente significativa com relação ao conteúdo de lignina insolúvel.

Figura 34 – Composição dos ácidos urônicos [GalA e GlcA (mg g⁻¹)] da parede celular em tecido xilemático e parenquimático medular do caule das plantas de tabaco transgênicas (SM1-SM5), em relação aos controles CG e WT. Valores são médias e desvios padrão

Figura 35 – Conteúdo [mg g⁻¹] de lignina solúvel e insolúvel determinado em tecido xilemático de caule das plantas transgênicas (SM1-SM5) em relação aos controles CG e WT. Valores são médias. *Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade segundo teste de *Dunnett*

O filtrado obtido no processo de extração dos monossacarídeos, após remoção de extrativos e hidrólise ácida (deslignificação), contém todos os monômeros dos componentes celulósicos, hemicelulósicos e pécnicos da parede celular. A determinação da concentração dos componentes de cada fração, em separado, poderia revelar outras informações em relação a possíveis alterações ainda não detectadas pelo método utilizado nesse trabalho. O tratamento do filtrado obtido após a hidrólise ácida com uma solução de oxalato de amônio ou EDTA (substâncias quelantes de Ca^{2+}) permite a extração dos componentes pécnicos. As hemiceluloses são mais difíceis de serem removidas da parede celular, por isso a necessidade do tratamento com soluções alcalinas concentradas de hidróxido de potássio ou sódio. O resíduo obtido após a remoção de pectinas e hemiceluloses é a fração celulósica, denominada de alfa-celulose (REID, 1997). A análise de cada uma das frações para determinação do conteúdo dos monossacarídeos e ácidos urônicos poderia oferecer novas informações sobre os efeitos da modulação do gene *miox2*.

Embora existam diferenças nos níveis de expressão do gene *miox2* nas linhagens transgênicas, o que se observa é que a superexpressão do gene *miox2* de *Arabidopsis thaliana* não provocou alterações fisiológicas e metabólicas nas plantas transgênicas, ou mesmo no conteúdo dos monossacarídeos precursores da parede celular. Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos de modulação da expressão do gene *miox2* via antisense por Defávare-Nascimento (2005). Outros trabalhos relacionados a genes envolvidos na rota de biossíntese de açúcares precursores da parede celular foram analisados via superexpressão ou por modulação via antisense mostram que as modificações na composição de carboidratos de parede celular (DÖRMANN; BENNING 1996; BONIN; REITER, 2000; KELLER et al., 1999) são muito discretas. Dörmann e Benning (1998) superexpressaram o gene para a UDP-D-glicose 4-epimerase 1 (UGE1), que sintetiza UDP-D-galactose a partir de UDP-D-glicose de maneira reversível, em *Arabidopsis thaliana*. Da mesma forma que no presente trabalho, eles não encontraram alterações estatisticamente significativas no conteúdo dos componentes monossacarídicos da parede celular de plantas transgênicas. As plantas parecem possuir a capacidade de se ajustar aos efeitos decorrentes de possíveis alterações na biossíntese dos monossacarídeos ou componentes da parede celular através da modulação da expressão gênica (YONG et al., 2005).

Além disso, como as diversas isoformas, até então encontradas para o gene *miox* (*miox1*, *miox2*, *miox4* e *miox5*), embora apresentem transcrição não totalmente específica para cada tecido (KANTER et al., 2005), a modulação dos níveis de expressão do transgene *miox2* de *Arabidopsis* nos experimentos de superexpressão desse em tabaco, pode ficar limitada. Essa redundância genética oferece aos organismos uma eficiente estratégia de manutenção dos níveis de expressão de um determinado gene cuja função é essencial ao desenvolvimento.

