

**CLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA A ENZIMA
MIO-INOSITOL OXIGENASE (EC 1.13.99.1) DE
Arabidopsis thaliana E MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO
GENE VIA *anti-sense* EM PLANTAS DE *Nicotiana tabacum* L.**

DANIELA DEFÁVARI DO NASCIMENTO

Engenheiro Agrônomo

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 2005

ERRATA

página	linha	onde se lê	leia-se
8	1	mio-inositol-1-fosfato	inositol-1-fosfato
8	2	inositol-3-fosfato sintase	inositol-1-fosfato sintase
8	24	inositol (3) fosfato	inositol (1) fosfato
8	25	(Ins(3)P)	(Ins(1)P)
8	26	(Ins(3)P)	(Ins(1)P)

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

Nascimento, Daniela Defávári do

Clonagem do cDNA que codifica a enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1) de *Arabidopsis thaliana* e modulação da expressão do gene via *anti-sense* em plantas de *Nicotiana tabacum* L. / Daniela Defávári do Nascimento. - - Piracicaba, 2005.

96 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Agrobacterium 2. Clonagem 3. Cultura de tecido vegetal 4. Desenvolvimento vegetal 5. DNA 6. Fumo 7. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDD 633.71

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

**Em memória de minha querida mãe,
Dircéia, que esteve sempre me
incentivando e apoiando, sem jamais
medir esforços para concretizar minha
formação,**

DEDICO.

**Ao meu esposo Edilson e a meu pai
José, pelas horas de incentivo,
paciência, compreensão e carinho,**

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela orientação, incentivo, apoio e amizade durante a realização deste trabalho;

À Dra. Mônica Teresa Veneziano Labate, pela orientação, amizade e assistência incondicional na realização dos experimentos;

Ao Dr. David Henry Moon, pelas sugestões e auxílio intelectual prestados durante o desenvolvimento deste projeto;

Aos estagiários, Plínio, Gabriela, Fernanda e Luís Otávio, pelo indispensável auxílio e dedicação durante o acompanhamento deste projeto;

Ao Juliano Bragatto, pelas análises químicas dos tabacos transgênicos;

A todos os funcionários, pós-graduandos e estagiários do Laboratório Max Feffer, pela amizade, companheirismo e apoio;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA/USP, pelos seqüenciamentos de DNA;

Ao Departamento de Genética pela oportunidade concebida e pelos ensinamentos recebidos;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos;

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

À Companhia Suzano de Papel e Celulose, pelo suporte técnico;

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP que, de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho;

Aos funcionários do Setor de Biblioteca da ESALQ/USP, pelo auxílio prestado;

À minha irmã Soraia, meus sobrinhos Bruno e Vitor, e meu cunhado Fábio, pelo carinho e auxílio em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características da parede celular vegetal.....	3
2.2 Biossíntese de componentes da parede celular.....	5
2.2.1 Mio-inositol.....	8
2.2.2 Enzima Mio-inositol oxigenase.....	9
2.3 Processo de polpação na indústria de papel e celulose.....	10
2.4 Clonagem de cDNA.....	13
2.5 Transformação de plantas via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Pesquisa em banco de dados.....	18
3.2 Clonagem do cDNA da MIOX.....	21
3.2.1 Extração de DNA.....	21
3.2.2 Reação de PCR com <i>primers</i> específicos para a ORF.....	23
3.2.3 Extração de RNA.....	23
3.2.4 Purificação de mRNA a partir de RNA total.....	25
3.2.5 Síntese do cDNA.....	26

3.3 <i>Southern blot</i>	27
3.4 Clonagem do cDNA da MIOX no vetor (TOPO).....	29
3.5 Análise por PCR das colônias transformadas.....	30
3.6 Extração de DNA plasmidial.....	31
3.7 Seqüenciamentos.....	32
3.8 Clonagem no vetor <i>Gateway</i>	33
3.9 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.10 Transformação de tabaco.....	36
3.11 Análise Molecular das plantas transgênicas de tabaco.....	38
3.11.1 <i>Southern blot</i>	38
3.11.2 <i>Northern blot</i>	38
3.12 Análise química dos componentes da parede celular de tabacos transgênicos..	41
3.13 Expressão da Enzima Mio-inositol oxigenase em <i>Escherichia coli</i>	43
3.13.1 Clonagem do cDNA do gene <i>miox</i> no vetor pDEST TM 17.....	44
3.13.2 Transformação da <i>E. coli</i> BL21-AI TM	46
3.13.3 Escolha do clone de maior expressão da enzima MIOX.....	46
3.13.4 Purificação e análise da enzima MIOX.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Clonagem do cDNA que codifica a enzima MIOX de <i>A. thaliana</i>	50
4.1.1 Busca de genes ortólogos no banco de dados do NCBI.....	50
4.1.2 Verificação de domínio conservado.....	50
4.1.3 Alinhamento da sequência do gene <i>miox</i> com várias espécies.....	52
4.1.4 Definição dos <i>primers</i> para a ORF.....	52
4.1.5 Extração do DNA genômico.....	54
4.1.6 Extração de mRNA de <i>A. thaliana</i>	54
4.2 Análise de <i>Southern blot</i> – <i>A. thaliana</i> e <i>E. grandis</i>	56
4.3 Clonagem do cDNA da MIOX no vetor (TOPO).....	56
4.3.1 Seqüenciamento de DNA plasmidial.....	58
4.4 Clonagem no vetor <i>Gateway</i>	59

4.4.1	Análise do cDNA do gene <i>miox</i> de <i>A. thaliana</i> clonado.....	59
4.5	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	60
4.6	Análise das plantas transformadas de <i>Nicotiana tabacum</i>	60
4.6.1	Análise do padrão de segregação do transgene na progênie T ₁	63
4.6.2	Análise do padrão de segregação do transgene na progênie T ₂	64
4.7	Análise molecular das plantas transgênicas de tabaco.....	64
4.7.1	<i>Southern blot</i>	64
4.7.2	<i>Northern blot</i>	67
4.8	Análise química das plantas transgênicas de tabaco.....	67
4.9	Expressão da enzima MIOX de <i>A. thaliana</i> em <i>E. coli</i>	69
4.9.1	Clonagem do cDNA do gene <i>miox</i> , em sentido <i>sense</i> no vetor TOPO.....	69
4.9.2	Clonagem do cDNA do gene <i>miox</i> de <i>A. thaliana</i> no vetor pDEST TM 17.....	71
4.9.3	Transformação da <i>E. coli</i> BL21-AI TM	71
4.9.4	Purificação e análise da proteína MIOX.....	74
5	CONCLUSÕES.....	77
	ANEXOS.....	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A₂₆₀ ou A₂₈₀ = absorvância a 260 ou 280nm de comprimento de onda

atm = atmosfera

ATP = trifosfato de adenosina

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA = albumina sérica bovina

°C = grau centígrado

cDNA = DNA complementar ao RNA

CIA = solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico

Cluster = seqüências organizadas em grupos.

CO₂ = dióxido de carbono

CTAB = detergente brometo de cetiltrimetilamônio

DEPC = dietilpirocarbonato

DNA = ácido desoxiribonucléico

dNTPs = desoxirribonucleotídeos trifosfato

EC = código da enzima dado pela *Enzyme comission*

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

EST = *Expressed Sequence Tag* – uma seqüência curta de cDNA

g = grama

G6P = glicose 6-fosfato

x g = força centrífuga relativa à aceleração padrão de gravidade

gi = identificador de uma seqüência de nucleotídeos – *GenInfo Identifier*

HCl = ácido clorídrico

H₂O = molécula de água

Ins(3)P = inositol 3-fosfato

IUB = *International Union of Biochemistry*

IUPAC = *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IPT = Instituto de Pesquisas Tecnológicas

kb = quilobase

kDa = quilo Dáltons

K_m = constante de Michaelis

KOH = hidróxido de potássio

L = litro

LB = meio de cultura Luria-Bertani

M = molar

mg = miligrama

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

miox = gene da mio-inositol oxigenase

MIOX = proteína mio-inositol oxigenase

mL = mililitro

mM = milimolar

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

mRNA = RNA mensageiro

MS = Meio formulado por Murashige & Skoog (1962)

NaCl = cloreto de sódio

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

ng = nanograma (10⁻⁶ grama)

nm = nanômetro

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

O₂ = molécula de oxigênio

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

ORF = *open reading frame* ou seqüência aberta de leitura .

pb = pares de bases

PCR = reação em cadeia da polimerase

PEG = polietilenoglicol

Pfam = *Protein family*

pmoles = picomoles

primer = oligonucleotídeo iniciador

p/v = peso por volume

PVP = polivinil pirrolidona

q.s.p. = quantidade suficiente para

RNA = ácido ribonucléico

rpm = rotações por minuto

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

SDS = dodecil sulfato de sódio

StIPS = gene que codifica enzima Inositol 3-fosfato sintase de *Solanum tuberosum*

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

Taq = DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

TCA = ciclo dos ácidos tricarboxílicos

Tm = *melting temperature*

Tris = Tris-hidroximetil-aminometano

U = unidades de enzima

UDP = uridinodifosfato

v/v = volume por volume

WT = espécie selvagem (não transformada)

µg = micrograma

µL = microlitro

µM = micromolar

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

**CLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA A ENZIMA MIO-INOSITOL
OXIGENASE (EC 1.13.99.1) DE *Arabidopsis thaliana* E MODULAÇÃO DA
EXPRESSÃO DO GENE VIA *anti-sense* EM PLANTAS DE *Nicotiana tabacum* L.**

Autora: DANIELA DEFÁVARI DO NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

RESUMO

Muitos dos açúcares precursores de hemiceluloses, como UDP-arabinose, UDP-xilose, ácido UDP-galacturônico, UDP-apiose e derivados metilados são provenientes de um precursor comum, o UDP-glucuronato. A síntese de UDP-glucuronato é mediada pela enzima UDP-glicose desidrogenase a partir de UDP-glicose, entretanto, existe uma rota biossintética secundária, a rota de oxidação do inositol, cujos passos regulatórios são pouco conhecidos. A alteração do metabolismo do mio-inositol nas plantas tem despertado grande interesse em razão de sua participação em vários processos metabólicos. Uma vez produzido, o mio-inositol pode seguir várias rotas metabólicas (Loewus & Loewus, 1983) ou ser oxigenado pela enzima mio-inositol oxigenase, formando ácido glucurônico. Essa reação é irreversível e o produto formado pode ser diretamente transferido para a síntese da parede celular ou ser fosforilado pela enzima glucuronoquinase. Este trabalho teve como objetivo clonar o cDNA do gene *miox* que codifica a enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1) para modulação da sua expressão, via *anti-sense*, em plantas de tabaco. A estratégia de clonagem iniciou-se com

a busca de genes no banco de dados do NCBI. A seqüência ortóloga da espécie vegetal encontrada, com alto grau de homologia com o gene de *Sus scrofa* (primeira espécie a ter o gene seqüenciado e caracterizado) foi a de *Arabidopsis thaliana*. Assim, a seqüência de nucleotídeos dessa, foi utilizada para a confecção dos *primers* para a ORF do gene da mio-Inositol oxigenase, contendo a seqüência de direcionamento CACC no *primer* 3' (para clonagem direcional *anti-sense* do gene). Realizou-se o isolamento do gene *miox* de *A. thaliana* através da extração de mRNA desta espécie, que foi em seguida, submetido a reação de RT-PCR com *primers* específicos para a ORF do gene. Esse produto da reação RT-PCR foi usado como sonda na análise de *Southern blot* e para clonagem do gene. Para a clonagem, foi necessário primeiro clonar o produto da reação RT-PCR no vetor TOPO seguida de transformação química de células competentes de *Escherichia coli* (TOP 10). Em seguida, procedeu-se a reação LR *clonase* para clonagem no vetor binário de transformação de plantas (*Gateway* - Invitrogen), seguido de transformação química de células competentes de *E. coli* (DH5 α). A transformação da linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, com o plasmídeo *Gateway* recombinante (pK7WG2D/*anti-sense-miox*) foi feita por eletroporação e os clones recombinantes foram selecionados. A transformação de plantas de tabaco foi realizada por infecção de discos foliares com o clone de *A. tumefaciens* (EHA105) que contém o transgene. A confirmação da presença do transgene nos brotos transformantes foi feita por análise de PCR, com *primers* do gene *nptII*, de resistência à canamicina. Essas plantas transgênicas foram cultivadas, sob condições de ambiente controlado, para produção de sementes e posterior avaliação da progênie, quanto à segregação do gene de resistência à canamicina. A expressão do transgene na progênie T₂, foi avaliada por *Northern blot* e através de quantificação dos componentes da parede celular, como carboidratos, lignina e ácidos urônicos. A expressão do gene *miox anti-sense* das plantas transgênicas causou acúmulo de arabinose e de ácido glucurônico no caule destas plantas.

**cDNA CLONING OF *Arabidopsis thaliana* MYO-INOSITOL OXYGENASE
ENZYME (EC 1.13.99.1) AND MODULATION OF GENE EXPRESSION BY
ANTI-SENSE IN *Nicotiana tabacum* L. PLANTS**

Author: DANIELA DEFÁVARI DO NASCIMENTO

Adviser: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

SUMMARY

The sugar precursors for hemicellulose biosynthesis, such as UDP-arabinose, UDP-xylose, UDP-galacturonic acid, UDP-apiose and methyl derivatives are formed from a common precursor, UDP-glucuronate. UDP-glucuronate is mainly formed by the action of UDP-glucose dehydrogenase. However, a second biosynthetic route is present in higher plants which involves the oxidation of myo-inositol. This second metabolic route is still not well understood. Changing the myo-inositol pathway in plants is of great interest mainly to change the regulation of hemicellulose biosynthesis. Once produced, myo-inositol can enter several pathways (Loewus & Loewus, 1983) or can be oxidized by myo-inositol oxygenase, forming glucuronic acid. This reaction is irreversible and the product is directly transferred to cell wall synthesis or phosphorylated by glucuronokinase. The aim of this work was to clone the *miox* cDNA, which codes for myo-inositol oxygenase (EC 1.13.99.1) and modulate its expression, by anti-sense in tobacco plants. The cloning strategy started by searching for genes in the NCBI gene bank. The plant orthologue sequence, with highest degree of homology with the *Sus*

scrofa gene (first *miox* gene to be sequenced and cloned), was from *Arabidopsis thaliana*. This nucleotide sequence was used as a template to design primers for myo-inositol oxygenase ORF gene, adding the direction sequence CACC to the reverse primer, to orientate anti-sense cloning. Gene cloning was performed by *A. thaliana* mRNA extraction, followed by RT-PCR with *miox* ORF specific primers. The RT-PCR product was used as a probe for *Southern blot* and for cloning. The RT-PCR product was first cloned in a TOPO vector followed by transformation of *Escherichia coli* competent cells (TOP 10). The LR clonase reaction was performed for cloning into a plant binary vector (Gateway - Invitrogen), followed by *E. coli* (DH5 α) transformation. *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 was transformed by eletroporation with the recombinant Gateway (pK7WG2D/ anti-sense *miox*). Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium* leaf discs infection. Transgenic plants were selected using kanamycin resistance and verified by PCR, using *nptII* primers. These plants were grown, under controlled environmental conditions, for seed production and half sib analyses for kanamycin resistance gene segregation. Transgenic gene expression in the T₂ generation was analyzed by *Northern blot* and analysis of cell wall compounds, such as carbohydrates, lignin and uronic acids. Anti-sense *miox* gene expression caused arabinose and glucuronic acid retention in transgenic plant stems.

1 INTRODUÇÃO

Dada a importância econômica da celulose e hemiceluloses para o setor florestal, existe grande interesse na alteração de sua biossíntese através de técnicas de biologia molecular. As recentes informações fornecidas pelos seqüenciamentos genéticos têm papel fundamental na identificação dos genes responsáveis pela codificação de produtos de interesse.

A biossíntese desses polissacarídeos, bem como dos demais componentes da parede celular, dependem do fornecimento dos açúcares produzidos pela fotossíntese nos cloroplastos. O carbono fixado pela fotossíntese é exportado do cloroplasto para o citoplasma na forma de uma triose-fosfato, iniciando uma série de reações metabólicas cuja direção do fluxo vai depender de vários fatores, como estágio de desenvolvimento das folhas, estado fisiológico da planta, condição nutricional, entre outros. Nas folhas jovens, grande parte dos fluxos metabólicos são preferencialmente utilizados para a síntese de lipídeos, via das pentoses fosfato (para a síntese de ácidos nucleicos), glicólise (gerando ATP e piruvato), ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), síntese de aminoácidos, e a via de oxidação dos açúcares, responsáveis pela síntese dos componentes da parede celular. O metabólito chave de todo esse processo é a UDP-glicose, que serve de matéria prima para a síntese de sacarose e celulose, sendo portanto, um componente importante na partição do carbono entre os vários compostos.

Outro componente importante no metabolismo da UDP-glicose é a via de oxidação do mio-inositol, composto essencial para o crescimento das células. Em culturas de células vegetais e tecidos em crescimento, a redução na quantidade intracelular de mio-inositol inibe a divisão celular.

Uma vez produzido, o mio-inositol pode seguir várias rotas metabólicas ou ser oxigenado pela enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1), formando ácido glucurônico. Esta reação é irreversível e o produto formado pode ser diretamente transferido para a síntese da parede celular ou ser fosforilado pela enzima glucuronoquinase (EC 2.7.1.43) e em seguida, desfosforilado pela enzima glucuronato 1-fosfato uridiltransferase (EC 2.7.7.44).

Sabe-se que a composição química da pasta celulósica, principalmente em relação à presença de hemiceluloses, determina as propriedades físicas do papel, bem como as propriedades físico-químicas e ópticas (kappa, viscosidade, rendimento, alvura e reversão de alvura) durante o processo de produção da celulose. As concentrações de anidridos urônicos afetam o número kappa e a alvura ISO das pastas celulósicas obtidas.

Visando minimizar a concentração de ácido glucurônico na planta, este trabalho teve como objetivo a modulação, via *anti-sense*, do gene que codifica a enzima mio-inositol oxigenase. O cDNA do gene *miox*, que codifica a enzima de interesse, foi clonado, pela primeira vez, de uma biblioteca de cDNA de rim de porco (Arner et al., 2001). Esta seqüência foi usada como base para a busca de seqüências ortólogas em plantas e confecção de *primers* usados para isolamento do gene de interesse. Uma vez isolado, o gene de *A. thaliana* foi clonado e utilizado em estudos sobre os efeitos da repressão da sua expressão na formação da parede celular e no desenvolvimento de plantas de tabaco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características da parede celular vegetal

A presença de parede celular é uma das principais características que distinguem células vegetais de animais. Anteriormente considerada produto supérfluo e inativo do protoplasto, a parede celular é responsável por funções específicas e essenciais.

As paredes celulares variam amplamente em espessura, dependendo em parte, da idade da célula individual e da função exercida na estrutura da planta. De acordo com estes critérios, pode-se distinguir os tipos de paredes celulares. A primeira camada de celulose formada, e depositada durante o crescimento celular, constitui a parede celular primária. A região de união entre a parede primária e as células adjacentes, se denomina lamela média, composta, principalmente, de substâncias pécticas. Muitas células depositam camadas de celulose adicionais, que constituirão a parede celular secundária (Hopkins, 1995).

Além de celulose, hemiceluloses e lignina, a parede primária possui grande quantidade de enzimas e glicoproteínas, podendo, em alguns casos, aparecer depósitos de lignina. Os componentes mais abundantes da matriz da parede primária são os polissacarídeos pécticos. A maior parte das células que se dividem ativamente possuem apenas parede primária. Estas células são capazes de perder sua forma especializada, dividirem-se e diferenciarem-se em novos tipos celulares (Raven et al., 2001).

A parede celular secundária é produzida pelo protoplasto e depositada internamente à parede celular primária. A síntese da mesma ocorre logo que o crescimento celular é cessado. As paredes secundárias são particularmente importantes

em células especializadas, com função de sustentação ou de condução de água. Estas células evoluem para um processo de morte celular programada, assim que o crescimento da parede secundária é paralisado. A proporção de celulose é maior nestas células, conferindo-lhes rigidez e falta de elasticidade. As enzimas e as glicoproteínas, geralmente, estão ausentes na parede celular secundária (Hopkins, 1995).

Podem-se distinguir três camadas diferentes na parede celular secundária, S1, S2 e S3, uma mais externa, outra intermediária e outra interna, respectivamente. As camadas podem distinguir-se entre si de acordo com a disposição das microfibrilas de celulose que a compõem. Tais paredes celulares multilaminares são encontradas apenas em certos tipos celulares, pertencentes, geralmente, ao xilema secundário ou lenho, e aumentam substancialmente a força e rigidez das células. Além disso, as paredes destas células normalmente se encontram lignificadas (Raven et al., 2001).

As paredes celulares vegetais crescem tanto em espessura quanto em superfície. A extensão da parede é um processo complexo de baixo controle químico do protoplasto, que requer relaxamento da estrutura da parede celular (processo influenciado por auxina), incremento da síntese protéica, aumento da taxa respiratória e do influxo de água na célula. O tipo de substância matricial sintetizada e secretada pela célula depende do estado de desenvolvimento em que a célula individual se encontra. Pectinas são características de células em expansão, enquanto que as hemiceluloses se encontram em células que já deixaram de se expandir (Raven et al., 2001).

Ao final do crescimento celular, quando as paredes celulares param de se expandir, inicia-se a deposição das paredes secundárias, conferindo estabilidade mecânica a certos tipos celulares especializados, como elementos do xilema e células esclerenquimáticas. Estas paredes são compostas de celulose e hemiceluloses, freqüentemente impregnadas de ligninas. As paredes celulares lignificadas representam a maior proporção de biomassa vegetal e constituem imensa reserva de carbono. O material que compõe as paredes celulares, além de grande importância prática na nutrição animal e humana, é também fonte natural de fibras, utilizadas na indústria têxtil e papelreira. Por estes motivos, o estudo da estrutura e das vias biossintéticas da

parede celular são de considerável interesse, tanto do ponto de vista básico como aplicado (Reiter, 2002). Até o momento, o melhoramento genético de espécies arbóreas tem sido conduzido através de métodos clássicos, que são difíceis de se aplicar devido aos tempos de gerações extremamente prolongados e à dificuldade de avaliação de caracteres específicos em estado adulto (Boudet, 2000). Neste contexto, a engenharia genética oferece novas oportunidades e perspectivas atrativas para o melhoramento de espécies lenhosas.

2.2 Biossíntese dos componentes da parede celular

A biossíntese dos polissacarídeos da parede celular é responsável pelo consumo da maior parte do carbono fixado pelas plantas superiores. A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza. Nas árvores, o conteúdo de celulose presente nos vasos lenhosos compreende cerca de 40-50% da massa de matéria seca total, sendo o restante composto por hemiceluloses e lignina (Hopkins, 1995).

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

A biossíntese de componentes da parede celular como celulose, hemiceluloses, pectina e lignina dependem do fornecimento de açúcares. O carbono fixado nos cloroplastos durante a fotossíntese é exportado na forma de trioses fosfatos para a biossíntese de açúcares no citoplasma, onde duas moléculas de trioses fosfato (gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato) são condensadas para formar frutose-1,6-bisfosfato. Para a síntese de polissacarídeos da parede celular, açúcares tais como UDP-D-glicose, UDP-D-glucuronato, UDP-D-galactose, UDP-D-xilose e UDP-L-arabinose, são utilizados como substrato (Reiter & Vanzin, 2001).

Em bactérias, a síntese de celulose parece depender apenas da disponibilidade de UDP-glicose para a formação de cadeias de glucanos. Por outro lado, em plantas superiores, a rota de biossíntese de celulose ainda é questionável (Delmer & Haigler, 2002). Modelos recentes indicam o açúcar UDP-glicose como provável substrato também em plantas, uma vez que a celulose sintase se associa à UDP-glicose promovendo a síntese de celulose *in vitro* (Delmer, 1999b). Entretanto, as rotas de síntese de UDP-glicose, assim como seus intermediários não estão bem claros (Delmer, 1999a; Haigler et al., 2001; Delmer & Haigler, 2002). Esses trabalhos mostram a existência de uma inter-relação dos vários substratos envolvidos na síntese de celulose e hemiceluloses, de tal forma que os fluxos de carbono para esses dois compostos é altamente regulado.

As moléculas de celulose estão organizadas em feixes de cadeias paralelas formando fibrilas, que são ligadas umas às outras por materiais poliméricos de hemiceluloses e outras substâncias. As hemiceluloses em dicotiledôneas são formadas, em grande parte, a partir de xilose e glucuronato e, em menor proporção, a partir de glicose e manose (Dalessandro & Northcote, 1977a). A biossíntese de UDP-D-xilose é mediada pela enzima UDP-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35), a partir de UDP-D-glucuronato (Bar-Peled et al., 2001). O UDP-D-glucuronato pode ser formado por duas vias metabólicas (Figura 1). A primeira consiste na conversão, pela ação da enzima fosfoglucomutase (EC 5.4.2.2), de D-glicose-6-fosfato em D-glicose-1-fosfato, que é convertido em UDP-glicose pela enzima UDP-D-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9). Já a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) é a responsável pela conversão do açúcar UDP-D-glicose em UDP-D-glucuronato. A segunda via de formação do UDP-D-glucuronato corresponde à rota metabólica de oxidação do mio-inositol (Reiter & Vanzin, 2001).

