

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA**

**“Caracterização do gene da pectina acetilsterase específica do pistilo de
Nicotiana tabacum L. (Solanaceae)”**

Andréa Carla Quiapim

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Biologia Comparada**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA**

**“Caracterização do gene da pectina acetilsterase específica do pistilo de
Nicotiana tabacum (L., Solanaceae).**

Andréa Carla Quiapim

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Biologia Comparada**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Helena de Souza Goldman

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2009**

DEDICO

Ao meu esposo **André Luís da Silva** pelo carinho, companheirismo e apoio nessa etapa de nossas vidas. Te amo muito!

À minha família, em especial aos meus queridos pais **Waltercides e Márcia** pelo amor, suporte e constante dedicação, e a minha grande irmã e amiga **Ana Paula**. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por estar sempre presente em minha vida, me fortalecendo e me guiando nesta jornada.

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman**, o meu muito obrigado, pela oportunidade, paciência, compreensão, amizade, motivação e grande apoio durante o meu percurso profissional.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada** da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pela oportunidade de aprendizado e por todo apoio financeiro recebido durante este trabalho.

À **CAPES** pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

À **FAPESP** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro concedido ao laboratório onde foi desenvolvido este projeto.

Ao **Departamento de Biologia** da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, por ter me acolhido durante a realização da Pós-Graduação.

Aos **professores membros da Banca Examinadora**, pelo tempo e atenção dispensados ao meu trabalho e pela gentileza em participar desta banca.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman** e seu grupo de pesquisa, pela constante ajuda, pelo uso de equipamentos e empréstimos de materiais.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (FMRP-USP), **Maria Dolores Seabra Ferreira**, **Maria Teresa Picinoto Maglia** e **José Augusto Maulim**, por toda ajuda indispensável na análise de microscopia de varredura.

À **Profª. Drª. Maria Cristina da Silva Pranchevicius**, pela amizade, confiança e por toda ajuda dispensada a este trabalho.

À **Profª. Drª. Maria Célia Jamur**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo uso do microscópio de fluorescência.

Aos professores do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, **Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos**, **Profª. Drª. Tiana Kohlsdorf** e **Prof. Dr. João Atílio Jorge**, pelo uso de equipamentos, orientação nas análises comparativas e nos ensaios enzimáticos, respectivamente.

À **Profª. Drª. Simone de Pádua Teixeira**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, e em especial a sua aluna **Marina Fernanda Bortolin Costa**, pelo empréstimo de material e pela ajuda na microscopia óptica.

À **Viviani Cossalter**, pela sincera amizade de longos anos e por estar sempre disposta a me ajudar naquilo que for preciso.

Ao **Ms. Michael dos Santos Brito** pela valiosa amizade e colaboração sem medir esforços para me ajudar.

Ao **Edward José Strini** pela amizade, confiança e por toda ajuda compartilhada.

À **Ms. Cristiane Paula Gomes Calixto**, pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos no Mousse Cake.

Ao **Ms. Nilton César Avanci**, pela amizade e ajuda nos experimentos realizados neste trabalho.

Ao **Ms. Henrique Cestari De Paoli**, por toda ajuda nas análises de hibridização “in situ”

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, **Danillo, Douglas, Ian, Marcella, Paulo e Samantha**, por toda a ajuda e pela ótima convivência.

À querida **Leomina de Jesus S. de Souza (Dona Nina)**, pela amizade e pelos ótimos momentos de alegria que passamos juntas.

À querida amiga **Patrícia Maróstica Vitorelli**, pela verdadeira e fiel amizade.

Aos meus **familiares**, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e confiança durante todos os dias de minha vida.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, o meu carinho e amizade.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Recentemente, uma análise por “macroarray” identificou um gene preferencial de estigmas/estiletos de *Nicotiana tabacum*, codificando uma pectina acetilesterase (Quiapim, 2005; Quiapim *et al.*, 2009), o qual foi denominado *NtPAE1* (*Nicotiana tabacum* pectin acetylesterase 1). A análise por RT-PCR em tempo real, feita com RNA dos diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos da planta, confirmou que este gene é específico de pistilo, com maior expressão nos estigmas/estiletos (Quiapim, 2005). O nível de expressão do gene *NtPAE1* nos estigmas/estiletos e ovários, durante os 12 estágios do desenvolvimento floral, foi analisado e mostrou que os maiores níveis de expressão ocorrem nos estágios desenvolvimentais tardios, próximos da ântese. Experimentos de hibridização “*in situ*” demonstraram que *NtPAE1* é expresso nos tecidos especializados do estigma/estilete, atravessados pelo tubo polínico durante seu crescimento em direção ao ovário. Nos estágios tardios do desenvolvimento floral, estes tecidos diminuem a adesão celular e formam espaços intercelulares, que são preenchidos pelo exudato. As pectinas da parede celular funcionam como moléculas de adesão e pectinases podem ter um papel na formação dos espaços intercelulares nos tecidos do pistilo. Para compreender melhor a função do gene *NtPAE1* no processo reprodutivo, foram produzidas plantas transgênicas superexpressando e silenciando este gene. Dentre 15 plantas independentes de superexpressão, 2 plantas transgênicas (PAESp 8.1 e PAESp 10.1) apresentaram flores de tamanho menor e com pistilos aparentemente mais finos, em comparação com as flores da planta selvagem (SR1). De 8 plantas de silenciamento (RNAi) obtidas, apenas a planta transgênica (PAERi 16.2) com o menor nível de expressão de *NtPAE1* apresentou flores mais robustas e firmes, caracterizando um fenótipo diferenciado da planta selvagem. Além das diferenças morfológicas, esta planta é estéril e incapaz de produzir frutos. A autopolinização controlada desta planta transgênica não resultou na formação de frutos e seu pólen não foi capaz de produzir frutos em plantas selvagens. Por outro lado, polinizações com pólen da planta selvagem SR1 em pistilos da planta transgênica (PAERi16.2) produziram frutos, mas evidenciaram um retardo no crescimento do tubo polínico quando comparado com a autopolinização de SR1. Estudos por microscopia de fluorescência e microscopia

eletrônica de varredura demonstraram alterações morfológicas no pólen da planta PAERi16.2. Embora o mecanismo preciso, responsável pela alteração fenotípica do pólen da planta transgênica, não seja conhecido, é possível inferir que o silenciamento da PAE tenha afetado o desenvolvimento adequado dos grãos de pólen. Adicionalmente, os estigmas/estiletes da planta PAERi 16.2, no estágio 11 do desenvolvimento floral, quando corados com vermelho de rutênio, demonstraram maior presença de pectinas no tecido transmissor do estilete, enquanto que os estigmas/estiletes da planta PAESp 8.1 mostraram redução das pectinas, quando comparados com os estigmas/estiletes de SR1. Os resultados obtidos apóiam a hipótese de que o gene *NtPAE1* apresenta um papel na regulação da degradação de pectina nos tecidos especializados do pistilo, contribuindo para a formação de espaços intercelulares e facilitando o crescimento do tubo polínico.

Para compreender o processo evolutivo do gene para PAE em diferentes espécies de *Nicotiana*, foram feitas amplificações da seqüência correspondente ao gene *NtPAE1* a partir do DNA genômico de *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora* e *N. alata*, utilizando “primers” para regiões conservadas. Foram realizadas comparações entre as seqüências utilizando o programa HYPHY, considerando *Solanum lycopersicum* como grupo externo. Os resultados mostraram uma grande similaridade entre as seqüências das diferentes espécies de *Nicotiana*. Esta conservação de seqüência durante a evolução pode ser vista como um forte indicativo de que a enzima PAE possui uma grande importância funcional.

ABSTRACT

Recently, a macroarray analysis has identified a gene preferentially expressed in *Nicotiana tabacum* stigmas/styles encoding a pectin acetyl esterase (Quiapim, 2005; Quiapim *et al.*, 2009), which was denominated *NtPAE1* (*Nicotiana tabacum* pectin acetylerase 1). The analysis by real time RT-PCR with RNA from different vegetative and reproductive organs has confirmed its pistil-specific expression, and higher expression levels at stigmas/styles (Quiapim, 2005). The expression of the *NtPAE1* gene was examined in stigmas/styles and ovaries at the 12 flower developmental stages and has shown that the higher expression levels occur at the later stages towards anthesis. *In situ* hybridization experiments have demonstrated that *NtPAE1* is expressed at the stigmas/styles specialized tissues, through which the pollen tubes grow on the way to the ovary. In the later flower developmental stages, there is a decrease in cellular adhesion at the stigma/style specialized tissues and the formation of intercellular spaces filled by the exudate. Pectins from the cell wall work as adhesion molecules and pectinases may have a role in the formation of the intercellular spaces at the pistillar tissues. To have a better understanding of the *NtPAE1* role in the reproductive process, transgenic plants overexpressing and silencing this gene were produced. Among 15 independent overexpression plants, 2 transgenic plants (PAESp 8.1 and PAESp 10.1) had smaller flowers with thinner pistils in comparison to the wild-type plant SR1. From 8 silencing (RNAi) transgenic plants obtained, only the one (PAERi 16.2) with the lowest *NtPAE1* expression level had tougher and firmer flowers, with a phenotype differentiated from the wild-type plant. Besides the morphological differences, this plant was sterile and unable to produce fruits. The controlled self-pollination of this transgenic plant did not result in fruit formation and its pollen was incapable to produce fruits in wild-type plants. On the other hand, pollinations with wild-type SR1 pollen in pistils of the PAERi16.2 transgenic plant have produced fruits, but showed a delay in pollen tube growth when compared to self-pollinations in SR1. Studies by fluorescence and scanning electron microscopy have demonstrated morphological alterations in the PAERi16.2 pollen. Despite the fact that the precise mechanism responsible for the phenotypical alterations is not known, it is possible to

infer that the PAE silencing has affected the adequate development of pollen grains. Additionally, the stage 11 stigmas/styles from the PAERi 16.2 plant were stained with ruthenium red and demonstrated the presence of more pectins in the stylar transmitting tissue, while the stigmas/styles of the PAESp 8.1 plant showed a reduction in pectins when compared to SR1 stigmas/styles. The results obtained support the hypothesis that the *NtPAE1* gene has a role in the regulation of pectin degradation in the pistillar specialized tissues, contributing to the formation of the intercellular spaces and facilitating the pollen tube growth.

To understand the evolutive process of the gene encoding PAE in different *Nicotiana* species, sequences corresponding to the *NtPAE1* gene were amplified from genomic DNA of *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora* and *N. alata*, using primers for the conserved regions. Sequence comparisons were performed using the HYPHY program, considering *Solanum lycopersicum* as an external group. The results have shown high similarity among the sequences of the different *Nicotiana* species. This sequence conservation during evolution points toward a very important function for the PAE enzyme.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A reprodução sexuada em angiospermas

A reprodução é uma das etapas mais importante no ciclo de vida de todos os organismos. Em angiospermas, as flores são responsáveis pela reprodução sexual que envolve a polinização e, posteriormente, a fertilização. O processo de polinização cruzada assegura a manutenção das espécies e também é um meio de aumentar a diversidade genética e, assim, o potencial de adaptação a novos ambientes (Sanchez et al., 2004).

Os órgãos florais podem ser reunidos em estéreis e de reprodução. As sépalas e pétalas constituem, respectivamente, o cálice e a corola, sendo ambos estéreis. Os estames e carpelos compõem as partes florais reprodutivas. O conjunto de estames, denominado androceu, representa a parte masculina da flor (Mauseth, 2003). Cada estame é composto por uma antera (onde os gametófitos masculinos são formados) presa a um filete. O conjunto de carpelos, que constitui a parte feminina da flor, é chamado de gineceu. A junção de dois ou mais carpelos é denominada de pistilo (Sanchez et al., 2004). O pistilo é geralmente diferenciado em uma porção inferior fértil, o ovário, que envolve os gametófitos femininos (óvulos), e em uma porção superior estéril, o estilete, sendo frequentemente diferenciada em uma região apical mais ou menos alargada denominada estigma (Mauseth, 2003).

Diferentes grãos de pólen são carregados para o estigma através de insetos, vento, água ou por contato direto entre a abertura da antera e o estigma. O sucesso do processo de polinização depende da adesão desses grãos de pólen na superfície do estigma e estes, quando compatíveis, hidratam e germinam, emitindo o tubo polínico (Wilhelm e Preuss, 1999). Durante a germinação e alongação do tubo, as células espermáticas e o núcleo vegetativo são transportados para dentro do tubo polínico, o qual cresce entre os espaços intercelulares dos tecidos especializados do pistilo em direção ao ovário. O tubo polínico transporta as duas células espermáticas até o saco embrionário (Preuss, 2002), sendo que uma célula se funde com a oosfera, para originar o zigoto $2n$, e a outra se une aos núcleos polares, originando o endosperma triploide.

Esta união, dos gametas masculino e feminino, caracteriza a dupla fertilização (Tsao e Linskens, 1986).

A reprodução sexual de plantas depende de interações específicas entre os grãos-de-pólen e o pistilo, sendo que este último, e principalmente os tecidos especializados do estigma e estilete, têm o papel de reconhecer e selecionar os gametas masculinos, sendo decisivos na determinação do genótipo dos futuros embriões e plantas (Linskens, 1983; Steinmetz *et al.*, 1992). Portanto, o estudo do pistilo é de extrema importância na biologia da reprodução.

1.2. Estruturas reprodutivas femininas de *Nicotiana tabacum*

O pistilo de *Nicotiana tabacum* é formado pela fusão de dois carpelos (Bell e Hicks, 1976) e pode ser dividido em três partes: o estigma, o estilete e o ovário.

O estigma, responsável pela captura e germinação dos grãos de pólen (Esau, 1974), é bilobado e sua superfície é formada por uma epiderme com células papilares esparsamente distribuídas. Na maturidade, o estigma fica coberto por um exudato, o qual caracteriza a espécie como sendo de estigma úmido (Bell e Hicks, 1976). Nas espécies de estigma úmido, a captura do pólen através da secreção estigmática (exudato) não é específica, e a hidratação parece ser passiva e grandemente não regulada (Swanson *et al.*, 2004). Estruturalmente, consiste de duas zonas diferenciadas: 1) uma zona glandular, formada por células papilares na parte superior, e logo abaixo, formada por duas a três camadas de células basais; a qual foi denominada zona secretória do estigma e 2) uma zona não secretora, formada por camadas de células parenquimáticas que dão suporte à zona secretória.

O estilete é uma estrutura que liga o estigma ao ovário, formando uma haste alongada que serve de passagem para os tubos polínicos em direção ao óvulo. Em *Nicotiana tabacum*, a zona secretória do estigma converge no estilete, de tipo sólido, como uma região central de tecido transmissor, circundado pelo córtex parenquimatoso e pela epiderme (Kandasamy e Kristen, 1987; Kandasamy *et al.*, 1990). Há autores, como Bell e Hicks (1976), que se referem à zona secretória como o tecido transmissor do estigma. No estilete sólido, o tubo polínico cresce entre os espaços intercelulares do tecido transmissor para atingir o gametófito feminino, sugerindo sua importância como

guia (Wilhelmi e Preuss 1996, 1997; Jauh et al. 1997) e/ou meio nutritivo para crescimento do tubo (Wu et al. 1995; Lind et al. 1996; Lush et al., 2000).

As células do tecido transmissor são alongadas e secretam um fluido proteínáceo que forma a matriz, sendo importante para a nutrição, reconhecimento e direcionamento do tubo polínico (Cheung, 1996). A matriz é composta de uma mistura complexa de proteínas como arabinogalactanas ricas em prolina (Cheung et al., 1993, 1995; Wu et al., 1995), proteínas similares a extensinas (Goldman et al., 1992; Chen et al., 1992; de Graaf et al., 2000), proteínas taumatinas (Kuboyama, 1998), proteína beta-glucanase (Sessa et al., 1995). Os tubos polínicos crescem do estigma em direção ao ovário, atravessando esta matriz e, portanto, muitas destas proteínas devem estar envolvidas com nutrição e direcionamento dos mesmos.