Por outro lado, a conversão de ácido UDP-D-glucurônico pela enzima MIOX foi considerada uma rota alternativa à ação da enzima UGDH (ROBERTS; LOEWUS, 1973; SEITZ, et al., 2000). Existem evidências de que as duas vias metabólicas coexistem. Seitz et al. (2000) demonstraram diferenças no padrão de expressão de ambas as enzimas. Nesse caso, a enzima UGDH apresentou altas taxas em raízes de plântulas de *Arabidopsis*, onde as condições anaeróbicas impedem a ação da via de oxidação do mio-inositol. Já nos hipocótilos, a atividade da enzima MIOX, que requer oxigênio, foi demonstrada pela incorporação de inositol-³H nos polímeros hemicelulósicos. Esse padrão invertido, observado para a expressão de UGDH e MIOX sugere que ambas agem paralela e coordenadamente no metabolismo das plantas durante a formação da parede celular primária nas fases iniciais do desenvolvimento, fase onde o crescimento das raízes é de vital importância.

Essas informações, sugerem que a enzima MIOX tem um importante papel na formação dos componentes hemicelulósicos da parede celular primária nos estádios iniciais do desenvolvimento das plantas. Já no caso da biossíntese da parede celular secundária, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a enzima MIOX2 parece não exercer um papel predominante em caules e folhas. Esses argumentos corroboram resultados de outros experimentos realizados no laboratório. Os dados obtidos das análises de expressão de genes, através da técnica SAGE, envolvidos na formação da parede celular secundária em plantas de *Eucalyptus grandis* (CARVALHO et al., 2006, submetido) juntamente com os perfis de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* (CELEDON et al., 2007), não incluem a identificação de nenhuma isoforma do gene *miox*. Já no caso da proteína UGDH encontraram-se 3 isoformas a partir de perfis de proteínas da região cambial de plantas de *E. grandis* de 3 e 22 anos (LABATE et al., 2007, submetido), fato que verifica a sua importância na biossíntese de parede celular secundária.

Trabalhos futuros complementares deverão ser realizados para avaliar-se o efeito da superexpressão do gene *miox2* na composição de carboidratos das paredes celulares primárias de plântulas de tabaco. Além disso, a enzima mio-inositol oxigenase está envolvida em uma rota alternativa de biossíntese de ácido L-ascórbico (mencionada no item 2.7) recentemente determinada em plantas (LORENCE et al., 2004; KANTER et al., 2005). Estas informações sugerem uma função adicional para a MIOX2 que está sendo investigada nas linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* de forma a dar continuidade aos estudos de alterações metabólicas decorrentes da superexpressão do gene *miox2* nas plantas transgênicas de tabaco.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho de pesquisa desenvolvido teve por objetivo modular a via de oxidação do mio-inositol através da superexpressão o gene *miox2* de *Arabidopsis* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Os resultados obtidos na avaliação da composição química das paredes celulares secundárias das plantas transgênicas de tabaco, indicam que a superexpressão desse gene não causou alterações fenotípicas visíveis nessas plantas em relação às controles. A dificuldade de modular o conteúdo de componentes hemicelulósicos através da superexpressão da MIOX2, talvez seja devido à regulação da biossíntese desses metabólitos nas paredes secundárias, por ação da rota metabólica alternativa mediada pela enzima UGDH. Dessa forma, mesmo alterando a Via de Oxidação do Mio-Inositol, o ácido UDP-D-glucurônico pode ainda ser formado a partir de UDP-D-glicose.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a superexpressão do gene *miox2* em plantas de eucalipto não seria a melhor via de obtermos genótipos com maior conteúdo de hemiceluloses. No entanto, as informações obtidas nas pesquisas dos últimos anos têm identificado novos genes candidatos para a modulação da biossíntese da parede celular, entre eles os genes da família *cesA* e da subfamília *csI*, que codificam diversas enzimas responsáveis pela biossíntese de celulose e de componentes hemicelulósicos. As informações obtidas nas pesquisas em proteômica e transcriptômica também têm contribuindo para a identificação de seqüências de proteínas e genes específicos de plantas, cujas funções estão associadas à formação da parede celular.