O mio-inositol é formado a partir de glicose-6P, o mesmo precursor de UDP-glicose. Esse composto é um precursor importante para uma série de produtos metabólicos como fosfatos de inositol, fosfoinositídeos, derivados metilados e conjugados de IAA e ácido glucurônico. A produção do inositol envolve a síntese de

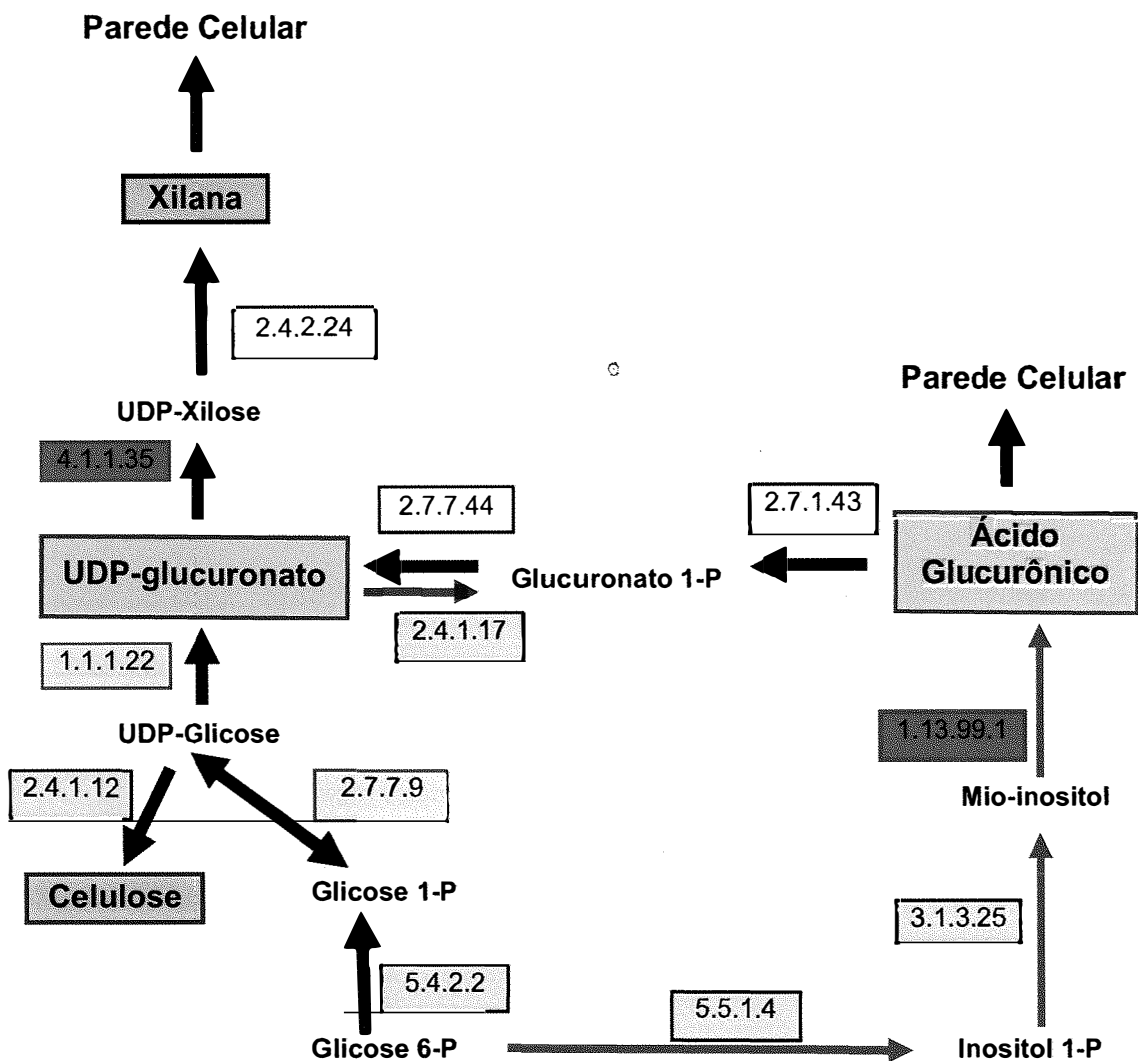


Figura 1 - Representação esquemática da formação de xilanas, celulose e ácido glucurônico a partir do açúcar glicose 6-P e da via de oxigenação do mio-inositol. 5.5.1.4, mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS); 3.1.3.25, mio-inositol monofosfatase (IMP); 1.13.99.1, mio-inositol oxigenase; 2.7.1.43, D-glucuronoquinase; 2.4.1.17, glucuronosil-transferase; 2.7.7.44, glucuronato 1-fosfato uridililtransferase; 5.4.2.2, fosfoglucomutase; 2.7.7.9, UDP-glicose pirofosforilase; 1.1.1.22, UDP-glicose desidrogenase, 4.1.1.35, UDP-glucuronato descarboxilase; 2.4.2.24, 1,4-beta-D-xilana sintase, 2.4.1.12, celulose sintase

mio-inositol-1-fosfato (Ins-1P) a partir de D-glicose-6P, catalisado pela enzima mio-inositol-3-fosfato sintase (MIPS, EC 5.5.1.4). O inositol-1P produzido é, em seguida, desfosforilado pela enzima inositol monofosfatase (IMP, EC 3.1.3.25) para liberar mio-inositol. Uma vez produzido, o mio-inositol pode seguir várias rotas metabólicas ou ser oxigenado pela enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1), formando ácido glucurônico. Essa reação é irreversível e o produto formado pode ser diretamente transferido para a síntese da parede celular ou ser fosforilado pela enzima glucuronoquinase (EC 2.7.1.43) e em seguida, desfosforilado pela enzima glucuronato 1-fosfato uridiltransferase (EC 2.7.7.44) (Loewus et al., 1962; Loewus & Murthy, 2000).

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

2.2.1 Mio-inositol

A alteração do metabolismo do mio-inositol nas plantas tem despertado grande interesse em razão de sua participação em vários processos metabólicos. Nas rotas metabólicas em que o mio-inositol atua, podemos destacar a produção de auxinas, respostas a estresses osmóticos, tolerância a déficit hídrico, estresse salino, biogênese de membranas, transdução de sinais e regulação gênica, e biossíntese de ácidos fítics. Todas essas rotas metabólicas respondem à disponibilidade do mio-inositol nas células. A biossíntese do mio-inositol envolve a participação de três enzimas: i) Hexoquinase (EC 2.7.1.1), que fosforila a glucose, produzindo glicose 6-P (G6P); ii) Inositol (3) fosfato sintase (EC 5.5.1.4), que promove a ciclização irreversível da G6P em inositol (3) fosfato (Ins(3)P) e iii) mio-inositol monofosfatase (3.1.3.25), que promove a desfosforilação de Ins(3)P liberando mio-inositol (Loewus & Murthy, 2000).

A alteração do metabolismo do mio-inositol pode ser obtida aumentando-se ou reduzindo-se a expressão dos genes responsáveis pela produção das enzimas acima

descritas, e também modificando as rotas metabólicas que utilizam o mio-inositol. Por exemplo, a enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1), que regula a oxidação do mio-inositol.

O mio-inositol é um composto essencial tanto para o crescimento das células como para outras funções essenciais. A redução nos níveis normais de mio-inositol nas células inviabiliza o desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae* (Henry et al., 1977) e inibe a divisão celular em culturas de células vegetais e tecidos em crescimento (Biffen & Hanke, 1990; Biswas et al., 1984;). A redução da biossíntese do mio-inositol foi obtida em plantas transgênicas de batata com a supressão da atividade da enzima Inositol(3) fosfato sintase (EC 5.5.1.4), utilizando-se um *anti-sense* do cDNA StIPS que codifica o gene de batata. As plantas transgênicas apresentam redução da dominância apical, alteração da morfologia foliar, antecipação da senescência das folhas e redução no peso dos tubérculos. Esses resultados mostram a importância do metabolismo do mio-Inositol para a fisiologia e desenvolvimento das plantas.

Uma vez produzido, o mio-inositol pode seguir várias rotas metabólicas ou ser oxigenado pela enzima mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1), formando ácido glucurônico. Essa reação é irreversível e o produto formado pode ser diretamente transferido para a síntese da parede celular ou ser fosforilado pela enzima glucuronoquinase (EC 2.7.1.43) e em seguida, desfosforilado pela enzima glucuronato 1-fosfato uridil transferase (EC 2.7.7.44) (Loewus & Murthy, 2000).

2.2.2 Enzima Mio-inositol oxigenase

O nome oficial da enzima de código EC 1.13.99.1 é Inositol-oxigenase e os nomes alternativos são meso-inositol oxigenase e mio-inositol oxigenase (MOO ou MIOX). A MIOX catalisa a primeira reação da rota de oxidação do mio-inositol: mio-inositol + O₂ → D-glucuronato + H₂O, tendo como cofator ferro (Koller et al., 1976), representando o determinante fundamental dos níveis de mio-inositol *in vivo*.

A MIOX foi purificada pela primeira vez de extratos de fígado de rato (Charalampous, 1959). A partir daí, foi purificada outras vezes, tendo sua estrutura

estudada (Reddy et al., 1981). É dependente de ferro e catalisa a oxidação de quatro elétrons com a transferência de um único átomo de oxigênio ao produto. Arner et al. (2001) clonaram e expressaram o gene que codifica a enzima, a partir da espécie *Sus scrofa*. O cDNA obtido possui uma região aberta de leitura (ORF) de 849pb e peso molecular correspondente à subunidade protéica de 32,7kDa.

Em plantas, a MIOX foi purificada pela primeira vez, por Koller et al. (1976) a partir de extratos de plântulas de aveia. Recentemente, Lorence et al. (2004) demonstraram que em *Arabidopsis thaliana*, a enzima MIOX é representada por 4 ORFs, correspondendo a uma família de proteínas. Este grupo clonou o cDNA, de 957pb, que codifica a MIOX do cromossomo 4 de *A. thaliana* (MIOX4). A massa molecular calculada, correspondente à sequência de aminoácidos desta proteína, é de 37kDa.

2.3 Processo de polpação na indústria de papel e celulose

O processo de extração de celulose é designado genericamente de polpação, cujo termo é utilizado para descrever o processo de separação das fibras da madeira mediante a utilização de energia mecânica, térmica ou química, ou ainda a combinação das três (Walker, 1993; Smook, 1990).

O objetivo da polpação química é degradar e dissolver a lignina, deixando a maior parte da celulose e das hemiceluloses intactas nas fibras (Smook, 1990; Sanjuan, 1997; IPT, 1998). Para isso, o material fibroso é misturado com uma solução aquosa de substâncias inorgânicas, denominada licor de cozimento, cuja composição varia de acordo com o processo utilizado e do uso que se dará à polpa. Essa mistura é colocada em um digestor, onde se aplica calor para efetuar o cozimento da massa, solubilizando o material lignino-celulósico e individualizando as fibras. Tal processo se realiza sob condições controladas de tempo, temperatura e pressão (Sanjuan, 1997; IPT, 1998).

A polpação química pode ser dividida em duas classes, conforme a faixa de pH em que opera, denominadas de processo ácido e processo alcalino (Walker, 1993).

Dentre os processos alcalinos, o processo *Kraft* é o de maior importância. A grande difusão desse processo, também conhecido como processo sulfato, se deve, principalmente, à possibilidade de adaptação de todas as espécies de madeiras, ao desenvolvimento de um sistema eficiente de recuperação dos reagentes do licor negro, à introdução de um processo de branqueamento satisfatório e aos tempos de cozimento relativamente curtos (IPT, 1998). A polpa *Kraft* dá origem a papéis resistentes (*Kraft* – palavra alemã que significa resistente), porém, com coloração escura (Smook, 1990; Sanjuan, 1997).

O processo *Kraft* de obtenção de celulose tem como característica básica o aquecimento dos cavacos de madeira em um vaso de pressão, o digestor, com licor de cozimento constituído, principalmente, de uma solução aquosa de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio. A razão entre a quantidade de madeira, bem como a concentração de licor, a umidade dos cavacos e outras variáveis, são cuidadosamente controladas (Smook, 1990; Walker, 1993; Sanjuan, 1997; IPT, 1998).

O ataque alcalino causa a ruptura das moléculas de lignina em fragmentos menores, cujos sais de sódio são solúveis no licor de cozimento. Em decorrência desse ataque químico, são dissolvidos, aproximadamente, 80% da lignina, 50% das hemiceluloses e 10% da celulose. Essa é a razão de serem obtidos baixos rendimentos nesse processo – cerca de 45 a 50% (Smook, 1990; Walker, 1993). A presença de sulfetos no álcali acelera a deslignificação e melhora a qualidade da pasta, produzindo uma pasta com menor teor de lignina para um determinado rendimento (IPT, 1998). Nesse processo, as duas variáveis que mais influenciam são a concentração do álcali e a temperatura (Smook, 1990; Sanjuan, 1997).

Após o cozimento, uma válvula no fundo do digestor é aberta e a pressão empurra os cavacos cozidos para um tanque, onde estes se desdobram em fibras individualizadas, formando a pasta ou polpa, que é, em seguida, lavada para remoção do licor aderente (Smook, 1990; Sanjuan, 1997; IPT, 1998).

Sabe-se que a concentração de hemiceluloses na pasta celulósica é afetada principalmente pelo álcali ativo no cozimento da madeira, de forma que quando se

utiliza maior concentração desse reagente, menor retenção de hemiceluloses é observada, além de alteração das propriedades físico-químicas (kappa, viscosidade, rendimento em celulose e alvura).

As hemiceluloses são caracterizadas por uma estrutura central formada por resíduos 1,4 β -xilana e por ramificações constituídas de moléculas de ácido glucurônico, arabinose e mananas. Esse grupo de polissacarídeos, pode ser classificado de acordo com a quantidade de ácido urônico em: hemicelulose ácida, quando apresenta grande quantidade desse ácido; ou hemicelulose neutra, quando apresenta baixa concentração do mesmo (Fry, 1989; Hayashi, 1989).

A formação dos ácidos hexenurônicos durante a polpação, a partir da modificação dos ácidos glucurônicos das xilanas, é influenciada pelas concentrações de álcali e sulfeto e pela temperatura de reação. Polpas de fibra curta, como as provenientes da madeira do eucalipto, contêm maior quantidade de xilana e, portanto, de ácido hexenurônico do que as polpas de fibra longa (Costa et al., 2001). Assim, a quantidade de grupos de ácidos hexenurônicos presentes em polpas *Kraft* de fibra curta é suficientemente alta para consumir uma quantidade expressiva de dióxido de cloro no clareamento da polpa (Jiang et al., 2000).

Os anidridos urônicos são benéficos no cozimento da madeira, através da proteção de grupos terminais de hemiceluloses, impedindo reações de descascamento (*peeling*). A relação entre anidridos urônicos e as propriedades ópticas indica que estes componentes formam compostos cromóforos que conferem coloração marrom à polpa após branqueamento convencional. Os ácidos hexenurônicos podem formar ligações covalentes com a lignina, além de consumirem reagentes químicos eletrofilicos de branqueamento (cloro, dióxido de cloro, ozônio, peróxidos, etc.), reterem íons metálicos na polpa, causarem reversão de alvura de polpas branqueadas e serem importantes fontes de ácido oxálico. A remoção de ácidos hexenurônicos reduz a quantidade de oxalato formado no branqueamento subsequente e diminui o problema das incrustações, especialmente em circuitos de água semifechados (Silva et al., 2001).

A retenção de hemicelulose permite a obtenção de polpas com propriedades físico mecânicas diferenciadas e fibras com composição de superfície distintas, influenciando assim, nas características de papel de impressão e embalagens.

2.4 Clonagem de cDNA

O termo clonagem, quando aplicado ao DNA, é entendido como a inserção de uma seqüência de DNA em uma célula, de tal modo que o DNA seja replicado e conservado.

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

Em uma biblioteca, a maioria das colônias será portadora de diferentes inserções clonadas. O clone contendo o gene de interesse, pode ser detectado usando-se uma

sonda específica para o DNA ou seu produto protéico, ou verificando-se sua capacidade de transformar um mutante nulo. O vetor do clone selecionado pode ser extraído e seqüenciado, e o gene usado na pesquisa de sua função celular.

Uma maneira alternativa para a clonagem, sem a construção de bibliotecas e de sondagens, pode ser por meio de PCR (Innis & Gelfand, 1990), utilizando dados de genes já seqüenciados. Desde que as seqüências que delimitam sua ORF sejam conhecidas, um par de *primers* pode ser quimicamente sintetizado e usado para amplificar esse fragmento, a partir do DNA genômico ou do cDNA, em quantidade suficiente a ser clonada diretamente em um vetor (Scharf et al., 1986; Scharf, 1990).

2.5 Transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*

Transformação genética se define como a introdução controlada de pequeno fragmento de ácido nucléico (DNA), através de via assexuada, em um genoma receptor, onde o fragmento se integra. Um gene responsável por uma característica de interesse econômico é isolado, clonado, seqüenciado e utilizado em programas de melhoramento genético de plantas, através da transformação genética. Existem várias técnicas que permitem transformar plantas (Brasileiro & Carneiro, 1998). Em geral, estas técnicas se dividem em duas categorias principais, a transferência direta e a indireta de genes. A transferência direta de genes se baseia em métodos físicos ou químicos, dentre os quais pode-se citar a transformação com polietilenoglicol (PEG), a eletroporação e a aceleração de partículas (biobalística). A transferência indireta de genes requer um vetor intermediário, como *Agrobacterium tumefaciens* ou a *Agrobacterium rhizogenes* (Chilton et al., 1982).

A *A. tumefaciens* é um bacilo gram negativo, aeróbico, cujo habitat natural são os solos (Smith & Townsend, 1907). A infecção da célula vegetal por essa espécie, resulta na doença conhecida como galha da coroa (*crown gall disease*), caracterizada pela formação de tumores nos locais da infecção. A *A. rhizogenes* causa a doença conhecida como síndrome das raízes em cabeleira (*hairy root disease*).

As linhagens selvagens de *A. tumefaciens*, ditas oncogênicas, têm a capacidade de infectar células vegetais, levando à formação de tumores. O desenvolvimento desses tumores é resultado da expressão de genes da bactéria que são transferidos e integrados de forma estável no genoma vegetal (Gaudin et al., 1994). Esta capacidade de transferência de genes está associada à presença do plasmídeo Ti (de *Tumor inducing*), no genoma bacteriano, que possui duas regiões diretamente envolvidas nesse processo: o T-DNA e a região *vir* (Tzfira & Citovsky, 2000).

O T-DNA é a sequência transferida para o genoma vegetal e que contém os oncogenes, além de genes para a síntese de opinas (derivados de açúcares e aminoácidos), utilizadas pela bactéria como fonte de carbono, nitrogênio e energia. Esses oncogenes, interferem na biossíntese de fitohormônios, auxinas e citocininas, levando a um desbalanço hormonal que causa divisão celular descontrolada, resultando na formação do tumor (chamado de galha). O tipo de opina produzida é um dos parâmetros utilizados para a identificação e classificação de diferentes linhagens de *Agrobacterium*.

A região *vir* é um *regulon* constituído por 6 ou 7 *operons* que incluem cerca de 25 genes (*virA*, *virG*, *virE*, *virD*, ... *virH*), responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas no processo de transferência do T-DNA e sua integração no genoma vegetal.

Assim, a virulência de uma linhagem de *Agrobacterium* é determinada pelo plasmídeo Ti, por genes cromossômicos, pelas condições fisiológicas da planta e pelas condições de infecção. Embora a formação do tumor seja consequência da expressão dos genes (oncogenes) do T-DNA integrado no genoma vegetal, estes genes não participam dos processos de transferência e integração, para os quais apenas a região *vir* e somente as extremidades do T-DNA, constituídas por sequências repetidas diretas de 25 pares de bases, são essenciais (Citovsky et al., 1992). Assim, os oncogenes, que se localizam na parte central do T-DNA, não são importantes para o processo de transferência do T-DNA, podendo ser eliminados ou substituídos. Essa substituição é feita através de processo de dupla recombinação gênica, produzindo-se linhagens desarmadas, sem que ocorram alterações no processo de transformação (Hooykaas & Schilperoort, 1992).

As linhagens “desarmadas” (sem os oncogenes), mantêm a região de virulência (*vir*) funcional, sendo os oncogenes do T-DNA original, substituídos por genes marcadores de interesse, flanqueados pelas sequências repetidas da extremidade do T-DNA, indispensáveis ao processo de transferência. Assim, as linhagens “desarmadas”, contendo um T-DNA modificado, embora não induzam tumores, retêm a capacidade de transformação.

O alto peso molecular e a complexidade do plasmídeo Ti dificultam sua manipulação direta, portanto foram desenvolvidos dois tipos de vetores alternativos para utilização de *Agrobacterium* spp. em transformação de plantas: o sistema co-integrado (van Haute et al., 1983; Zambryski et al., 1983); e o sistema binário (Hoekema et al., 1983). No sistema co-integrado (em *cis*), os genes *vir* e o T-DNA modificado (sem oncogene, mas com o gene de interesse) estão no mesmo *replicon*. Nesse caso, o plasmídeo contendo o T-DNA modificado (vetor intermediário) que geralmente, é derivado do vetor de expressão pBR322, é integrado ao plasmídeo Ti, por um processo de recombinação simples. A recombinação ocorre através de regiões de homologia de bases entre o vetor intermediário e o plasmídeo Ti desarmado, que também apresenta sequências de bases do pBR322, como resultado do processo de deleção do T-DNA. No sistema binário (em *trans*), o T-DNA modificado é mantido em um plasmídeo distinto do Ti. O T-DNA, contendo os genes de interesse, é clonado em plasmídios que se replicam tanto em *E. coli* quanto em *Agrobacterium*, independentemente, não sendo necessário sua integração ao plasmídeo Ti.

Quando se aplicam estas técnicas de transformação de plantas, há necessidade de se trabalhar com tecidos vegetais que sejam capazes de regenerar plantas completas *in vitro*, já que a transferência do gene de interesse ocorre em células individuais (McCown & Sellmer, 1987). Desta forma, estudos de genética molecular e transformação, são normalmente realizados em sistemas de plantas modelo. São assim chamadas por possuírem algumas características como: boa adaptação ao cultivo de tecidos, alta susceptibilidade à infecção por *Agrobacterium* e fácil manipulação ao nível molecular. Dentre as principais espécies modelo, pode-se mencionar: *Nicotiana tabacum* (tabaco),

Brassica napus (canola), *Daucus carota* (cenoura), *Populus spp.* (álamo) e *Arabidopsis thaliana*. As vantagens da utilização do tabaco são: ser facilmente transformado, ter ciclo de desenvolvimento curto e ser facilmente regenerado *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pesquisa em bancos de dados

O primeiro passo do processo de clonagem do gene, que codifica a enzima MIOX, foi a busca de genes ortólogos em bancos de dados, a partir do código enzimático EC 1.13.99.1. Os *sites* utilizados para a busca, classificação de domínios, caracterização, alinhamento das seqüências e confecção dos *primers* foram:

a. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> – O NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) é um centro de informação biotecnológica, criado pelo governo americano em 1988, que gera bancos de dados de domínio público via *internet*, desenvolve programas para a análise de dados (como BLAST; ORF *finder*, dentre outros) e mantém intercâmbio de dados com outros centros de pesquisa internacionais, através de atualizações diárias.

Neste *site*, entrou-se com o código da enzima mio-inositol oxigenase (1.13.99.1) e a única seqüência encontrada, na ocasião, de *Sus scrofa* (*accession*: AF_401311), foi utilizada como referência. Pelo *link* para análise de dados de **BlastX** (Altschul et al., 1997), que confronta a seqüência de nucleotídeos de interesse com as seqüências de aminoácidos de proteínas do banco de dados do NCBI, a seqüência de plantas com maior grau de ortologia (menor *E-value*) foi escolhida como alvo de clonagem. Determinou-se então, a região aberta de leitura (ORF), correspondente à seqüência de bases nitrogenadas que compõem a proteína.

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

BlastN: confronta a seqüência de nucleotídeos a ser analisada contra seqüências de nucleotídeos disponíveis na base de dados do NCBI.

Blast 2 Sequences: faz análise comparativa de alinhamento entre duas seqüências de nucleotídeos ou proteínas.

b. <http://pfam.wustl.edu/> - O programa Pfam (Bateman et al., 2002) versão 10.0 contém modelos para 6.190 famílias de proteínas, baseados em seqüências de proteínas dos bancos de dados Swissprot e SP-TrEMBL.

A seqüência de aminoácidos da proteína foi analisada, com auxílio deste *site*, para determinação do domínio. As proteínas podem conter de um a vários domínios, cada um com uma função e origem evolutiva diferentes. O retorno da consulta aparece com o *Score*, que indica a similaridade com um ou mais membros da família Pfam. O valor *E* é uma medida mais quantitativa da significância estatística, sendo que, quanto menor o valor *E*, maior a semelhança, indicando que a seqüência é membro de uma das famílias de proteínas, contendo um domínio Pfam definido.

c. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> - O programa Clustal W *Multiple Sequence Alignments* faz o alinhamento de diversas seqüências de DNA ou de proteínas. Calcula o melhor pareamento para as seqüências escolhidas e alinha, de forma que as similaridades e diferenças possam ser observadas (Thompson et al., 1994).