Na porção inferior do pistilo há uma estrutura fértil, conhecida como ovário, que além de conter os óvulos, se diferencia em um fruto após a fertilização (Esau, 1997). O ovário de *N. tabacum* é formado por dois lóculos, sendo que cada lóculo contém mais de 1000 óvulos (Huang e Russel, 1992).

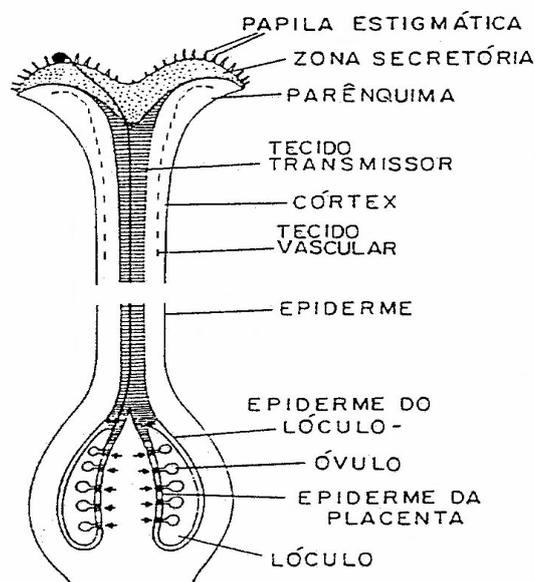


Figura 1: Esquema da morfologia do pistilo de *Nicotiana tabacum*, discriminando as diferentes estruturas do estigma, estilete e ovário (Kandasamy et al., 1990).

1.3. Importância do pistilo na reprodução

No processo de reprodução, o pistilo exerce duas funções principais: a produção do gametófito feminino (ou saco embrionário) no ovário e a discriminação entre os diferentes tipos de grãos de pólen na superfície do estigma e/ou na porção inicial do estilete (Cornish *et al.*, 1988).

O processo de seleção dos grãos de pólen se caracteriza pela habilidade do pistilo de determinar se aceita ou se rejeita um determinado grão de pólen (Linskens, 1986; Wilhelm e Preuss, 1999). Os mecanismos fisiológicos envolvidos na rejeição podem ser: interespecífico (incongruidade) ou intraespecífico (auto-incompatibilidade). O mecanismo interespecífico evita a germinação e a formação dos tubos polínicos funcionais em pistilos de outras espécies (Linskens, 1986).

Como a maioria das angiospermas é hermafrodita, a autopolinização é sempre uma possibilidade (Hiscock e Allen, 2008). Entretanto, muitas angiospermas possuem o sistema genético de auto-incompatibilidade (Hiscock e Allen, 2008). Neste mecanismo, o pistilo reconhece o pólen da própria planta, impedindo-o de germinar e crescer dentro do tecido do estilete (Linskens, 1986). A auto-incompatibilidade é frequentemente controlada por um único locus altamente polimórfico, S, que interfere na interação pólen-pistilo. O reconhecimento e a rejeição do pólen são orquestrados por no mínimo dois diferentes genes não recombinantes para o locus S, controlando a identidade do pólen e a identidade do pistilo, respectivamente (Hiscock e Allen, 2008). Isto não só previne a auto-fertilização, como também previne a fertilização entre diferentes indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo S, uma característica que tem conseqüências importantes na geração de variabilidade dentro da população (Hiscock e Allen, 2008). Estudos de auto-incompatibilidade têm descrito genes específicos que produzem moléculas capazes de reconhecer o pólen e rejeitar aquele que é incompatível (Foote *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Nasrallah *et al.*, 1994; Stone *et al.*, 2003; Bosch e Franklin-Tong, 2008).

Outras funções do pistilo são relevantes para que haja sucesso na reprodução. Estas funções começam quando ocorre a transferência dos grãos de pólen compatíveis até a superfície receptiva do estigma, favorecendo sua adesão e o prolongamento do tubo polínico, dentro do tecido transmissor do estilete, até o saco embrionário (Van Eldik

et al., 1997). Os tecidos especializados do pistilo exercem funções também no direcionamento, nutrição e proteção dos tubos polínicos. O direcionamento do tubo polínico é determinado pela morfologia do estigma, do tecido transmissor e do ovário (Gasser *et al.*, 1993; Hulskamp *et al.*, 1995). Quando o pistilo está maduro, as células da zona secretória do estigma encontram-se separadas por grandes lacunas intercelulares, preenchidas por uma secreção heterogênea, o exudato, composto por polissacarídeos, proteínas e uma grande quantidade de lipídeos (Kandasamy e Kristen, 1987). A presença do exudato também é importante para o crescimento direcional do tubo polínico (Goldman *et al.*, 1994) e a proposta de que componentes presentes no tecido transmissor agem na adesão já tem sido demonstrada (Jauh *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2000 e Mollet *et al.*, 2000).

Em algumas plantas (p.ex. lírio), moléculas de adesão presentes no estilete, como pectina de baixa esterificação e adesinas de baixo peso molecular, rica em resíduos de cisteína (denominadas SCA – stigma/style cysteine-rich adhesin), são necessárias para induzir adesão do tubo polínico à matriz extracelular (Lord, 2000; Mollet *et al.*, 2000).

Em estigmas e estiletos, provavelmente são necessárias enzimas para facilitar a entrada do tubo polínico na matriz extracelular do tecido transmissor, produzindo canais longitudinais onde grandes quantidades de exudato se acumulam e através dos quais os tubos crescem (Dumas *et al.*, 1978; Janson *et al.*, 1994). Muitas enzimas têm sido descritas no pólen, como cutinase (Hiscock *et al.*, 1994), poligalacturonase (Dearnaley e Daggard, 2001), pectina metilesterase (Mu *et al.*, 1994; Wakeley *et al.*, 1998; Futamura *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Lacoux *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2006), glucanase (Kotake *et al.*, 2000; Doblin *et al.*, 2001), endoxilase (Bih *et al.*, 1999) e pectato liase (Wing *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1996; Kulikauskas e McCornick, 1997). Entretanto, pouco se sabe sobre a expressão destas enzimas no pistilo.

1.4. A parede celular e as pectinas

A parede celular vegetal foi, por muito tempo, considerada estruturalmente inerte e acreditava-se que sua função era limitada a suporte e proteção. Estudos mais recentes apontam a parede celular com funções envolvidas na comunicação celular

(Carpita e Gibeaut, 1993; Roberts, 1994; Schindler, 1998), no crescimento e desenvolvimento celular e na interação com o meio (McCann et al. 2001). Além disso, executa papéis importantes nas atividades fisiológica e patológica da planta (Shevchik e Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003).

A parede celular da planta é composta de celulose, hemicelulose e pectinas (Figura 2). A combinação de pectina com a celulose e hemicelulose por ligações covalentes dá origem a protopectina, que é insolúvel em água, mas facilmente decomposta por soluções ácidas liberando a pectina (Penna, 2002).

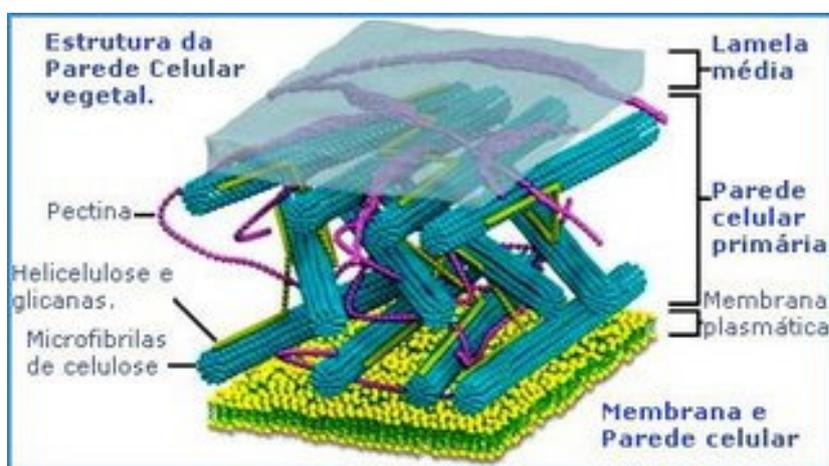


Figura 2: Representação da estrutura da parede celular composta de celulose, hemicelulose e pectinas. Em rosa, destacam-se as pectinas situadas na parede celular primária, principalmente na lamela média.

Pectina é um nome derivado da palavra grega “pectos”, que significa gelatinado ou solidificado. Há aproximadamente 200 anos atrás, o cientista Vauquelin descobriu a existência das pectinas em sucos de fruta. Em 1824, Branconnot continuando as pesquisas de Vauquelin, denominou a substância que formava gel de ácido péctico. Smolenski, em 1924, foi o primeiro a definir pectina como um polímero do ácido galacturônico. Em 1930, Meyer e Mark descobriram a formação em cadeia da molécula de pectina e, sete anos depois, Schneider e Bock estabeleceram sua fórmula.

As pectinas constituem um grupo altamente heterogêneo de polissacarídeos de estrutura coloidal complexa, localizadas na parede celular primária, presentes em maior concentração na lamela média. A lamela média é a camada intercelular mais externa da parede celular, responsável pela aderência de duas células adjacentes (Van Buren, 1991). A estrutura química da pectina é constituída de uma cadeia linear de unidades repetidas de ácido D-galacturônico, ligadas covalentemente por ligações α (1,4), onde os grupos carboxílicos podem ser metil e/ou acetil esterificados em diferentes extensões.

Devido às suas propriedades de gel, para a arquitetura, força mecânica, controle da porosidade e estado iônico da parede celular, as pectinas são consideradas moléculas de adesão entre as células, como avaliado por coloração e imunolocalização (Liners *et al.*, 1994; Knox, 1997; Willats *et al.*, 1999), dados bioquímicos (Fry, 1988; Satoh, 1998), e alguns estudos genéticos (Sinha e Lynch, 1998), incluindo a observação de mutantes que possuem alterações na síntese, deposição ou degradação deste polissacarídeo (Rhee e Sommerville, 1998; Shevell *et al.*, 2000, Iwai *et al.*, 2002).

A pectina é um material polimérico com grupos carboxílicos esterificados com metanol e pode ser dividido em duas regiões: uma “região lisa” (“smooth region”) e uma “região cabeluda” (“hairy region”) (Yadav *et al.*, 2009). O grau de esterificação, que é usado como critério de classificação das pectinas, é a medida da proporção dos grupos de ácido galacturônico metilados em relação ao total de grupos de ácido galacturônico presentes na molécula de pectina (Bocheck *et al.*, 2001; Penna, 2002, Mesbahi *et al.*, 2005). As pectinas são formadas por três principais polissacarídeos modificados (Figura 3), homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) e ramnogalacturonano II (RG-II) (Willats *et al.*, 2006). Esses três polissacarídeos formam uma rede, a qual tem um considerável potencial para a modulação desta estrutura pela ação das enzimas que degradam a parede celular (Yadav *et al.*, 2009).

Homogalacturonanos (HG) são polímeros constituídos por longas cadeias de unidades de ácido galacturônico em ligação α -(1,4), que podem estar parcialmente esterificadas, razão pela qual são mais resistentes à hidrólise. Unidades de ramnose podem ser encontradas ocasionalmente no polímero homogalacturonano (Brett e

Waldron, 1996; Buchanan *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2006). HG é sintetizado no complexo de Golgi pelas enzimas galacturonosiltransferase e torna-se metilesterificado no mesmo compartimento (Micheli, 2001; Sterling *et al.*, 2006) e, subsequentemente, é liberado para o espaço extracelular por vesículas secretoras (Röckel *et al.*, 2008). Ramnogalacturonano I (RG-I) é o segundo polissacarídeo mais importante das pectinas. Sua cadeia consiste da repetição de unidades de dissacarídeos de ácido galacturônico e ramnose, apresentando cadeias laterais formadas por diferentes açúcares, principalmente arabinose e galactose, ligados diretamente às unidades de ramnose (Carpita e Gibeaut, 1993; Buchanan *et al.*, 2000). Ramnogalacturonano II (RG-II) é um polissacarídeo péctico complexo, de baixa massa molar, formado por ácido galacturônico, ramnose, galactose e alguns açúcares raros como apiose, ácido acérico, Dha, Kdo, 2-O-Me-Fuc e 2-O-Me-Xyl (Vidal *et al.*, 2000; Buchanan *et al.*, 2000; Gulfi *et al.*, 2007). Em contraste, a RG-II possui uma estrutura altamente conservada (Willats *et al.*, 2006).

Acreditava-se que a estrutura principal da pectina era formada pelos homogalacturonanos, com ligações simples chamadas “regiões lisas” (“smooth region”) e as ramnogalacturonanos com ramificações contendo vários açúcares, chamadas de “regiões em cabeleira” (“hairy region”), como mostrado na Figura 3A. Entretanto, mais recentemente uma estrutura alternativa foi proposta por alguns pesquisadores, na qual HG pode ser considerado como uma cadeia lateral do RG I (Figura 3B), o que causou grande impacto nos estudos de estrutura fina das pectinas (Vincken *et al.*, 2003; Willats *et al.*, 2006).

As pectinas são polímeros complexos e estruturalmente diversos. A estrutura fina das pectinas pode ser extremamente heterogênea entre as plantas, entre os tecidos e até mesmo em uma parede celular. O tamanho das cadeias pode variar consideravelmente e a composição dos açúcares da RG-I pode ser altamente heterogênea. Os açúcares neutros estão presentes como cadeias laterais em diferentes quantidades, dependendo da fonte de pectina e do método de extração utilizado (Kjoniksen *et al.*, 2005).

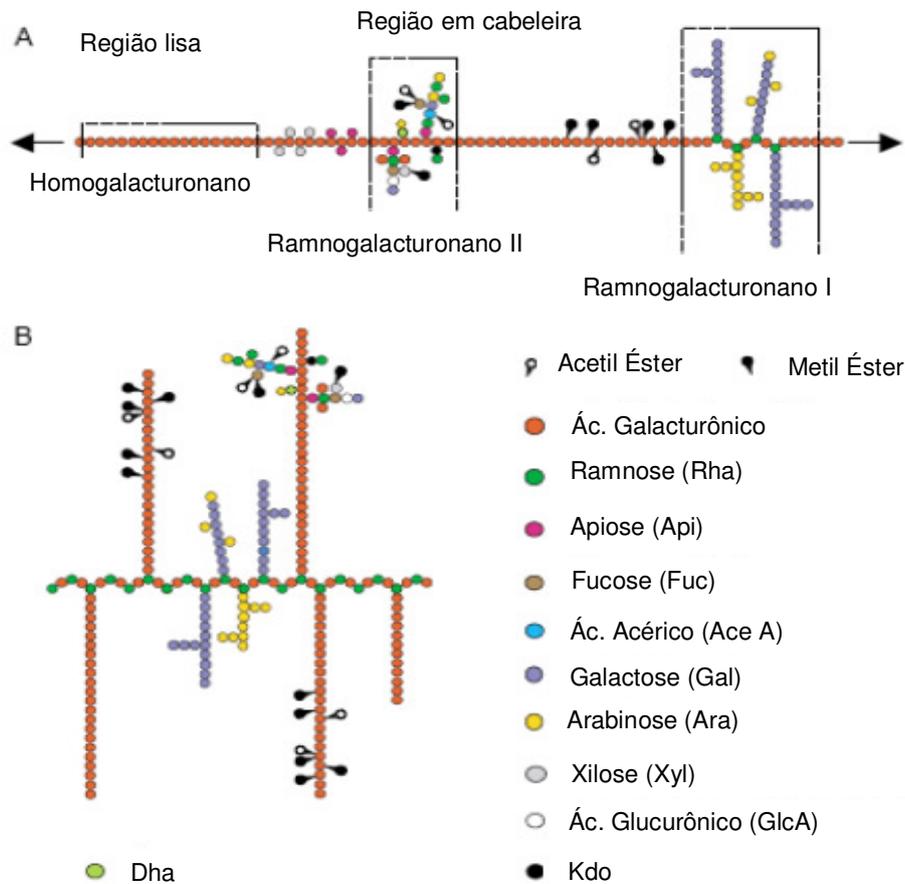


Figura 3: Representação esquemática da estrutura convencional (A) e da alternativa recentemente proposta (B) das pectinas (Willats *et al.*, 2006).