Finalmente, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na regulação transcricional, pós-transcricional e pós-traducional são aspectos que deverão ser amplamente estudados, a fim de entender-se a complexidade da regulação do fluxo de carbono para a biossíntese de paredes celulares.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, 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**, London, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997
- AMINO, S.; TAKEUCHI, Y.; KOMAMINE, A. Changes in the enzyme activities involved in formation and interconversion of UDP-sugars during cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 64, p. 111-117, 1985
- AMOR, Y.; HAIGLER, C.H.; JOHNSON, S.; WAINSCOTT, M.; DELMER, D.P. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 92, p. 9353-9357, 1995.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, p. 796-815, 2000.
- ARNER, R.J.; PRABHU, K.S.; REDDY C.C. Molecular cloning, expression, and characterization of *myo*-inositol oxygenase from mouse, rat, and human kidney. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 324, p. 1386-1392, 2004.
- ARNER, R.J.; PRABHU, S.; THOMPSON, J.T.; HILDENBRANDT, G.R.; LIKEN, A.D.; REDDY, C.C. Myo-inositol oxygenase: molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxidizes *myo*-inositol and D-*chiro*-inositol. **The Biochemical Journal**, London, v. 360, n. 2, p. 313-320, 2001.
- 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-xilose synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 98, p. 12003-12008, 2001.
- BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU M.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 125–197, 1998.
- BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell killing by the F plasmid ccdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 226, p. 735-745, 1992.
- BERNARD, P.; KEZDY, K.E.; MELDEREN, L.V.; STEYAERT, J.; WYNS, L.; PATO, M.L.; HIGGINS, P.N.; COUTURIER, M. The F plasmid ccdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 234, p. 534-541, 1993.
- BERTOLO, A.L.F. **Alteração da composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, pela modulação da expressão do gene *uxs* que codifica a enzima UDP-glucuronato descarboxilase (E.C.4.1.1.35)**. 2007. 142 p. Tese (Doutorado em Genética e

Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BOLWELL, G.P. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. **International Review of Cytology**, New York, v. 146, p. 261-324, 1993.

BONIN, C. P.; POTTER, I., VANZIN, G.F. and REITER, W.-D. The MUR1 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 4, p. 2085-2090, 1997.

BONIN, C.P.; REITER, W.D. A bifunctional epimerase reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the de novo synthesis of GDP-L-fucose in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 445–454, 2000.

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

BROWN, S.M. Jr. Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments. **Journal of Cell Science Supplement**, Cambridge, v. 2, p. 13-32, 1985.

BUSH, G.L.; TASSIN, A.M.; FRIDEN, H., MEYER, D.I. Secretion in yeast. Purification and *in vitro* translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 21, p. 13811-13814, 1991.

CAMPBELL, M.M.; SEDEROFF, R.R. Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 3-13, 1996.

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

CARPITA, N.C.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. chap. 2, p. 52-108.

CARTHREW, R.W. Gene silencing by double-stranded RNA. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 244-248, 2001.

CARVALHO, M.C.C.G.; CARNEIRO, R.T.; CALDAS, D.G.G.; SALVATIERRA, G.R.; FRANCESCHINI, L.M.; ANDRADE, A. CELEDON, P.A.F.; ODA, S.; LABATE, C.A. SAGE Transcript profiling of *Eucalyptus grandis*: a dynamic view of wood formation, from seedlings to 6-year-old-trees. **New Phytologist**, London, (submitted), 2007.

CASSAB, G.I. Plant cell wall proteins. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 281-309, 1998.

CASSAB, G.I.; VARNER, J.E. Cell wall proteins. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 321-353, 1988.

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

CHARALAMPOUS, F.C. Biochemical studies on inositol. V. Purification and properties of the enzyme that cleaves inositol to D-glucuronic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 234, p. 220-227, 1959.

COLEMAN, H.D.; ELLIS, D.D.; GILBERT, M.; MANSFIELD, S.D. Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 87-101, 2006.

COSGROVE, D.J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 109-124, 2000.

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

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

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

DARLEY, C.P.; FORRESTER, A.M.; McQUEEN-MASON, S.J. The molecular basis for cell wall extension. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, p. 179-195, 2001.

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

DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis: Existing times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 245-276, 1999.

DELMER, D.P.; AMOR, Y. Cellulose biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 987-1000, 1995.