Para verificar se a proteína é conservada evolutivamente nos diferentes organismos, realizou-se além de **BLAST** no NCBI, alinhamento múltiplo no programa Clustal W (Thompson et al., 1994) das seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos do gene *miox*.

d. <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi> Os *primers* que flanqueiam a ORF do gene que codifica a MIOX, utilizados na reação RT-PCR, foram definidos com auxílio do programa *Primer 3*, usando como base a seqüência de nucleotídeos de *A. thaliana* ortóloga ao gene *miox* de *Sus scrofa*. Utilizou-se como

opção principal, no programa, o tamanho do produto, induzindo-se desta forma a obtenção de *primers* que abrangessem toda a ORF.

Como a clonagem do cDNA que codifica a MIOX foi feita com auxílio do Sistema *Gateway*TM de clonagem da Invitrogen (Karimi et al., 2002), adicionou-se a seqüência de direcionamento CACC do sistema direcional TOPO[®] à extremidade 5' do *Reverse Primer*. Com auxílio do programa *Primer 3*, verificou-se a viabilidade desses *primers* com relação à porcentagem C/G, temperatura de anelamento (TM) e ausência de auto-complementariedade. Os *primers* foram ainda submetidos à confirmação de identidade com o auxílio do programa BlastN – opção *Search for Short Nearly Exact Matches*, no banco de dados do NCBI e sintetizados quimicamente pela Invitrogen.

e. <http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html> - *New England Biolabs NEBcutter*. Para análise de *Southern blot*, o DNA genômico total foi digerido com uma enzima de restrição que não reconhece sítios de restrição internos à ORF da MIOX e outra que reconhece. Através do programa *NEBcutter*, com a seqüência de nucleotídeos da ORF do gene *miox* de *A. thaliana*, foi possível definir as enzimas que poderiam ser utilizadas.

Descrição de alguns termos utilizados nas análises

a) Gi number: (*GenInfo Identifier*) identificador único para cada seqüência de nucleotídeos, independente de atualizações, representado por um número inteiro simples. Se uma seqüência difere de outra por apenas um par de bases, as duas possuirão diferentes gi(s), apesar de possuírem, por exemplo, o mesmo número de acesso.

b) Accession: número de acesso direto de uma seqüência de nucleotídeos ao GenBank. As letras indicam em qual centro a seqüência foi submetida. O complemento, separado do número de acesso por um ponto, indica qual é a versão (atualização).

c) **Protein id:** código similar ao número de acesso dado para seqüências de proteínas.

d) **Formato FASTA** (Pearson, 1990): é o modelo padrão para a comparação algrítima de uma seqüência heurística, usada para busca de seqüências no banco de dados. A primeira linha, indicada pelo sinal > (maior que), corresponde à identificação da seqüência. O texto é apresentado sem formatação (ou *courier new* 10), com quebra de linhas, contendo no máximo 80 caracteres por linha e obedecendo ao código padrão IUPAC/IUB (Anexo A1) de representação de ácidos nucléicos ou aminoácidos.

e) **E-value:** O *Expected Value* indica a probabilidade com que o alinhamento testado possa ser obtido ao acaso em um banco de dados no mesmo tamanho do utilizado na pesquisa. O número indicado corresponde à potência de 10. Por exemplo, $5e-23$ significa uma probabilidade de 5×10^{-23} . Quanto mais próximo de zero for o *E-value*, mais significativo é o alinhamento entre as seqüências. O cálculo do *E-value* leva em consideração o comprimento da seqüência em questão, portanto, para seqüências curtas, como no caso de *primers*, o valor de *E-value* pode ser alto, mesmo para seqüências idênticas.

f) **Bit Score:** medida de similaridade entre a consulta e o resultado da busca em uma base de dados. Essa medida é inversamente proporcional aos valores de *E-value*.

3.2 Clonagem do cDNA da MIOX

3.2.1 Extração de DNA

Observação:

- Todo material esterilizado por autoclavagem foi mantido por 15 minutos a pressão de 1 atm a 120°C.

O DNA genômico total foi extraído de plântulas de *A. thaliana* e de folhas de plantas jovens do clone 744 de *E. grandis*, fornecido pela Suzano Papel e Celulose, através do método CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987). Aproximadamente 80mg de material vegetal de *E. grandis* ou de *A. thaliana* foram macerados em cadinho de porcelana (previamente desinfestados a 200°C por 8 horas), com auxílio de nitrogênio líquido, transferido para tubo *ependorf* autoclavado (1mL) contendo 700µL de tampão de extração (Anexo A2) previamente aquecido (55°C), agitados e mantidos por 15 minutos a 55°C, com homogeneização em intervalos de 5 minutos. Em seguida, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos, antes da adição de 600µL de CIA 24:1 (24v clorofórmio : 1v álcool isoamílico). A homogeneização foi feita por inversão dos tubos (25 vezes) até a formação de uma emulsão, antes da centrifugação (18.000xg), à temperatura ambiente, por 7 minutos.

A fase aquosa (superior) foi transferida para tubo novo. A esse, adicionou-se 200µL de tampão de extração sem β-mercaptoetanol, e 600µL de CIA. Após a homogeneização, a amostra foi centrifugada (18.000xg), à temperatura ambiente, por 7 minutos. A fase aquosa superior foi novamente transferida para tubo novo, repetindo-se esse passo, uma segunda vez.

Após a centrifugação, a fase aquosa superior, contendo o DNA genômico, foi recuperada. A precipitação foi feita pela adição de 600µL de isopropanol, seguida de centrifugação (18.000xg), a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado lavado com 600µL de etanol 70%, mantido a -20°C por 20 minutos, antes da centrifugação por 15 minutos, 4°C, a 18.000xg. O precipitado, após a secagem, foi ressuspenso em 30µL de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=7,5), contendo 10µg/mL de RNase, e mantido a 37°C por 1 hora, antes de ser armazenado a 4°C. A verificação da qualidade do DNA total e a quantificação foram realizadas por eletroforese em gel de agarose (1%). As bandas foram visualizadas através de coloração com brometo de etídeo (0,01ng/µL) sob luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989) e comparadas com padrões de peso molecular.

3.2.2 Reação de PCR com *primers* específicos para a ORF

A reação de PCR do DNA genômico de *A. thaliana* e *E. grandis* com *primers* específicos da ORF do gene *miox* de *A. thaliana* foi feita para um volume final de 50µL, conforme indicado no Anexo A3.

A amplificação do segmento de DNA de *A. thaliana* foi realizada com 2 minutos iniciais a 94°C, e 38 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Já a amplificação do DNA de eucalipto, foi realizada com 2 minutos iniciais a 96°C, 3 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 42°C e 2 minutos a 72°C; mais 30 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C.

O produto de PCR (10µL de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5x (Anexo A4), submetido a corrente de 75V por 60 minutos, tendo como marcador de peso molecular 1kb DNA *Ladder* (Invitrogen), todos acrescidos de tampão de amostra (*Dye IV*) (Anexo A5) (Sambrook et al., 1989). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01ng/µL) sob luz ultravioleta.

3.2.3 Extração de RNA

Observações:

- Todo material plástico utilizado foi tratado para estar livre de RNAses, através de lavagem dos tubos com SDS 2% (p/v) por 2 horas a 70°C, seguida de lavagem com álcool comercial por 20 minutos e posterior lavagem com H₂O₂ 3% (p/v) por mais 20 minutos. Após enxágüe com água DEPC (dietilpirocarbonato) a 0,01% (v/v) por 20 minutos, os tubos foram autoclavados, por 15 minutos (1atm) a 120°C.
- Toda a vidraria utilizada, foi desinfectada em estufa a 200°C por 8 horas.
- A água foi tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato), na concentração de 0,1% (v/v), mantida a 37°C por 16 horas, seguida de autoclavagem (15 minutos, 1atm, 120°C).

O RNA total foi extraído a partir de 2g de material vegetal (plântulas de *A. thaliana*), conforme protocolo de Salzman et al. (1999). O material vegetal foi macerado

em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo, transferido para tubos de centrífuga contendo 10mL do tampão de extração (Anexo A6), seguido de agitação vigorosa, por 1 minuto, em vórtex. Em seguida, adicionou-se 10mL de CIA (24v clorofórmio : 1v álcool isoamílico), agitando-se vigorosamente a suspensão (200rpm) por 20 minutos, antes da centrifugação a 16.000xg por 10 minutos, a 4°C. A fase superior foi transferida para novo tubo repetindo-se a extração com CIA mais duas vezes para completa remoção do material de interfase. Ao sobrenadante final, em novo tubo, adicionou-se 2 volumes (20mL) de etanol absoluto e 0,1 volume (1mL) de NaCl 5M, para precipitação por 16 horas a -20°C.

Após esse período, procedeu-se uma centrifugação a 16.000xg, por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi então ressuscitado em 10mL de água DEPC e novamente centrifugado por mais 5 minutos a 20.000xg. O sobrenadante foi transferido para tubo novo ao qual adicionou-se 1 volume (10mL) de 1v CIA : 1v fenol. Após um período (10 minutos) de agitação, à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 13.000xg por 10 minutos. A fase superior foi transferida para tubo novo repetindo-se esse passo mais uma vez. Depois da centrifugação, adicionou-se 2 volumes (20mL) de etanol absoluto e 0,1 volume (1mL) de NaCl 5M ao sobrenadante, para precipitação adicional por 16 horas a -20°C.

Passado esse período, o precipitado resultante da centrifugação (16.000xg), por 15 minutos a 4°C, foi ressuscitado em 500µL de água milliQ tratada com DEPC. Ao volume ajustado para 1mL com água milliQ tratada com DEPC, adicionou-se 333µL de LiCl 8M. A precipitação foi realizada a 4°C por 3 horas, seguida de centrifugação por 20 minutos a 12.000xg, também a 4°C. O precipitado foi lavado com 400µL de etanol 80%, centrifugado (12000xg) por 10 minutos, a 4°C e, depois de seco sobre papel absorvente, ressuscitado em 100µL de água milliQ tratada com DEPC.

A qualidade da amostra foi verificada em espectrofotômetro, com base na relação A_{260nm}/A_{280nm} , onde valores maiores que 1,6 indicam boa qualidade do RNA extraído. Um *mix* da amostra de RNA (Anexo A7), foi ainda submetido a gel de agarose (1%) em tampão TAE 1X (Sambrook et al., 1989). A quantificação do RNA total foi feita também

por espectrofotometria, sendo a concentração calculada, para uma cubeta de 10mm, através da seguinte fórmula:

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

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

3.2.4 Purificação de mRNA a partir de RNA total

Isolou-se o mRNA, a partir de 75µg de RNA total com o auxílio do *Dynabeads*[®] mRNA *Purification Kit* (Dyna), conforme recomendações do fabricante. O uso desse *kit* baseia-se no pareamento de bases entre resíduos poli A na extremidade 3' da maioria dos mRNAs e resíduos *oligo* dT covalentemente ligados à superfície dos *Dynabeads Oligo* (dT)₂₅. Outros tipos de RNAs desprovidos de cauda poli A não hibridizam aos *Dynabeads Oligo* (dT)₂₅ e são prontamente eliminados.

Ao RNA total, numa diluição de 75µg em 100µL de água milliQ tratada com DEPC, acrescentou-se 100µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*) (Anexo A8). A amostra foi aquecida a 65°C por 2 minutos para que as estruturas secundárias fossem rompidas. Enquanto isso, 200µL (1mg) de *Dynabeads Oligo* (dT)₂₅ foram transferidos do estoque para um tubo *ependorf* de 1,5mL de capacidade. Os *Oligo* (dT)₂₅ foram lavados uma vez com auxílio do *Dynal MPC*[®]-S (concentrador magnético de partículas). Essa lavagem é feita removendo-se o tubo do magneto, ressuspendendo os *Oligo* (dT)₂₅ em 100µL de tampão de ligação (Anexo A8) e recolocando o tubo no magneto. Depois de 30 segundos, o sobrenadante é pipetado e o tubo, contendo os *Oligo* (dT)₂₅ limpos, removido do magneto.

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

Em seguida, a amostra homogeneizada foi colocada no magneto e depois de 30 segundos, o sobrenadante foi removido. O tubo foi retirado do magneto e lavado duas vezes com 200µL de tampão de lavagem B (*Washing Buffer B*) (Anexo A9), com auxílio do MPC, da mesma forma descrita anteriormente, removendo-se completamente o sobrenadante entre cada lavagem.

Para a eluição do mRNA adicionou-se 20µL de Tris-HCl 10mM ao precipitado, seguido de aquecimento (65°C) por 2 minutos. Após o aquecimento, o tubo foi colocado imediatamente no magneto. O mRNA eluído foi transferido para um tubo novo, livre de RNase. A quantidade e qualidade do mRNA purificado foram verificadas por espectrofotometria (A_{260nm} e A_{280nm}) e por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook et al., 1989).

3.2.5 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada através de amplificação com o *kit SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen), a partir do mRNA de plântulas de *A. thaliana*. Para uma reação de 50µL adicionou-se 25µL (2X *reaction Mix*, contendo 0,4mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO₄); 100pg de mRNA; 10µM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse* específicos da MIOX); 1µL de *RT/Platinum Taq Mix* e q.s.p. 50µL de água MilliQ autoclavada. Utilizou-se o seguinte programa, no termociclador, para amplificação: 30 minutos a 50°C; 2 minutos a 94°C; 38 ciclos: (15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C; 1 minuto e 30 segundos a 72°C), seguido de uma extensão final por 7 minutos a 72°C.

A identificação do produto de amplificação obtido da reação de RT-PCR, utilizando-se o mRNA de *A. thaliana* e *primers* específicos para a MIOX, foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5X (Anexo A4), submetido a corrente de 75V por 60 minutos, tendo como marcador de peso molecular

1kb DNA *Ladder* (Invitrogen), todos acrescidos de tampão de amostra (*Dye IV*) (Anexo A5) (Sambrook et al., 1989). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/ μ L) sob luz ultravioleta.

3.3 Southern blot

Para análise de *Southern blot* (Southern, 1975; Sambrook et al., 1989), 20 μ g de DNA genômico de *A. thaliana* e de eucalipto foram digeridos, separadamente, com as enzimas *EcoRI* e *PstI*, em excesso (50 unidades), de acordo com recomendações do fabricante (Invitrogen), a 37°C por 16 horas. O DNA digerido foi precipitado pela adição, de 1/10 do volume total, de acetato de amônia e, 2,5 vezes o volume, de etanol absoluto. As amostras foram deixadas a -20°C por 24 horas. Após centrifugação a 18.000xg, por 40 minutos a 4°C, o precipitado foi lavado com 600 μ L de etanol 70%, seguido de centrifugação e secagem, antes de ser ressuspensionado em 40 μ L de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=7,5). À este volume adicionou-se 8 μ L de sacarose 40%, para aumentar a densidade da amostra a ser submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (Anexo A4) e contendo brometo de etídio (0,01 ng/ μ L). Como marcador de peso molecular, foi utilizado 1kb DNA *Ladder* (Invitrogen). O gel foi submetido a uma corrente de 35V por 15 horas e fotografado juntamente com uma régua visível sob luz ultravioleta, que permite correlacionar a altura da banda obtida ao correspondente peso molecular do marcador.

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

Após lavagem, o DNA foi carregado, por capilaridade do gel, para a membrana de nylon *Hybond-N+* (Amersham Biosciences) pela solução de transferência 20X SSC

(Anexo A10) por 16 horas, de acordo com Sambrook et al. (1989). O DNA foi fixado à membrana por aquecimento (80°C) em forno, por duas horas.

O produto da reação de RT-PCR purificado com auxílio do *kit Concert™ Nucleic Acid Purification System* (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, foi utilizado como sonda para hibridização na análise de *Southern blot*. A sonda foi marcada de forma não radioativa, com auxílio do *kit Gene Images™ random prime labelling module* (Amersham Biosciences), segundo normas do fabricante. A 1μL do produto da reação RT-PCR (aproximadamente 50ng) foi acrescentado 24μL de água milliQ autoclavada. Esta solução foi desnaturada a 98°C por 7 minutos e transferida imediatamente para gelo, antes da adição de: 10μL de nucleotídeo *mix*; 5μL de *primers*, 1μL de enzima *Klenow*, fornecidos pelo *kit* e q.s.p. 50μL de água MilliQ autoclavada. Misturou-se suavemente e incubou-se a 37°C por 1 hora. Antes da hibridização, procedeu-se nova desnaturação da sonda a 98°C por 7 minutos.

Todos os passos da hibridização foram realizados no forno de hibridização. A membrana foi umedecida com 50mL de solução 5X SSC (Anexo A10) a 55°C por 30 minutos, após, substituiu-se esta solução por 20mL da solução de pré-hibridização (Anexo A11), na qual a membrana foi deixada por pelo menos 1 hora a 55°C. A hibridização se deu, após a adição da sonda marcada à solução de pré-hibridização, por 16 horas a 55°C. As lavagens de pós-hibridização da membrana foram realizadas com 100mL de solução I (1X SSC + SDS 0,1% p/v) e 100mL de solução II (0,5X SSC + SDS 0,1% p/v), a 55°C, por 15 minutos cada.

A detecção dos pontos de hibridização foi realizada com auxílio do *kit* de detecção *Gene Images CDP-Star detection module* (Amersham Bioscience). Após as lavagens de pós-hibridização, a membrana foi mantida por 1 hora, à temperatura ambiente, em solução bloqueadora, composta de 45mL de Tampão A (Anexo A12) e 1/10 v/v do agente bloqueador de detecção fornecido pelo *kit*. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo *antifluorescein-AP conjugate* diluído (1:5000) em 25mL de Tampão A + 0,5% BSA p/v, à temperatura ambiente, por 1 hora. O excesso de anticorpo foi removido por três lavagens de 10 minutos cada, com 100mL de solução de lavagem

(300mL Tampão A + 0,3% Tween-20 v/v). Em capela de fluxo laminar, a membrana foi colocada sobre um plástico, e sobre ela distribuiu-se, homoganeamente, 300 μ L do reagente de detecção, fornecido pelo *kit*. A reação se deu durante 5 minutos. O excesso de líquido foi removido com auxílio de uma régua, antes que as bordas do saco plástico fossem seladas.

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

3.4 Clonagem do cDNA da MIOX no vetor (TOPO)

O produto de amplificação do RT-PCR foi clonado no vetor pENTR/D-TOPO[®] (Figura 2) com auxílio do *Kit pENTR Directional TOPO[®] Cloning* (Invitrogen) seguindo-se as normas do fabricante. Esse *kit* permite a clonagem de produtos de reação de PCR sem extremidades coesivas no Sistema *Gateway*[™], onde uma recombinação sítio-específico possibilita a clonagem do inserto na orientação correta, com eficiência igual ou superior a 90%.

Para cada reação TOPO[®] *Cloning* utilizou-se 2 μ L do produto da reação RT-PCR; 1 μ L da solução salina; 2 μ L H₂O milliQ autoclavada e 1 μ L do vetor TOPO[®]. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Para a transformação, utilizou-se 3 μ L da reação TOPO[®] *Cloning*, em 25 μ L de células quimicamente competentes de *E. coli One Shot*[®] TOP10 (Invitrogen). Os tubos contendo as células, acrescidas do vetor recombinante, foram incubados por 5 minutos, em gelo, seguido de choque térmico a 42°C por 30 segundos, retornando ao gelo por mais 5 minutos. Às células

células recombinantes, adicionou-se 250µL de meio de cultura SOC (Invitrogen) (Anexo A13), previamente mantido à temperatura ambiente, onde permaneceram por 1 hora, sob agitação (150rpm) a 37°C, antes de serem plaqueadas em meio seletivo LB sólido (Anexo A14), acrescido de 50µg/mL de canamicina. As colônias transformantes foram selecionadas após 16 horas de incubação a 37°C.

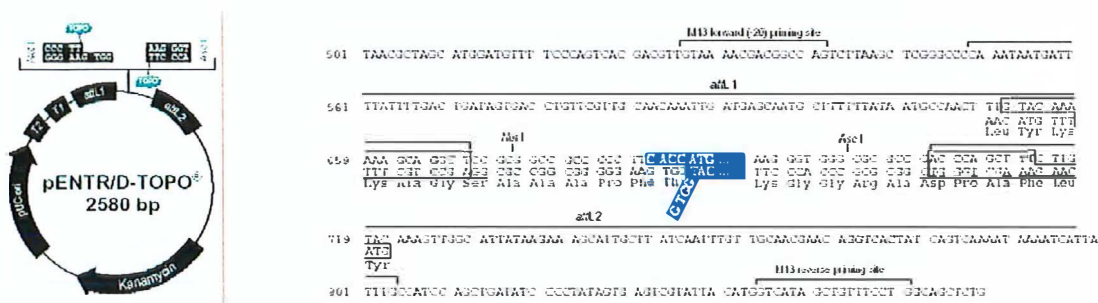


Figura 2 - Representação esquemática da construção do vetor pENTR/D-TOPO® (Invitrogen) com indicação do sítio de clonagem delimitado por sítios de restrição únicos. O gene quimérico foi inserido entre os sítios de reconhecimento TOPO

3.5 Análise por PCR das colônias transformadas

As colônias transformadas foram analisadas através de PCR (Anexo A3), utilizando-se um inóculo de cada colônia resistente ao meio seletivo com *primers* específicos da ORF do gene *miox*. O inóculo da colônia foi adicionado à reação de PCR, com auxílio de um palito enfiado, sob fluxo laminar. Para a amplificação do segmento de DNA das colônias foi utilizado programa sugerido pelo protocolo de transformação do vetor pENTR/D-TOPO®: 10 minutos a 94°C, com o objetivo de romper as células e inativar endonucleases; 35 ciclos de (45 segundos a 92°C, para desnaturação do DNA; 1 minuto a 60°C, para anelamento dos *primers*; e 2 minutos a 72°C, para polimerização da fita complementar ao molde); e mais um ciclo de 10 minutos a 72°C, para extensão final. O produto de PCR (10µL de cada reação) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5X (Anexo A4), submetido à corrente de 75V por 60 minutos, tendo como marcador de peso molecular 1kb DNA *Ladder* (Invitrogen), todos acrescidos de tampão de amostra (*Dye IV*) (Anexo

1kb DNA *Ladder* (Invitrogen), todos acrescidos de tampão de amostra (*Dye IV*) (Anexo A5) (Sambrook et al., 1989). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01ng/μL) sob luz ultravioleta.

3.6 Extração de DNA plasmidial

Para confirmar a autenticidade dos clones recombinantes, extraiu-se o DNA plasmidial da colônia transformada utilizando-se o *Plasmid Mini Kit* (Qiagen). Uma colônia, que apresentou produto de amplificação (PCR) com peso molecular similar ao do gene de interesse, foi usada como inóculo em 10mL de meio seletivo LB líquido (Anexo A14) suplementado com 50μg/mL de canamicina, sendo mantida em agitador orbital a 200rpm, 37°C, por 16 horas. Em seguida, uma fração (3mL) foi sedimentada por meio de centrifugação a 3.500xg, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado bacteriano foi utilizado para a extração do DNA plasmidial.

O protocolo de purificação do *kit* baseia-se na técnica modificada de lise alcalina (Birboim & Doyle, 1979) pela adição dos tampões P1, P2 e P3 (Anexo A15), seguida pela adição do DNA plasmidial à resina de troca-aniônica Qiagen, previamente equilibrada com a solução QBT (Anexo A16). RNA, proteínas, pigmentos e impurezas de baixo peso molecular são removidos por meio de 4 lavagens com a solução QC (Anexo A17) de média salinidade. O DNA é eluído pela solução QF (Anexo A18) de alta salinidade e, então, concentrado e dessalinizado por precipitação em isopropanol e lavagem com etanol 70%. O DNA resultante foi diluído em água para posterior sequenciamento. A quantificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5X (Anexo A4), submetido à corrente de 75V por 60 minutos, tendo 50 e 100ng de DNA λ (Promega) como padrão de peso molecular, todos acrescidos de tampão de amostra (*Dye IV*) (Anexo A5) (Sambrook et al., 1989). As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01ng/μL) sob luz ultravioleta.

3.7 Seqüenciamentos

Os seqüenciamentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular – CENA/USP, através de aparelho ABI PRISM 3100 *genetic analyser*, que consiste de uma plataforma automatizada com capacidade de analisar 16 amostras simultaneamente por eletroforese capilar. As amostras de DNA foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em termociclador *GeneAmp 9700* e mantidas em gelo por 2 minutos antes de serem transferidas para o seqüenciador 3100.

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

As seqüências de nucleotídeos obtidas dos seqüenciamentos foram comparadas com dados genéticos do *GenBank* por meio do programa BlastX (Altschul et al., 1997), no *site* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, que permite a procura de proteínas a partir de seqüências de nucleotídeos. A busca resulta em uma representação gráfica onde a linha vermelha que se estende por toda a parte superior representa a própria seqüência examinada, denominada *query*. As seqüências resultantes da busca são ordenadas por valores decrescentes de *Bit score*. À medida que o valor do *Score* decai (e o correspondente *E-value* aumenta), menor é o grau de homologia.