Em várias espécies de plantas (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Petunia hybrida*, *Jasminum humile* e *Zea mays*), ocorre uma deposição periódica anular de pectinas na parede do tubo polínico (Li *et al.*, 1994) e este fato é um aspecto taxonômico que reflete a evolução das plantas (Stepka *et al.*, 2000).

Na reprodução de plantas, a importância no controle da síntese e degradação de pectinas tem sido sugerida. Perturbação na síntese de pectina, em tecidos “in planta” e “in vitro”, causam um grande enfraquecimento das adesões intercelulares (Iwai *et al.*, 2002). Durante o processo de alongação do tubo polínico, as pectinas são polimerizadas, metil-esterificadas e têm parte das cadeias

modificadas dentro do complexo de Golgi, sendo transportadas das vesículas derivadas do Golgi para a extremidade do pólen (Li *et al.*, 1995; Sterling *et al.*, 2001). O processo de germinação do tubo polínico envolve mudanças na parede celular que facilitam a formação e o crescimento do tubo (Suárez-Cervera *et al.*, 2002). Vários estudos de transcriptoma têm mostrado genes que codificam proteínas relacionadas à regulação e biossíntese da parede celular, sendo altamente expressos no pólen de *Arabidopsis* (Becker *et al.*, 2003; Honys e Twell, 2003; Pina *et al.*, 2005), refletindo a importância da remodelagem da parede celular no processo do crescimento do tubo polínico. Vários estudos têm mostrado que a composição e a configuração da parede celular do tubo polínico têm sido implicadas no desenvolvimento de espaços intercelulares (Jarvis *et al.*, 2003) e no crescimento do tubo polínico (Taylor e Hepler, 1997; Mollet *et al.*, 2000).

Como já mencionado acima, a adesão entre o tubo polínico e as células do tecido transmissor em *Lilium longiflorum* parece ser dependente de uma pectina com baixa esterificação (Mollet *et al.*, 2000). Bush e McCann (1999) sugeriram que o grau de esterificação das pectinas pode ser um fator de regulação da adesão célula-célula.

A estrutura complicada das pectinas e a retenção de um grande número de genes necessários para sintetizar e modificar a estrutura das pectinas, pelas plantas, sugere que elas possuam múltiplas funções no crescimento e desenvolvimento das plantas (Ridley *et al.*, 2001).

1.5. As pectinases e suas funções

Durante o crescimento e desenvolvimento da planta as pectinas podem ser degradadas e modificadas pela ação combinada de várias enzimas endógenas, conhecidas como pectinases, tais como: pectina esterase (EC 3.1.1.11), também denominada de pectina metilesterase (PME) e pectina acetilesterase (PAE – EC 3.1.1.6), pectina liase (PNL), pectato liase (PL) e poligalacturonase (PG) (Novoa de Armas *et al.*, 2002). Essas enzimas desempenham importante papel no crescimento da planta, amadurecimento do fruto e na modificação da biomassa (Linko *et al.*, 1989; Walsh e Headon, 1994; Said e Pietro, 2004).

As enzimas são classificadas de acordo com o modo de ação (hidrólise ou transeliminção) e preferência pelo substrato (pectina ou ácido pécico) (Tabela 1). Uma subclasse de enzimas envolvidas na degradação da “região lisa” (homogalacturonano) inclui as enzimas de desesterificação, pectina metil esterase (PME) e pectina acetilsterase (PAE) (Yadav *et al.*, 2009). A outra subclasse é a das despolimerases, que clivam as ligações (α -1,4) por hidrólise (poligalacturonases) ou pelo mecanismo de transeliminção (pectato liase - PL e pectina liase - PNL) (Said e Pietro, 2004; Yadav *et al.*, 2009).

Tabela 1: Classificação das pectinas (Yadav *et al.*, 2009).

Tipo de pectinases	nº E.C.	Substrato	Modo de ação	Produto
1. Esterases				
(a) PME	3.1.1.11	Pectina	Hidrólise	Ác. pécico + metanol
(b) PAE	3.1.1.6	Pectina	Hidrólise	Ác. pécico + etanol
2. Despolimerases				
(a) Hidrolases				
(a') Endo PG	3.2.1.15	Ác. pécico	Hidrólise	Oligogalacturonato
(a'') Exo PG	3.2.1.67	Ác. pécico	Hidrólise	Monogalacturonato
(b) Liases				
(b') Endo PL	4.2.2.2	Ác. pécico	Transeliminção	Oligogalacturonato não saturado
(b'') Exo PL	4.2.2.9	Ác. pécico	Transeliminção	Digalacturonato não saturado
(b''') Endo PNL	4.2.2.10	Pectina	Transeliminção	Metiloligogalacturonato não saturado

Durante a maturação da parede celular, os ácidos poligalacturônicos (pectina) são desesterificados pela ação das enzimas pectina metilsterase (PME), liberando metanol e ácido pécico. A desesterificação permite que as cargas negativas dos ácidos poligalacturônicos se liguem aos íons (ex: cálcio), modificando-

os para a forma semi-rígida (gel pectato), alterando as propriedades físicas da parede celular (Morris *et al.*, 1982) Desse modo, a PME torna a pectina mais susceptível à ação das poligalacturonases e/ou pectato liase (Figura 4). A hidrólise enzimática parcial da pectina contribui para que a matriz da parede celular apresente uma estrutura mais “frouxa” (Said e Pietro, 2004).

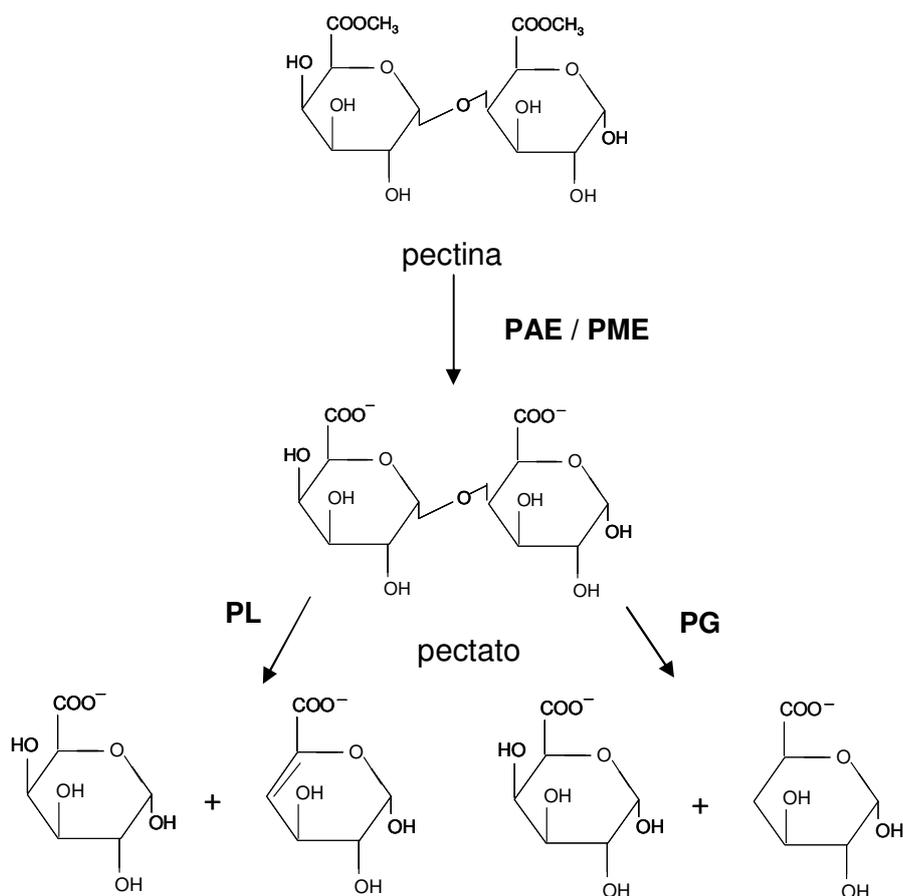


Figura 4: Esquema representativo da ação das pectinases que atuam sinergicamente na degradação de pectina.

Pelloux *et al.* (2007) demonstraram que as PMEs estão envolvidas, diretamente e indiretamente, em diversos processos fisiológicos associados com o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta. Alguns de seus papéis estão relacionados com a extensão e o amaciamento da parede celular (Moustacas *et al.*,

1991; Al-Qsous *et al.*, 2004), na separação celular (Wen *et al.*, 1999; Sobry *et al.*, 2005;), na germinação de sementes (Ren e Kermode, 2000), no desenvolvimento de raiz (Wen *et al.*, 1999) e, no amaciamento de frutos (Brummell e Harpster, 2001).

Estudos levaram a identificação de pectina metil esterases (PMEs) específicas do pólen e do tubo polínico, indicando que as PMEs podem estar envolvidas no desenvolvimento do tubo polínico e sua interação com os tecidos florais femininos (Wakeley *et al.*, 1998; Futamura *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). Vários genes que codificam PME são expressos no pólen de diversas espécies de plantas, tais como *Brassica* (Albani *et al.*, 1991), alfafa (Qiu e Erickson, 1995), milho (Wakeley *et al.*, 1998), planta do fumo (Rogers *et al.*, 2001; Lacoux *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2005), *Salix* (Futura *et al.*, 2000), *Medicago* (Rodriguez-Llorente *et al.*, 2004) e *Arabidopsis* (Jiang *et al.*, 2005; Pina *et al.*, 2005).

Em *Arabidopsis thaliana*, foi descrita a caracterização de uma mutação no gene VANGUARD1, que codifica uma PME específica de grão de pólen e tubo polínico (Jiang *et al.*, 2005). Esta mutação não afetou o crescimento do tubo polínico nas células estigmáticas, mas reduziu o crescimento do tubo no tecido transmissor do estilete, ocasionando uma redução na fertilidade (Jiang *et al.*, 2005).

O gene *AtPPME1* (At1g69940), codificando uma PME específica do pólen, foi identificado (Tian *et al.*, 2006). A perda da atividade deste gene, ocasionado pela inserção de um T-DNA, afetou a forma e taxa de crescimento do tubo polínico, indicando que *AtPPME1* é necessário para o crescimento e desenvolvimento do tubo polínico (Tian *et al.*, 2006). Entretanto, a mutação neste gene não ocasionou problemas na fertilidade e na produção de sementes (Tian *et al.*, 2006).

Em *Nicotiana tabacum*, a mutação do gene *NtPPME1*, específico do pólen, ocasionou uma leve redução do crescimento do tubo polínico “in vivo”, mas a atividade total de PME no pólen não foi significativamente afetada (Bosch *et al.*, 2006). Em *Medicago sativa* e *Medicago truncatula*, oito genes que codificam PMEs foram isolados, dois deles mostrando uma expressão específica na flor (Rodriguez-Llorente *et al.*, 2004).

Inibidores de PMEs, denominados de “Pectin Methylesterase Inhibitor” (PMEI), podem representar um mecanismo adicional de controle (Camardella *et al.*,

2000; Giovanne *et al.*, 2004). PMEIs já foram isoladas a partir de kiwi e *Arabidopsis*. A habilidade de duas PMEIs de *Arabidopsis*, em reduzir a atividade de PME, foi demonstrada “in vitro” e “in planta” (Wolf *et al.*, 2003; Raiola *et al.*, 2004; Lionetti *et al.*, 2007).

Recentemente, foram descritas enzimas PMEs, que desesterificam pectinas no tubo polínico, que são co-expressas com diferentes inibidores de PME, o que aumenta a possibilidade de interação entre PMEs e PMEIs, que atuam na regulação da estabilidade da parede celular no tubo polínico (Röckel *et al.*, 2008). Os genes *AtPPME1* e *AtPMEI2*, ambos especificamente expressos no pólen de *Arabidopsis*, interagem fisicamente, sendo que o *AtPMEI2* inativa o *AtPPME1* “in vitro” (Röckel *et al.*, 2008).

Também já foi demonstrado que a atividade das poligalacturonases (PG) está associada à maturação do pólen e ao crescimento do tubo polínico (Pressey e Reger, 1989; Pressey, 1991). Em tomate, foi demonstrado que os genes para PG, *TAPG1* e *TAPG4*, são expressos nos pistilos de flores maduras (Hong e Tucker, 2000). Em *Brassica napus*, foi identificada a expressão do gene PG no desenvolvimento de anteras e altos níveis de transcritos de PG no pólen maduro (Robert *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 1997). Outros estudos nesta espécie demonstraram que estas enzimas podem também atuar na modificação da parede nos tecidos do pistilo (Dearnaley e Daggard, 2001).

Sequências codificando pectato liase (PL) em plantas superiores foram primeiramente relatadas como expressas especificamente em pólen de tomate (Wing *et al.*, 1989). Em 1990, Budelier *et al.* descreveram a identificação de um gene denominado MON9612, especificamente expresso no tecido transmissor do estilete de tomate. Hoje se sabe que este gene codifica uma pectato liase (PL). Desde então, muitas outras sequências similares têm sido identificadas como expressas no pólen, anteras e pistilos (Marin-Rodrigues *et al.*, 2002). Taniguchi *et al.* (1995) e Wu *et al.* (1996) sugeriram funções para PL no pólen, que inclui a perda inicial da parede celular do pólen para capacitar a germinação e o crescimento do tubo polínico e, a quebra da parede celular do tecido transmissor do estilete, facilitando a penetração do tubo polínico.

Em bananas, a expressão de dois genes distintos para pectato liase (PL) (Pel I e Pel II), foi detectada durante o amadurecimento de frutos (Marin-Rodriguez, 2003). Em 2002, a supressão de um gene PL manipulado em morangos transgênicos, durante o amadurecimento do fruto, resultou em frutos significativamente mais firmes (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002).

Como já descrito acima, a pectina acetilesterase (PAE) é uma das enzimas que participa da clivagem do polímero de pectina (Linko *et al.*, 1989) quebrando as ligações acetil éster, com formação de ácido péctico e etanol (Said e Pietro, 2004). A existência das ligações acetil éster provavelmente tem o papel biológico de restringir a despolimerização da pectina pelas outras pectinases. A enzima pectina acetilesterase (E.C. 3.1.1.6) pode hidrolisar especificamente tais acetil ésteres, possuindo uma função crítica na modificação da parede celular (Breton *et al.*, 1996). A desacetilação pode afetar a solubilização da pectina, tornando-a mais solúvel em água, por diminuir a hidrofobicidade da estrutura. *In vivo*, o grau de acetilação das pectinas deve ser um fator estrutural a ser levado em consideração no desenvolvimento das propriedades das paredes celulares (Breton *et al.*, 1996).

A pectina acetilesterase (PAE) tem sido identificada em microorganismos (Matthew *et al.*, 1990; Shevchik e Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003) e em diversas plantas, como na casca da laranja (Williamson, 1991), em raízes de *Arabidopsis* após a infecção de nematóides (Vercauteren *et al.*, 2002), em *Vigna radiata* (Breton *et al.*, 1996), no látex de *Papaver somniferum* L. (Pilatzke-Wunderlich e Nessler, 2001), em cenoura (Stratilova *et al.*, 1998) e em beterraba (Oosterveld *et al.*, 2000). Breton *et al.* (1996) identificaram e caracterizaram um cDNA (VrPAE1) que codifica uma pectina acetilesterase em sementes de *Vigna radiata*, sugerindo que a atividade da PAE pode contribuir para a limitação na capacidade de crescimento celular.