- DÖRMAN P.; BENNING C., Functional expression of uridine 5'-diphospho-glucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2) from *Arabidopsis thaliana* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 327, p. 27-34, 1996.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1987.
- EDWARDS, M.E.; DICKSON, C.A., CHENGAPPA, S.; SIDEBOTTOM, C.; GIDLEY, M.J.; REID, J.S. Biosynthesis of legume-seed galactomannans *in vitro*. **Planta**, Berlin, v. 178 n. 1, p. 41-51, 1989.
- EFFLAND, M.J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. **Tappi**, Madison, v. 60, n. 10, p. 143-144, 1977.
- FAIK, A.; BAR-PELED, M.; DeROCHER, A.E.; ZENG, W.; PERRIN, R.M.; WILKERSON, C.; RAIKHEL, N.V.; KEEGSTRA, K. Biochemical characterization and molecular cloning of an alpha-1,2-fucosyltransferase that catalyzes the last step of cell wall xyloglucan biosynthesis in pea. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 20, p. 15082-15089, 2000.
- FARDIM, P.; DURÁN, N. Wood and pulp carbohydrate analysis using HPLC and electrochemical detection. **Chemistry Preprint Archive**, Zurich, v. 7, p. 158-163, 2001.
- FEINGOLD, D.S. Aldo (and keto) hexoses and uronic acids. In: LOEWUS, F.A.; TANNER, W. (Ed.). **Carbohydrates I**. Intracellular carbohydrates. London: New Series, 1982. p. 38-75. (Encyclopedia of Plant Physiology, 13).
- FEINGOLD, D.S.; AVIGAD, G. Sugar nucleotide transformations in plants. In: PREISS, J. (Ed.). **Carbohydrates: structure and function**. London: New Series, 1980. p.101-170. (The Biochemistry of Plants, 3).
- FREUDENBERG K.; NEISH A.C. **Constitution and biosynthesis of lignin**. Berlin: Springer-Verlag, 1968. 129 p.
- FROMMER, M.; McDONALD, L.E.; MILLAR, D.S.; COLLIS, C.M.; WATT, F.; GRIGG, G.W.; MOLLY, P.L.; PAUL, C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 89, p. 1827-1831, 1992.
- FUKUDA, H. Xylogenes: initiation, progression and cell death. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 299-325, 1996.
- GIBEAUT, D.M. Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 69-80, 2000.

GOUBET, F. MOHNEN, D. Subcellular localization and topology of homogalacturonan methyltransferase in suspension-cultured *Nicotiana tabacum* cells. **Planta**, Berlin, v. 209, n. 1, p. 112-117, 1999.

GROODBERG, J.; DUNN, J.J. *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 170, p. 1245-1253, 1988.

HAMES, B.D.; HIGGINS, S.J. **Gene probes I**: a practical approach. New York: IRL Press, 1995. 284 p.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G.J. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules and implications for genomics. **Plant Physiology**, Washington DC, v. 124, p. 1515-1519, 2000.

HOLLAND, N.; HOLLAND, D.; HELENTJARIS, T.; DHUGGA, K.S.; XOCONOSTLE-CAZARES, B., DELMER, D.P. A comparative analysis of the plant cellulose synthase (*CesA*) gene family. **Plant Physiology**, Washington DC, v. 126, p. 1313-1324, 2000.

HOLSTERS, M.; DEWAFLE, D.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 163, p. 181-187, 1978.

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

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

JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 7, p. 153-164, 1984.

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

KANTER, U.; BECKER, M., FRIAUF, E.; TENHAKEN, R. Purification, characterization and functional cloning of inositol oxygenase from *Cryptococcus*. **Yeast**, West Sussex, v. 20, p. 1317-1329, 2003.

KANTER, U.; USADEL, B.; GUERINEAU, F.; LI, Y.; PAULY, M.; TENHAKEN, R. The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides. **Planta**, Berlin, v. 221, n. 2, p. 243-254, 2005.

KELLER R.; SPRINGER, F.; RENZ, A.; KOSSMANN, J. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 131–141, 1999.