Os resultados dos seqüenciamentos também foram confrontados com a seqüência da ORF da MIOX de *A. thaliana* através do programa *Blast 2 Sequences*, disponível no mesmo *site*.

3.8 Clonagem no vetor *Gateway*

O vetor binário *Gateway* pK7WG2D (adquirido do *Department of Plant Systems Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology*, Bélgica) possui o gene marcador *nptII* (neomicina fosfotransferase II) que permite a seleção de transformantes, em meio seletivo contendo canamicina (Bevan et al., 1983). Possui também a seqüência codante (gene *EgfpER*) para a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) sob o controle transcricional do promotor e terminador *nos*, da nopalina sintetase (Hellens et al., 2000), localizada na borda esquerda do T-DNA, o que permite a seleção visual das plantas transformadas. Já, o sítio de recombinação, para inserção do fragmento de interesse está localizado na borda direita do T-DNA.

Como nesse sistema de clonagem, o produto de PCR está flanqueado por sítios de recombinação *att*, pode ser clonado de forma direcional nesses vetores, que contêm sítios de recombinação compatíveis, numa reação mediada pela *Gateway* LR *clonase* (Karimi et al., 2002).

A modulação via *anti-sense* do gene *miox*, foi feita pela inserção do cDNA no sítio de clonagem do vetor, localizado entre o promotor e o terminador do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S (Odell et al., 1985). Uma vez que o gene já possui a seqüência de direcionamento CACC na região 5' do *reverse primer*, e considerando o posicionamento do promotor e terminador com relação aos sítios de clonagem *attR1* e *attR2* (Figura 3), o vetor pK7WG2D foi destinado à modulação *anti-sense* do gene *miox*. Para clonagem do gene em células competentes DH5 α , utilizou-se o kit LR *clonase*TM *Enzyme Mix* (Invitrogen) conforme normas do fabricante e vetor *Gateway* pK7WG2D (Karimi et al., 2002). Para a reação, adicionou-se 300ng do *Entry clone* (pENTR D-TOPO*anti-sense-miox*), 300ng do vetor de destino (*Gateway* – pK7WG2D), 4 μ L do tampão de reação (5X LR *Clonase*TM), q.s.p. 16 μ L de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=8,0) e 4 μ L de LR *Clonase*TM *enzyme mix*. A reação foi mantida a 25°C por 3 horas. Em seguida adicionou-se 2 μ L de proteinase K à reação, que foi incubada por 10 minutos a 37°C.

A transformação das células de *E. coli* DH5 α , foi feita acrescentando-se 1 μ L da reação LR *clonase* a 25 μ L de células competentes DH5 α . As células foram então incubadas em gelo por 30 minutos, sendo em seguida submetidas a um choque térmico, a 42°C por 45 segundos, e imediatamente transferidas para gelo. Após 5 minutos, 450 μ L de meio SOC (Anexo A13) foram acrescentados às células que foram mantidas a 37°C sob agitação constante (200rpm) por 1 hora. Aliquotas de 100 μ L foram transferidas para placas contendo meio LB sólido (Anexo A14) acrescido de espectinomicina (100 μ g/mL) e incubadas por 16 horas a 37°C.

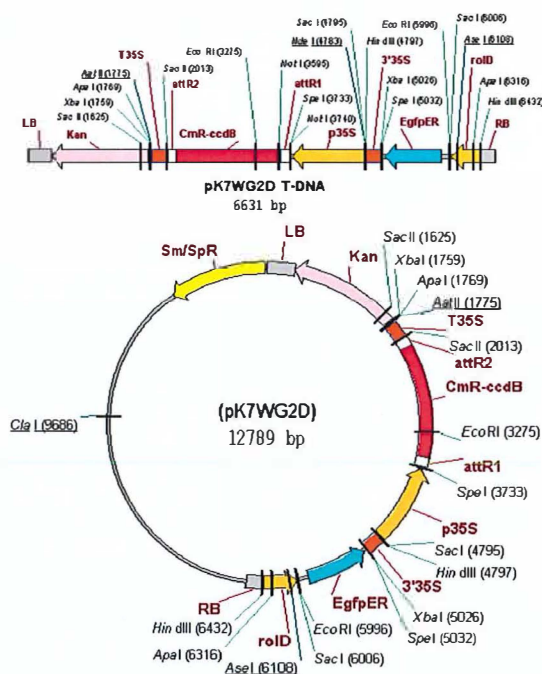


Figura 3 - Representação esquemática da construção do vetor *Gateway*, pK7WG2D, com indicação do sítio de clonagem delimitado por sítios de restrição únicos (*attR1* e *attR2*) e do promotor e terminador 35S. O gene quimérico foi inserido direcionalmente, sendo a seqüência de direcionamento CACC do *reverse primer* inserida por recombinação no sítio *attR1*

3.9 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

O plasmídio recombinante pK7WG2D/*anti-sense-miox* foi utilizado para a transformação da linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) por eletroporação, de acordo com Lilley (1993).

Células de *A. tumefaciens* (EHA 105) “desarmadas” (Hood et al., 1986), foram estriadas em placa contendo meio AB (Anexo A19) sólido e mantidas por 72 horas a 28°C, para obtenção de colônias isoladas. Para preparo do pré-inóculo, uma única colônia foi transferida para 5mL de meio AB (Ishida et al., 1996) (Anexo A19) líquido e mantida a 200rpm por 24 horas a 28°C. Após, retirou-se 1 mL desta solução para ser transferida para frasco *erlenmeyer* contendo 50mL de meio AB (Anexo A19) líquido, onde foi mantida por 24 horas a 28°C e 200rpm. Em seguida, a solução, contendo a bactéria, foi transferida para tubo *falcon* e centrifugada a 3.300xg, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e procedeu-se a lavagem do precipitado. A lavagem foi feita através de três sucessivas ressuspensões e centrifugações a 3.300xg, a 4°C, por 10 minutos, e descarte do sobrenadante, com 30mL da seguinte seqüência de soluções: i) HEPES 1mM (pH=7,0); ii) água MilliQ autoclavada; iii) HEPES 1mM (pH=7,0) + glicerol 10%. O precipitado final foi ressuspenso em 500µL de HEPES 1mM (pH=7,0) + glicerol 10%.

Para a eletroporação, uma alíquota (80µL) dessa solução celular em HEPES+glicerol foi transferida para tubo *eppendorf*, à qual adicionou-se 50ng (0,3µL) do plasmídio (pK7WG2D/*miox-anti-sense*), sendo em seguida transferida para cubeta (de 0,2cm de *gap*) de eletroporação e submetida a um pulso elétrico de 2,5kV em eletroporador (Bio-Rad). Após a eletroporação, a solução foi recuperada e transferida para tubo contendo 500µL de meio SOC (Anexo A13) sem antibiótico que foi mantido por 2 horas a 200rpm e 28°C, a fim de que as bactérias se recuperassem, antes de serem plaqueadas em meio seletivo.

Para seleção das bactérias transformadas pela eletroporação, alíquotas de 50 e 100µL foram plaqueadas em meio seletivo AB sólido (Anexo A19), contendo espectinomicina (100mg/L), e mantidas à temperatura de 28°C por 72 horas, a análise das colônias foi feita via PCR, com *primers* específicos para a ORF da mio-inositol oxigenase de *A. thaliana*.

3.10 Transformação de tabaco

Os clones de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) recombinantes, contendo os transgenes, foram utilizados para transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana), por infecção de discos foliares (Horsch et al., 1985; Deroles & Gardner, 1988).

Folhas jovens cultivadas em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, foram colhidas, lavadas e rapidamente imersas em etanol 70% (30 segundos), antes de serem transferidas para solução de hipoclorito de sódio (1%), contendo Tween 20 (0,05%), por 5 minutos, sob agitação manual, em capela de fluxo laminar. Após a desinfestação, as folhas foram lavadas 3 vezes com água MilliQ autoclavada.

Discos foliares de 1cm de diâmetro, cortados em capela de fluxo laminar, sobre papel de filtro autoclavado, foram transferidos para placas de petri, contendo 50mL da cultura, de *A. tumefaciens* transformada, em fase log ($DO_{600nm}=0,7$) e incubados por 5 minutos, sob leve agitação manual.

Os discos foliares inoculados foram colocados em placas de *Petri* contendo meio de cultura (Anexo A20), composto por sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas B5, acrescido de 1mg/L de BAP e 0,1mg/L de NAA (Deroles & Gardner, 1988) por 48 horas. Após esse período, os discos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio (0,25%) contendo Tween 20 (0,05%) por 10 minutos, seguido de mais três lavagens em água MilliQ autoclavada, e transferidos para meio de cultura (Anexo A20) acrescido de 1mg/L de BAP, 0,1mg/L de NAA e dos antibióticos de seleção (100mg/L de canamicina) e de inibição de desenvolvimento da *A. tumefaciens*

(600mg/L de cefotaxima). Após 4 semanas, os brotos que regeneraram dos cali formados nesse meio seletivo, foram transferidos, por uma semana, para indução de alongamento, para meio de cultura (Anexo A20) acrescido de 0,1mg/L de IBA e dos antibióticos, cefotaxima (400mg/L) e canamicina (50mg/L). Para enraizamento, os brotos alongados foram transferidos para meio de cultura (Anexo A20) sem fitorreguladores, acrescido apenas dos antibióticos, canamicina (25mg/L) e cefotaxima (300mg/L).

A confirmação da presença do transgene nos brotos transformantes foi feita por análise de PCR (Anexo A3) com *primers* do gene *nptII forward* (5'-GCTTGGGTGGAGAGGCTATT-3') e *reverse* (5'-GCGATACCGTAAAGCACGAG-3'), de resistência à canamicina. Os brotos que enraizaram foram transferidos para vasos e mantidos em câmara de crescimento, sob condições controladas de umidade, luminosidade e temperatura para produção de sementes autofecundadas, por duas gerações.

As sementes provenientes das plantas de tabaco autofecundadas em casa de vegetação foram desinfestadas, em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos antes de serem lavadas 5 vezes com água milliQ autoclavada. Estas progênes foram avaliadas quanto à segregação do gene de resistência à canamicina, em meio de cultura (Anexo A20), acrescido de canamicina (50mg/L), sendo mantidas apenas aquelas que, após 30 dias, apresentaram segregação significativa 3:1 na geração T₁ e as que não segregaram na geração T₂. A análise estatística utilizada nos testes de segregação foi feita através de teste χ^2 , conforme fórmula abaixo, e tabela de significância para um grau de liberdade e 5% de probabilidade ($\chi^2_{\text{tabelado}}=3,84$).

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

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

3.11 Análise Molecular das plantas transgênicas de tabaco

3.11.1 *Southern blot*

Plantas T₂, que não segregaram, foram utilizadas para determinar o número de cópias do transgene inserido, através da análise de *Southern blot*. Para isso, o DNA genômico das plantas transgênicas de tabaco foi extraído de folhas, através do método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), como já descrito no item 3.2.1 de Material e Métodos. Para a realização do *Southern blot*, uma amostra de 20µg do DNA genômico foi digerida com a enzima de restrição *EcoRI*, por 16 horas e, em seguida, submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, a 35 Volts, por 15 horas (Sambrook et al., 1989), conforme descrito no item 3.3 de Material e Métodos.

O gene *nptII* (de resistência a canamicina) foi usado como sonda na hibridização e sua marcação e detecção foram feitas com auxílio dos kits de marcação *Gene Images*TM *Random Prime Labelling Module* e de detecção *Gene Images*TM *CDP-Star Detection Module*, ambos da Amersham Biosciences, sob as mesmas condições de temperatura e adstringência, descritas no item 3.3 de Material e Métodos.

3.11.2 *Northern blot*

O padrão de expressão das linhagens transgênicas foi analisado por *Slot blot* de RNA de plantas, transgênicas T₂ e selvagens, de tabaco. O RNA total foi extraído a partir de botão floral, de acordo com metodologia de Salzman et al. (1999), como descrito no item 3.2.3 de Material e Métodos.

O RNA precipitado (50µg), por centrifugação a 18.000xg à temperatura de 4°C, por 40 minutos, seguido de lavagem com etanol 80% foi eluído em 500µL de solução desnaturante (10mM NaOH, 1mM EDTA). O RNA foi carregado, por vácuo através de *Bio-Dot*[®] *SF Microfiltration Apparatus* (Bio-Rad), para a membrana de nylon *Hybond-N+* (Amersham Biosciences) pré-umedecida com solução 6X SSC (Anexo A10). Após breve lavagem da membrana com solução 2X SSC (Anexo A10) acrescida de 0,1% SDS, o RNA foi fixado à membrana por aquecimento (80°C) em estufa, por duas horas. A

hibridização foi realizada com sonda de dupla fita, específica para o gene *miox* de tabaco, clonado através de reação RT-PCR de mRNA de caules de plântulas (40 dias) de tabacos selvagens.

A extração do RNA total, assim como a purificação do mRNA do tabaco foram feitas conforme descrito para plântulas de *A. thaliana* nos itens 3.2.3 e 3.2.4 de material e métodos. A síntese do cDNA foi realizada através de amplificação com o kit *SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen). Para uma reação de 50µL adicionou-se 25µL (*2X reaction Mix*, contendo 0,4mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO₄); 100pg de mRNA; 10µM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse* específicos da MIOX de *A. thaliana*); 1µL de *RT/Platinum Taq Mix* e q.s.p. 50µL de água MilliQ autoclavada. Utilizou-se o seguinte programa, no termociclador, para amplificação: 45 minutos a 42°C; 2 minutos a 94°C; 3 ciclos: (45 segundos a 94°C, 2 minutos a 42°C; 2 minutos e 30 segundos a 72°C) e 35 ciclos: (45 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C; 2 minutos e 30 segundos a 72°C).

O produto da reação de RT-PCR purificado do gel, com auxílio do kit *Concert™ Nucleic Acid Purification System* (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, foi utilizado como sonda para hibridização na análise de RNA *Slot blot*. A sonda foi marcada de forma não radioativa, com auxílio do kit *Gene Images™ random prime labelling module* (Amersham Biosciences), segundo normas do fabricante. A 1µL do produto da reação RT-PCR (aproximadamente 50ng) foi acrescentado 24µL de água milliQ autoclavada. Esta solução foi desnaturada a 98°C por 7 minutos e transferida imediatamente para gelo, antes da adição de: 10µL de nucleotídeo *mix*; 5µL de *primers*, 1µL de enzima *Klenow*, fornecido pelo *kit*, e q.s.p. 50µL de água MilliQ autoclavada. A reação foi mantida a 37°C por 1 hora. Antes da sonda ser utilizada na hibridização, procedeu-se nova desnaturação a 98°C por 7 minutos.

Todos os passos da hibridização foram realizados no forno de hibridização. A membrana foi umedecida com 50mL de 5X SSC (Anexo A10) a 55°C por 30 minutos. Após, substituiu-se esta solução por 20mL da solução de pré-hibridização (Anexo A11), na qual a membrana foi deixada por pelo menos 1 hora a 55°C. A hibridização se deu,

após a adição da sonda marcada à solução de pré-hibridização, por 16 horas a 55°C. As lavagens de pós-hibridização da membrana foram realizadas com 100mL de solução I (1X SSC + SDS 0,1% p/v) e 100mL de solução II (0,5X SSC + SDS 0,1% p/v), a 55°C, por 15 minutos cada.

A detecção dos pontos de hibridização foi realizada com auxílio do *kit* de detecção *Gene Images CDP-Star detection module* (Amersham Biosciences). Após as lavagens de pós-hibridização, a membrana foi mantida por 1 hora, à temperatura ambiente, em solução bloqueadora, composta de 45mL de Tampão A (Anexo A12) e 1/10 v/v do agente bloqueador de detecção fornecido pelo *kit*. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo *antifluorescein-AP conjugate* diluído (1:5000) em 25mL de Tampão A + 0,5% BSA p/v, à temperatura ambiente, por 1 hora. O excesso de anticorpo foi removido por três lavagens de 10 minutos cada, com 100mL de solução de lavagem (300mL Tampão A + 0,3% Tween-20 v/v). Em capela de fluxo laminar, a membrana foi colocada sobre um plástico, e sobre ela distribuiu-se, homoganeamente, 300µL do reagente de detecção, fornecido pelo *kit*. A reação se deu durante 5 minutos. O excesso de líquido foi removido com auxílio de uma régua, antes da selagem das bordas do saco plástico.

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

O RNA das plantas transgênicas, transferido para a membrana, foi quantificado através de nova hibridização com sonda marcada do gene 18S, conforme descrito acima para o gene *miox* endógeno. Para isso, a membrana foi lavada, para remoção do gene endógeno, com solução de 0,1%SDS (w/v) a 98°C até resfriamento da solução, seguida

de lavagem por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução 2X SSC (Anexo A10). A hibridização e a detecção, com o gene 18S, foram realizadas sob as mesmas condições do gene *miox* endógeno.

3.12 Análise Química dos componentes da parede celular de tabacos transgênicos

Para realização das análises químicas de plantas transgênicas de tabaco, 18 plantas T₂ homozigotas de cada um dos 5 eventos de transformação analisados, bem como 18 plantas da testemunha (selvagem) foram cultivadas em casa de vegetação sob condições controladas de umidade, temperatura e luminosidade. Após emissão dos botões florais, os caules foram isolados, limpos e secos em estufa a 50°C por uma semana, antes de serem moídos em porções de seis caules, possibilitando a análise química de três repetições por evento.

Para as análises químicas utilizou-se apenas a serragem, proveniente da moagem em moinho tipo Willey, que passou por peneira de malha 40 mesh e que ficou retida em malha de 60 mesh. Como a madeira é um material altamente higroscópico, dada a capacidade de adsorção de água pela celulose, hemiceluloses e lignina, a serragem obtida foi incubada em estufa a 104°C por 4 horas e transferida para dessecador até seu resfriamento, antes de ser devidamente pesada para obtenção da massa de matéria seca.

A remoção de extrativos solúveis em solventes orgânicos, como ácidos resinosos e graxos, ésteres, ceras, substâncias insaponificáveis e coloridas, foi feita a partir de porções de 1g de massa de matéria seca, de cada repetição, em bateria de extração *Soxhlet* através de três etapas: a) solução de tolueno e etanol na proporção 2:1 (v/v) por 5 horas (4 sinfonadas por hora); b) etanol por 4 horas (4 sinfonadas por hora); c) banho em água a 95°C por 1 hora. Em seguida, este material foi filtrado em placa porosa.

Madeiras tratadas com ácidos fortes sofrem hidrólise dos carboidratos, deixando um resíduo insolúvel determinado como lignina. Apenas pequena parte da lignina é solubilizada, sendo determinada como lignina solúvel. Assim, para determinação da lignina, adicionou-se 3mL de solução de ácido sulfúrico 17N em 300mg de massa de

matéria seca das amostras livres de extrativos, incubando-se em banho a 30°C por uma hora, sob agitação com bastão de vidro. Após, as amostras foram filtradas em cadinhos sinterizados previamente tarados. O material remanescente do cadinho foi incubado a 104°C por 5 horas, sendo posteriormente pesado para obtenção da quantidade de lignina insolúvel. A lignina solúvel foi determinada através de leitura do filtrado, em espectrofotômetro, a 215 e 280nm, conforme norma TAPPI T 249 cm 85 (TAPPI, 1991).

Para determinação dos carboidratos, os polímeros de açúcar precisam ser quebrados em monômeros através de hidrólise ácida, para isso, incubou-se 300mg de massa de matéria seca livre de extrativos, em 3mL de ácido sulfúrico 17N, em banho a 30°C por 1 hora sob agitação constante. Em seguida, uma segunda hidrólise foi realizada através da adição de 84mL de água MilliQ, sendo estas amostras transferidas e mantidas em autoclave a 120°C por 1 hora. Também uma mistura padrão, contendo todos os possíveis carboidratos presentes na amostra (L-arabinose, D-galactose, D-glicose, D-xilose e D-manose, todos da Sigma[®]) foi preparada e submetida às mesmas condições das amostras. Após o resfriamento da segunda hidrólise, as amostras e os padrões foram filtrados em cadinhos de placa porosa. Estes filtrados (hidrolisados secundários) foram transferidos para balão volumétrico, onde os volumes foram completados a 1L com água MilliQ. A determinação foi feita em cromatógrafo de íons DIONEX ICS 2500, equipado com gradiente de bomba GS50, detector eletroquímico ED50 e amostrador automático AS50. O fluxo do eluente foi de 0,25mL/minuto, todos preparados com água MilliQ. As injeções foram de 25µL, determinadas pelo *loop*. A separação dos carboidratos foi feita em NaOH 4mM, em corrida isocrática através de coluna de troca aniônica DIONEX PA 10 com guarda-coluna CarboPac PA 10.

Para análise dos ácidos urônicos, uma mistura padrão contendo ácido D-glucurônico (Sigma[®]) e ácido D-Galacturônico (Fluka[®]) foi preparada e submetida às mesmas condições das amostras. À partir de hidrolisado secundário, obtido conforme descrito no parágrafo anterior, as análises foram feitas no cromatógrafo de íons DIONEX ICS 2500. O fluxo dos eluentes, preparados com água MilliQ, foi de 0,25mL/minuto. Todas as injeções determinadas pelo *loop* foram de 25µL. A separação dos ácidos

urônicos foi feita através de gradiente de NaOH 100mM com NaOAc 150mM, em coluna de troca iônica DIONEX PA10 e guarda-coluna CarboPac PA10.

3.13 Expressão da Enzima Mio-inositol oxigenase em *Escherichia coli*

Para a expressão da enzima recombinante em *E. coli*, foi utilizado o *kit E. coli Expression System with Gateway[®] Technology* (Invitrogen). Este *kit* se baseia no sistema de expressão pET, que foi inicialmente desenvolvido por Studier et al. (1990). Este sistema apresenta vantagens como a alta atividade e especificidade da RNA polimerase do bacteriófago T7, que permite a expressão regulada de genes heterólogos, com a sequência promotora T7 (Rosenberg et al., 1987; Studier & Moffatt, 1986; Studier et al., 1990), em *E. coli*.

A linhagem de bactéria *E. coli* BL21-AITM faz parte do *kit* e é utilizada como hospedeira para a expressão de genes regulados pela RNA polimerase T7. Esta linhagem deriva das linhagens BL21 (Grodberg & Dunn, 1988; Studier & Moffatt, 1986) e contém uma inserção cromossômica do gene que codifica a RNA polimerase T7, que se encontra dentro do *locus araB* do *operon araBAD*. Isto significa que a expressão da RNA polimerase T7 se encontra sob controle do promotor *araBAD*. Para indução deste promotor, utiliza-se como substrato a L-arabinose (Lee, 1980; Lee et al., 1987). Variações nas concentrações deste substrato no meio de cultivo permitem modular os níveis de expressão de um determinado gene.

O promotor *araBAD* (P_{BAD}) pode ser regulado positivamente e negativamente, na linhagem BL21-AITM de *E. coli*, pelo produto do gene *araC* (Ogden et al., 1980; Schleif, 1992). *AraC* é um regulador transcricional que forma um complexo com L-arabinose. Na ausência deste substrato, o dímero *AraC* se une à molécula de O₂ e ao sítio I₁ do *operon araBAD*, formando um *loop* de DNA de 210pb. Neste caso, a transcrição de *araC* é inibida pelo sítio I₂. Quando a L-arabinose está presente no meio, o dímero *AraC* se une a ambos os sítios inibidores I₁ e I₂. Assim, o desaparecimento do *loop* de 210pb permite

210pb permite que o AMPc una-se ao seu ativador CAP, promovendo a expressão do promotor P_{BAD} (Figura 4).