Apesar dos relatos sobre a PAE, quase nada se sabe sobre o seu papel no processo reprodutivo das plantas.

1.6. O gene *NtPAE1* (*Nicotiana tabacum* pectin acetylesterase 1)

A partir de uma biblioteca de cDNA de estigmas/estiletos de *Nicotiana tabacum* (daSilva, 2004) foi feito um sequenciamento de um total de 12.480 clones,

gerando 11.216 ESTs de alta qualidade (com qualidade Phred/Phrap ≥ 20) (Quiapim *et al.*, 2009). ESTs (“Expressed Sequence Tags”), ou etiquetas de sequências expressas, são feitas a partir do sequenciamento aleatório de clones oriundos de uma biblioteca de cDNA de um determinado organismo ou órgão de interesse. Dessa forma, os ESTs representam apenas as sequências de DNA que se expressam nas células, ou seja, que tem participação direta na síntese de proteínas, as quais são responsáveis pelas características bioquímicas, fisiológicas e estruturais do tecido em estudo.

Para a identificação de ESTs derivados de um mesmo transcrito, foi utilizado o programa CAP3 (Huang e Madan, 1999). Esta análise resultou em um total de 6.177 clusters (1.749 “contigs” e 4.428 “singlets”), representando diferentes transcritos putativos. Estas informações foram organizadas em um banco de dados denominado TOBEST (Quiapim *et al.*, 2009). Adicionalmente, 782 sequências independentes foram analisadas por “macroarray”, revelando 46 genes expressos predominantemente no estigma/estilete. O clone 004A06 apresentou expressão 16 vezes maior no estigma/estilete do que nos órgãos vegetativos (raiz, caule, folha, sépalas e pétalas) (Quiapim *et al.*, 2009). Este clone codifica uma proteína com similaridade significativa à enzima pectina acetilsterase, podendo ser importante durante o desenvolvimento do pistilo e sua função no processo reprodutivo. Posteriormente, um experimento de RT-PCR em tempo real, utilizando RNAs de diferentes tecidos da planta (raiz, caule, folha, sépala, pétala, antera, estigma/estilete e ovário), confirmou a expressão preferencial deste gene no estigma/estilete da planta do fumo (Dissertação de Mestrado – Quiapim, 2005). Este gene foi denominado *NtPAE1* (*Nicotiana tabacum* pectin acetylesterase 1).

A identificação, em nosso laboratório, do gene *NtPAE1* codificando uma pectina acetilsterase (PAE) específica do pistilo, reforça a importância desta via de degradação de pectina no processo reprodutivo e levanta a questão sobre seu papel nos tecidos do órgão reprodutivo feminino. É possível que a PAE, preferencialmente expressa no estigma/estilete, identificada na etapa anterior deste trabalho (Quiapim, 2005), tenha um importante papel na dissociação das células da zona secretória do estigma e do tecido transmissor do estilete. O afrouxamento destes tecidos, que

ocorre durante o desenvolvimento floral, permite a formação de espaços intercelulares, que são preenchidos pelo exudato. A possibilidade de usar plantas transgênicas, com silenciamento e superexpressão deste gene, oferece a oportunidade de responder a questão fundamental sobre o papel desta enzima no processo reprodutivo.

1.7. Silenciamento gênico por RNAi

O RNAi é uma poderosa ferramenta de pesquisa para uma grande variedade de aplicações de silenciamento gênico (Scherr *et al.*, 2003), e também pode ser usado para estudar as funções e as interações dos genes (Bosher e Labouesse, 2000). O fenômeno de RNAi foi descoberto primeiramente nas plantas, durante experiências relacionadas com as mudanças na pigmentação em petúnia (Napoli *et al.*, 1990; Hannon, 2002). Neste método, o RNA antisense é transcrito a partir de um promotor localizado na fita oposta da mesma molécula de DNA e, portanto, é complementar ao seu RNA alvo (Brantl, 2002), impedindo a tradução do RNAm do gene.

A etapa inicial do RNAi está relacionada com a aparição do dsRNA na célula, que é perfeitamente homólogo em sequência ao gene silenciado (Bass, 2000; Scherr *et al.*, 2003). O dsRNA pode ser sintetizado intracelularmente ou ser produzido exogenamente e introduzido diretamente nas células (Shuey *et al.*, 2002). Os dsRNAs são reconhecidos pela enzima Dicer, que é um membro da família de ribonuclease RNase III (Bernstein *et al.*, 2001; Scherr *et al.*, 2003). A Dicer das plantas processa o dsRNA em siRNA ("small interfering" RNA) dupla-fita curtos (21-23 nucleotídeos) e longos (24-25 nucleotídeos) (Zamore, 2004). Os siRNAs produzidos pela Dicer são incorporados em um complexo de nuclease, denominado complexo induzido de silenciamento de RNA (RISC), que deve ser convertido de uma forma latente, contendo um siRNA dupla-fita, a uma forma ativa por meio do desenrolamento do siRNA por um helicase. O RISC contém também uma endorribonuclease que, usando a sequência codificada pela fita de siRNA antisense, encontra e destrói a sequência complementar de mRNA (Nykänen *et al.*, 2001). Quando a degradação é finalizada, o RISC e o siRNA podem ser usados em um

novo ciclo de reconhecimento e degradação do mRNA, protegendo o siRNA de uma rápida degradação (Zamore e Aronin, 2003).

Os siRNAs são produtos celulares naturais de sequência-específica, não produzem metabólitos tóxicos, têm uma vida longa na cultura de células, e são eficientes mesmo em concentrações baixas (Zamore e Aronin, 2003). Por ser difícil introduzir pequenos dsRNAs diretamente nas células vegetais, sua expressão endógena, por meio de promotores constitutivos, permitem a transcrição de siRNAs funcionais ou de seus precursores com maior facilidade (Scherr *et al.*, 2003). Desta maneira, os siRNAs produzidos são expressos por períodos mais longos do que siRNAs introduzidos exogenamente, particularmente nas células onde a unidade de expressão se integra no genoma hospedeiro (Shuey *et al.*, 2002). Os siRNAs produzidos são incorporados no RISC, sem nenhuma modificação adicional, e especificamente e eficientemente suprimem as funções do gene.

Existem outros tipos de métodos de silenciamento, como oligonucleotídeos antisense (Dias e Stein, 2002; Higuchi *et al.*, 2009), RNA antisense e pequenas moléculas de RNA de interferência (Lee e Roth, 2003; McGinnis *et al.*, 2007; Santiago-Doménech *et al.*, 2008).

Há uma variedade de trabalhos que utilizaram a técnica de RNAi no estudo dos genes de diversas espécies de plantas. Por exemplo, no trabalho de Levitin *et al.* (2008), a função dos genes AGP6 e AGP11 de *Arabidopsis thaliana* foi elucidada após silenciamento por RNAi. Estes genes codificam glicoproteínas associadas à parede de células dos estames e grãos de pólen, sugerindo importância no processo reprodutivo. Assim, plantas transgênicas, com baixos níveis destes transcritos, foram geradas. Foi observado que estas plantas tinham fertilidade reduzida, principalmente devido à inibição do crescimento do tubo polínico, comprovando a importância dos genes AGP6 e AGP11 na reprodução. Em outro estudo, publicado por Chincinska *et al.* (2008), plantas de batata RNAi-silenciadas para o gene SUT4 (“sucrose transporter 4”) tiveram florescimento precoce e aumento na produção de tubérculos, provavelmente devido a alterações no fluxo de sacarose entre os tecidos da planta, causado pela ausência de SUT4.

2. OBJETIVOS

A reprodução de plantas é um evento de extrema importância, no entanto, ainda pouco se sabe sobre a ação das pectinases no processo reprodutivo. Este trabalho visou estudar o papel do gene da pectina acetilesterase (*NtPAE1*), específica do pistilo de *N. tabacum*, contribuindo para a elucidação do papel dessas enzimas no processo reprodutivo de plantas.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Obter o sequenciamento completo do cDNA referente ao gene *NtPAE1*;
2. Caracterizar a expressão deste gene durante os estágios do desenvolvimento floral;
3. Identificar o local de expressão do gene *NtPAE1* no pistilo, por método de hibridização "*in situ*";
4. Analisar a função da proteína PAE, através do estudo das alterações acarretadas pelo bloqueio (RNAi) e pela superexpressão (promotor constitutivo) do gene *NtPAE1* em plantas transgênicas;
5. Estudo comparativo da sequência *NtPAE1* em diferentes espécies do gênero *Nicotiana*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

As sementes de *Nicotiana tabacum* Petit Havana SR1, cedidas pelo Jardim Botânico da University of Nijmegen (Holanda), foram distribuídas em sementeiras de isopor contendo composto vegetal de fabricação comercial e bem irrigadas, com água, no dia da semeadura. O processo de crescimento ocorreu em casa de vegetação, com controle da umidade relativa do ar, mantida em 70%, e irrigação automática, ativada por mecanismo de "timer". Os estigmas/estiletos de flores não polinizadas nos 12 estágios de desenvolvimento floral descritos por Koltunow *et al.* (1990) foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, foram armazenados em freezer -70°C.

3.2. Preparação de células de *Escherichia coli* competentes para transformação (Sambrook *et al.*, 1989)

3.2.1. Células eletrocompetentes

Estriou-se, com uma alça de platina, uma suspensão bacteriana de *E. coli*, cepa DH10B, em uma placa contendo meio LB sólido (10g/l de triptona, 5g/l de extrato de levedura, 10g/l de NaCl e 1% de ágar). A placa foi incubada durante 16 horas, a 37°C. Transferiu-se uma colônia para 5ml de meio LB líquido (10g/l de triptona, 5g/l de extrato de levedura, 10g/l de NaCl) e incubou-se durante 16 horas, a 37°C, sob agitação de 300rpm. Transferiu-se 1ml da suspensão bacteriana para 200ml de meio LB, deixou-se a 37°C, sob agitação de 300rpm por 16h (até a leitura da absorbância atingir o ponto ideal -A₆₀₀ entre 0,5 e 0,8). Colocou-se a cultura no gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se a 5.000rpm durante 10 minutos, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas delicadamente em 200ml de água estéril a 4°C. Centrifugou-se novamente a 5.000rpm durante 10 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas delicadamente em 100ml de água estéril a 4°C. Centrifugou-se mais uma vez a 5.000rpm durante 10 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e, desta vez, as

células foram ressuspendidas delicadamente em 10ml de glicerol 10% a 4°C. Centrifugou-se a 5.000rpm durante 10 minutos, a 4°C. Nesta última etapa, as células foram ressuspendidas delicadamente em um volume final de 500µl de glicerol 10% a 4°C. Foram feitas alíquotas de 40µl, as quais foram estocadas a -80°C.

3.2.2 Células competentes para transformação por choque térmico (Método de CaCl₂)

Colônias isoladas de *E.coli*, cepa DH5α, foram obtidas em placa de Petri contendo meio LB sólido. Uma colônia isolada foi inoculada em um frasco contendo 50ml de meio LB líquido. O crescimento das bactérias foi feito por 16 horas, com agitação vigorosa (200rpm) a 37°C. Após este tempo, a cultura de bactérias foi transferida para tubo Falcon de 50ml, e um precipitado de células foi obtido após centrifugação por 6 minutos a 5.000rpm. A seguir, o precipitado de células foi ressuspendido, delicadamente, em 20ml de uma solução gelada de MgCl₂, 0,1M. Após centrifugação das células, o precipitado foi ressuspendido, com leve agitação, em 10ml de solução gelada de CaCl₂ 0,1M e, em seguida, incubado no gelo por 15 minutos. As células foram centrifugadas por 6 minutos a 5.000rpm e novamente ressuspendidas em 2ml de solução gelada de CaCl₂ 0,1M. Uma nova incubação foi feita no gelo por pelo menos 30 minutos, e a ressuspensão foi misturada com 0,5ml de glicerol 80%. A seguir, as células ressuspendidas foram alíquotadas em tubos Eppendorf, cada um com 100µl. Os tubos de células competentes foram, então, guardados imediatamente no freezer a -80°C, para posterior uso.

3.3. Transformação de células de *E.coli* competentes (Sambrook *et al.*, 1989)

3.3.1. Eletroporação de *E. coli*

Foi adicionado 1µl da ligação em 40µl de células DH10B eletrocompetentes, previamente preparadas e alíquotadas em frascos de 1,5ml (item 3.2.1). Colocou-se a mistura em uma cubeta de eletroporação previamente resfriada no gelo. Submeteu-se o conjunto a um pulso de 1,8 kV/25 µF (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Adicionou-se, imediatamente após a eletroporação, 1000µl de meio

LB líquido e ressuspendeu-se delicadamente as células. Transferiu-se o conjunto para um tubo de ensaio, incubando-se durante 1 hora a 37°C, sob agitação de 200rpm. Em seguida, a cultura foi distribuída uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas contendo meio LB sólido com antibiótico apropriado. As placas foram, então, incubadas a 37°C durante 16-20 horas.

3.3.2. Transformação de células competentes de *E.coli*

Inicialmente 7µl da reação de ligação foram delicadamente misturados com 100µl de células competentes (CaCl₂), previamente preparados (item 3.2.2.). Após incubação no gelo durante 15 minutos, o tubo foi transferido para um banho estabilizado a 37°C, por 5 minutos. Após este tempo, foram acrescentados 500µl de meio LB líquido, e o mesmo foi novamente colocado em um banho com temperatura estável a 37°C, durante 30 minutos. A mistura do tubo (250µl) foi distribuída uniformemente sobre uma placa com meio LB sólido, suplementado com antibiótico adequado (ex: 100µg/ml de ampicilina), para seleção apenas de colônias transformadas. A placa foi incubada a 37°C por 16-20 horas.

3.4. Preparação de DNA plasmidial

3.4.1. Mini-preparação de DNA plasmidial

Após a transformação, um número determinado de colônias isoladas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5ml de meio de cultura LB líquido, suplementado com antibiótico adequado e, em seguida, incubadas a 37°C, com agitação. Após 16-20 horas de crescimento, as culturas foram transferidas para tubos de 1,5ml e centrifugadas a 14.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 2 minutos. Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente ressuspendido em 175µl de tampão TES (10mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1mM de EDTA, pH 8,0 e 15% Sacarose) e misturado, delicadamente, com 20µl de lisozima (10mg/ml). Esta mistura foi deixada à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, incubada em um banho termo-estabilizado a 73°C, durante 15 minutos para romper as células

bacterianas. Posteriormente, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 14.000rpm (centrífuga Eppendorf 5415C) por 15 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml e a ele foram acrescentados 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. A precipitação foi feita por 1 hora a -20°C e, em seguida, centrifugada por 15 minutos a 14.000rpm (centrífuga Eppendorf 5415C). O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% e, em seguida, ressuspendido em 100µl de tampão TE (10mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1mM de EDTA, pH 8,0).

