

*Em Angiospermas, o pistilo, contido na flor, é um órgão de extrema importância na reprodução vegetal, sendo que analisar a função dos genes expressos nos tecidos especializados que o compõem, é fundamental para um melhor entendimento do processo reprodutivo vegetal. Utilizando a técnica de “screening” diferencial de uma biblioteca de cDNA de estigma/estilete de *Nicotiana tabacum*, foi identificado um clone de cDNA (PA3), com alta similaridade a metiltransferases (SAMT, BAMT, e JAMT). O gene correspondente ao cDNA (PA3) foi denominado *NtPMT* (*Nicotiana tabacum* – Pistil Methyltransferase). As metiltransferases são enzimas envolvidas em processos como desenvolvimento vegetal, respostas de defesa, sinalização química, polinização, entre outros. Dois clones de cDNAs, (46B11 e 134B02), codificando proteínas com alta similaridade a metiltransferases, foram isolados de um banco de ESTs (TOBEST), e utilizados para experimentos de expressão heteróloga. Para tanto, foram construídos dois plasmídeos recombinantes, contendo uma “tag” de histidinas em fusão N-terminal com as regiões codificadoras das proteínas, sob controle de um promotor forte e regulável. Os vetores de expressão bacterianos foram utilizados para transformar diferentes linhagens de *Escherichia coli* [BL21 (DE3), BL21(DE3) Códon Plus-RP e BL21 (DE3) Rosetta], de forma a analisar os níveis de expressão em diferentes temperaturas de cultivo (37°C, 30°C e 20°C) e diferentes tempos de indução (1, 2, 3, 4, 5 e 20hs). O vetor de expressão pEXP1746B11 foi utilizado para transformar as três linhagens de *E. coli*, enquanto o vetor de expressão pEXP17-134B02 foi introduzido apenas em BL21(DE3) Rosetta. Em BL21 (DE3) a proteína esperada (22,7kDa), correspondente ao clone pEXP17-46B11, foi produzida apenas em 37°C, apresentando um bom nível de expressão já nas primeiras três horas de indução. Por outro lado, as cepas BL21 (DE3)Códon Plus-RP e BL21 (DE3) Rosetta foram capazes de produzir boa quantidade da proteína recombinante, em todas as condições testadas. Entretanto, a proteína de fusão (22,7kDa) pôde ser observada apenas na fração celular insolúvel, na maioria das condições testadas, provavelmente na forma de corpos de inclusão. Contudo, ao se utilizar 20h de indução, na temperatura de 20°C, foi possível detectar uma pequena quantidade da proteína recombinante pEXP17-46B11 na fração celular solúvel, resultado confirmado por análises de Western blot. A linhagem BL21(DE3) Rosetta também apresentou bons níveis de expressão da proteína recombinante pEXP17-134B02, em todas as condições testadas. Entretanto, a proteína, com massa esperada (13,9kDa), foi observada apenas na fração celular insolúvel, provavelmente na forma de corpos de inclusão.*

Apesar de a proteína pEXP17-46B11 estar insolúvel, os bons níveis de expressão obtidos tornaram possível a utilização da mesma para a produção de anticorpos policlonais. Para tanto, bandas da proteína recombinante, induzidas em BL21(DE3) Rosetta, por três horas, à 37°C, foram cortadas do gel de poliacrilamida, e utilizadas para a imunização de camundongos.

Dois fragmentos do gene *NtPMT* foram amplificados via PCR, a partir do DNA genômico de *N. tabacum* e de suas prováveis espécies parentais, *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana*

*tomentosiformis*. Após clonagem e sequenciamento, os fragmentos obtidos foram utilizados para análises comparativas de seqüências, visando um melhor entendimento da história evolutiva desse gene, nas três espécies de *Nicotiana*. Os resultados obtidos corroboraram com uma das hipóteses de origem evolutiva, segundo a qual, a espécie *N. tabacum* teria surgido a partir de um cruzamento entre um ancestral de *N. sylvestris* e um ancestral de *N. tomentosiformis*.