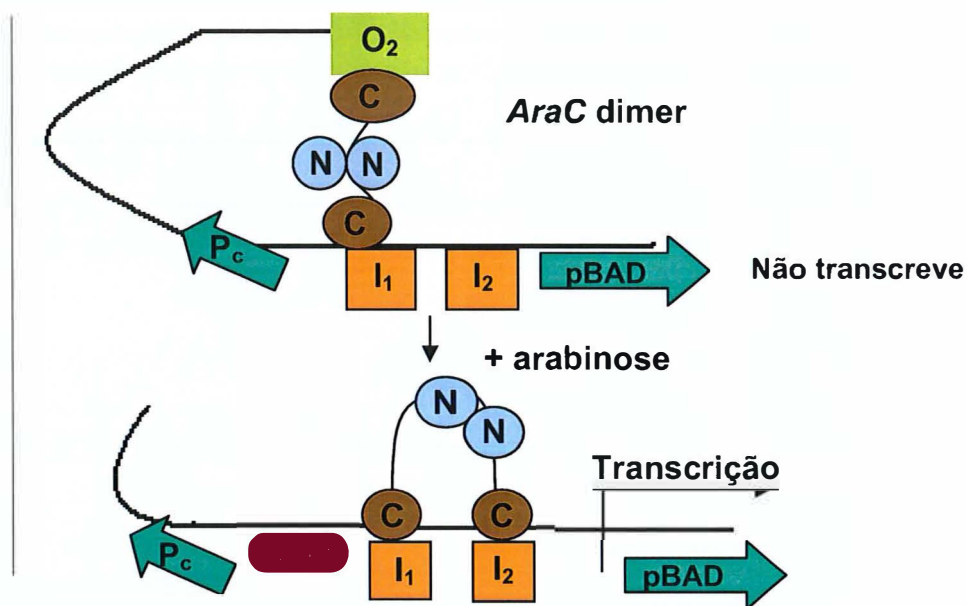


Figura 4 - Mecanismo de regulação do *operon araBAD*, conforme protocolo do *kit E. coli Expression System with Gateway® Technology* (Invitrogen)

3.13.1 Clonagem do gene *miox* no vetor $pDEST^{TM}17$

Para clonagem do gene de interesse no vetor de expressão em *E. coli* ($pDEST^{TM}17$) há necessidade de que o gene fique na orientação correta, ou seja, o códon de início ATG deve ficar posicionado logo em seguida do promotor T7 de expressão em procariotos (Figura 5). Como o gene foi clonado no sentido *anti-sense* no vetor TOPO, houve a necessidade de nova clonagem do gene, agora no sentido *sense*. Para isso, novos *primers* específicos para a ORF do gene *miox* de *A. thaliana* foram sintetizados, apenas alterando a posição da seqüência de direcionamento (CACC) do sistema *Gateway* de clonagem, do *reverse primer* para o *forward primer*. A partir desses *primers*, novo cDNA foi sintetizado, conforme descrito no item 3.2.5 de Material e Métodos, porém utilizando-se, no termociclador, o seguinte programa para amplificação: 30 minutos a 45°C; 2 minutos a 94°C; 38 ciclos de (15 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C; 1 minuto e 30 segundos a 72°C), seguido de uma extensão final por 7 minutos a 72°C. Este

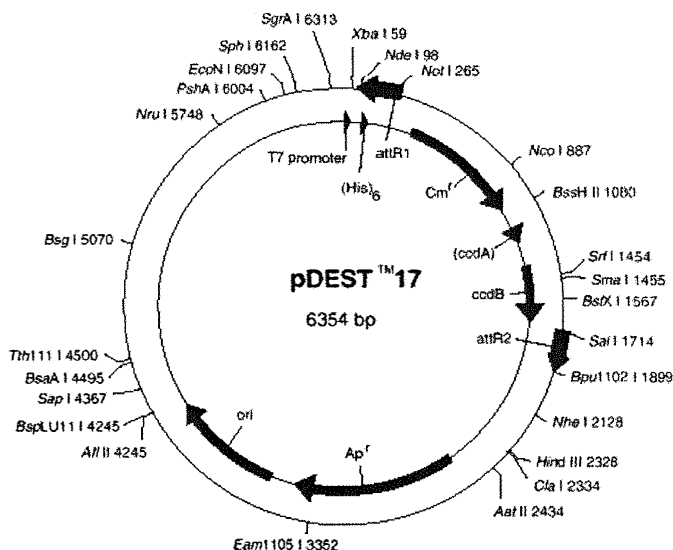


Figura 5 - Representação esquemática da construção do vetor *Gateway*, pDEST[™]17, com indicação do sítio de clonagem delimitado por sítios de restrição únicos (*attR1* e *attR2*) e do promotor T7. O gene quimérico foi inserido direcionalmente, sendo a seqüência de direcionamento CACC do *forward primer* inserida por recombinação no sítio *attR1*

cdNA foi analisado por seqüenciamento e clonado no vetor TOPO, conforme descrito anteriormente no item 3.4 de Material e Métodos.

Para clonagem do gene em células competentes DH5 α , utilizou-se o *kit LR clonase*[™] *Enzyme Mix* (Invitrogen) conforme normas do fabricante e vetor *Gateway pDEST*[™]17 (Invitrogen). Para reação, adicionou-se 300ng do *Entry clone* (pENTR D-TOPO/*miox-sense*), 300ng do vetor de destino (*Gateway – pDEST*[™]17), 4 μ L do tampão de reação (5X LR *Clonase*[™]), q.s.p. 16 μ L de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=8,0) e 4 μ L de LR *Clonase*[™] *enzyme mix*. A reação foi mantida a 25°C por 3 horas, à qual adicionou-se 2 μ L de proteinase K, seguida de incubação por 10 minutos a 37°C.

A transformação das células de *E. coli* DH5 α , foi feita acrescentando-se 2 μ L da reação LR *clonase* em 25 μ L de células competentes DH5 α . As células foram mantidas em gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos, sendo imediatamente transferidas para gelo. Após 5 minutos, 450 μ L de meio

SOC (Anexo A13) foram acrescentados às células que foram incubadas a 37°C sob agitação (200rpm) por 1 hora. Alíquotas de 100µL foram transferidas para placas contendo meio LB sólido (Anexo A14) acrescido de ampicilina (100µg/mL). Os clones recombinantes foram selecionados após 16 horas a 37°C.

3.13.2 Transformação da *E. coli* BL21-AITM

O plasmídio pDESTTM17/*miox*, depois de extraído conforme descrito anteriormente no item 3.7, foi utilizado para a transformação química da linhagem de *E. coli* BL21-AITM (Invitrogen). Para isso, acrescentou-se 10ng de DNA (plasmídio pDESTTM17/*miox*) em 50µL de células quimicamente competentes BL21-AITM. Essas foram mantidas em gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos, sendo imediatamente transferidas para gelo. Após 5 minutos, 250µL de meio SOC (Anexo A13) foram acrescentados às células que foram mantidas a 37°C sob agitação (200rpm) por 30 minutos. Alíquotas de 100µL foram transferidas para placas contendo meio LB sólido (Anexo A14) acrescido de ampicilina (100µg/mL). Os clones recombinantes foram selecionados após 16 horas a 37°C.

3.13.3 Escolha do clone de maior expressão da enzima MIOX

Colônias recombinantes selecionadas em meio LB (Anexo A14) acrescido do agente seletivo ampicilina (100mg/L) foram isoladas para posterior utilização em experimento de purificação da enzima MIOX.

Quatro clones de BL21-AITM recombinantes foram analisados quanto ao nível de expressão da MIOX, para determinação do melhor clone. Para isso, foram cultivados em 5mL (pré-inóculo) de meio LB (Anexo A14) acrescido de 100mg/L de ampicilina, a 37°C sob agitação (200rpm) até atingir DO_{600nm} entre 0,6 e 1,0. Essas culturas foram usadas como inóculo de nova cultura, mantida sob as mesmas condições, para atingir DO_{600nm} entre 0,05 e 0,1 (diluição 1:20, a partir do pré-inóculo). Esta diluição permite o retorno rápido das células para a fase *log* do crescimento bacteriano e, portanto, o alcance da densidade de células adequado. As células foram mantidas neste meio até a

fase *mid-log* ($DO_{600nm} = 0,4$), adequada para a expressão gênica. A cultura bacteriana foi dividida em duas partes de igual volume. Em uma das partes adicionou-se L-arabinose numa concentração final de 0,2%, necessária para indução da proteína MIOX no sistema de expressão em *E. coli* (*Gateway*[®] - Invitrogen). Assim, obtiveram-se duas culturas de cada colônia transformante: uma induzida e outra não-induzida pela L-arabinose.

Após adição de L-arabinose, amostras de 500 μ L foram coletadas nos tempos T₀ (0 hora), T₁ (1 hora), T₂ (2 horas), T₃ (3 horas) e T₄ (4 horas) de cultivo a 37°C, e centrifugadas a 8.000xg por 1 minuto a 4°C. Em 40 μ L do sobrenadante adicionou-se 40 μ L de tampão 2X SDS-PAGE (Anexo A21) que foi submetido a fervura por 5 minutos antes de ser carregado (10 μ L) em gel de poliacrilamida (Anexo A22). Finalizando a eletroforese após 5 horas a 100V, os géis foram corados com Comassie Blue R250 sob agitação por 4 horas, seguido de descoloração (Anexo A23) por mais 8 horas.

Os precipitados foram utilizados para análise de proteínas solúveis e insolúveis, para isso, foram ressuspensos em 500 μ L de *Lysis Buffer* (Anexo A24), seguidos de 4 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 42°C, para facilitar o rompimento das células. As células rompidas foram centrifugadas a 10.000xg por 1 minuto a 4°C, para precipitar as proteínas insolúveis. O sobrenadante foi transferido para tubo novo, ao qual adicionou-se um volume de 2X SDS-PAGE (Anexo A21) sendo, em seguida, submetido a fervura por 5 minutos. Aos precipitados, acrescentou-se 500 μ L de 1X SDS-PAGE (Anexo A21) antes de serem submetidos a fervura por 5 minutos. Os géis de poliacrilamida (Anexo A22) foram carregados com 40 μ L de cada amostra e submetidos à eletroforese a 100V por 5 horas. Os géis foram corados com Comassie Blue R250 sob agitação por 4 horas, seguido de descoloração (Anexo A23) por mais 8 horas.

3.13.4 Purificação e análise da enzima MIOX

A purificação da proteína em condições nativas foi realizada com o auxílio do *kit ProBond™ Purification System* (Invitrogen), conforme normas do fabricante. Esse *kit* é destinado à purificação de proteínas recombinantes, que contenham 6 resíduos de histidina (6xHis-tag), expressas em células de bactéria, inseto ou de mamíferos. Este sistema é baseado na alta afinidade e seletividade, de sua resina quelante de níquel, em proteínas que contêm 6 resíduos histidina alinhados. A proteína que se liga à resina, é eluída com tampão de baixo pH ou por competição por imidazol ou histidina. Desta forma, essas proteínas podem ser purificadas sob condições desnaturante, nativa ou híbrida.

O clone de BL21-AITM/*miox* de maior expressão foi cultivado em 5mL (pré-inóculo) de meio LB (Anexo A14) acrescido de 100mg/L de ampicilina, a 37°C sob agitação (200rpm) até atingir DO_{600nm} entre 0,6 e 1,0. Essa cultura foi usada como pré-inóculo de nova cultura em 50mL de meio LB (Anexo A14) contendo ampicilina e mantida sob as mesmas condições. Quando esta cultura atingiu DO_{600nm}=0,4, acrescentou-se L-arabinose para uma concentração final de 0,2%, para indução da expressão do gene *miox*. Após 4 horas, esta cultura foi centrifugada a 3.000xg por 5 minutos a 4°C.

O precipitado foi ressuspendido em 8mL de *Native Binding Buffer* (Anexo A25) acrescido de 8mg de lisozima e incubado em gelo por 30 minutos. Esta solução foi sonicada em gelo por três ciclos de: sonicação de 10 segundos em média intensidade, congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C. Em seguida, esta solução foi centrifugada a 3.000xg por 15 minutos a 4°C para precipitar as membranas rompidas. Parte do sobrenadante (10µL) foi utilizado para análise, via SDS-PAGE, e o restante foi adicionado à resina ProBondTM (Invitrogen), previamente equilibrada em 6mL de *Native Binding Buffer* (Anexo A25), conforme instruções do fabricante. Após 1 hora sob suave agitação, para manter a resina suspensa, a coluna foi acondicionada em suporte para que a resina sedimentasse por gravidade. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, efetuou-se 4 lavagens da resina com 8mL de *Native Wash Buffer* (Anexo

A25), seguidas de descarte do sobrenadante após a resina sedimentar. Em seguida, a resina foi ressuspensa em 10mL de *Native Elution Buffer* (Anexo A25) e alíquotas de 1mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem do cDNA que codifica a enzima MIOX de *A. thaliana*

4.1.1 Busca de genes ortólogos no banco de dados do NCBI

Atualmente existem 5 acessos para esta enzima, porém, a seqüência de *Sus scrofa* (Arner et al., 2001), foi escolhida por ter sido a primeira espécie a ser seqüenciada e determinada. O cDNA do gene *miox* foi seqüenciado, pela primeira vez, de uma biblioteca de cDNA de rim de porco (Arner et al., 2001). Esta seqüência, com 282 aminoácidos, depositada no NCBI com número de acesso AF401311, foi utilizada na busca de seqüências ortólogas em genomas de plantas. Como um dos objetivos do trabalho é a futura transformação de eucalipto, procurou-se um organismo vegetal modelo no estudo de madeira que possuísse xilogênese semelhante, como a *A. thaliana* (Chaffey et al., 2001).

Com auxílio do programa BlastX do NCBI e utilizando-se da seqüência de nucleotídeos da enzima MIOX de *Sus scrofa*, localizaram-se seqüências ortólogas de proteínas de plantas. A seqüência de espécie vegetal com maior ortologia (menor E-value) encontrada, do cromossomo 2 de *Arabidopsis thaliana* (Town & White¹) (Figura 6), foi utilizada como seqüência molde para a clonagem do gene *miox*.

4.1.2 Verificação de domínio conservado

Através do *site* <http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>, foi possível verificar a qual família de proteínas (Pfam) a seqüência de aminoácidos candidata pertencia, através da verificação da existência de domínios conservados na seqüência de

¹TOWN, C.D.; WHITE, O. (The institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Dr, Rockville, USA). *Arabidopsis thaliana* chromosome 2 CHR2v07142002 genomic sequence. (submetido em 29-jul-2002).

Query= gi|17432543|gb|AF401311.1|AF401311 *Sus scrofa* myo-inositol oxygenase (MIOX) mRNA, complete cds (883 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 28380058 sp Q8WN98 MIOX PIGInositol oxygenase (Myo-inos	612	e-174
gi 20127575 ref NP_060054.2 aldehyde reductase (aldose red	546	e-154
gi 21955132 ref NP_665714.1 aldehyde reductase (aldose red	545	e-154
gi 6694290 gb AAF25204.1 unknown [Homo sapiens]	545	e-154
gi 12656149 gb AAK00766.1 kidney-specific protein 32 [Homo	540	e-152
gi 9845269 ref NP_063973.1 hypothetical protein LOC56728 [537	e-152
gi 9910318 ref NP_064361.1 aldehyde reductase (aldose redu	535	e-151
gi 15488825 gb AAH13543.1 renal-specific oxido-reducatsse [532	e-150
gi 21296669 gb EAA08814.1 agCP7814 [Anopheles gambiae str.	334	9e-91
gi 24663188 ref NP_648556.1 CG6910-PA [Drosophila melanoga	317	1e-85
gi 18399158 ref NP_565459.1 expressed protein; protein id:	258	1e-67
gi 15236160 ref NP_194356.1 putative protein; protein id:	256	3e-67
gi 23296360 gb AAN13052.1 unknown protein [Arabidopsis tha	256	3e-67
gi 21554393 gb AAM63498.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	255	6e-67
gi 21536858 gb AAM61190.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	255	6e-67
gi 15241891 ref NP_200475.1 putative protein; protein id:	253	3e-66

Figura 6 - Resultado de BlastX no NCBI, para busca de seqüências de proteínas de plantas ortólogas ao gene *miox* de *Sus scrofa*. Seqüência em negrito, representa proteína de *A. thaliana* com maior ortologia

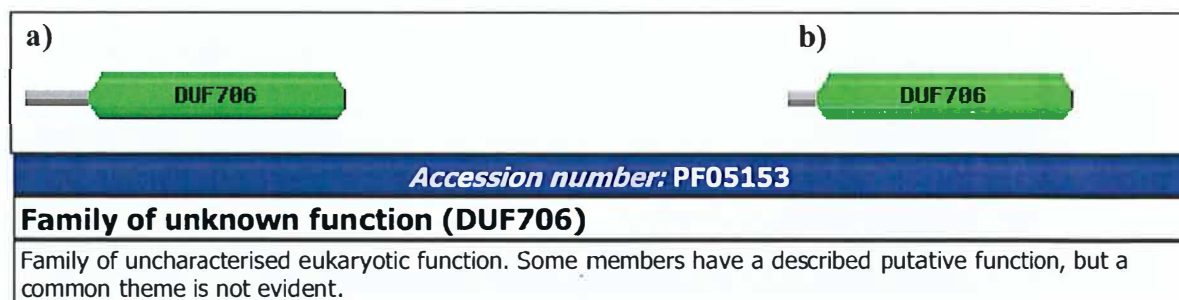


Figura 7 - Representações diagramáticas da extensão do domínio DUF706 (em verde) em relação a sequênci deduzida a partir do cDNA: **a)** candidato a codificador da MIOX de *A. thaliana*, **b)** codificador da MIOX de *Sus scrofa*, obtidas no programa Pfam. O domínio DUF706 corresponde a família de proteína de função desconhecida

aminoácidos de *A.thaliana* (gi:18399158). Como a família de proteínas apresentada para a seqüência de *A. thaliana* é de função desconhecida (Figura 7a), verificou-se, então, se existem domínios conservados da proteína do gene *miox* de *Sus scrofa* (seqüência de proteínas do NCBI) no Pfam (Figura 7b). Apesar de não ser conhecido o gene que expressa a proteína em *A. thaliana*, pode-se inferir que a seqüência utilizada corresponde ao gene *miox*, pois o domínio conservado da proteína tanto de *Sus scrofa* como de *A. thaliana* é o mesmo, DUF706. Desta forma, utilizou-se a seqüência de *Arabidopsis thaliana* como referência para a clonagem.

4.1.3 Alinhamento da seqüência do gene *miox* com várias espécies

Foi feita uma análise comparativa, através do programa *ClustalW*, das sequências de aminoácidos de organismos que apresentam o mesmo domínio (DUF706), para verificação do grau de identidade da enzima em diferentes organismos. Os organismos utilizados neste alinhamento foram: *Homo sapiens* (gis: 17932582; 20127575; 31982885), *Sus scrofa* (gi: 17432544), *Cryptococcus neoformans* (gi: 27227549) e *A. thaliana* (gi:18399158). Pelo resultado apresentado na Figura 8, pode-se observar que há similaridade entre as seqüências da proteína nos diferentes organismos, desde bactérias até plantas e mamíferos. Entretanto, pode-se observar, ainda, que nas regiões 3' e 5' não há homologia suficiente para síntese de *primers* universais para o gene *miox*. Assim, para que pudéssemos confeccionar *primers*, tendo como objetivo a possibilidade de clonar esse gene de eucalipto, optamos pela síntese de *primers* específicos para a seqüência de *A. thaliana* (gi: 18399158).

4.1.4 Definição dos *primers* para a ORF

De posse da seqüência da ORF do gene candidato a *miox* de *A. thaliana* (gi: 18399158), definiu-se como *primers* as primeiras 20 bases das extremidades 3' (para o *reverse primer*) e 5' (para o *forward primer*).

gi 17932582 gb AAL47192.1	-----MKVTVGPDPSLVYRPDVDPEVAKDK-----	25
gi 20127575 ref NP_060054.2	-----MKVTVGPDPSLVYRPDVDPEVAKDK-----	25
gi 31982885 ref NP_060054.3	-----MKVTVGPDPSLVYRPDVDPEVAKDK-----	25
gi 17432544 gb AAL39076.1 AF40	-----MK---DSDPSQVYRPMDPEAAKDK-----	22
gi 27227549 gb AAN85573.1	MHAPEVNDYIKHKAVKLDQVSDIDEVNVLKLKQKDAVEKTQAEIDYDLA	50
gi 18399158 ref NP_565459.1	-MTILVEHFVPSRVDEKVKVIEERD--NELVLDDGGFVVPKSKETDAFDAP	47
	: * * * * :	
gi 17932582 gb AAL47192.1	-----ASFRNYTSG--PLLDRVFTTYKLMHTHQTVDFVRSKHAQFG	64
gi 20127575 ref NP_060054.2	-----ASFRNYTSG--PLLDRVFTTYKLMHTHQTVDFVRSKHAQFG	64
gi 31982885 ref NP_060054.3	-----ASFRNYTSG--PLLDRVFTTYKLMHTHQTVDFVRSKHAQFG	64
gi 17432544 gb AAL39076.1 AF40	-----GSFRNYTSG--PLLDRVFRTYKLMHTWQTVDFVRKKHAQFG	61
gi 27227549 gb AAN85573.1	SKFDQEKDKAAFRQYEEA-CDR---VKNFYAEQHLKQTYEYNVKIRQEFR	96
gi 18399158 ref NP_565459.1	---DMNFLGHSFRDYENGESERQQGVVEEYRMQHIIHQTYDFVKKMRKEYG	94
	: * * * * : : : :	
gi 17932582 gb AAL47192.1	GFSYKKMTVMEAVDLLDGLVDESDDVDVDFPNSFHAFQTAEGIRKAHPDKD	114
gi 20127575 ref NP_060054.2	GFSYKKMTVMEAVDLLDGLVDESDDVDVDFPNSFHAFQTAEGIRKAHPDKD	114
gi 31982885 ref NP_060054.3	GFSYKKMTVMEAVDLLDGLVDESDDVDVDFPNSFHAFQTAEGIRKAHPDKD	114
gi 17432544 gb AAL39076.1 AF40	GFSYKRMTVLEAVDMLDGLVDESDDVDVDFPNSFHAFQTAEGIRKAHPDKD	111
gi 27227549 gb AAN85573.1	NTVRRARMSIWEAMELLDNLVDESDDPTSVGQIEHLLQTAEAIRRDGKPE-	145
gi 18399158 ref NP_565459.1	KLNMEMSIWECCCELLNNVVDESDDLDEPQIQHLLQTAEAIRRDYDDED	144
	: * * * * : : * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * :	
gi 17932582 gb AAL47192.1	WFHLVGLLHDLGKVLAL---FGEPQWAVVGDTPFVGCRRPQASVVFCDSTF	161
gi 20127575 ref NP_060054.2	WFHLVGLLHDLGKVLAL---FGEPQWAVVGDTPFVGCRRPQASVVFCDSTF	161
gi 31982885 ref NP_060054.3	WFHLVGLLHDLGKVLAL---FGEPQWAVVGDTPFVGCRRPQASVVFCDSTF	161
gi 17432544 gb AAL39076.1 AF40	WFHLVGLLHDLGKVLAL---AGEPQWAVVGDTPFVGCRRPQASVVFCDSTF	158
gi 27227549 gb AAN85573.1	WMQVTLGLIHDLGKLLCF---FGADGQWVVDVDFVVGCKFSDKIIPD-TF	192
gi 18399158 ref NP_565459.1	WLHLTALIHDLGKVLLEPEFGGLPQWAVVGDTPFVGCRRPQASVVFCDSTF	193
	* : : : * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * : : * * * * * * * * * * :	
gi 17932582 gb AAL47192.1	QDNPDLDQPRYSTELGMYQPHCGLDRVLMSWGHDYMYQVMKFNKFSLPP	211
gi 20127575 ref NP_060054.2	QDNPDLDQPRYSTELGMYQPHCGLDRVLMSWGHDYMYQVMKFNKFSLPP	211
gi 31982885 ref NP_060054.3	QDNPDLDQPRYSTELGMYQPHCGLDRVLMSWGHDYMYQVMKFNKFSLPP	211
gi 17432544 gb AAL39076.1 AF40	QDNPDLDQPVYSTELGMYQPHCGLENALMSWGHDYMYQVMKFNKFSLPP	208
gi 27227549 gb AAN85573.1	KSNPDYNNPKLNTKYGVEPNCGLDNVLLSWGHDYMYEICK-NQSTLPP	241
gi 18399158 ref NP_565459.1	KGNHDIINPKYNTKNGVYTEGCGLDNVLMSWGHDYMYLVAKKNGTTLPH	243
	: * * * * : * :	
gi 17932582 gb AAL47192.1	EAFYMIREFHSFYPWHTGRDYQQLCSQQDLAMLPWVREFNKFDFLYTKCPDL	261
gi 20127575 ref NP_060054.2	EAFYMIREFHSFYPWHTGRDYQQLCSQQDLAMLPWVREFNKFDFLYTKCPDL	261
gi 31982885 ref NP_060054.3	EAFYMIREFHSFYPWHTGRDYQQLCSQQDLAMLPWVREFNKFDFLYTKCPDL	261
gi 17432544 gb AAL39076.1 AF40	EAFYIIRFHSFYPWHTGGDYRQLCNEQDLAMLPWVQEFNKFDFLYTKGSDM	258
gi 27227549 gb AAN85573.1	EALAMIRYHSFYPWREGAYEHLMEKDYSQLKAVKAFNPYDLYSKSDPP	291
gi 18399158 ref NP_565459.1	AGLFIIRYHSFYPLHKAGAYTHLMNDEDRDLKWLHVFNKYDLYSKSKVL	293
	: : * :	
gi 17932582 gb AAL47192.1	PDVDKLRPYQGLIDKYCPGILSW	285
gi 20127575 ref NP_060054.2	PDVDKLRPYQGLIDKYCPGILSW	285
gi 31982885 ref NP_060054.3	PDVDKLRPYQGLIDKYCPGILSW	285
gi 17432544 gb AAL39076.1 AF40	PDVDELRLPYQGLIDKYCPGVLCW	282
gi 27227549 gb AAN85573.1	PKKEELKPYQSLISKFFPEEVQW	315
gi 18399158 ref NP_565459.1	VDVEQVKPYISLKNKYFPAKLKW	317
	: : : : * :	

Figura 8 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da enzima MIOX de *Homo sapiens* (gi_s: 17932582; 20127575; 31982885), *Sus scrofa* (gi: 17432544), *Cryptococcus neoformans* (gi: 27227549) e *A. thaliana* (gi:18399158), através do programa ClustalW. Os asteriscos indicam resíduos idênticos, dois pontos indicam substituições conservadas, um ponto indica variação em uma ou mais seqüências e os traços indicam os intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento

Como foi usado o sistema *Gateway*[®] de clonagem da Invitrogen, adicionamos a seqüência de direcionamento CACC do sistema direcional TOPO, para modulação *anti-sense* do gene *miox*, na extremidade 5' do *reverse primer*. Pelo programa *Primer3*, verificou-se a viabilidade destes *primers* (Figura 9).