3.4.2. Midi-preparação de DNA plasmidial

Para a midi-preparação de DNA, inicialmente foi preparada 200ml de uma cultura bacteriana, a 37°C por 16 horas em meio LB, suplementado com quantidade adequada de antibiótico. Em seguida, o volume da cultura foi dividida em 2 tubos Falcon e as células bacterianas foram precipitadas submetendo-as a uma centrifugação por 10 minutos, numa velocidade de 4.000rpm a 4°C. Posteriormente, todo o precipitado foi completamente ressuspendido em 4ml de TE 50/1 gelado (50mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1mM EDTA, pH 8,0) e, em seguida, a ressuspensão foi transferida para um tubo de 50ml da Nalgene, e ao mesmo foram adicionadas 1,25ml de lisozima (10mg/ml). Após inversão do tubo por 10 vezes a mistura foi incubada no gelo por 5 minutos e, em seguida, foram adicionadas 1ml de EDTA 0,5M, pH 8,0 e mantida novamente no gelo por 5 minutos. Após adição de 25µl de RNase (10mg/ml) e 75µl de uma solução 10% de Triton X-100, o tubo foi novamente invertido com cautela por 10 vezes. Após incubação no gelo por 30 minutos, a mistura foi centrifugada por 1 hora e 30 minutos a 10.500rpm. O sobrenadante foi então submetido a uma limpeza com fenol/clorofórmio e o DNA foi precipitado com 1/10 v de acetato de potássio 5M e 4ml de isopropanol. O precipitado de DNA, obtido após centrifugação a 10.500rpm, foi ressuspendido em 100µl de tampão TE.

3.5. Extração de DNA genômico das folhas de *N. tabacum*

A extração de DNA genômico das plantas foi realizada de acordo com Dellaporta et al. (1983). Resumidamente, 0,5 a 0,75g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Este pó foi ressuspendido em 15ml tampão de extração (tampão de extração corresponde a 100mM de Tris, pH8,0; 50mM de EDTA pH8,0; 500mM de NaCl; 10mM mercaptoetanol), dentro de um tubo Oak Ridge de 30ml. Em seguida, foi adicionado 1ml de SDS 20%, misturado intensamente no vórtex e incubados a 65°C por 10 minutos. Após adição de 5ml de acetato de potássio 5M e misturado com cuidado, o tubo foi incubado no gelo por 20 minutos. Após centrifugação a 10.500rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi passado em filtro Miracloth (Calbiochem) e recolhido em tubo Corex de 30ml contendo 10ml de isopropanol. O tubo foi incubado a -20°C por 30 minutos e, em seguida, o DNA foi precipitado por centrifugação a 10.500rpm (Centrífuga Eppendorf 5403) por 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado foi, então, secado a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. O DNA ressuspendido em 700µl de solução TE (50mM Tris e 10mM EDTA, pH 8,0 foi transferido para um tubo de 1,5ml. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 14.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 10 minutos, tratado com 10mg/ml de RNase a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 75µl de acetato de sódio 3M e 500µl de isopropanol e, em seguida, centrifugado a 14.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 2 minutos. O precipitado de DNA foi lavado em etanol 70%, secado a temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, ressuspendido em 100µl de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0).

3.6. Digestão do DNA utilizando enzimas de restrição

As digestões foram feitas utilizando-se aproximadamente 10µg de DNA, 2µl de tampão adequado para a enzima (solução 10x concentrada) e 1µl de enzima de restrição (ex: *Pst*I 10U/µl e *Sac*I 10U/µl –Biolabs), sendo o volume completado para 20µl com TE. Após o preparo, as digestões foram colocadas em banho-maria a 37°C por 2 horas e, posteriormente, submetidas a uma corrida eletroforética.

3.7. Eletroforese em gel de agarose

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de agarose 1%, em tampão 1X TBE (TBE10X: 108g/l de Tris base, 55g/l de ácido bórico, 8,3g/l de EDTA), contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA e permite a visualização das bandas de DNA, quando exposto à luz ultravioleta. Foi adicionado a cada amostra 1/5 do volume de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL).

O gel de agarose (ainda líquido) foi colocado em uma bandeja apropriada para inserção de pentes, possibilitando a formação de canaletas, onde as amostras são inseridas. Após solidificação, o gel de agarose foi colocado em uma cuba de acrílico, e esta foi preenchida com tampão 1X TBE, ligado a um gerador que polariza a cuba. Devido ao DNA possuir carga elétrica negativa, migra entre os poros do gel em direção ao pólo positivo da cuba. Tal fenômeno permite a formação de bandas separadas de acordo com o tamanho molecular do fragmento de DNA. O tamanho de tais fragmentos foi inferido através da comparação com a migração de fragmentos de marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder plus – Invitrogen), também aplicado no gel. Ao final, as eletroforeses foram fotografadas.

3.8. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose, utilizando fenol/clorofórmio

Com um bisturi excisou-se a porção do gel onde se encontrava o fragmento de DNA de interesse. Pegou-se uma membrana Millipore, tipo GV, poro de 22µm, a qual foi umedecida em tampão TE. Dobrou-se esta membrana na forma de cone, colocando-a em um tubo de 1,5ml, cortado na sua extremidade superior e com um furo na extremidade inferior, feito com uma agulha quente. A porção de gel de agarose, contendo o fragmento de DNA, foi colocada dentro do cone feito com a membrana. Este conjunto foi colocado sobre outro tubo de 1,5ml e todo o aparato foi centrifugado a 10.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 5 minutos. O líquido

recuperado no tubo inferior foi transferido para um novo tubo. A limpeza foi feita da seguinte forma:

Adicionou-se 1 volume de fenol. Levou-se ao vortex e centrifugou-se a 14.000rpm por 2 minutos. A parte superior aquosa, contendo o DNA, foi transferida para outro tubo. Adicionou-se 1 volume de clorofórmio (1 volume de álcool isoamílico para 24 de clorofórmio). Levou-se ao vortex e centrifugou-se a 14.000rpm por 2 minutos. Recolheu-se a parte superior aquosa, a qual foram adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. Incubou-se durante pelo menos 1 hora a -20°C. Centrifugou-se a 14.000rpm durante 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se secar e ressuspendeu-se o DNA em volume adequado de tampão TE ou água destilada autoclavada.

3.9. Preparações de RNA

3.9.1. Mini-preparação de RNA total de estigmas/estiletos

A extração de RNA total foi feita com “Plant RNA Reagent” (Invitrogen). De acordo com o protocolo, o material foi macerado em nitrogênio líquido e, em seguida, ressuspendido em 350µl de “Plant RNA Reagent”. Posteriormente, a amostra ressuspendida foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação a 12.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf novo. Ao sobrenadante foram adicionados 100µl de NaCl 5M e 300µl de clorofórmio (Mallickrodt). A amostra foi centrifugada a 10.500rpm 4°C por 10 minutos. A fase aquosa obtida foi transferida para um tubo Eppendorf novo e a ela foram adicionados 500µl de isopropanol. Após inversão do tubo por 10 vezes para misturar, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 10.500rpm (rotor fixo, Centrífuga Eppendorf 5403) por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 75% e posteriormente centrifugado por 1 minuto a 10.500rpm (rotor fixo, Centrífuga Eppendorf 5403) a 4°C. O precipitado foi dissolvido com 35µl de água-DEPC.

3.9.2. Isolamento de RNA total em larga escala (Dean *et al.*, 1985)

Todas as soluções para uso com RNA foram preparadas com água milli-Q tratada com DEPC (Dietil Pirocarbonato) e as vidrarias tratadas a 180°C em estufa de esterilização por no mínimo 4 horas. O RNA total foi extraído das diferentes amostras, de acordo com o protocolo a seguir.

Os tecidos congelados (2 a 10g) foram colocados em nitrogênio líquido e macerados em graal até se obter um pó fino. O tecido macerado foi transferido para um tubo tipo Falcon de 50ml, sendo adicionado 9ml de tampão NTES (0,1M NaCl, 0,01M Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA e 1% SDS) e 6ml de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1); após agitação, durante 10 minutos no vortex, as amostras foram transferidas para um tubo Corex de 30ml e centrifugadas a 8.500rpm por 10 minutos.

À fase aquosa foram adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. Após agitação leve, as amostras foram mantidas por pelo menos 1 hora no freezer a -20°C (o precipitado deve ser claramente visível). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas novamente a 8.500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado invertendo-se o tubo, e o precipitado lavado com etanol 70% e dissolvido em 2,5ml de água milli-Q tratada com DEPC. Em seguida, foram adicionados 2,5ml de acetato de lítio 4M (precipita principalmente RNA) e as amostras foram mantidas no gelo por dois dias, sendo o gelo trocado sempre que necessário.

Após dois dias, as amostras foram centrifugadas novamente a 8.500rpm por 10 minutos e o precipitado dissolvido em 1,8ml água milli-Q tratada com DEPC. Em seguida, foram adicionados 0,2ml de acetato de sódio 2M pH 4,8 e 4ml de etanol absoluto. Essa mistura foi homogeneizada e incubada por pelo menos 1 hora no freezer -20°. As amostras foram novamente centrifugadas a 8.500rpm por 10 minutos e, em seguida, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 100µl de água milli-Q tratada com DEPC (ou outro volume mais adequado, de acordo com a quantidade de RNA). Todas as amostras foram quantificadas e armazenadas em freezer -70°C.

3.10. RT-PCR em tempo real

3.10.1. Tratamento com a enzima DNase para realizar o RT-PCR em tempo real

Uma alíquota de RNA (20µg) de cada órgão foi tratada com DNase (1U/µl), como descrito a seguir: 5µl de DNase (Promega), 5 µl de tampão 10X concentrado (Promega), 2,5µl DTT 100mM e 0,5µl de RNase OUT (40U/µl - Invitrogen), completando o volume com água DEPC para 50µl. Posteriormente, colocou-se em banho-maria a 37°C por 1 hora e, em seguida, foram feitas reações de PCR utilizando “primers” da actina (10pmol/µl), para verificar contaminação de DNA genômico. Em seguida, adicionou-se na reação 1 volume de fenol sendo vigorosamente agitada e, posteriormente, centrifugada a 14.000rpm por 3 minutos. A fase superior foi recuperada e, em seguida, adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1). Como na etapa anterior, a mistura foi agitada e centrifugada a 14.000rpm por 3 minutos. A fase superior foi recuperada, então adicionou-se 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo agitada e centrifugada como na etapa anterior.

Após essas três etapas de limpeza, o RNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto, permanecendo a – 20°C durante pelo menos uma hora. A amostra foi centrifugada a 14.000rpm durante 15 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 12µl de água autoclavada tratada com DEPC.

3.10.2. Reação com a transcriptase reversa (RT)

As amostras de RNA foram convertidas a cDNA, por tratamento enzimático com transcriptase reversa (Superscript III - 200U/µl, Invitrogen). Foram misturados em um microtubo, 12µl de RNA tratado com DNase e 1,5 µl de oligonucleotídeo (dT)V (100pmol/µl). Essa mistura foi aquecida a 75°C por 10 minutos (para permitir a desnaturação do RNA, rompendo estruturas secundárias), e centrifugada rapidamente sendo transferida para o gelo.

Em seguida, foram adicionados 5,0µl de First Strand Buffer (5x, Invitrogen), 2,5µl de DTT (100mM), 2,0µl de RNase OUT (40U/µl Invitrogen), 2,5µl de dNTPs (10mM cada), a mistura foi aquecida a 42°C por 5 minutos e, posteriormente, foram adicionados 1,25µl de Superscript III (200U/µl), permanecendo a 42°C por 60 minutos. Em seguida, o cDNA foi ressuspendido em 70µl de água autoclavada.

3.10.3. RT-PCR em tempo real

As reações de PCR, para a análise de expressão por RT-PCR em tempo real, foram feitas utilizando o aparelho ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As reações de PCR foram feitas com 5,0µl de “SyBR Green – Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystems), 2,0µl dos oligonucleotídeos 1 e 2 (1pmol/µl). As condições de termociclagem têm um passo inicial de 50°C por 2 minutos e, posteriormente, 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para cada amostra foram feitas reações em triplicata, permitindo a detecção de possíveis erros. No caso dos resultados das triplicatas apresentarem uma variação maior que 1 ciclo, novas repetições foram feitas, para garantir que os resultados representassem valores o mais próximo possível da realidade. Em todos os experimentos foram realizadas reações-controle, que não contêm nenhum molde de DNA, para verificar possíveis contaminações.

Reações de PCR em tempo real foram realizadas com um par de “primers” (Tabela 2). Inicialmente, foram feitas reações usando quantidades conhecidas do DNA alvo, obtido por diluições seriadas de cDNA de *Nicotiana tabacum* como molde, cobrindo várias ordens de magnitude (1pg a 100ng). A partir dos dados de cada reação foi feita uma curva padrão e, a partir da equação da reta, fornecida pela curva padrão de cada par de oligonucleotídeos, foi feito o cálculo do número de cópias de cada gene. Os resultados foram normalizados com relação à expressão de um gene constitutivo em plantas, a actina, sendo usado como referência em experimentos de expressão gênica (Brunner *et al.*, 2004).

Tabela 2: “Primers” senso e antisenso, referentes ao cDNA 004A06, utilizados nas análises de RT-PCR em tempo real.

“Primer” senso RT-PAE-F	5’ AGGAGGGTTGGGTGCAATCATACA 3’
“Primer” antisenso RT-PAE-R	5’ GCAGATCCGTGCAAAGCAACAACACT 3’

Na análise por PCR em tempo real, a quantificação é baseada no ciclo limite, ou seja, no primeiro ciclo no qual a fluorescência é maior que o “background”, sendo que a o ciclo limite é inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias (Tyagi *et al.*, 1998). Uma relação linear é obtida em um gráfico de ciclo limite pelo logaritmo da quantidade conhecida do DNA molde inicial. A equação da reta que melhor se adapta aos dados é determinada por análise de regressão. As quantidades de cópias-alvo, contidas nas amostras desconhecidas foram determinadas por extrapolação a partir da regressão linear da curva padrão obtida para cada conjunto de “primers” (Freeman *et al.*, 1999). As reações e cálculos foram feitos de acordo com Semighini *et al.* (2002).

3.11. Preparação do material para análises histológicas

3.11.1. Preparação das lâminas com aminopropiltriethoxisilano (AES) (Engler *et al.*, 2001)

As lâminas novas foram lavadas extensivamente em água quente (60°C) com detergente por 2 horas ou deixadas durante a noite à temperatura ambiente (TA). As lâminas foram lavadas com água destilada quente e, então, secadas ao ar.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas por 2h a 180°C para eliminar RNases, lavadas com etanol 45%, contendo 1% de ácido acético, e foram secadas ao ar. As lâminas foram incubadas por 15 minutos em 2% de AES (organosilano) em acetona (P.A.) e, então, foram enxaguadas com 100% de acetona por 2 minutos, em seguida com 10% de acetona por 2 minutos e, finalmente, em água DEPC por 2

minutos. As lâminas foram secadas ao ar e guardar a TA, em caixas apropriadas, protegidas de poeira.

3.11.2. Fixação/Desidratação/Emblocação

Fixador: Paraformaldeído 4%, Glutaraldeído 4% e PBS 1X (PBS10X: NaCl (82g/l), Na₂HPO₄ (10,5 g/l) e NaH₂PO₄ (3,55 g/l).

1º Dia: foi feita uma quantidade suficiente de PBS 1X e, em seguida, ajustou-se a solução para pH 11 com NaOH. A solução foi aquecida até 70 °C e, logo foi adicionado o paraformaldeído (na capela), o qual deve dissolver em mais ou menos um minuto. Após dissolver o paraformaldeído, a solução foi resfriada até 4°C e, novamente, foi ajustado o pH para 7 com H₂SO₄. Posteriormente, foi adicionado glutaraldeído 4% (v/v). O tecido foi coletado e colocado no fixador gelado. Foi aplicado vácuo por 15 minutos, o qual foi repetido por mais 3 vezes. Antes da última aplicação de vácuo o fixador foi trocado. Após o último vácuo, os tecidos foram guardados durante a noite a 4°C. Nota-se que alguns tecidos nunca afundam usando este método (ex. flores) por causa dos espaços intercelulares do tecido, que são preenchidos por bolhas de ar.