KOLLER, F.; HOFFMAN-OSTENHOF, O. *myo*-Inositol oxygenase from rat kidneys I. Purification by affinity chromatography, physical and catalytic properties. **Hoppe-Seyler's: Zeitschrift für Physikalische Chemie**, Munich, v. 360, p. 507-513, 1979.

KOLLER, E.; KOLLER, F.; HOFFMAN-OSTENHOF, O. *myo*-Inositol oxygenase from oat seedlings. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 10, p. 33-39, 1976.

LEROUXEL, O.; CAVALIER, D.M.; LIEMPAM, A.H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of cell wall polysaccharides – a complex process. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 621-630, 2006.

LABATE, M.T.V.; BERTOLO, A.L.F.; DEFÁVARI-NASCIMENTO, D.; GUTMANIS, G.; ANDRADE, A.; CALDERAN, M.J.R.; CAMARGO, E.L.O.; BOARETTO, L.F.; CONTI, G.; LABATE, C.A. Cloning and functional characterization of a cDNA encoding the *Ucalyptus grandis* UDP-glucose dehydrogenase. **Gene**, Amsterdam, (submitted), 2007.

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

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

LEE, N. Molecular aspects of a regulation in the operon. In: MILLER, J.H.; REZNIKOFF, W.S. (Ed.). **The Operon**. New York: Cold Spring Harbor, 1980. p. 389-3410.

LEE, N.; FRANCKLYN, C.; HAMILTON, E.P. Arabinose-Induced Binding of AraC Protein to *araI*₂ Activates the *araBAD* Operon Promoter . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 84, p. 8814-8818, 1987.

LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M.W. *myo*-Inositol: its biosynthesis and metabolism. **Annual Reviews of Plant Physiology**, London, v. 34, p. 137-161, 1983.

LOEWUS, F.A.; CHEN, M.S.; LOEWUS, M.W. The *myo*-inositol oxidation pathway to cell wall polysaccharides. In: LOEWUS, F.A. (Ed.). **Biogenesis of plant cell wall polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p. 1-27.

LOEWUS, F.A.; KELLY, S.; NEUFELD, E.F. Metabolism of *myo*-inositol in plants: conversion to pectin, hemicellulose, D-xilose and sugar acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 48, p. 421-425, 1962.

LORENCE, A.; CHEVONE, B.I.; MENDES, P.; NESSLER, C.L. *myo*-Inositol Oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. **Plant Physiology**, Washington DC, v. 134, p. 1200-1205, 2004.

MAITRA, U.S.; ANKEL, H. Uridine diphosphate-4-keto-glucose, an intermediate in the uridine diphosphate-galactose-4-epimerase reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 68, n. 11, p. 2660-2663, 1971.

MATERN, U.; GRISEBACH, H. UDP-apiose/UDP-xylose synthase. Subunit composition and binding studies. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, Berlin, v. 74, n. 2, p. 303-312, 1977.

McCANN, M.C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In: LLOYD, C.D. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. London: Academic, 1991. p. 109-129.

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

MEYER P. Variation of transgene expression in plants. **Euphytica**, Dordrecht, v. 85, p. 359-366, 1995.

MISHIBA, K.-I.; NISHIHARA, M.; NAKATSUKA, T.; ABE, Y.; HIRANO, H.; YOKOI, T.; KIKUCHI, A.; YAMAMURA, S. Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. **The Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 541-556, 2005.

MUELLER, S.C.; BROWN, R.M. Jr. Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 84, n. 2, p. 315-326, 1980.

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

MUSKENS, M.W.M.; VISSERS, A.P.A.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 43, n.2/3, p. 243-260, 2000.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

OGDEN, S.; HAGGERTY, D.; STONER, C.M.; KOLODRUBETZ, D.; SCHLEIF, R. The *Escherichia coli* L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 77, p. 3346-3350, 1980.

O'NEIL, R.A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Purification and characterization of a xyloglucan oligosaccharide-specific xylosidase from pea seedlings. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 34, p. 20430-20437, 1989.

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

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

PTASHNE, M. **A genetic switch: phage (lambda) and higher organisms**. Cambridge: Harvard University Press, 1992.