Os *primers* foram, ainda, submetidos à confirmação de identidade com auxílio do programa BLASTN do banco de dados do NCBI (opção *search for short nearly exact matches*), encontrando-se 100% de identidade com o gene candidato de *A. thaliana*.

4.1.5 Extração do DNA genômico

O DNA genômico de *A. thaliana* e de *E. grandis* foi utilizado, para realização de PCR, com os *primers* confeccionados a partir da seqüência candidata do gene *miox* de *A. thaliana* e posterior análise de *Southern blot*, nas duas espécies.

Pela análise de PCR do DNA genômico de *A. thaliana*, com *primers* específicos para a ORF, observamos a possível presença de íntrons, pois o produto de amplificação resultante corresponde a aproximadamente 2kb (Figura 10), maior que o tamanho esperado do cDNA, de 954pb (Arner et al., 2001).

Na tentativa de clonar o gene *miox* de eucalipto, a mesma reação foi feita utilizando DNA genômico de *E. grandis* e os *primers* de *A. thaliana*, entretanto não houve amplificação, indicando que as regiões 5' e 3' do gene não são conservadas entre essas espécies vegetais.

4.1.6 Extração de mRNA de *A. thaliana*

Como observamos a presença de íntrons, optamos por utilizar o cDNA do gene *miox*, através de reação RT-PCR, obtido com auxílio do kit *SuperScript*[™] *One-Step* RT-PCR *with Platinum*[®] *Taq* (Invitrogen). Este produto foi posteriormente utilizado, também como sonda para a análise de *Southern blot*. O produto amplificado apresentou altura de banda, em gel de agarose, pouco abaixo de 1kb (Figura 11), tamanho aproximadamente correspondente à ORF do gene *miox* (954pb) (Arner et al., 2001).

4.2 Análise de *Southern blot* – *A. thaliana* e *E. grandis*

As enzimas escolhidas, após análise pelo programa *Rebase Ncbutter*, para digestão do DNA genômico de *A. thaliana* e de eucalipto foram a *EcoRI*, que cliva uma vez a ORF do gene candidato a *miox* de *A. thaliana*, e *PstI*, já que esta se encontra na relação de enzimas que não clivam a ORF.

O padrão de banda para o DNA de *A. thaliana*, está de acordo com o esperado para uma cópia do gene no genoma, tanto quando digerido com *EcoRI* onde apareceram 2 bandas, como quando digerido com *PstI*, apresentando apenas uma banda (Figura 12).

Pela análise de *Southern blot* com o DNA de *E. grandis* (Figura 13), percebe-se que o gene *miox* de eucalipto tem homologia com o gene de *A. thaliana*, devido à hibridização da sonda com regiões do genoma do eucalipto, abrindo perspectiva, desta maneira, da possibilidade de transformação desta espécie arbórea com o gene de *A. thaliana* para superexpressão ou repressão deste gene.

4.3 Clonagem do cDNA da MIOX no vetor (TOPO)

A clonagem do produto de amplificação do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* com *primers* específicos, foi realizada, seguida de transformação química de células competentes de *E. coli* (TOP 10), com auxílio do *kit pENTR directional TOPO[®] cloning* (Invitrogen), seguindo normas do fabricante, conforme descrito no item 3.4 de Material e Métodos.

Das 4 colônias transformantes obtidas em meio seletivo (LB acrescido de 50µg/mL de canamicina), analisadas por reação de PCR, com os *primers* da ORF do gene *miox*, duas destas colônias apresentaram produto da amplificação com tamanho próximo de 1kb (tamanho da ORF = 954pb). A partir destas colônias realizou-se, então, a extração dos plasmídios, com auxílio do *Plasmid Mini kit* (Qiagen) conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos, para serem seqüenciados.

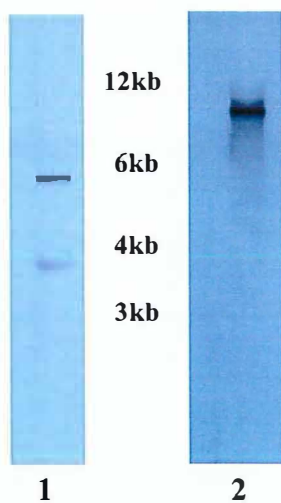


Figura 12 - Radiografia da análise de *Southern blot* com digestão do DNA genômico de *A. thaliana*, usando como sonda o cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*, (1) digestão com *EcoRI*; (2) digestão com *PstI*

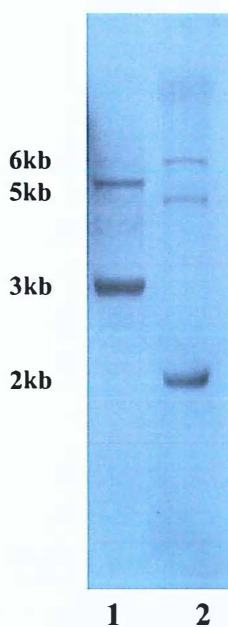


Figura 13 - Radiografia da análise de *Southern blot* com digestão do DNA genômico de *E. grandis*, usando como sonda o cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*, (1) digestão com *EcoRI*; (2) digestão com *PstI*

4.3.1 Sequenciamento do DNA plasmidial

Os plasmídios extraídos foram seqüenciados, com *primers* M13 (*forward* e *reverse*), conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos. O resultado do seqüenciamento foi analisado através dos programas Blast 2 *sequences* (Figura 14) e BlastX (Figura 15) do NCBI, comprovando a clonagem do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*. No caso do gene *miox* clonado de *A. thaliana*, a análise de BlastX mostra a existência de homologia entre 222 pares de bases da seqüência do clone e o gi:18399158. Essa homologia inicia-se a partir da base 156, devido ao anelamento do *primer* M13 ao vetor. A análise de BlastX confirma a identidade da seqüência clonada.

Query:	563	ggcaaggttctccttctgccagaattcgggtggtcttccccagtgggctgctcgttggcgat	622
Sbjct:	641	ggcaaggtttcccttttncennaattcggnggt-tcccccnngggcnntggnggggggt	583
Query:	623	acatttccagttggatgtaccttcgactcagccaatattcaccacaagtatttcaaagga	682
Sbjct:	582	acatttccanttggaggtcconttggntcagccnattttccccccnagntnttcaaaggn	523
Query:	683	aaccatgatatcaacaacccaaagtacaacacaaaaaatggagttaactgaaggatgt	742
Sbjct:	522	aaccntgatatcancaccccnaagtcancacccaaaaaatggagttnccctgaaggatgt	463
Query:	743	ggtttagacaatgttctcatgtcatggggtcatgacgactacatgtatttgggtggctaag	802
Sbjct:	462	ggtttagacaatgttctcatgtcatggggtcatgacgactacatgtatttgggtggctaag	403
Query:	803	aagaatggcagcacccttctcacc-gctggtctcttcattattcgatatcattcctttta	861
Sbjct:	402	aagaatggcagcacccttctccccgctggtctcttcattattcgatatcattcctttta	343
Query:	862	tccattgcacaaggcaggagcctacacacacttgatgaacgatgaggacagagatgatct	921
Sbjct:	342	tccattgcacaaggcaggagcctacacacacttgatgaacgatgaggacagagatgatct	283
Query:	922	caagtggctccatgtcttcaataaatatgacctatacagtaagagcaaagttctggtaga	981
Sbjct:	282	caagtggctccatgtcttcaataaatatgacctatacagtaagagcaaagttctggtaga	223
Query:	982	tgtcgaacaagtgaagccttactacatttactcatcaacaagattttccggcgaaact	1041
Sbjct:	222	tgtcgaacaagtgaagccttactacatttactcatcaacaagattttccggcgaaact	163
Query:	1042	aaaatggtgag	1052
Sbjct:	162	aaaatggtgag	152

Figura 14 – Análise de Blast 2 *sequences* no *site* do NCBI, entre a seqüência do plasmídio TOPO/*miox-anti-sense* (*Query*) e a seqüência candidata do gene *miox* de *A. thaliana* (gi:18399158) (*Sbjct*)

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gi 18399158 ref NP_565459.1	expressed protein [Arabidopsis...		160	3e-63
gi 21554393 gb AAM63498.1	unknown [Arabidopsis thaliana]		160	3e-63
gi 13877657 gb AAK43906.1	AF370587.1 Unknown protein [Arabi...		160	3e-63
gi 25411930 pir C84581	hypothetical protein At2g19800 [imp...		141	1e-58
gi 21536858 gb AAM 61190.1	unknown [Arabidopsis thaliana]		138	5e-51
gi 15241891 ref NP_200475.1	expressed protein [Arabidopsis...		138	5e-51
gi 26451656 dbj BAC42925.1	unknown protein [Arabidopsis th...		132	3e-49
gi 30683840 ref NP_172904.2	expressed protein [Arabidopsis...		132	3e-49
gi 7484478 pir T08116	hypothetical protein - Monterey pine...		129	7e-49
gi 7262695 gb AAF43953.1	AC012188.30 Strong similarity to a...		114	7e-44
gi 7527731 gb AAF63180.1	AC010657.16 T5E21.2 [Arabidopsis t...		114	7e-40
gi 27227549 gb AAN85573.1	myo-inositol oxygenase [Cryptoco...		91	1e-31
gi 31208867 ref XP_313400.1	ENSANGP00000011385 [Anopheles ...		88	8e-31
gi 30687167 ref NP_194356.2	expressed protein [Arabidopsis...		135	9e-31
gi 7487428 pir T06010	hypothetical protein T25K17.70 - Ara...		135	9e-31
>gi 18399158 ref NP_565459.1 expressed protein [Arabidopsis thaliana]				
gi 20197290 gb AAC62136.2	expressed protein [Arabidopsis thaliana]			
Length = 317				
Score = 160 bits (405), Expect(2) = 3e-63, Identities = 74/74 (100%), Positives = 74/74 (100%), Frame = -2				
Query: 377 AGLFIIRYHSFYPLHKAGAYTHLMNDEDRDDLKWLHVFNKYDLYSKSKVLVDVEQVKPYY 198				
AGLFIIRYHSFYPLHKAGAYTHLMNDEDRDDLKWLHVFNKYDLYSKSKVLVDVEQVKPYY				
Sbjct: 244 AGLFIIRYHSFYPLHKAGAYTHLMNDEDRDDLKWLHVFNKYDLYSKSKVLVDVEQVKPYY 303				
Query: 197 ISLINKYFPAKWK 156				
ISLINKYFPAKWK				
Sbjct: 304 ISLINKYFPAKWK 317				

Figura 15 – Análise de BlastX no *site* do NCBI da sequência do plasmídeo TOPO/*miox-anti-sense* (*Query*), apresentando alta homologia com a sequência candidata do gene *miox* de *A. thaliana* (gi:18399158) (*Sbjct*)

4.4 Clonagem no vetor *Gateway*

Feita a clonagem no vetor binário *Gateway*, como descrito em Material e Métodos, procedeu-se a análise de PCR de alguns dos clones recombinantes, selecionados em espectinomicina (100mg/mL). Verificando-se que os padrões de banda estavam de acordo com o esperado, ou seja, apresentaram um produto de amplificação de ~1kb, correspondente ao tamanho da ORF, o vetor recombinante foi então, usado para transformação de plantas de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*.

4.4.1 Análise do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* clonado

Através dos vários seqüenciamentos realizados do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*, pode-se afirmar que a sequência clonada no vetor *Gateway*[®] não difere da

sequência depositada no banco de dados do NCBI sob a descrição de proteína expressa de *A. thaliana* (acesso [NM_127538](#)).

A proteína codificada pelo cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* (Figura 16), apresenta motivo aldo-ceto redutase conservado, com serina essencial para ligação à NADPH, além de resíduos de histidina e cisteína conservados, necessários para manter a função enzimática de enzimas dependentes de ferro (Arner et al., 2001).

4.5 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Após transformação, via eletroporação, de *A. tumefaciens* com o cassete de expressão (Figura 17), proveniente do vetor *Gateway*[®], procedeu-se a análise de PCR, com *primers* específicos para o transgene, de algumas colônias, ao acaso, que cresceram em meio seletivo. Um clone, que apresentou produto de amplificação correspondente ao tamanho da ORF (Figura 18), foi utilizado no experimento de transformação de plantas de tabaco.

4.6 Análise das plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*

Os discos foliares transformados, conforme descrito em Material e Métodos, foram induzidos à diferenciação celular (Figura 19) e regeneração de plantas. Os brotos (Figura 20) obtidos dos cali foram induzidos ao enraizamento (Figura 21), ainda em meio seletivo. As plantas que enraizaram em canamicina foram transferidas para vasos, aclimatadas e posteriormente submetidas à análise de PCR com *primers* do gene *nptII*, de resistência à canamicina, para confirmação da presença do transgene. Os transformantes primários que apresentaram produto de amplificação correspondente a 700pb, em gel de agarose (Figura 22), foram cultivados e autofecundados, em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, para produção de sementes, de forma que sua progênie pudesse ser avaliada, quanto à segregação do gene de resistência à canamicina.

```

>gi|18399158|ref|NP_565459.1| expressed protein [Arabidopsis thaliana]
MTILVEHFVPSRVDEKKVIEERDNELVLDGGFVVPKSKETDAFDAPDMNFLGHSFRDY
ENGESERQQGVVEEFYRMOHIHQTYDFVKKMRKEYGKLNKMEMSIWECCELLNNVDES
PDLDEPQIQHLLQTAEAIRRDPDEDWLHLTALIHDLGKVLPLPEFGGLPQWAVVGDTF
PVGCTFDSANIHKKYFKGNHDINPKYNTKNGVYTEGCGLDNVLMSWGHDDYMYLVAKK
NGTTLPHAGLFIIRYHSFYPLHKAGAYTHLMNDEDRDDLKWLHVFNKYDLYSKSKVLVD
VEQVKPYYISLINKYFPAKLLK
  
```

Figura 16 - Sequência da proteína candidata a MIOX de *A. thaliana* clonada, apresentando domínios conservados: aldo-ceto redutase em rosa, histidina em verde e cisteína em laranja

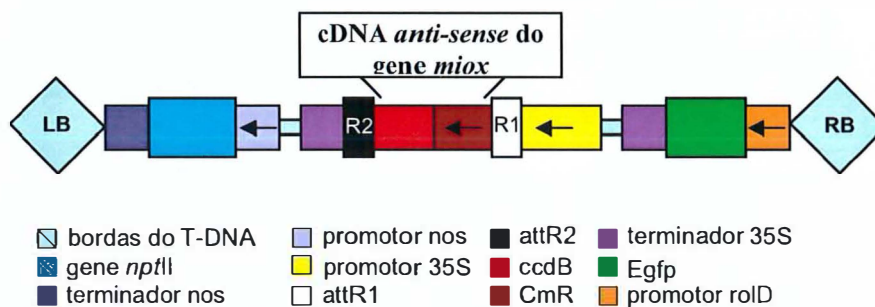


Figura 17 - Cassete de expressão *anti-sense-miox*. O vetor está caracterizado com os símbolos e abreviações: gene *nptII* - gene marcador de seleção em plantas; promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor; terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor; *Egfp* - amplificador do gene *gfp* que codifica a proteína verde-fluorescente (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA); promotor *nos* da nopalina sintetase; terminador *nos*, da nopalina sintetase; *attR1* e *attR2* - sítios de recombinação; *ccdB* - gene da proteína CcdB que interfere com a DNA girase de *E.coli* (Bernard & Couturier, 1992; Bernard et al., 1993); *CmR* - gene de resistência a cloranfenicol; promotor *rolD* de *Agrobacterium rhizogenes* (Goddijn et al., 1993); LB e RB - bordas, esquerda (L) e direita (R) do T-DNA

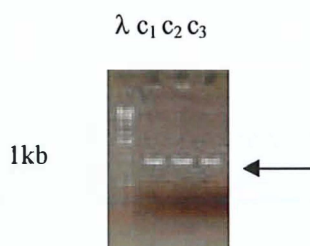


Figura 18 - Produto de amplificação por PCR de 3 clones recombinantes de *A. tumefaciens*. λ : 1kb DNA Ladder, c_1 , c_2 e c_3 : clones 1, 2 e 3 respectivamente



Figura 19 - Cali em início de regeneração de brotos em meio de cultura (Anexo A20) acrescido de 1mg/L de BAP, 0,1mg/L de NAA, 600mg/L de cefotaxima e 50mg/L de canamicina



Figura 20 - Broto regenerado de calo em meio (Anexo A20) de alongamento contendo 0,1mg/L de IBA, 400mg/L de cefotaxima e 25 mg/L de canamicina



Figura 21 - Broto enraizando em meio (Anexo A20) de enraizamento contendo 300mg/L de cefotaxima e 25mg/L de canamicina, sem fitorreguladores

4.6.1 Análise do padrão de segregação do transgene na progênie T₁

As plantas transformantes primárias (geração T₀), *anti-sense-miox*, obtidas após confirmação do transgene via PCR, foram mantidas em casa de vegetação para produção de sementes. As sementes (geração T₁) obtidas da autofecundação das plantas (geração T₀) foram desinfestadas e semeadas em meio de cultura (Anexo A20) acrescido de canamicina (50mg/L). Após 30 dias, as plantas T₁ *anti-sense-miox* foram avaliadas quanto ao padrão de segregação, com relação à resistência à canamicina (Figura 23), pelo teste de χ^2 (Tabela 1).

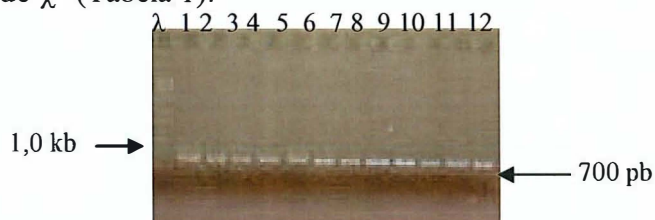


Figura 22 - Produtos de amplificação (700 pb) do DNA genômico de algumas das plantas de *N. tabacum* que enraizaram em canamicina. (1 a 12) referente ao gene *nptII*: controle positivo (DNA plasmidial do vetor pK7WG2D/*anti-sense-miox*). λ : 1 kb DNA Ladder

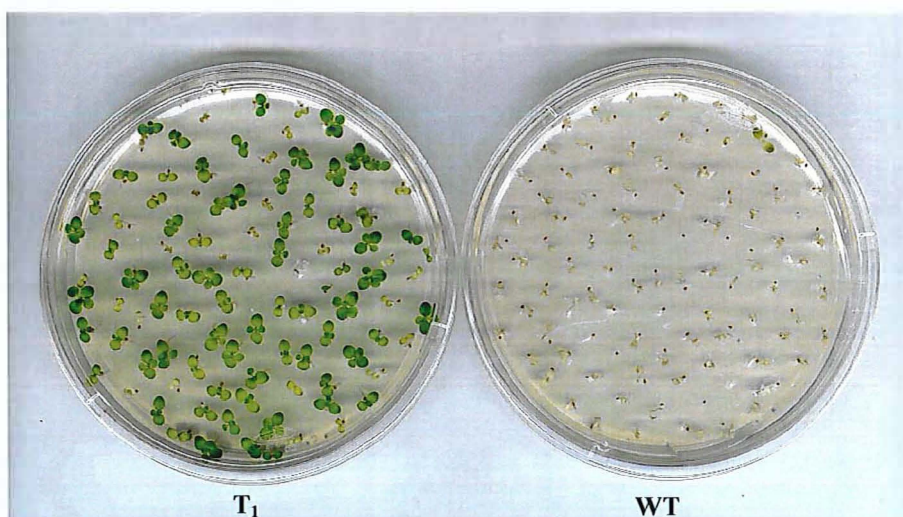


Figura 23 - Plantas em meio de cultura MS contendo canamicina (50mg/L). T₁: plantas transgênicas *anti-sense-miox* (geração T₁), com segregação 3:1 para o caractere de resistência à canamicina. WT: Progênie da planta selvagem, sensível ao antibiótico

Dez plantas foram selecionadas de cada evento de transformação com a construção *anti-sense-miox* (genótipos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 23, 26), cultivadas e induzidas à autofecundação, em casa de vegetação para produção de sementes (geração T₂). Selecionou-se então, apenas oito eventos que apresentaram os menores valores de χ^2 ao nível de 5% de probabilidade e significativo apenas para segregação do tipo 3:1 (Deroles & Gardner, 1988; Budar et al., 1986) (Tabela 1).

4.6.2 Análise do padrão de segregação do transgene na progênie T₂

As plantas T₂ *anti-sense-miox* que não segregaram (eventos 1, 2, 3, 4, 5) em meio de cultura com canamicina (homozigotas para o transgene) foram usadas para análises moleculares e da composição química do caule (celulose, hemicelulose, lignina e ácidos urônicos). Foram avaliados ainda, os efeitos da modulação do gene *miox* no desenvolvimento e produção de biomassa.

4.7 Análise molecular das plantas transgênicas de tabaco

4.7.1 Southern blot

A enzima escolhida, após análise pelo programa *Rebase Nebcutter*, para digestão do DNA genômico de plantas transgênicas T₂ e selvagem de tabaco, foi a *EcoRI*, que não cliva a ORF do gene *nptII*, de resistência à canamicina.

O padrão de bandas para o DNA das plantas transgênicas e selvagem de tabaco, está de acordo com o esperado. O DNA de tabaco selvagem não apresentou bandas enquanto que todos os transgênicos apresentaram uma ou mais bandas, confirmando a inserção do transgene (Figura 24). Devido à presença de mais bandas na radiografia dos eventos 1, 2, 4 e 5, mais de uma cópia pode ter sido inserida no genoma, entretanto, como os transgênicos analisados foram selecionados com base na segregação 3:1 (geração T₁) em canamicina, apenas uma cópia do transgene deve estar sendo expressa em cada evento.