2º Dia: foram feitas duas lavagens com PBS1X por 30 minutos cada. Em seguida, foram feitas várias lavagens em séries de etanol por 30 minutos cada (30% a 95%), sob agitação, a 4°C. Após as lavagens o material foi deixado em etanol 95%, a 4°C durante a noite.

3º Dia: foram feitas 4 lavagens de etanol 100% por 30 minutos cada, a temperatura ambiente. Posteriormente, foram feitas lavagens da seguinte maneira:

Xilol 25% + etanol 75% por 30 minutos

Xilol 50% + etanol 50% por 30 minutos

Xilol 75% + etanol 25% por 30 minutos

Xilol 100% por 60 minutos

Xilol 100% por 60 minutos

Xilol 100% + ¼ do volume de pastilhas de parafina, deixando durante a noite sem agitação.

4º Dia: o material foi colocado a 42°C, até que as pastilhas derretessem completamente e, em seguida, foi adicionado ¼ do volume de pastilhas deixando derreter completamente. A temperatura foi aumentada para 60°C e foi feita substituição de parafina/Xilol por parafina fundida e o material foi deixado durante a noite a 60°C.

5º Dia ao 7º Dia: foram realizadas duas trocas de parafina por dia (separadas por algumas horas). No oitavo dia o material foi colocado em formas e estocado a 4°C.

3.11.3. Cortes histológicos

As lâminas, banhadas com organossilano, foram pré-aquecidas a 42°C e o material foi cortado com 10 µm de espessura em micrótomo (Microtome 820 spencer) (equipamento cedido gentilmente pelo Prof. Wagner Ferreira). A lâmina foi deixada sobre a chapa aquecida durante a noite, para que o tecido aderisse à lâmina e a água evaporasse completamente. Os cortes podem ser guardados por algumas semanas a 4°C.

3.12. Hibridização “*in situ*”

3.12.1. Preparação das sondas

Para preparar sondas senso e antisenso, foram feitas duas digestões em larga escala, separadamente, com o clone de cDNA, afim de linearizar o plasmídeo. As digestões foram feitas utilizando-se aproximadamente 15µg de DNA, 5µl de tampão adequado para a enzima (solução 10X concentrada) e 3µl de enzima de restrição, sendo o volume completado para 50µl com TE. Após o preparo, as digestões foram colocadas em banho-maria a 37°C por 4 horas e, em seguida, foram adicionados mais 2µl de enzima de restrição, deixando a digestão continuar durante a noite. Na primeira digestão foi utilizada a enzima *EcoRI* e, na segunda digestão, foi utilizada a enzima *BamHI*, que corta o extremo oposto do inserto, a partir do promotor T7. Ambas as digestões foram checadas em gel de agarose, para confirmar a completa linearização do plasmídeo. O plasmídeo digerido foi limpo com

fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, e transferidos para um tubo de 1,5ml livre de RNase. ****A PARTIR DESTE PONTO TODO MATERIAL DEVE SER LIVRE DE RNASE.**

Foi feita uma precipitação com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto e, depois, o precipitado foi ressuspendido em água DEPC para ~1µg/µl. Em seguida, foram feitas as reações de transcrição, uma utilizando a RNA polimerase T7 (controle) e a outra utilizando a RNA polimerase SP6 (sonda), ou seja, a transcrição a partir do promotor T7, gerando RNA senso e a outra transcrição, a partir do promotor SP6, gerando o RNA antisense.

A reação de transcrição foi feita usando o kit DIG RNA Labelling (SP6/T7) (Roche - 11175025910), usando 1µl plasmídeo linearizado (1ug), 2µl NTP mix 10X (10mM ATP, CTP e GTP; 6,5mM UTP, 3,5mM DIG-11-UTP), 4µl tampão de transcrição 5X, 2µl T7 RNA polimerase (e a outra reação com SP6), 1µl inibidor RNase e 10µl água DEPC. A reação foi colocada a 37°C por 2h e, após a checagem de uma alíquota em gel de agarose, foram adicionados 2µl de DNase livre de RNase no restante da reação de transcrição. O tratamento com DNase foi realizado a 37°C por 15 minutos e, logo após, a reação foi parada adicionando-se 4µl de EDTA 200mM. Ambas as sondas, tratadas com DNase, foram precipitadas com 5µl LiCl 4M e 150µl de etanol absoluto, deixando-se 2h a -20°C e, depois, centrifugando-se por 10 min. a 13.000rpm a 4°C. Devido ao grande tamanho das sondas (aproximadamente 1200pb), estas foram hidrolisadas em um tamanho de 400pb, para facilitar a penetração nas células, como descrito abaixo:

Hidrólise da sonda: o tempo da hidrólise alcalina determina o comprimento final da sonda com a fórmula:

$$\text{Tempo (em minutos)} = (Li - Lf) / (0,11 \times Li \times Lf)$$

Li = comprimento inicial da sonda (transcrito) em kb

Lf = comprimento desejado da sonda em kb

A sonda precipitada foi ressuspendida em 50µl de NaHCO₃ 0,1M pH 10,2 e, foi feita a hidrólise à 60°C por 17 minutos (tempo calculado de acordo com a

fórmula acima). A hidrólise foi paralisada, após adicionar 5µl de ácido acético 5% e, em seguida, foi feita uma precipitação adicionando-se 5µl de acetato de sódio 3M e 125µl de etanol 100%. A sonda hidrolisada foi deixada por 2h a -20°C e, depois, centrifugada por 10 min. a 12.000rpm a 4°C. O RNA precipitado foi ressuspensionado em 100µl de água DEPC.

Mistura de Hibridização: 300-600ng/ml sonda, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 50% Formamida, 1mM EDTA, 1x Denhardts, 10% Dextran sulfato e 250ng/ml tRNA.

3.12.2. Pré-Hibridização

As lâminas, contendo os cortes histológicos em parafina (item 3.10.3), foram colocadas em várias etapas de banho: Xilol 100% por 5 minutos, Xilol 100% por 10 minutos, 1:1 Xilol/Etanol por 1 minuto e 5 minutos em Etanol Absoluto. As lâminas foram secadas ao ar livre e colocadas em caixa com papel umedecido. Foi adicionada uma solução de Proteinase K (1µg/ml em 0,05M Tris-HCl pH 7,5) sobre as lâminas, por 10 minutos e, em seguida, as lâminas foram colocadas em solução Tris-HCl 0,05M por 10 minutos.

3.12.3. Hibridização

As sondas foram pré-aquecidas por 5 a 10 minutos, a 80°C, e adicionou-se 200µl em cada lâmina, a qual permaneceu a 42°C durante a noite. Após a hibridização, foram feitas cinco lavagens: duas lavagens com SSC 2X (SSC 20X: 175,3 g/l NaCl e 88,2 g/l de citrato de sódio) por 30 minutos, a 56°C, duas lavagens com SSC 1X por 30 minutos, a 56°C e uma lavagem com NTE (0,1M NaCl, 0,01M Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA), acrescido de RNase (20µg/ml).

3.12.4. Imuno Detecção

Após a hibridização, as lâminas foram colocadas em solução DB1 (0,1M Tris-HCl pH 8,0 e 0,15M NaCl, ajustar o pH 7,5) por 5 minutos e, em seguida, foi

adicionado o agente bloqueador (2% BSA em SSC 4X), deixando-se a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram colocadas em solução DB1 por 1 minuto e aplicou-se 100µl do anti-DIG:AP, diluído 1:1000 em agente bloqueador, deixando-se a 37°C por 1 hora. Posteriormente, foram feitas duas lavagens com DB1, 30 segundos cada, e uma lavagem com DB3 (0,1M Tris-HCl pH 7,5, 0,1M NaCl e 0,05M MgCl₂, ajustar o pH 9,5) por 30 minutos. Aplicou-se uma solução NBT/BCIP (1-Step™ NBT/BCIP Plus Suppressor – 34070, Pierce), a qual permaneceu sobre as lâminas por 1 hora ou durante a noite, a 37°C. A reação foi paralisada em solução DB4 (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA, pH 8,0).

3.13. Sequenciamento de DNA

3.13.1. Crescimento de colônias de bactérias em meio líquido para preparação de DNA

As colônias de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o inserto a ser sequenciado, foram inoculadas e armazenadas em estoque (cultura líquida) em glicerol. Foram inoculados aproximadamente 2µl da cultura em 1ml de meio de cultura Circle Grow (BIO 101) líquido (40g/l), com ampicilina na concentração de 100µg/ml. O inóculo foi mantido por 22 horas, a 37°C em agitação (300 rpm).

3.13.2. Mini-Preparação de DNA em placas de 96 poços

Foi realizada a extração de DNA do gene *NtPAE1*, utilizando o protocolo desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Paulo Arruda (CBMEG/UNICAMP) e descrito abaixo.

A cultura foi centrifugada a 4.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R) por 6 minutos, obtendo um precipitado de células. Este precipitado foi ressuscitado em 240µl de solução GTE (23ml de glicose 20%, 10ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0, 13ml de Tris-HCl 1M, pH 7,4 q.s.p. 500ml de água destilada) e novamente centrifugadas a 4.000rpm por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 80µl de solução GTE e 5µl de RNase (10mg/ml). Em seguida, 60µl

da ressuspensão foram transferidos para um poço de uma placa receptora de 96 poços sendo adicionados 60µl de solução de lise (NaOH 4M e SDS 10%) e a placa receptora foi selada com um adesivo. Após inversão da placa por 10 vezes, a mesma foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos.

A placa foi, em seguida, centrifugada a 3.000rpm. Foram adicionados 60µl de acetato de potássio 3M gelado (147,2g de KOAc, 7,5ml de Ácido Acético Glacial q.s.p. 500ml de água destilada) e a placa selada foi invertida por algumas vezes. Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, a placa foi incubada a 90°C por 30 minutos e, em seguida, resfriada no gelo por 10 minutos. Após o resfriamento, a placa foi centrifugada a 4.000rpm por 4 minutos a 20°C, o sobrenadante foi transferido para placa de filtro Millipore-MAGV e centrifugado a 4.000rpm por 4 minutos a 20°C. Ao sobrenadante filtrado, foram adicionados 110µl de isopropanol e, em seguida, misturado por inversão. Após centrifugação a 4.000rpm por 45 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200µl de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada por 5 minutos a 4.000rpm a 20°C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e a amostra secada a temperatura ambiente por 60 minutos. O precipitado de DNA foi ressuspendido com 40µl de água milli-Q autoclavada.

3.13.3. Reação de sequenciamento de DNA (PCR)

As amostras foram preparadas com o kit de reação ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). Para cada amostra a ser sequenciada em microplaca de 96 poços, foram usados aproximadamente 500ng de DNA (1 a 2µl), 2µl de “primer” 5 pmoles/µl, 2µl de “Big Dye” (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes, enzima Taq DNA-Polimerase.), 2µl de tampão de diluição do “Big Dye” (200mM Tris-HCl pH 9,0 e 5mM de Cloreto de Magnésio) e água milli-Q estéril, para completar o volume final de 10µl. A microplaca foi então selada, levada ao vortex por 1 minuto e centrifugada rapidamente a 1.000rpm. O programa de PCR utilizado foi:

Desnaturação - 96°C por 2 minutos (passo inicial)

Desnaturação - 96°C por 45 segundos;

Pareamento - 50°C por 30 segundos;
Extensão - 60°C por 4 minutos.
Número total de ciclos: 35
Manutenção: 4°C por tempo indeterminado.

3.13.4. Purificação e precipitação da reação de sequenciamento

Nesta etapa, as amostras, obtidas na reação em cadeia da polimerase (PCR), são precipitadas e limpas dos dideoxinucleotídeos fluorescentes não incorporados durante a síntese de moléculas de DNA. Estes dideoxinucleotídeos livres interferem com a leitura das bases durante o sequenciamento.

O produto das reações de PCR foi precipitado com 80µl de isopropanol 75% e, após leve agitação no vortex, foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 4.000rpm por 45 minutos a 20°C (Centrífuga Eppendorf 5810R), o isopropanol foi removido completamente por centrifugação (spin até 1.000rpm), com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. Em seguida, o precipitado foi lavado com 200µl de etanol 70% e, a seguir, centrifugado a 3.000rpm por 10 minutos a 20°C. O etanol foi removido completamente por centrifugação (spin até 1.000rpm), com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora para secar.

Após a precipitação das reações de PCR, cada amostra foi ressuspensa em 10µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), a placa foi levada ao vortex por 1 minuto, centrifugada e colocada a 95°C por 5 minutos, para desnaturação das amostras. As placas foram colocadas no sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), que contém 16 capilares preenchidos por poliacrilamida (POP6.- Applied Biosystems) A corrida eletroforética nos capilares foi realizada em 15h para cada 96 amostras. O sequenciador reconhece as bases por meio de diferentes fluorescências, e as informações são transferidas automaticamente para um computador. A leitura das bases foi analisada pelo programa de computador, o ABI 3100 Data Collection.

“Primers” utilizados para obter a sequência completa do gene *NtPAE1*:

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

SP6: 5' ATTTAGGTGACACTATAG- 3'
DTV: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
PAE1: 5'-CCAATATCGTGCACTTACGG-3'
PAE2: 5'-TTCTTGGAACCCACTTCGGT-3'
PAE3: 5'-ACCTGAAATCTTGGAGAGTTTGGA-3'
PAE4: 5'-GGGTCATCGTATACTGGCGATA-3'

“Primers” utilizados na análise comparativa do gene *NtPAE1* em diferentes espécies do gênero *Nicotiana*:

PAE7: 5'-AATCCAGACTTCTACAACCTGGAACAG -3'
PAE8: 5'-CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATA -3'
M13R: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3'
T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

3.14. Consulta a banco de dados e comparação entre sequências nucleotídicas

Para identificar a similaridade das sequências clonadas neste trabalho com as sequências registradas nos bancos de genes, foi utilizado o programa BlastX (Altschul *et al.*, 1997), que pode ser encontrado no site <http://www.ncbi.nih.gov/Blast>. Este programa é capaz de traduzir a sequência de nucleotídeos que lhe é fornecida, nas 6 possíveis fases de leitura, em sequências de aminoácidos correspondentes, comparando com o banco de dados de proteína. Para se comparar a similaridade entre as bases nucleotídicas de duas sequências foi utilizado o programa Blast de duas sequências, que pode ser encontrado no site <http://www.ncbi.nih.gov/Blast>. Este programa faz o alinhamento de duas sequências nucleotídicas e encontra similaridades entre elas. Para comparar a similaridade e fazer o alinhamento entre bases nucleotídicas de três ou mais sequências foi utilizado o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), que pode ser encontrado no site <http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>.

Para verificar diferenças estatísticas entre as sequências, optou-se por uma análise probabilística através do programa Hyphy (Hypothesis Testing Using

Phylogenies) desenvolvido por Pond *et al.* (2005). A análise adotada foi a (standard relative rate pairwise) com o modelo HKY85.

3.15. Quantificação da concentração de ácidos nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada através do aparelho Genesis 5 (Spectronics®), onde uma amostra de DNA (ou RNA) diluída (1:100) em água é colocada em uma cubeta para que seja realizada a leitura da mesma em comprimento de onda de 260 nm e 280nm. No caso de DNA dupla-fita, uma DO (densidade óptica) igual a 1 corresponde a aproximadamente 50µg/ml (e 40µg/ml para RNA). A razão da DO_{260nm} / DO_{280nm} foi utilizada como um parâmetro da qualidade do ácido nucleico extraído.