RAVEN, P.H.; RAY F.E.; SUSAN, E.E. **Biology of Plants**, 6a. ed. New York: Worth Publishers, 2001. 791 p.

REDDY, C.C.; PIERZCHALA, P.A.; HAMILTON, G.A. myo-Inositol oxygenase from hog kidney. II Catalytic properties of the homogeneous enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, p. 8519-8524, 1981.

REDDY, C.C.; SWAN, J.S.; HAMILTON, G.A. myo- Inositol oxygenase from hog kidney. I. Purification and characterization of the oxygenase and of an enzyme complex containing the oxygenase and D-glucuronate reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, p. 8510-8518, 1981.

REID, J.S.G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). **Plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1997. p. 205–236.

REITER, W.D. Structure, synthesis, and function of the plant cell wall. In: MEYEROWITZ, E.M.; SOMERVILLE, C.R. (Ed.). **Arabidopsis**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. p. 955-988.

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

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

RICHMOND, T.A.; SOMERVILLE, C.R. The cellulose synthase superfamily. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, n. 2, p. 495-498, 2000.

RICHMOND, T.A.; SOMERVILLE, C.R. Integrative approaches to determining Csl function. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, n. 1/2, p. 131-143, 2001.

ROBERTS, R.M.; LOEWUS, F.A. The conversion of d-glucose-6-C to cell wall polysaccharide material in *Zea mays* in presence of high endogenous levels of myoinositol. **Plant Physiology**, Washington DC, v. 52, n. 6, p. 646-650, 1973.

- ROSENBERG, A.H.; LADE, B.N.; CHUI, D.-S.; LIN, S.-W.; DUNN, J.J.; STUDIER, F.W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. **Gene**, Amsterdam, v. 56, p. 125-135, 1987.
- ROSENFELD, C-L., FANN, C., LOEWUS, F.A. Metabolic studies on intermediates in the *myo*-inositol oxidation pathway in *Lilium longiflorum* pollen. I. Conversion to hexoses. **Plant Physiology**, Washington DC, v. 6, p. 89-95, 1978.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Sprig Harbor Laboratory Press, 1989. 765p.
- SCHELEIF, R.S. DNA Looping. **Annual Review of Biochemistry**. Palo Alto, v. 61, p. 199-223, 1992.
- SEIFERT, G.J. Nucleotide sugars interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 277-284, 2004
- SEITZ, B.; KLOS, C.; WURM, M.; TENHAKEN, R. Matrix polisaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 537-546, 2000.
- SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P.L.; LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 437-467, 2001.
- SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 22, p. 53-78, 2006.
- STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned gene. **Methods in Enzymology**, New York, v. 185, p. 60-89, 1990.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão. In: _____. **Fisiologia vegetal**, Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339-364, 2004.
- TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test methods T249 cm-85**: carbohydrate composition of extractive-free wood and wood-pulp by gas-liquid chromatography. Atlanta, 1991. 1 v.
- TENHAKEN R.; TULKE O. Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-glucose dehydrogenase. **Plant Physiology**, Washington DC, v. 112, p. 1127-1134, 1996.
- VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J. NEBBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 13, p. 3688-3691, 2003.

WILLATS W.G.T.; McCARTNEY, L.; Mackie, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 47, p. 9–27, 2001.

WINEGRAD, A.I. Banting lecture 1986: does a common mechanism induce diverse complications of diabetes? **Diabetes**, New York, v. 36, n. 3, p. 396-405, 1987.

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

ZIMMERMANN, U. Electrical breakdown, electroporabilization, and electrofusion. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Berlin, v. 105, p. 175-256, 1986.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Alineamento do mRNA de *Nicotiana tabacum* e do mRNA da MIOX2 de *Arabidopsis*. A região inicial da sequência de *Nicotiana tabacum* foi utilizada para o desenho dos *primers* para o gene *miox* endógeno de tabaco, por não apresentar similaridade com o gene *miox2* de *Arabidopsis*

APÊNDICE B – *Northern blot* das amostras de RNA total extraído de tecido caulinar e foliar de plantas de tabaco da geração T₂, pertencentes às linhagens WT, CG (1-3) e SM (1-5). **A e C:** hibridização com as sondas *miox* de tabaco; **B e D:** hibridização com as sondas para a sequência do RNA ribossômico 18S

ANEXOS

ANEXO A – Meio de cultura S.O.C.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Bacto Triptona	2% (p/v)
Bacto extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂ *	10 mM
MgSO ₄ *	10 mM
Glicose*	20 mM
Água MilliQ	q.s.p. 1L
Ajustar pH para 7 e autoclavar.	