Tabela 1. Padrão de segregação de plantas T_1 *anti-sense-miox*. Número de resistentes (Or) e sensíveis (Os) observados em meio seletivo; números esperados de resistentes (Er) e sensíveis (Es) para cada tipo de segregação (3:1 para 1 cópia do transgene no genoma; 2:1 para homocigoto letal; 15:1 para 2 cópias independentes; 100% para duas cópias ligadas e independentes) (Deroles & Gardner, 1988); e valor de χ^2 calculado (valores significativos sombreados)

n	Or	Os	total	3:1 – 1 cópia			2:1 – homocigoto letal			15:1 – 2 cópias independentes			100% - 2 cópias ligada independente		
				Er	Es	χ^2	Er	Es	χ^2	Er	Es	χ^2	Er	Es	χ^2
1	240	76	316	237	79	0,15	210	105	12,25	296	20	170	316	0	18,2
2	284	90	374	280	93	0,17	249	124	14,16	350	23	202	374	0	21,6
3	235	84	319	239	79	0,30	212	106	7,04	299	20	219	319	0	22,1
4	157	52	209	156	52	0,00	139	69	6,72	195	13	123	209	0	12,9
5	279	90	369	276	92	0,07	246	123	13,28	345	23	207	369	0	21,9
6	244	93	337	252	84	1,21	224	112	4,99	315	21	262	337	0	25,6
7	247	77	324	243	81	0,26	216	108	13,35	303	20	169	324	0	18,3
8	186	79	265	198	66	3,27	176	88	1,48	248	16	251	265	0	23,5
9	102	6	108	81	27	21,8	72	36	37,5	101	7	0,09	108	0	0,33
10	188	77	265	198	66	2,33	176	88	2,18	248	16	235	265	0	22,3
11	313	30	343	257	85	48,3	228	114	93,31	321	21	3,65	343	0	2,62
12	248	92	340	255	85	0,77	226	113	6,02	318	21	251	340	0	24,9
13	159	63	222	166	55	1,35	148	74	2,45	208	14	185	222	0	17,8
14	217	78	295	221	73	0,33	196	98	6,31	276	18	205	295	0	20,6
15	263	72	335	251	83	2,20	223	111	21,14	314	21	132	335	0	15,4
16	307	17	324	243	81	67,4	216	108	115	303	20	0,56	324	0	0,89
17	309	22	331	248	82	59,5	220	110	106	310	21	0,09	331	0	1,46
18	158	46	204	153	51	0,65	136	68	10,68	191	13	92,5	204	0	10,3
19	236	91	327	245	81	1,40	218	109	4,46	306	20	259	327	0	25,3
20	208	84	292	219	73	2,21	194	97	2,74	273	18	252	292	0	24,2
21	132	17	149	111	37	14,7	99	49	32,23	139	9	6,77	149	0	1,94
22	340	35	375	281	93	49,1	250	125	97,20	351	23	6,08	375	0	3,27
23	242	85	327	245	81	0,17	218	109	7,93	306	20	217	327	0	22,1
24	292	43	335	251	83	26,4	223	111	63,34	314	21	24,8	335	0	5,52
25	200	6	206	154	51	53,6	137	68	85,79	193	13	3,92	206	0	0,17
26	254	79	333	249	83	0,29	222	111	13,84	312	21	173	333	0	18,7
27	88	154	242	181	60	192	161	80	100	226	15	1360	242	0	98
28	109	52	161	120	40	4,57	107	53	0,08	150	10	186	161	0	16,8
29	272	42	314	235	78	22,6	209	104	56,28	294	20	27,2	314	0	5,62
30	23	9	32	24	8	0,17	21	10	0,39	30	2	26,1	32	0	2,53
31	59	13	72	54	18	1,85	48	24	7,56	67	4	17,1	72	0	2,35

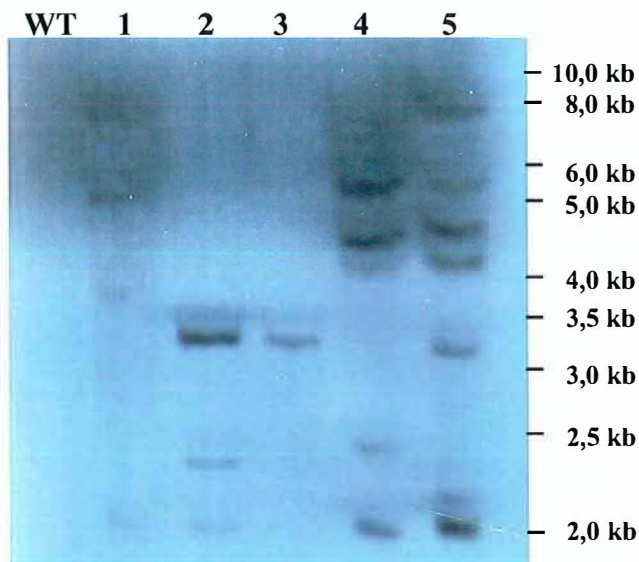


Figura 24 - Radiografia da análise de *Southern blot* do DNA genômico de plantas selvagem (WT) e transgênicas T₂ (1 a 5) de tabaco, digerido com *EcoRI*, usando como sonda o cDNA do gene *nptII*

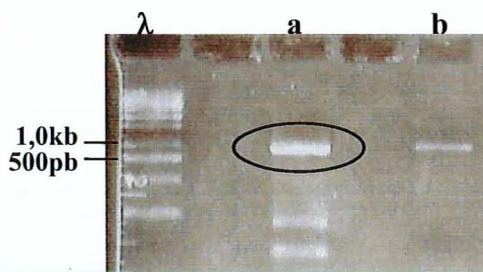


Figura 25 - Clonagem do cDNA do gene *miox* de tabaco. (λ) 1kb DNA *Ladder*; (a) produto da reação RT-PCR com DNA de caule de plântulas de tabaco e *primers* específicos para a ORF do gene *miox* de *A. thaliana*, apresentando altura de banda semelhante ao cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*; (b) cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*

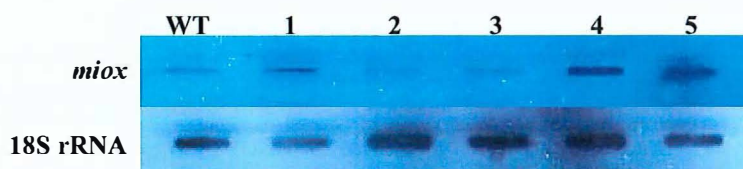


Figura 26 - RNA *Slot blot* de botão floral de plantas selvagem (WT) e transgênicas T₂ (1 a 5) de tabaco, usando como sonda o cDNA do gene *miox* de tabaco e o gene 18S para quantificação do RNA

4.7.2 Northern blot

A partir de reação de RT-PCR com mRNA do caule de plântulas de 40 dias de tabaco selvagem e com os *primers* específicos da ORF do gene *miox* de *A. thaliana* foi possível clonar o gene *miox* de tabaco. Este produto da reação RT-PCR, apresentando altura de banda semelhante ao cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*, foi eluído do gel (Figura 25) e seqüenciado. O produto do seqüenciamento apresentou homologia de 64%, em análise de BlastX no NCBI, com as seqüências da *miox* de *A. thaliana* (gi: 37926363) e de *Oryza sativa* (gi: 53792787).

A Figura 26 mostra que houve redução da expressão do gene *miox* nas plantas transgênicas 2 e 3. Entretanto, quando se compara a quantificação de RNA, expressa através da hibridização com o rRNA 18S, parece haver menor quantidade de RNA da planta selvagem, o que poderia estar mascarando um sinal mais forte do RNA da planta selvagem quando hibridizado com a sonda do gene *miox* endógeno, já que conforme comprovado através de seqüenciamentos, o cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* foi clonado no sentido *anti-sense*.

4.8 Análise química das plantas transgênicas de tabaco

As plantas transgênicas T₂ de tabaco, homozigotas para o gene de resistência à canamicina, tiveram seu caule coletado assim que o botão floral foi emitido, aproximadamente, 40 dias após a germinação (Figura 27). As plantas transgênicas não apresentaram diferenças morfológicas com relação ao controle selvagem, indicando que os eventos de transformação não causaram danos ao desenvolvimento normal da planta.

Análises químicas dos caules, entretanto, comprovam que o metabolismo vegetal sofreu alterações. Houve acréscimo significativo nas concentrações de arabinose e ácido glucurônico (Tabela 2). O aumento dos níveis normais de arabinose pode ser indicativo de que o metabolismo esteja sendo compensado pela rota de síntese de UDP-glucuronato via UDP-glicose (Figura 1) (Loewus et al., 1962; Loewus, 1990). O que se

O que se faz necessário, em trabalhos futuros, estudar a expressão dos genes e quantificar os compostos envolvidos nessa rota de síntese de UDP-glucuronato.

O aumento nos níveis normais de arabinose promove, conseqüentemente, aumento proporcional dos níveis de glucuronato nas plantas, uma vez que a arabinana, nos organismos, encontra-se conjugada a moléculas de ácido glucurônico (Loewus et al., 1962).

O acréscimo significativo de ácido glucurônico pode ser resultado, também da compensação do metabolismo, tendo sido conseqüência de maior síntese de UDP-glucuronato via UDP-glicose. O ácido glucurônico analisado pode ter sido mascarado pela presença de UDP-glucuronato (Figura 28), forma ativada do D-glucuronato (ácido glucurônico). Em certas reações, UDP-glucuronato libera D-glucuronato (Mathews et al., 2000).

O material analisado, proveniente de caule, corresponde a compostos acumulados nas paredes celulares diferenciadas deste órgão, podendo não refletir exatamente o metabolismo ativo da planta. Para tal, pretende-se, em trabalhos futuros a adequação de métodos de análise dos componentes da parede celular de folhas, esperando-se desta forma analisar de forma mais conclusiva as alterações metabólicas causadas pelo transgene, além de melhor entendimento dos fatores que determinam a preferência pelas rotas de síntese do ácido glucurônico.



Figura 27 – Plantas de tabaco selvagem (WT) e transgênicas T₂ (1, 2, 3, 4 e 5), mantidas em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, para coleta dos caules a serem analisados

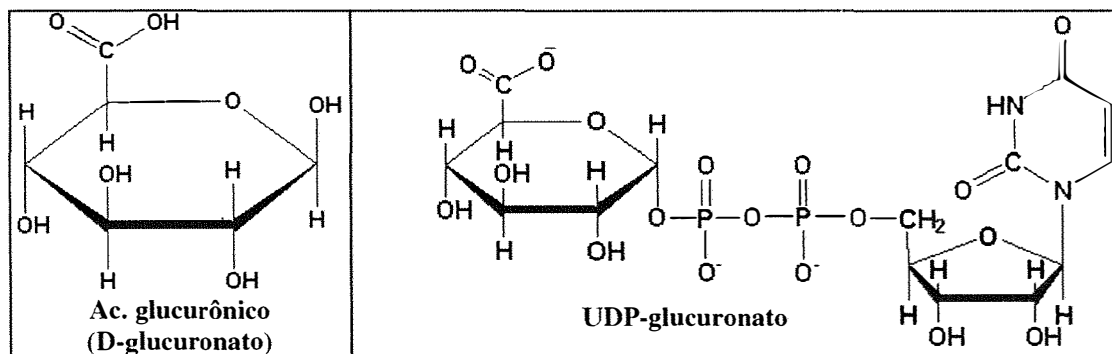


Figura 28 – Estruturas químicas do ácido glucurônico e do UDP-glucuronato (adaptado de Mathews et al., 2000)

4.9 Expressão da enzima MIOX de *A. thaliana* em *E. coli*

4.9.1 Clonagem do cDNA do gene *miox*, em sentido *sense* no vetor TOPO

A clonagem, em sentido *sense* do produto de amplificação do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* com *primers* específicos, foi realizada, seguida de transformação química de células competentes de *E. coli* (TOP 10), com auxílio do *kit pENTR directional TOPO[®] cloning* (Invitrogen), seguindo normas do fabricante, conforme descrito no item 3.13.1 de Material e Métodos.

A partir de colônias transformantes obtidas em meio seletivo (LB acrescido de 50µg/mL de canamicina), realizou-se reação de PCR, com os *primers* da ORF *miox-sense*. Algumas destas colônias apresentaram produto de amplificação com tamanho próximo a 1kb (ORF = 954pb). Um clone recombinante foi utilizado para extração de plasmídeo, com auxílio do *Plasmid Mini kit* (Qiagen) conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos, para ser seqüenciado. O plasmídeo extraído foi seqüenciado, com os *primers* M13 (*forward* e *reverse*), conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos. O resultado do seqüenciamento foi analisado através dos programas Blast 2 *sequences* (Figura 29) e BlastX (Figura 30) do NCBI, comprovando a clonagem do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* em sentido *sense*. A análise de BlastX mostra a existência de homologia de 79% entre a seqüência do clone e o gi:18399158. Essa homologia inicia-se a partir da base 305, devido ao anelamento do *primer* M13 ao vetor.

Tabela 2. Médias de componentes da parede celular de três repetições, expressas em mg/g de massa de matéria seca, da análise química das plantas de tabaco selvagem (WT) e transgênicas T₂ (1, 2, 3, 4, 5), com agrupamento das médias através de teste Tukey a 5% de probabilidade (a, b, ab)

	WT	1	2	3	4	5
Arabinana	16,904 a	19,139 ab	20,459 ab	23,237 b	21,520 ab	18,965 ab
Galactana	20,090 ab	24,750 a	17,684 ab	22,678 ab	19,903 ab	16,748 b
Glicana	502,90 a	462,550 a	500,719 a	500,687 a	512,213 a	502,667 a
Xilana	133,360 a	127,017 a	119,804 a	115,393 a	121,121 a	125,106 a
Manana	34,389 a	40,827 a	35,403 a	36,704 a	38,802 a	32,990 a
Ácido galacturônico	71,890 a	80,647 a	80,663 a	85,869 a	78,125 a	86,030 a
Ácido glucurônico	1,072 a	1,196 ab	1,185 ab	1,363 b	1,241 ab	1,296 b
Lignina	149,030 ab	160,950 a	138,527 b	142,837 ab	141,270 ab	142,790 ab
Hemiceluloses	312,094 a	334,402 a	310,601 a	321,947 a	319,514 a	314,125 a
Celulose	467,701 a	421,723 a	465,316 a	463,983 a	473,411 a	469,677 a
Carboidratos totais	779,795 a	756,125 a	775,917 a	785,930 a	792,925 a	783,802 a

4.9.2 Clonagem do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* no vetor pDESTTM17

Feita a clonagem no vetor pDESTTM17 como descrito em Material e Métodos, procedeu-se a análise de PCR de alguns dos clones recombinantes, selecionados em ampicilina (100mg/L). Verificando-se que os padrões de banda estavam de acordo com o esperado, ou seja, apresentaram um produto de amplificação de ~1kb, correspondente ao tamanho da ORF, realizou-se, extração de plasmídeo, com auxílio do *Plasmid Mini kit* (Qiagen) conforme descrito no item 3.6 de Material e Métodos, para serem seqüenciados. O plasmídeo recombinante extraído foi seqüenciado, com o *primer* universal T7 (*forward*). O resultado do seqüenciamento foi analisado através dos programas Blast 2 *sequences* (Figura 31) e BlastX (Figura 32) do NCBI, comprovando a clonagem do cDNA do gene *miox* de *A. thaliana* em sentido *sense*. A análise de BlastX mostra a existência de homologia de 81% entre a sequência do clone e o gi:18399158. Essa homologia inicia-se a partir da base 24, devido ao anelamento do *primer* M13 ao vetor.

4.9.3 Transformação da *E. coli* BL21-AITM

A polimerase do RNA T7 produz, de forma eficiente, transcritos de qualquer DNA, sob o controle do promotor T7 (Studier & Monfatt, 1986). Um fator que contribui para a eficiência deste sistema é que o promotor T7 não é encontrado naturalmente em *E. coli*, tornando o processo de indução muito específico.

A linhagem BL21 contém uma cópia cromossomal única do gene para a polimerase do RNA T7, sob controle de um promotor induzível. A adição de L-arabinose induziu este promotor a produzir a polimerase T7, a qual iniciou a expressão em altos níveis do gene alvo no plasmídeo sob controle do promotor T7.

O fator preponderante na produção e subsequente acúmulo da proteína heteróloga é o tempo de cultivo após adição do indutor. Visando otimizar este processo e selecionar

```

Query: 139 atgactattcttgttgaacatcttggctcctgattcaagagtgatgaaaagaaagtgata 198
          |||
Sbjct:   1 atgactattcttgttgaacatcttggctcctgattcaagagtgatgaaaagaaagtgata 60

Query: 199 gaggagagggataaatgaattggtgttgatggaggttttgggtccaaaatcaaaggaa 258
          |||
Sbjct:  61 gaggagagggataaatgaattggtgttgatggaggttttgggtccaaaatcaaaggaa 120

Query: 259 actgatgcattcgatgctcctgatatgaatttcttgggccattccttttntattatga 318
          |||
Sbjct: 121 actgatgcattcgatgctcctgatatgaatttcttgggccattcc-ttcagggattatga 179

Query: 319 gaatggtgaaagcgagagacaacaagggtgttgaggaaatcttaccaggatgcaacacattca 378
          |||
Sbjct: 180 gaatggtgaaagcgagagacaacaagggtgttgaggaaatcttaccaggatgcaacacattca 239

Query: 379 ccagacctatgactttgtgaagaagatgaggaaagagtatggaaaacttaacaagatgga 438
          |||
Sbjct: 240 ccagacctatgactttgtgaagaagatgaggaaagagtatggaaaacttaacaagatgga 299

Query: 439 aatgagnatattgggaatgntgtgagntattgaacaatggtntgatgaaagcngtccgga 498
          |||
Sbjct: 300 aatgagtatattgggaatgntgtgagntattgaacaatggtntgatgaaagcngtccgga 359

Query: 499 tcttgattcccctcnnattcaacaccttctccaaacgctgnanccattcncaagggacc 558
          |||
Sbjct: 360 tcttgatgagcctcaaattcaacaccttctccaaacgctgaagccattcg-aagggga-c 417

Query: 559 tatccccnangaanattgtctccatctcantgncntaatccatgatcttngcaaggtt 618
          |||
Sbjct: 418 tat-cccgacgaagattggctccatctcactg-ccctaatccatgatcttg-gcaaggtt 474

```

Figura 29 – Análise de Blast 2 sequences no site do NCBI, entre a sequência do plasmídio TOPO/miox (Query) e a sequência candidata do gene miox de *A. thaliana* (gi:18399158) (Sbjct)

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 20197290 gb AAC62136.2 expressed protein [Arabidopsis thaliana]	150	8e-64
gi 21554393 gb AAM63498.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	148	5e-63
gi 7269477 emb CAB79481.1 putative protein [Arabidopsis thaliana]	122	4e-32
gi 23296360 gb AAN13052.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	122	6e-31
gi 37926363 gb AAP59548.1 myo-inositol oxygenase [Arabidopsis thaliana]	121	2e-30
gi 7262695 gb AAF43953.1 Strong similarity to an unknown protein [Arabidopsis thaliana]	114	2e-25
gi 23197958 gb AAN15506.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	114	3e-25
gi 26451656 dbj BAC42925.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]	112	9e-25
gi 25411930 pir C84581 hypothetical protein At2g19800 [imp...]	115	1e-24
gi 13877657 gb AAK43906.1 Unknown protein [Arabidopsis thaliana]	115	1e-24


```

>gi|20197290|gb|AAC62136.2| expressed protein [Arabidopsis thaliana]
gi|18399158|ref|NP_565459.1| expressed protein [Arabidopsis thaliana] Length = 317 Score
= 150 bits (380), Expect(2) = 8e-64 Identities = 75/94 (79%), Positives = 76/94 (80%)
Frame = +2
Query: 305 FXYYENGESERQQGVVEFYRMQHIHQTYDFVKKMRKEYGKLNKMEMXIWEXCEXLNNVXD 484
          F YENGESERQQGVVEFYRMQHIHQTYDFVKKMRKEYGKLNKMEM IWE CE LNNV D
Sbjct: 56 FRDYENGESERQQGVVEFYRMQHIHQTYDFVKKMRKEYGKLNKMEMSIWECCELLNNVVD 115

Query: 485 ESDPDLDSPXIQHLLQTAXXIXKGPIPXEXCLHL 586
          ES PDL D P IQHLLQTA I + P E LHL
Sbjct: 116 ESDPDLDEPQIQHLLQTAEAIRR-DYPDEDWLHL 148

```

Figura 30 – Análise de BlastX no site do NCBI da sequência do plasmídio TOPO/miox (Query), apresentando alta homologia com a sequência candidata do gene miox de *A. thaliana* (gi:18399158) (Sbjct)

```

Query: 24 atgactattcttggtgaacattttgttcctgattcaagagtggtgaaaagaaagtgata 83
      |||
Sbjct: 1 atgactattcttggtgaacattttgttcctgattcaagagtggtgaaaagaaagtgata 60

Query: 84 gaggagagggataaatgaattggtggttgatggaggttttgtggttccaaaatcaaaggaa 143
      |||
Sbjct: 61 gaggagagggataaatgaattggtggttgatggaggttttgtggttccaaaatcaaaggaa 120

Query: 144 actgatgcattcgatgctcctgatatgaatttcttgggccattccttcagggatattgag 203
      |||
Sbjct: 121 actgatgcattcgatgctcctgatatgaatttcttgggccattccttcagggatattgag 180

Query: 204 aatggtgaaagcgagagacaacaagggtgtgaggaatttacaggatgcaacacattcac 263
      |||
Sbjct: 181 aatggtgaaagcgagagacaacaagggtgtgaggaatttacaggatgcaacacattcac 240

Query: 264 cagacctatgactttgtgaagaagatgaggaaagagtatggaaaacttaacaagatggaa 323
      |||
Sbjct: 241 cagacctatgactttgtgaagaagatgaggaaagagtatggaaaacttaacaagatggaa 300

Query: 324 atgagtatatgggaatgttgtgagttattgaacaatggtggtgatgaaagcgatccggat 383
      |||
Sbjct: 301 atgagtatatgggaatgttgtgagttattgaacaatggtggtgatgaaagcgatccggat 360

Query: 384 cttgatgagcctcaaattcaacaccttctccaaaccgctgaagccattcgaagggactat 443
      |||
Sbjct: 361 cttgatgagcctcaaattcaacaccttctccaaaccgctgaagccattcgaagggactat 420

Query: 444 cccgacgaagattggctccatctcactgccctaataccatgatcttggcaagggttctcctt 503
      |||
Sbjct: 421 cccgacgaagattggctccatctcactgccctaataccatgatcttggcaagggttctcctt 480

Query: 504 ctgccagaattcggtggtcnttccccagtggtgctcgttggcgatacatattccagttgg 563
      |||
Sbjct: 481 ctgccagaattcggtggtc-ttccccagtggtgctcgttggcgatacatattccagttgg 539

Query: 564 atgtacctcgactcagccaatattcaccacaagttttcaangnaancatgnatatcaa 623
      |||
Sbjct: 540 atgtacctcgactcagccaatattcaccacaagttttcaangnaaacatgatatacaa 599

Query: 624 c-accccaagtac-acnc-aaaaatggantttcccctgaangatgtggttta 672
      | ||| | ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 600 caaccacaagtacaacacaaaaatggagtttacctgaaggatgtggttta 651

```

Figura 31 – Análise de Blast 2 sequences no site do NCBI, entre a sequência do plasmídeo pDESTTM17/miox (Query) e a sequência candidata do gene miox de *A. thaliana* (gi:18399158) (Sbjct)

o clone de maior produção da proteína, os clones foram induzidos pela L-arabinose, sendo alíquotas separadas em diferentes tempos de exposição ao indutor e avaliadas através de SDS-PAGE para proteínas solúveis e insolúveis. A proteína MIOX encontra-se na porção solúvel extracelular (Figura 33) e citosólica (Figura 34), não estando presente no gel carregado com amostras do precipitado celular, correspondente à membrana plasmática da *E. coli*.

O acúmulo da proteína recombinante foi proporcional ao tempo de indução pela L-arabinose (Figuras 33 e 34). O melhor clone considerado nesse trabalho foi o clone 3 no tempo T₄ correspondente a 4 horas de cultivo induzido pela L-arabinose.

4.9.4 Purificação da proteína MIOX

A estratégia de clonagem do gene em vetores pDEST foi feita com o objetivo de produzir quantidades suficientes de proteínas para realizar a purificação. Desta forma a introdução de uma cauda de histidinas na extremidade da proteína, foi feita visando facilitar sua purificação.

Células recombinantes do clone 3 foram primeiramente lisadas (Figura 35) para posterior purificação, utilizando-se o *kit ProBond™ Purification System* (Invitrogen). Na figura abaixo (Figura 36), pode-se observar a eluição da proteína MIOX proveniente desta purificação.

Sequences producing significant alignments:			Score	E
gi	gb	Accession	(bits)	Value
gi 20197290	gb AAC62136.2	expressed protein [Arabidopsis t...	351	1e-95
gi 21554393	gb AAM63498.1	unknown [Arabidopsis thaliana]....	348	8e-95
gi 7269477	emb CAB79481.1	putative protein [Arabidopsis th...	232	8e-60
gi 23296360	gb AAN13052.1	unknown protein [Arabidopsis tha...	228	1e-58
gi 37926363	gb AAP59548.1	myo-inositol oxygenase [Arabidop...	226	3e-58
gi 21536858	gb AAM61190.1	unknown [Arabidopsis thaliana]....	208	1e-52
gi 10176768	dbj BAB09882.1	unnamed protein product [Arabid...	206	5e-52


```

>gi|20197290|gb|AAC62136.2| expressed protein [Arabidopsis thaliana]
gi|18399158|ref|NP_565459.1| expressed protein [Arabidopsis thaliana] Length = 317 Score
= 351 bits (900), Expect = 1e-95 Identities = 176/216 (81%), Positives = 181/216 (83%),
Gaps = 9/216 (4%) Frame = +3
Query: 24 MTILVEHFVPSRVDEKKVIEERDNELVLDGGFVVPKSKETDAFDAPDMNPLGHSFRDYE 203
MTILVEHFVPSRVDEKKVIEERDNELVLDGGFVVPKSKETDAFDAPDMNPLGHSFRDYE
Sbjct: 1 MTILVEHFVPSRVDEKKVIEERDNELVLDGGFVVPKSKETDAFDAPDMNPLGHSFRDYE 60
Query: 204 NGESERQQGVVEEFYRMQHIHQTYDFVKKMRKEYGKLNKMEMSIWECCELLNNVDESDDP 383
NGESERQQGVVEEFYRMQHIHQTYDFVKKMRKEYGKLNKMEMSIWECCELLNNVDESDDP
Sbjct: 61 NGESERQQGVVEEFYRMQHIHQTYDFVKKMRKEYGKLNKMEMSIWECCELLNNVDESDDP 120
Query: 384 LDEPQIQHLLQTAEAIRRDYPDEDWLHLTALIHDLGKVLVLLPEFGG-----XSPVG 536
LDEPQIQHLLQTAEAIRRDYPDEDWLHLTALIHDLGKVLVLLPEFGG PVG
Sbjct: 121 LDEPQIQHLLQTAEAIRRDYPDEDWLHLTALIHDLGKVLVLLPEFGGLPQWAVVGDTFPVG 180
Query: 537 CRWRYSWMYLRLSQYSPQVFXHXHYQHPKYTK 644
C + + + F+ H+ PKY K
Sbjct: 181 CTF-----DSANIHKKYFKGNHDINPKYNTK 207

```

Figura 32 – Análise de BlastX no *site* do NCBI da sequência do plasmídeo pDESTTM17/*miox* (*Query*), apresentando alta homologia com a sequência candidata do gene *miox* de *A. thaliana* (gi:18399158) (*Sbjct*)

A proteína purificada apresentou altura de banda, em gel de poliacrilamida, em conformidade com o descrito por Lorence et al. (2004), próximo a 40kDa, correspondente ao tamanho calculado de 37kDa para a sequência de aminoácidos da proteína MIOX, mais 2,6kDa correspondente ao *tag* de histidina (vetor pDEST 17, Invitrogen).