3.16. Clonagem do produto de PCR no vetor TOPO TA Cloning (Invitrogen)

A partir da purificação dos produtos de PCR foi feita a ligação, adicionando-se 2µl da reação de PCR, 1µl do vetor PCR2.1, 1µl de enzima T4 ligase, 1µl de tampão da enzima T4 e o volume foi completado para 6µl com água estéril. A reação foi feita a 14°C durante a noite e, em seguida, usada para transformar *E. coli* eletrocompetentes. Adicionalmente, o vetor pCR®2.1–TOPO® (Figura 5) apresenta um mecanismo de detecção da inserção de fragmentos de DNA no plasmídeo, pela presença do sítio de clonagem no meio do gene lacZ. Assim, quando o fragmento de DNA é inserido no plasmídeo, o gene lacZ é inativado, o que providencia uma seleção pelas cores azul e branco das colônias (quando na presença de X-Gal e IPTG), caracterizando, respectivamente, ausência e presença do inserto.

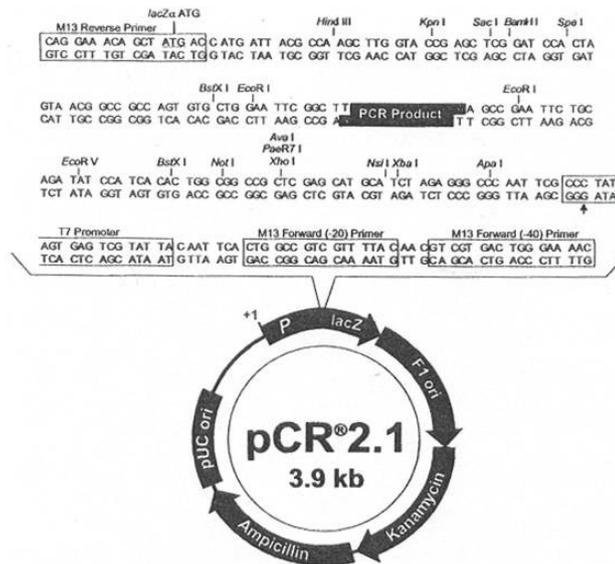


Figura 5: Estrutura do plasmídeo pCR[®]2.1–TOPO[®] do Kit TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen), evidenciando a região do sítio múltiplo de clonagem.

3.17. Sistema Gateway (Invitrogen)

3.17.1. Amplificação da sequência codificadora do gene *NtPAE1* para entrada no Sistema Gateway

Para introduzir o cDNA do clone 004A06, correspondente ao gene *NtPAE1*, no sistema Gateway, foram feitas duas reações de PCR. Na primeira amplificação, os "primers" utilizados para amplificar o cDNA do clone 004A06, continham, nas extremidades, uma parte das sequências correspondentes aos sítios attB1 e attB2. Logo em seguida, foi feita a segunda amplificação utilizando os "primers" específicos dos sítios de recombinação, attB1 e attB2, desse modo à construção pode ser inserida no sistema Gateway. As duas reações de PCR foram realizadas como descrito abaixo:

Primeira reação (PCR1): nesta reação, é inserida uma parte dos sítios de recombinação attB1 e attB2 no fragmento amplificado, a partir dos primers PAE-ATT1

e PAE-ATT2 (para superexpressão), PAE-ATT1 e PAE-ATT2NEW (para RNAi) e PAEBt-ATT1 e PAE-ATT2 (para expressar proteína). As sequências sublinhadas correspondem ao sítio de recombinação.

PAE-ATT1- 5'-AGCAGGCTTCACCATGGAGAAAGTGATGGATTG- 3'

PAE-ATT2- 5'-GAAAGCTGGGTCTACTGGCAAATTTGCCAC- 3'

PAE-ATT2NEW-5'-GAAAGCTGGGTCAGTGGTGTGCAAATATGTCTTGC- 3'

PAEBt-ATT1- 5'-GCA GGC TTC GAC CTC ATT GTT AAT ATA AC 3'

Montagem da primeira reação:

- 2µl de DNA molde (10ng/µl)
- 1µl de PAE-ATT1 (10pmoles/µl)
- 1µl de PAE-ATT2(10pmoles/µl) ou PAE-ATT2NEW (RNAi)
- 1µl dNTP (10mM)
- 0,7µl enzima TripleMaster (5U/µl - Eppendorf)
- 5µl Buffer high fidelity (10X)
- 39,3µl de água destilada autoclavada (para completar 50µl)

Nesta etapa foram realizadas três reações. Os “primers”, PAE-ATT1 e PAE-ATT2, foram desenhados para amplificar a região codificadora do gene *NtPAE1*, para posterior introdução no Sistema Gateway, sendo utilizado nos estudos de superexpressão do gene. Os “primers”, PAE-ATT1 e PAE-ATT2NEW, desenhados para amplificar a região codificadora de *NtPAE1*, serão utilizados nos estudos de bloqueio do gene (RNAi). Os “primers”, PAEBt-ATT1 e PAE-ATT2, desenhados para amplificar a região codificadora de *NtPAE1*, serão utilizados nos estudos de expressão de proteína.

Segunda reação (PCR2): nesta reação foram obtidos os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* completos, utilizando o produto da PCR1 como molde.

BP1- 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC- 3'

BP2- 5'-GACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC- 3'

Montagem da segunda reação:

- 5µl do produto da primeira reação mencionada acima
- 1µl de primer BP1 (10pmoles/µl)
- 1µl de primer BP2 (10pmoles/µl)
- 1µl dNTP (10mM)
- 0,7µl enzima TripleMaster (5U/µl - Eppendorf)
- 5µl Buffer high fidelity (10X)
- 36,3µl de água destilada autoclavada (para completar 50µl)

Condições das reações:

Desnaturação (94°C) 45 segundos

Pareamento (52°C) 45 segundos

Extensão (72°C) 45 segundos

Número de ciclos - 35 ciclos

Extensão após os ciclos (72°C) 5 minutos

3.17.2. Recombinação da região codificadora do gene *NtPAE1*, no vetor de entrada (pDONR 201)

Neste sistema, o gene de interesse é clonado em um vetor de entrada e, posteriormente, pode ser transferido para diferentes vetores de expressão. Assim, o gene *NtPAE1* foi clonado no vetor de entrada pDONR 201 (Figura 6) através da reação BP. Nesta reação utilizamos 2µl (~100ng) do produto de PCR 2, 1µl do vetor pDONR 201 (250 ng), 4µl do tampão BP (5X), 3µl da mistura da enzima BP clonase, num volume final de 20µl, completados com água milli-Q autoclavada. A reação foi incubada a 25°C durante a noite. Após esse tempo, foram adicionados 2µl de proteinase K (2µg/µl) e foi feita uma incubação a 37°C, durante 10 minutos, para que ocorresse a degradação de proteínas presentes na reação. Os plasmídeos resultantes, agora denominados pENTRY-PAESp (para super expressão), pENTRY-PAERi (para RNAi) e pENTRY-PAEBt (para expressão da proteína), foram utilizados

para uma nova reação de recombinação com os vetores de expressão (pK7WG2, pK7GWIWG2 e pDEST17).

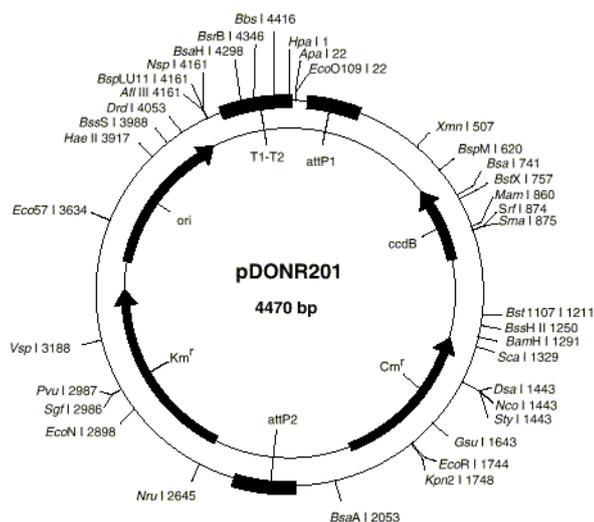


Figura 6: Mapa de restrição do vetor pDONR201 (Invitrogen), destinado a inserção de produtos de PCR por recombinação, na região entre os nucleotídeos 111 e 2352. Este vetor de 4470kb apresenta os genes que conferem resistência a canamicina (*Km^r*) e a cloramfenicol (*Cm^r*). O gene *ccdB* inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios *attP1* e *attP2* são reconhecidos por recombinases.

3.17.3. Transferência da região codificadora do gene *NtPAE1*, para os vetores de expressão em plantas (pK7WG2 e pK7GWIWG2)

Após verificar a inserção da região codificadora do gene *NtPAE1*, no vetor de entrada (pDONR 201), foi feita uma nova recombinação com os vetores de expressão em plantas (pK7WG2 e pK7GWIWG2).

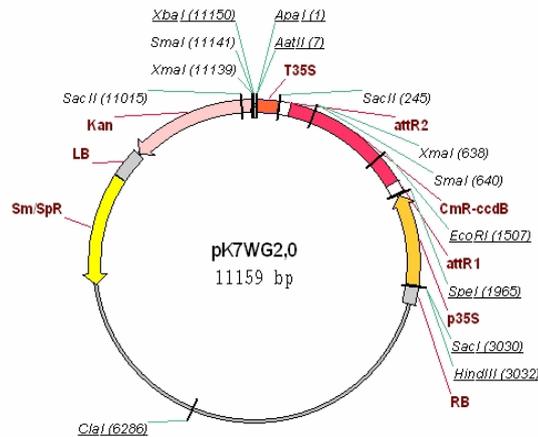


Figura 7: Mapa de restrição do vetor pK7WG2, destinado a inserção de produtos de PCR por recombinação, na região entre os sítios attR1 e attR2. Este vetor de 11.159kb apresenta os genes que conferem resistência a canamicina (KM^r) e a Estreptomicina/Espectinomicina (Sm/SpR). O gene ccdB inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios attR1 e attR2 são reconhecidos por recombinases.

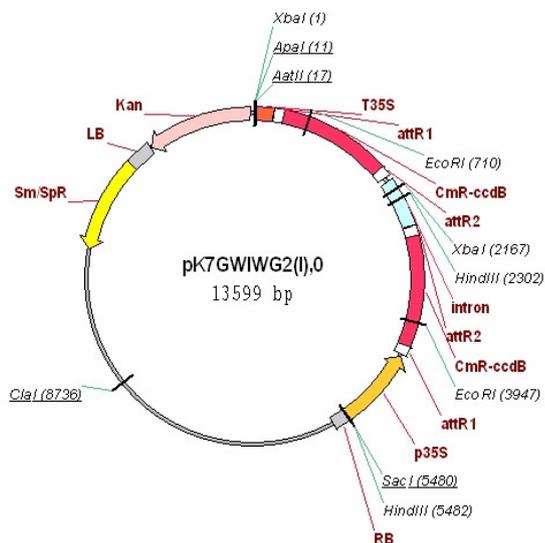


Figura 8: Mapa de restrição do vetor pK7GWIWG2, destinado a inserção de produtos de PCR por recombinação, na região entre os sítios attR1 e attR2. Este vetor de 13.599kb apresenta os genes que conferem resistência a canamicina (KM^r) e a

Streptomicina/Spectinomicina (Sm/SpR). O gene *ccdB* inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios *attR1* e *attR2* são reconhecidos por recombinases.

O vetor pK7WG2 apresenta cerca de aproximadamente 11kb de tamanho e foi utilizado na reação de recombinação LR (Invitrogen), juntamente com o vetor de entrada contendo a região codificadora do gene *NtPAE1* (pENTRY-PAESp). O vetor pK7GWIWG2(I) apresenta cerca de 13,5kb de tamanho e foi utilizado na reação de recombinação LR, juntamente com o vetor de entrada contendo a região codificadora do gene *NtPAE1* (pENTRY-PAERi).

Nas reações LR foram utilizados 1µl do pENTRY-PAE (pDONR 201 + *NtPAE1* – 300 ng), 1µl do vetor (pK7WG2 ou pK7GWIWG2 – 500 ng), 4µl de tampão de reação da enzima LR clonase (5X), 3µl da enzima LR clonase, num volume final de 20µl, completados com água milli-Q autoclavada. A reação foi incubada a 25°C durante a noite. Em seguida, foram adicionados 2µl de proteinase K (2µg/µl) e foi feita uma incubação a 37°C durante 10 minutos. As reações de transferência do fragmento *NtPAE1* inserido no vetor pDONR 201, para os vetores PK7WG2 e PK7GWIWG2, foram feitas em tubos separados, ou seja, foram feitas duas reações. O pENTRY-PAESp (pDONR 201 + *NtPAE1*) foi recombinado com o vetor PK7WG2 e o pENTRY-PAERi (pDONR 201 + *NtPAE1*) foi recombinado com o vetor PK7GWIWG2. O plasmídeo resultante dessa recombinação foi denominado de pEXP-PAESp (superexpressão) e pEXP-PAERi (RNAi).

3.17.4. Transferência da região codificadora do gene *NtPAE1* para o vetor de expressão de proteína (pDEST17)

Após verificar a inserção da região codificadora do gene *NtPAE1*, no vetor de entrada (pDONR 201), foi feita uma nova recombinação, reação LR (Gateway LR Clonase Enzyme Mix - Invitrogen), onde o plasmídeo pENTRY-PAEBt foi transferido para o vetor de expressão de proteína (pDEST17). Este vetor (Figura 9), possui o

promotor para a T7 RNA polimerase viral, uma fusão na extremidade N-terminal com uma “tag” de histidinas (6 resíduos), que é expressa na mesma fase de leitura da proteína de interesse, auxiliando em experimentos de purificação e detecção da proteína recombinante.

Na reação LR foi utilizado 1µl do pENTRY-PAEBt (pDONR 201 + NtPAE1 – 300 ng), 1µl do vetor (pDEST17 – 150ng), 4µl de tampão de reação da enzima LR clonase (5X), 3µl da enzima LR clonase, num volume final de 20µl, completados com água milli-Q autoclavada. A reação foi incubada a 25°C durante a noite. Em seguida, foram adicionados 2µl de proteinase K (2µg/µl), para que ocorresse a degradação das proteínas presentes na reação enzimática, deixando o DNA mais limpo e, colocou-se a reação em Banho-Maria a 37°C durante 10 minutos. O plasmídeo resultante dessa recombinação foi denominado de pEXP17-PAEBt. Após confirmação por digestão e sequenciamento, este vetor foi utilizado para transformação da linhagem BL21(DE3) Rosetta, de *E. coli*, própria para expressão de proteínas.

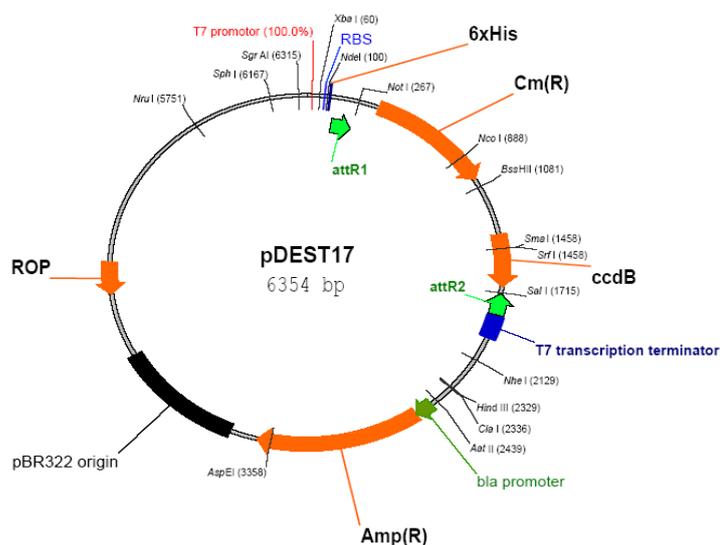


Figura 9: Mapa de restrição do plasmídeo pDEST17 (Invitrogen), destinado à formação do vetor de expressão de proteínas em fusão com uma “tag” de 6 histidinas, sob controle do

promotor T7. Este vetor possui 6354pb, e apresenta também os genes que conferem resistência à ampicilina (Ap) e ao cloranfenicol (Cm). O gene *ccdB* inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios attR1 e attR2 são reconhecidos por recombinases.