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

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

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Bacto triptona	1% (p/v)
Bacto extracto de levadura	0,5%
NaCl	0,5%
Agar bacteriológico (medio sólido)	1,5%
Água MilliQ	q.s.p. 1L
Ajustar pH =7,0 y autoclavar	

ANEXO C – Tampão 1X SDS-PAGE.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	0,5 M
Glicerol 87%	10%
β-Mercaptoetanol	5%
Azul de Bromofenol	1%
SDS 10%	2%
Água MilliQ	q.s.p. 1 L

ANEXO D – Gel de Poliacrilamida (LAEMMLI, 1970)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>	
	<i>Running 12%</i>	<i>Stacking 4%</i>
Acrilamida-Bis (30%-2,67%)	40%	13%
Tris/HCl pH 8,0	1,5 M	-
Tris/HCl pH 6.8	-	0,5 M
Persulfato de amônio (APS) 10%	0,5%	0,5%
TEMED	0,05%	0,05%
Água MilliQ	q.s.p. vol. final	q.s.p. vol. final

ANEXO E – Tampões de corrida superior e inferior.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>	
	Tampão inferior	Tampão superior
Tris	25 mM	25 mM
Glicina	192 mM	192 mM
SDS 0,1%	-	0,1%

ANEXO F – Tampão de transferência para *Western Blot*

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Tris	49 mM
Glicina	39 mM
Metanol	20% (v/v)
Água MilliQ	q.s.p. volume final
Ajustar o pH para 9,2	

ANEXO G – Tampão TBS-T

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
1M Tris, pH 7,5	20 mL
NaCl	29,22 g
Detergente Tween-20	0,5 mL
Água MilliQ	q.s.p. 1L

ANEXO H – Tampão TBE 0,5 X (SAMBROOK et al., 1989)

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

ANEXO I – Tampão para aplicação de amostras em gel de agarose 1% - *Dye IV* (SAMBROOK et al., 1989)

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

ANEXO J – *Master Mix* para reação de amplificação por PCR

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. 50µL
Tampão de reação 10x (Biosystems)	5,0 µL
MgCl ₂ (Biosystems)	2,5 mM
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dTTP	200 µM
<i>Primer sense</i>	50 pM
<i>Primer anti-sense</i>	50 pM
DNA	q.s.p. 100 ng (ou colônia)
<i>Taq</i> polimerase (Biosystems) (5U/µL)	1U

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

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Estoque de Tampão	
K ₂ HPO ₄	60 g
NaH ₂ PO ₄	20 g
Água MilliQ	q.s.p. 1L
Ajustar pH para 6,6	
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	
Estoque de Sais	
NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	6 g
KCl	3 g
CaCl ₂	0,2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
Água MilliQ	q.s.p. 1L
Esterilização por filtração (Millipore 0,2 µm)	

OBS: Para preparo de 1L de meio AB, são adicionados 5 g de glicose (10 g de agar bacteriológico, em meios sólidos) em 900 mL de água destilada e autoclavada. Em seguida são adicionados 50mL.L-1 do tampão e 50mL.L-1 de sais, em capela de fluxo laminar.