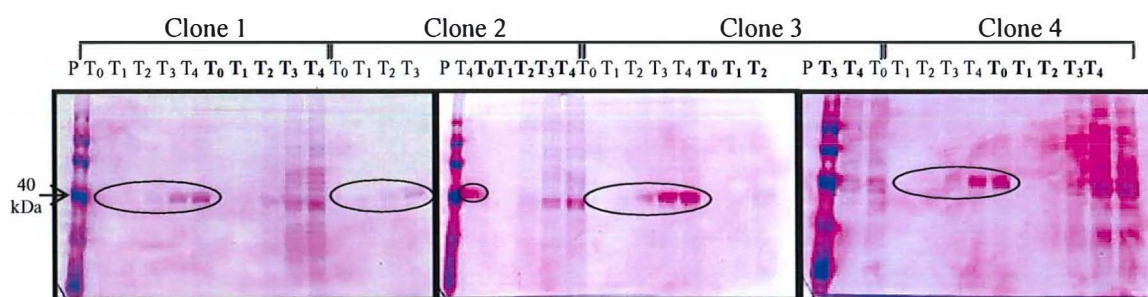


Figura 33 - Eletroforese em gel vertical/SDS-PAGE das amostras do citosol de células de diferentes clones de *E. coli* expressando a proteína MIOX em diferentes tempos de exposição à arabinose. **P** = padrão; T₀, T₁, T₂, T₃ e T₄ correspondem aos diferentes tempos de exposição dos clones à arabinose (indutor); **T₀, T₁, T₂, T₃ e T₄** em **negrito** correspondem aos tempos sem acréscimo de arabinose

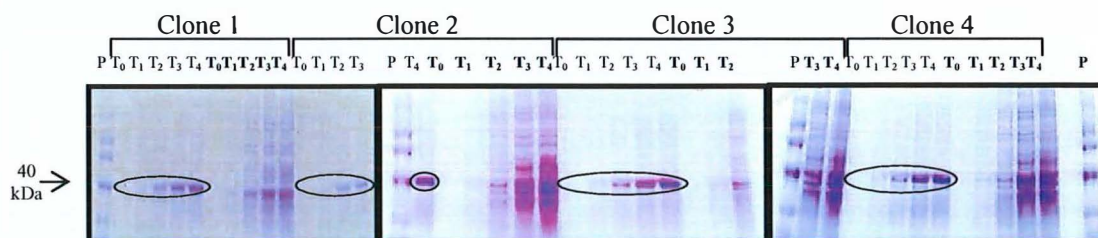


Figura 34 - Eletroforese em gel vertical/SDS-PAGE das amostras do conteúdo extracelular de células de diferentes clones de *E. coli* expressando a proteína MIOX em diferentes tempos de exposição à arabinose. **P** = padrão; T₀, T₁, T₂, T₃ e T₄ correspondem aos diferentes tempos de exposição dos clones à arabinose (indutor); **T₀, T₁, T₂, T₃ e T₄** em **negrito** correspondem aos tempos sem acréscimo de arabinose

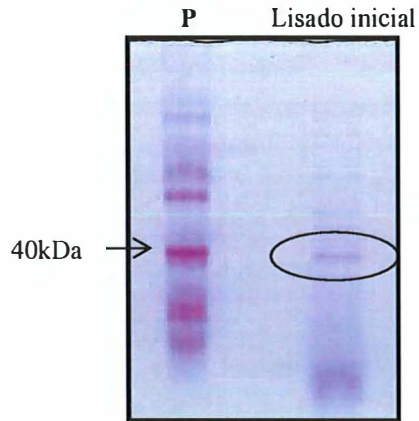


Figura 35 - Eletroforese SDS-PAGE do lisado inicial de células de *E. coli* expressando a enzima MIOX de peso próximo a 40 kDa, antes da purificação da mesma. **P**= padrão

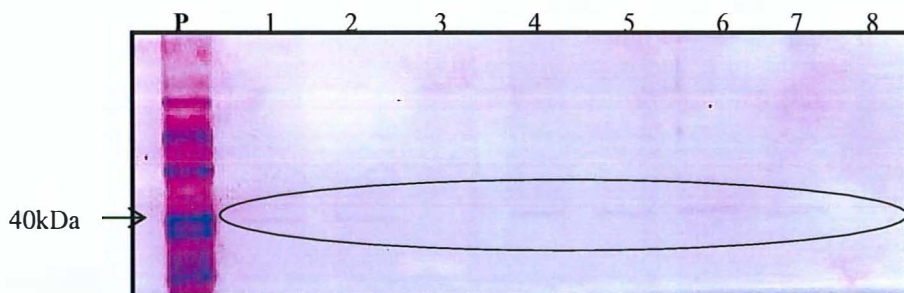


Figura 36 - Eletroforese SDS-PAGE da proteína MIOX purificada. **P** = padrão; **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8** correspondem às frações de eluição da proteína durante a purificação

5 CONCLUSÕES

A partir da sequência do cDNA do gene *miox* de *Sus scrofa* foi possível isolar e clonar o cDNA do gene *miox* do cromossomo 2 de *A. thaliana*, utilizando ferramentas de bioinformática.

A sequência clonada, correspondente ao gene *miox* do cromossomo 2 de *A. thaliana*, não difere significativamente da sequência de aminoácidos disponível no banco de dados do NCBI sob gi:18399158.

Plantas de tabaco foram transformadas com o cDNA do gene *miox* de *A. thaliana*, clonado na direção *anti-sense*, com fins de modular sua expressão.

Plantas transgênicas que apresentaram redução da expressão do gene *miox* sofreram alteração no metabolismo das hemiceluloses, havendo acréscimo significativo nas concentrações de arabinose e ácido glucurônico do caule.

A proteína isolada, com peso molecular calculado de 37kDa, corresponde à enzima mio-inositol oxigenase de *Arabidopsis thaliana*.

ANEXOS

A1- Códigos padrão IUPAC/IUB

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

Nomenclatura IUB de bases em seqüências de ácidos nucléicos

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

A2- Tampão de extração de DNA - método CTAB (Doyle & Doyle, 1987)

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

*adicionados no momento do uso

A3- Master Mix para reação PCR

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

A4- Tampão TBE 0,5x (Sambrook et al., 1989)

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

A5- Tampão da amostra (Dye IV – Sambrook et al., 1989)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Sacarose	40%
Azul de bromofenol	0,25%
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. 1mL

A6- Tampão de extração de RNA (Salzman et al., 1999)

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

* Adicionado na hora do uso

A7- Tampão da amostra de RNA aplicado no gel de agarose 1% e Tampão TAE (1X) (Sambrook et al., 1989)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Mix de RNA aplicado no gel	
MOPS 10x	1,5µL
Formaldeído 37%	3,0µL
Formamida deionizada	7,5µL
Tampão <i>Dye</i> III	2,0µL
Brometo de etídeo	1,0µL
RNA	5,0µg
Tampão TAE (1X)	
Tris base	4,84g
Ácido acético glacial	1,142mL
EDTA 0,5M (pH=8,0)	2mL
Água MilliQ	q.s.p. 1L

A8- Tampão de ligação (*Binding Buffer*) para purificação de mRNA (conforme protocolo *Dynabeads[®] mRNA Purification kit – Dynal*)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Tris-HCl (pH=7,5)	20mM
LiCl	1M
EDTA	2 mM
Água MilliQ tratada com DEPC	q.s.p. 4mL
Esterilizado por filtragem (Millipore 0,2µm)	

A9- Tampão de lavagem B (*Washing Buffer B*) para purificação de mRNA (conforme protocolo *Dynabeads[®] mRNA Purification kit – Dynal*)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
Tris-HCl (pH=7,5)	10mM
LiCl	0,15M
EDTA	1mM
Água MilliQ tratada com DEPC	q.s.p. 4mL
Esterilizar por filtragem (Millipore 0,2µm)	

A10- Solução 20X SSC (conforme protocolo *Hybond da Amersham Biosciences*)

<i>Componentes</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	3M
Citrato de Sódio	0,3M
Água MilliQ	q.s.p. 500mL
Ajustar pH=7,0 e autoclavar	

Obs: As soluções 6X SSC, 5X SSC, 2X SSC, 1X SSC e 0,5X SSC foram preparadas a partir da diluição da solução 20X SSC em Água MilliQ autoclavada

A11- Solução de pré-hibridização para *Southern blot* (conforme protocolo *Hybond* da Amersham Biosciences)

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

A12- Tampão A (Conforme protocolo *Hybond* da Amersham Biosciences)

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	100mM
Tris-HCl	300mM
Água MilliQ autoclavada	q.s.p. 400 mL
Ajustar pH=9,5	

A13- Meio de cultura SOC

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

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

A14- Meio de cultura LB (Luria-Bertani)

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

A15- Tampões P1, P2 e P3 (Conforme protocolo do *Plasmid Mini kit* da QIAGEN)

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

A16- Solução QBT (Conforme protocolo do *Plasmid Mini Kit* da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	750mM
MOPS	50mM
Ajustar pH=7,0	
Isopropanol puro	15% (v/v)
Triton [®] X-100	0,15% (v/v)
Água MilliQ	q.s.p. 1L
Esterilizar por filtração (Millipore 0,2µm)	

A17- Solução QC (conforme protocolo do *Plasmid Mini kit* da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	1,0M
MOPS	50mM
Ajustar pH=7,0	
Isopropanol puro	15% (v/v)
Água MilliQ	q.s.p. 1L
Esterilizar por filtração (Millipore 0,2µm)	

A18- Solução QF (Conforme protocolo do *Plasmid Mini Kit* da QIAGEN)

<i>Componente</i>	<i>Concentração final</i>
NaCl	1,25M
Tris-HCl	50mM
Ajustar pH=8,5 com HCl	
Isopropanol puro	15% (v/v)
Água MilliQ	q.s.p. 1L
Esterilizar por filtração (Millipore 0,2µm)	

A19- Meio de cultura AB

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

Obs.: Para preparo de 1L de meio AB, agrega-se 5g de glicose (e 10g de ágar bacteriológico, em meios sólidos) à 900mL de água destilada e autoclavar. Após, acrescenta-se 50mL/L de Tampão e 50mL/L de Sais, em capela de fluxo laminar

A20- Meio de cultura de plantas, composto por sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas B5

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

A21- 2X SDS-PAGE

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

Obs: A solução 1 X SDS-PAGE foi preparada a partir da diluição da solução 2 X SDS-PAGE em Água MilliQ

A22- Preparo do Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

<i>Componente/Tipo de Gel</i>	<i>Runnig 12%</i>	<i>Stacking 4%</i>
Acrilamida/Bis	40%	13%
Tris-HCl pH 8,0	375 mM	-
Tris-HCl pH 6,8	-	125 mM
Persulfato de amônio	0,05%	0,05%
TEMED	0,05%	0,1%
Água MilliQ	q.s.p. 40 mL	q.s.p. 10 mL

Tampões de corrida

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

A23- Solução de descoloração

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

A24- Lysis Buffer (Conforme protocolo *E. coli* expression System with Gateway® Technology da Invitrogen)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Fosfato de potássio, pH = 7,8	50mM
NaCl	400mM
KCl	100mM
Glicerol	10%
Triton X-100	0,5%
Imidazol	10mM
Água MilliQ	q.s.p. 100mL

A25– Tampões para purificação da proteína recombinante em condição Nativa (Conforme protocolo *E. coli expression System with Gateway® Technology* da Invitrogen)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
<i>Buffer Stock Solution A (10X)</i>	
NaH ₂ PO ₄	200mM
NaCl	5M
<i>Buffer Stock Solution B (10X)</i>	
Na ₂ HPO ₄	200mM
NaCl	5M
<i>1X Native Purification Buffer</i>	
NaH ₂ PO ₄ , pH = 8,0	50mM
NaCl	0,5M
<i>Imidazol 3M, pH = 6,0</i>	
Imidazol	3M
<i>Buffer Stock Solution A (10X)</i>	8,77mL
<i>Buffer Stock Solution B (10X)</i>	1,23mL
Água MilliQ	q.s.p. 100mL
<i>Native Binding Buffer</i>	
<i>1X Native Purification Buffer</i>	30mL
Imidazol 3M, pH = 6,0	100µL
Agitar bem e ajustar pH = 8,0	
<i>Native Wash Buffer</i>	
<i>1X Native Purification Buffer</i>	50mL
Imidazol 3M, pH = 6,0	335µL
Agitar bem e ajustar pH = 8,0	
<i>Native Elution Buffer</i>	
<i>1X Native Purification Buffer</i>	13,75mL
Imidazol 3M, pH = 6,0	1,25mL
Agitar bem e ajustar pH = 8,0	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. E LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ARNER, R.J.; PRABHU, K.S.; THOMPSON, J.T.; HILDENBRANDT, G.R.; LIKEN, A.D.; REDDY, C.C. Mio-inositol oxigenase: molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxidizes myo-inositol and D-chiro-inositol. **Biochemical Journal**, 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-xylose synthesis. **Proceedings of the National Academic Sciences USA**, v. 98, n.21, p.12003-12008, Oct. 2001.
- BATEMAN, A.; BIRNEY, E.; CERRUTI, L.; DURBIN, R.; ETWILLER, L.; EDDY, S.R.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOWE, K.L.; MARSHALL, M.; SONNHMMER, E.L.L. The Pfam protein families database. **Nucleic Acid Research**, v.30, n.1, p.276-280, Jan 2002.
- BEVAN, M. W.; FLAVELL, R. B.; CHILTON, M. D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, v.304, p.184-187, 1983.
- BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. **Journal of Molecular Biology**, v.226, n.3, p.735-745, 1992.

- BERNARD, P.; KEZDY, K.E.; MELDEREN, L.V., STEYAERT, J.; WYNS, L.; PATO, M.L.; HIGGINS, P.N. COUTURIER, M. The F Plasmid CcdB Protein Induces Efficient ATP-dependent DNA Cleavage by Gyrase. **Journal of Molecular Biology**, v.234, n.3, p.534-541, 1993.
- BIFFEN, M.; HANKE, D.E. Reduction in the level of intracellular *myo*-Inositol in culture soybean (*Glycine max*) cells inhibits cell division. **Biochemical Journal**, v.265, n.3, p.809-814, 1990.
- BIRBOIM, H.C.; DOYLE, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid Research**, v.7, p.1513, 1979.
- BISWAS, B.B.; GHOSH, B.; MAJUNDER, A.L. *myo*-Inositol polyphosphates and their role in cellular metabolism: a propose cycle involving glucose-6-phosphate and *myo*-Inositol phosphates. In: ROODYN, D.B. (Ed.) **Subcellular Biochemistry**. London:Plenum Press, 1984. p.237-280.
- BOUDET, A.M. Lignins and lignification: Selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, n.1-2, p.81-96, Jan-Feb 2000.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. 309p.
- BUDAR, F.; THIA-TOONG, L. VAN MONTAGU, M.; HERNALSTEENS, J.P. Agrobacterium mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single Mendelian factor. **Genetics**, v.114, n.1, p.303-313, 1986.
- CHAFFEY, N.; CHOLEWA, E.; SHARON, R.; SUNBERG, B. Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.594-600, 2001.
- CHARALAMPOUS, F.C. Biochemical studies on inositol. V. Purification and properties of the enzyme that cleaves inositol to D-glucuronic acid. **Journal of Biology Chemistry**, v.234, p.220-227, 1959.
- CHILTON, M.D.; TEPFER, D.A.; PETIT, A.; DAVID, C.; CASSEDELBART, F; TEMPE, J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. **Nature** v.295, n.5848, p.432-434, 1982.

- CITOVSKY, V.; ZUPAN, J.; WARNICK, D.; ZAMBRYSKI, P. Nuclear-localization of agrobacterium vire2 protein in plant-cells. **Science**, v.256, n.5065, p.1802-1805, Jun 1992.
- COSTA,M.M.; MOUNTEER,A.H.; COLODETTE,J.L. Ácidos hexenurônicos. Parte I: origem, quantificação, reatividade e comportamento durante a polpação kraft. **O Papel**, v.62, n.5, p.75-85, mai.2001.
- DALESSANDRO, G., NORTHCOTE, D.H. Possible control sites of polysaccharide synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.). **Planta**. v.134, n.1, p.39-44, 1977a.
- DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Changes in enzymatic activities of nucleoside diphosphate sugar interconversions during differentiation of cambium to xylem in sycamore and poplar. **The Biochemical Journal**, v.162, n.2, p.267-279, 1977b.
- DELMER D.P. Cellulose biosynthesis in developing cotton fibers. In: A.S. BASRA (Ed.). **Cotton Fibers**. New York: Hayworth/Food Science Press, 1999a. p.85-102.
- DELMER, D.P. Cellulose synthesis: Exciting times for a difficult field. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.245-276, 1999b.
- DELMER D.P.; HAIGLER C.H. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. **Metabolic Engineering**, v.4, n.1, p.22-28, 2002.
- DEROLES, S.C.; GARDNER, R.G. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, v.11, n.3, p.355-364, 1988.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.
- FOSTER, G.D.; TWELL, D. (Eds.) **Plant gene isolation: principles and practice**. New York: Chichester/ John Willey, 1996. cap.4.
- FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v.40, p.1-11, 1989.

- GAUDIN, V.; VRAIN, T.; JOUANIN, L. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.32, n.1, p.11-29, Jan-Feb 1994.
- GODDIJN, O.J.M.; LINDSEY, K.; VAN DER LEE, F.M.; KLAP, J.C.; SIJMONS, P.C. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-*gusA* fusion constructs. **Plant Journal**, v.4, n.5, p.863-873, 1993.
- GRODBERG, J.; DUNN, J.J. *ompT* Encodes the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease that Cleaves T7 RNA Polymerase During Purification. **Journal in Bacteriology**, v.170, n.3, p.1245-1253, 1988.
- HAIGLER, C.H.; IVANOVA-DATCHEVA, M.; HORGAN, P.S.; SALNIKOV, V.V.; HWANG, S.; MARTIN, L.K.; DELMER, D.P. Carbon partitioning to cellulose synthesis. **Plant Molecular Biology**, v.47, n.1-2, p.29-51. 2001
- HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.139-168, 1989.
- HELLENS, R. P.; EDWARDS, E. A.; LEYLAND, N. R.; BEANS, S. E MULLINEAUX, P. M. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Plant Molecular Biology**, v.42, n.6, p.819-832, 2000.
- HENRY, S.A.; ATKINSON, K.D.; KOLAT, A.I.; CULBERSTON, M.R. Growth and metabolism of inositol-starved *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.130, n.1, p.472-484, 1977.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCILPEROORT, R.A. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T- region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v.303, n.5913, p.179-180, 1983.
- HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M. D. The Hypervirulente of *Agrobacterium tumefaciens* A281 Is Encoded in a Region of pTiBo542 Outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, v.168, n.3, p.1291-1301, 1986.
- HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, v.19, n.1, p.15-38, 1992.

- HOPKINS, W.G. **Introduction to Plant Physiology**. United States of America: John Willey & Sons, Inc., 1995. 464p.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICH HOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v.227, n.4691, p.1229-1231, 1985.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCR. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. cap.1.
- IPT. **Celulose e papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. São Paulo: IPT, 1998., v.2, 402p.
- 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**, v.14, p.745-750, 1996.
- JIANG, Z.; LIEROP, B.V.; BERRY, R. Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. **Tappi Journal**, v.83, n.1, p.167-175, 2000.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. Gatewaytm vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v.7, n.5, p.193-195, 2002.
- KOLLER, E.; KOLLER, F.; HOFFMANN-OSTENHOF, O. Myo-inositol oxygenase from oat seedlings. **Molecular & Cellular Biochemistry**, v.10, n.1, p.33-39, Jan., 1976.
- LEE, N. Molecular Aspects of *ara* Regulation. In: MILLER, J.H.; REZNIKOFF, W.S. (Eds.) **The Operon**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980. p.389-410.
- LEE, N., FRANCKLYN, C., AND HAMILTON, E.P. Arabinose-Induced Binding of AraC Protein to *araI*₂ Activates the *araBAD* Operon Promoter. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America**, v.84, n.24, p.8814-8818, 1987.
- LILLEY, G. Survey number 007. **Gene Pulser Eletroprotocol, BIO-RAD**, 1993.
- LOEWUS, F.A. Inositol biosynthesis. In: MOORE, D.J.; BOSS, W.F.; LOEWUS, F. (Eds.). **Inositol Metabolism in plants**. New York: Wiley Liss, 1990. p.13-19.

- 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 United States of America**, v.48, n.3, p.421-425, 1962.
- LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M.W. *myo*-Inositol: Its biosynthesis and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v.34, p.137-161, 1983.
- LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. Myo-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v.150, n.1, p.1-19, 2000.
- LORENCE, A.; CHEVONE, B.I.; MENDES, P.; NESSLER, C.L. *myo*-Inositol Oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbat biosynthesis. **Plant Physiology**, v.134, n.3, p.1200-1205, 2004.
- MATHEWS, C.K.; VAN HOLDE, K.E.; AHERN, K.G. **Biochemistry**. Oregon: Benjamin Cummings, 2000. v.1, 1200 pp.
- McCOWN, D.D.; SELLMER, J.C. General media and vessels suitable for woody plant microculture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1, p.4-14.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v.313, p.810-812, 1985.
- OGDEN, S.; HAGGERTY, D.; STONER, C.M.; KOLODRUBETZ, D.; SCHLEIF, R. The Escherichia coli L-Arabinose Operon: Binding Sites of the Regulatory Proteins and a Mechanism of Positive and Negative Regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.77, n.6, p.3346-3350, 1980.
- PEARSON, W.R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. **Methods in Enzymology**, v.183, p.63-98, 1990.

- RAVEN, P.H.; RAY F.E.; SUSAN E.E. **Biology of Plants**. New York: Worth Publishers, 2001. 791p.
- 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. **Journal of Biology Chemistry**, v.256, n.16, p.8510-8518, 1981.
- REITER, W.D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.536-542, 2002.
- REITER, W.D.; VANZIN, G.F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, v.47, n.1-2, p.95-113, Sep. 2001.
- ROBERTS, R.M., LOEWUS, F. The conversion of D-glucose-6 [¹⁴C] to cell wall polysaccharide material in *Zea mays* in the presence of high endogenous level of myo-inositol. **Plant Physiology**, v.52, n.6, p.646-650, 1973.
- ROSENBERG, A.H., LADE, B.N., CHUI, D.-S., LIN, S.-W., DUNN, J.J., AND STUDIER, F.W. Vectors for Selective Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. **Gene**, v.56, n.1, p.125-135, 1987.
- SALZMAN, R.A.; FUJITA, T.; ZHU-SOLZMAN, K.; HASEGAWA, P.M. E VERSON, R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.17, n.1, p.11-17, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 765p.
- SANJUAN, D.R. **Obtención de pulpas y propiedades de las fibras para papel**. Guadalajara: Universidad de Guadalajara, 1997. 293p.
- SCHARF, S.J. Cloning with PCR. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. cap.11.

- SCHARF, S.J.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. **Science**, v.233, n.4768, p.1076-1078, Sep. 1986.
- SCHLEIF, R.S. DNA Looping. **Annual Review of Biochemistry**, v.61, p.199-223, 1992.
- SILVA, M.R.; MOUNTEER, A.; COLODETTE, J.L. Ácidos Hexenurônicos. Parte II: Remoção e Impacto na branqueabilidade e qualidade da polpa e no processo de branqueamento. **O papel**, v.62, n.6, p.77-84, jun.2001.
- SMITH, E.F.; TOWNSEND C.O. A plant-tumor of bacterial origin. **Science**, v.25, p.671-673, 1907.
- SMOOK, G.A. **Manual para técnicos de pulpa y papel**. Vancouver: A. Wilde, 1990. 397p.
- SOUTHERN, E. M. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, n.3, p.503-517, 1975.
- STUDIER, F.W., ROSENBREG, A. H.; DUNN, J. J.; AND DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned genes. **Methods in Enzymology**, v.185, p.60-89, 1990.
- STUDIER, F.W.; MOFFATT, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. **Journal of Molecular Biology**, v.189, n.1, p.113-130, 1986.
- TAPPI, Carbohydrate Composition of Extractive-free Wood and Wood Pulp by Gas-Liquid Chromatography, Test Method T 249 cm-85. **TAPPI Test Methods**. Atlanta: Ga. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 1991.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

- TZFIRA T.; CITOVSKY V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. **Molecular Plant Pathology**, v.1, p.201-212, 2000.
- VAN HAUTE, E.; JOOS, H.; MAES, M.; WARREN, G.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.S. Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. **EMBO Journal**, v.2, p.411-417, 1983.
- WALKER, J.C.F. **Primary wood processing**: Principles and practice. London: Chapman & Hall, 1993. 213p.
- WITT, H.J. UDP-glucose metabolism during differentiation and dedifferentiation of *Riella helicophylla*. **Journal of Plant Physiology**, v.140, n.3, p. 276-281, 1992.
- ZAMBRYSKI, P.C.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.S. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, v.2, n.12, p.2143-2150, 1983.