ANEXO L – Meio de cultura de plantas, composto por sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e vitaminas

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1,65 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44 g
KNO ₃	1,90 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37 g
KH ₂ PO ₄	0,17 g
Fe-EDTA	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,0413 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0278 g
Agitação sob aquecimento até atingir cor amarela intensa	
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6,20 mg
MnSO ₄ .1H ₂ O	16,9 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60 mg
KI	0,83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg
Sacarose	20 g
Ágar (em meios sólidos)	0,8%
Água	q.s.p. 1 L
Ajustar pH para 5,7 e autoclavar	
Vitaminas	
Ácido nicotínico	0,50 mg
Piridoxina-HCl	0,50 mg
Tiamina-HCl	0,10 mg
D-Ca-Pantotenato	0,10 mg
Esterilizar por filtração (Millipore 0,2 µm)	
Tampão	
MES 0,7 M (pH=6,0)	4,4 mL
Esterilizar por filtração (Millipore 0,2 µm)	

ANEXO M- Tampão de extração de DNA - método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987)

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

*adicionados no momento de uso

ANEXO N – Solução 20X SSC (conforme protocolo *Hybond* da Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	3 M
Citrato de Sódio	0,3 M
Água MilliQ	q.s.p. volume final
Acertar o pH para 7 e esterilizar por autoclavagem	
OBS: As soluções 5X SSC, 1X SSC, 0,5X SSC foram preparadas a partir da diluição da solução 20X SSC em água milliQ autoclavada.	

ANEXO O – Solução de hibridização (*Southern Blot*) (conforme protocolo do kit *Gene Images™ random prime labelling module* da Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
NaCl	0,5 M
Agente Bloqueador de Marcação (<i>kit</i>)	4% (p/v)
Tampão de hibridização (<i>kit</i>)	q.s.p. 20 mL

ANEXO P – Solução de lavagem I (conforme protocolo do kit *Gene Images™ Alkphoss Direct Labelling and Detection System* da Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Uréia	2 M
SDS	0,1% (p/v)
5 M Fosfato de Sódio pH 7,0	50 mM
5 M NaCl	150 mM
1 M MgCl ₂	1 mM
Agente Bloqueador	0,2%
Água MilliQ	q.s.p. volume final

ANEXO Q – Solução de lavagem II (conforme protocolo do kit *Gene Images™ Alkphoss Direct Labelling and Detection System* da Amersham Biosciences)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração Final</i>
Tris	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂ (adicionar no momento de uso)	2 mM
Água milliQ	q.s.p. volume final

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

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

ANEXO S – Tampão de corrida para RNA (para aplicação no gel)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
MOPS 10X (ANEXO T)	1,5 µL
Formaldeído 37%	3,0 µL
Formamida deionizada	7,5 µL
Tampón Dye III	2,0 µL
Brometo de Etídio	1,0 µL
RNA	5,0 µg

ANEXO T – Tampão MOPS 10X (HAMES; HIGGINS, 1995)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
MOPS	0,2 M
Acetato de Sódio	0,05 M
EDTA pH 7,0	0,01 M
Água MilliQ	q.s.p. volume final
Esterilizar por filtração (Millipore 0,2 µM)	

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

ANEXO U – Tampão de ligação para purificação de mRNA (conforme protocolo Dynabeads[®] mRNA Purification kit – Dynal)

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

ANEXO V – Tampão de lavagem B para purificação de mRNA (conforme protocolo *Dynabeads® mRNA Purification kit* – Dynal)

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

ANEXO W - Códigos padrão IUPAC/IUB

Código IUPAC de uma e três letras para os aminoácidos					
<i>Códigos</i>		<i>Resíduo</i>	<i>Códigos</i>		<i>Resíduo</i>
A	Ala	alanina	P	Pro	prolina
B	Asx	aspartato ou asparagina	Q	Gln	glutamina
C	Cys	cisteína	R	Arg	arginina
D	Asp	aspartato	S	Ser	serina
E	Glu	glutamato	T	Thr	treonina
F	Phe	fenilalanina	U		selenocisteína
G	Gly	glicina	V	Val	valina
H	His	histidina	W	Trp	triptofano
I	Ile	isoleucina	X	Xaa	desconhecido
K	Lys	lisina	Y	Tyr	tirosina
L	Leu	leucina	Z	Glx	glutamato ou glutamina
M	Met	metionina	*		fim da tradução
N	Asn	asparagina	-		Intervalo de longitude indeterminada

Nomenclatura IUB de bases em seqüências de ácidos nucleicos

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