3.18. Obtenção de plantas transgênicas para análise do gene *NtPAE1*

3.18.1. Preparo de células competentes de *Agrobacterium*

Estriou-se, com uma alça de platina, uma suspensão bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens*, cepa C58C1RifR (pGV2260), em uma placa contendo meio MAS sólido (200ml Meio 5x A; 10ml Sacarose 20%; 2ml MgSO₄ 20%; 0,5ml Tiamina 10mg/ml; Ágar (Difco) 12g/l). Meio 5x A: 69g/l K₂HPO₄ 3H₂O; 22,5g/l KH₂PO₄; 5g/l (NH₄)₂SO₄; 2,5g/l Citrato de Sódio.

A colônia isolada foi inoculada em 3ml de meio LB líquido (2x), por dois dias a 28°C, com agitação. Em seguida, 1ml da cultura foi transferida para um novo meio LB líquido (100ml), e crescida por cerca de 12 horas a 28°C. Esta cultura foi, posteriormente, centrifugada a 5.000rpm por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso delicadamente em 15ml de Hepes/KOH 1mM. Após centrifugação a 4.000rpm a 4°C por 10 minutos, repetir a lavagem duas vezes. Posteriormente, as células foram ressuspendidas em 10ml de glicerol 10% e centrifugadas a 4.000rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi, então, ressuspenso em 400µl de glicerol 10%. Alíquotas de 40µl foram feitas em tubos 1,5ml e, em seguida, estocadas a -80°C.

3.18.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação

Foi adicionado 1µg de DNA plasmidial a 40µl do estoque de células competentes de *Agrobacterium*, misturou-se delicadamente e incubou-se no gelo por 2 minutos. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação, a qual foi mantida no gelo. Posicionou-se a cubeta no eletroporador e aplicou-se um pulso de 1,8 kV/2,5 µF. Adicionou-se, imediatamente após a eletroporação, 1ml de meio LB 2X

líquido e ressuspendeu-se delicadamente as células. Transferiu-se o conjunto para um tubo de ensaio, incubando-se durante 3 horas a 28°C, sob agitação de 100rpm. Plaqueou-se 100µl da suspensão bacteriana em meio MAS sólido, contendo os antibióticos seletivos (Streptomomicina - 300µg/ml e Spectinomomicina 90µg/ml) para bactérias transformantes. Incubou-se a 28 °C durante 2 dias.

3.18.3. Mini-preparação de DNA plasmidial para *Agrobacterium*

A mini-preparação de DNA de vetores de plantas foi feita da seguinte maneira: inicialmente, 3ml de cultura bacteriana feita em meio LB 2x, contendo o antibiótico adequado, foram centrifugados a 14000rpm (centrífuga Eppendorf 5415C). O precipitado de células foi ressuspendido em 100µl de Tampão I (NaCl 0,2M em 10ml de TE), em seguida, centrifugue a 14000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ressuspendido em 1ml de Tampão I. Esta etapa foi repetida uma ou 2 vezes. Após a lavagem foi colocado de 200µl do Tampão I e, em seguida, foi adicionado 200µl de solução I (NaOH 0,2N e SDS 1%), o tubo foi invertido e incubado no gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 150µl de Acetato de potássio 3M, o tubo foi invertido e incubado no gelo por 30 minutos. O sobrenadante, obtido após centrifugação a 14000rpm por 5 minutos (centrífuga Eppendorf 5415C), foi transferido para um novo tubo, e em seguida, adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio. A amostra foi centrifugada por 5 minutos e, a fase aquosa foi transferida para outro tubo, acrescentando 2 volumes de etanol absoluto. A amostra foi mantida a -20°C por pelo menos 1 hora, e um precipitado de DNA foi obtido após centrifugação a 14000rpm (centrífuga Eppendorf 5415C). Este precipitado foi então ressuspendido em 20µl de água destilada autoclavada.

3.18.4. Transformação de plantas de *Nicotiana tabacum* via *A. tumefaciens* e regeneração das plantas

3.18.4.1. Obtenção de plantas de *Nicotiana tabacum* em condições estéreis

Sementes de *N. tabacum* Petit Havana SR1, cedidas pelo Seita Institut du Tabac, foram tratadas com etanol 70% por um minuto e, em seguida, com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 15 % (Sigma) por 40 minutos, lavadas 5 vezes em água destilada autoclavada e, posteriormente, distribuídas em placas contendo meio MS sólido (4,4 g/l de MS; 30 g/l de Sacarose e 0,5 g/l de MES; 7g/l de ágar da Difco, ajustar o pH 5,8 com KOH) (Murashige e Skoog, 1962). As placas foram colocadas em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28 °C) até a germinação. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para caixas Magenta, com o mesmo meio de cultura, em condições estéreis.

3.18.4.2. Obtenção dos discos foliares

Para obtenção das plantas transgênicas foram utilizados fragmentos foliares extraídos de plantas com seis semanas de idade, crescidas em condições estéreis como descrito acima. Uma folha de cada vez foi cortada (Figura 10) com bisturi sobre um papel de filtro estéril, embebido em água.

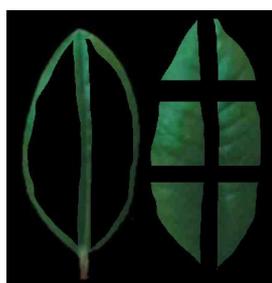


Figura 10: Todo o perímetro do segmento foliar foi ferido (no próprio processo de corte), para haver a liberação de moléculas-sinal que induzem a transferência do T-DNA, presente em *Agrobacterium*, para o genoma vegetal (Stachel *et al.*, 1985).

3.18.4.3. Infecção dos discos foliares

Pelo método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, os segmentos foliares cortados foram imediatamente transferidos para placas de Petri com a sua face abaxial em contato com o seguinte meio: 40ml de MS líquido (4,4 g/l de MS; 30 g/l de Sacarose e 0,5 g/l de MES, ajustar o pH 5,8 com KOH) (Murashige e Skoog, 1962) e, em seguida, foi adicionado 1,5ml de suspensão bacteriana (*Agrobacterium* contendo o plasmídeo pEXP-PAESp ou pEXP-PAERi).

As placas foram seladas com Parafilm®. Após incubação a 28 °C por dois dias, na ausência de luz, os discos foliares foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de indução de calos M300 (meio MS sólido contendo 200µg/ml de canamicina, 0,1µg/ml de NAA, 1µg/ml de 6-BAP e 250µg/ml de cefotaxima) em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28 °C).

3.18.4.4. Obtenção de brotos transgênicos

Os pequenos calos formados foram separados dos discos foliares e distribuídos individualmente sobre uma placa contendo o meio de indução de calos e deixados por aproximadamente 15 dias em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28 °C). Após esse período, foram transferidos para potes maiores contendo meio de indução da parte aérea (meio MS sólido contendo 200µg/ml de canamicina e 1µg/ml 6-BAP). Após a identificação dos brotos (maiores que 0,7 cm), que foram surgindo a partir dos calos resistentes, eles foram excisados na base, procurando excluir tecidos do calo. Individualmente, os brotos foram transferidos para potes Magenta contendo meio de enraizamento sólido (meio MS), acrescido de canamicina (200µg/ml). Os brotos foram mantidos nesse meio até o desenvolvimento completo das raízes.

3.18.4.5. Transferência para a terra

Após o desenvolvimento das raízes, as plantas (10 a 15 cm de altura) foram delicadamente retiradas dos potes Magenta, e o excesso de meio de cultura foi removido com água. As plantas foram então transplantadas para sacos plástico preto (de aproximadamente 25 cm de altura) contendo a mistura solo: vermiculita. A parte aérea da planta foi coberta com um saco de plástico transparente umedecido, para evitar ressecamento. Após uma semana em casa de vegetação, o saco plástico transparente foi retirado. A planta cresceu na casa de vegetação até atingir uma altura de 30cm, neste momento, então, a planta pode ser transferida para um vaso maior contendo solo adubado. Deste modo, a planta se desenvolve normalmente na casa de vegetação.

3.19. Detecção da presença do T-DNA nas plantas transgênicas

3.19.1. Mini-extração de DNA de folha de plantas transgênicas

De acordo com FuYu et al. (1993), a mini-extração de DNA foi feita para confirmar a presença do transgene, através da reação de PCR. A mini-extração foi feita da seguinte maneira: um pedaço da folha jovem da planta transgênica foi macerado em tubo de 1,5ml contendo tampão de extração (200mM Tris-HCl, pH7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA, pH 8,0 e 0,5% SDS). Em seguida, o extrato foi centrifugado por 1 minuto a 14.000rpm (centrífuga Eppendorf 5415C) e 300µl do sobrenadante foi transferido para um tubo 1,5ml novo. Em seguida, foram adicionados 300µl de isopropanol e a mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 14.000rpm (centrífuga Eppendorf 5415C) por 6 minutos, um precipitado de DNA foi obtido e, então, o mesmo foi ressuspensionado em 100µl de água destilada autoclavada.

3.19.2. Amplificação para detecção da presença do T-DNA nas plantas transgênicas

Utilizou-se a técnica de PCR para amplificar parte do T-DNA e confirmar a presença deste nas plantas transgênicas. Para as plantas transgênicas de

superexpressão, foram utilizados os “primers” P35S e PAE6. O primeiro pareia na extremidade 3’ do promotor 35S. O segundo pareia no cDNA da PAE. Tal conjunto permite a amplificação de uma região de aproximadamente 1316 pares de bases.

Para as plantas de RNAi, foram utilizados os “primers” T35S e Rt-PAE-R. O primeiro pareia na extremidade 5’ do terminador 35S e, o outro pareia no cDNA antisense da PAE, respectivamente, flanqueando uma região de aproximadamente 866 pares de bases. As reações foram realizadas no termociclador T3 thermocycler da Biometra®, nas seguintes condições:

Molde (DNA – 100ng)	1,0 µl
dNTPs (10mM cada)	1,2 µl
“Primer” P35S (10 pmoles/µl)	1,2 µl
“Primer” PAE6 (10 pmoles/µl)	1,2 µl
Enzima Taq Polimerase (Biotools)(5U/µl)	0,5 µl
Tampão para Taq Polimerase (10X)	5,0 µl
Água Milli-Q (para completar 50µl)	30,9 µl

Ciclos:

Desnaturação (94°C)	1 min
Pareamento (60°C)	45 seg
Extensão (72°C)	1 min
Número de ciclos	35
Extensão após os ciclos (72°C)	5 min

Sequências dos “primers” utilizados:

PROM35S: 5'-ATGACGCACAATCCCCTATCC-3'

TERM35S: 5'-GGGAATTAGGGTTCTTATAGGG-3'

PAE6: 5'- AACCAATCTCCAACAGCTTCAGC-3'

RT-PAE-R: 5'-GCAGATCCGTGCAAAGCAACAACT-3'

3.20. Análise do crescimento e desenvolvimento do tubo polínico

Pistilos de SR1 e PAERi 16.2 (RNAi), no estágio 11 do desenvolvimento floral (Koltunow *et al.*, 1990), foram polinizados com pólen de flores já abertas (estágio 12). Nestes experimentos, as sépalas, pétalas e anteras foram retiradas, restando apenas o pistilo, o qual foi manualmente, polinizado e protegido com um canudo. Foram feitas várias autopolinizações de SR1 e PAERi 16.2, e polinizações cruzadas, ou seja, o pólen de SR1 na planta transgênica e o pólen da planta transgênica em SR1. Os pistilos foram coletados 7 e 9 horas após a polinização e os estigmas/estiletos foram preparados sobre lâmina histológica para visualização. Sobre o material foram colocadas aproximadamente 5 gotas de azul de anilina 0,05% (Hawes e Satiat-Jeunemaitre, 2001). Este corante cora os “plugs” de calose presentes ao longo do tubo polínico. Estas lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência modelo Zeiss KS-300 Imaging System (equipamento cedido gentilmente pela Profa. Dra. Maria Célia Jamur).

3.21. Coloração com vermelho de rutênio

Os estigmas/estiletos das plantas transgênicas (PAESp e PAERi) e SR1 (estágio 11) foram coletados e fixados (item 3.11.2). Após os cortes do material embocado em parafina, as lâminas foram colocadas na estufa a 60°C por 20 a 30 minutos. As lâminas foram colocadas duas vezes em xilol 100% por 15 minutos cada e, em seguida, colocadas em etanol absoluto e xilol (1:1) por 10 minutos. Foram feitas várias lavagens de série de etanol do 100% a 10%, por 10 minutos cada.

As lâminas foram colocadas no corante vermelho de rutênio (0,02%, dissolvido em água) por 5 minutos. Após, as lâminas foram passadas rapidamente na água destilada e, em seguida, em série de etanol de 10% a 100% rapidamente. As lâminas foram colocadas em etanol e xilol (1:1) por 5 minutos e, depois, foram realizadas 2 lavagens de xilol 100% por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com resina sintética Permout e estocadas à temperatura ambiente.

3.22. Preparação do material para análises dos grãos de pólen por MEV

3.22.1. Fixação FAA (Johansen, 1940)

Formaldeído 37%	25 ml
Ácido acético glacial	25 ml
Etanol 50%	450 ml

As anteras fechadas (estágio 11 de SR1 e PAERi 16.2) foram fixadas na solução acima, para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos grãos de pólen. Aplicou-se 1 ou 2 vácuos de 15mmHg por 15 minutos e o material foi deixado por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi desidratado em séries de etanol (50% a 100%), duas vezes e por 2 horas cada.

O material desidratado em séries de etanol foi levado para a técnica Sra. Maria Dolores S Ferreira, responsável pelo laboratório de microscopia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), para que fosse feita a MEV. O material foi submetido ao ponto crítico em um aparelho Balzers CPD 030, montado em suporte metálico, colado sobre uma fita adesiva de Carbono e, então, o material foi coberto com Ouro em um metalizador Balzers SCD050. As observações foram efetuadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica na FMRP-USP, em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM- 5200, em 15kv, e as fotomicrografias foram obtidas em uma câmera fotográfica Jeol MP.

3.23. Método colorimétrico para quantificar pectina (Taylor, 1993)

Os estigmas e estiletos de plantas transgênicas foram macerados em 200µl de água estéril e, após centrifugação a 5.000rpm por 10 minutos, a 4°C, estes foram colocados em um tubo de ensaio (16x150mm). Em seguida, foram adicionados 3ml de Ácido Sulfúrico concentrado e, depois, adicionado 100µl de 0,1% w/v carbazole em etanol 100% (Sigma). As reações foram misturadas e incubadas por 1 hora, a 60°C. Após a incubação as reações foram resfriadas em a temperatura ambiente (banho-maria). A absorbância das amostras foi lida no espectrofotômetro 530nm contra um branco (água). Para a curva padrão 0 - 40ug de pectina foi usado.

3.24. Teste de segregação

Para estimar o número de cópias do T-DNA, presentes nas plantas transgênicas independentes obtidas, foi realizado o teste de segregação genético para verificar se as plantas apresentam algum padrão mendeliano de segregação de 1:1 e 3:1, para o gene escolhido. O teste foi baseado na resistência à canamicina, como a herança genética analisada.

Para tal, sementes geradas por auto-fecundação, das plantas transgênicas independentes, foram esterilizadas (item 3.18.4.1) e semeadas em meio MS contendo canamicina. As plantas, após cerca de 30 dias de desenvolvimento, foram separadas em dois diferentes grupos: todas as que apresentaram desenvolvimento normal e coloração verde (presença do gene de resistência a canamicina) e todas que apresentaram um aspecto esbranquiçado (pouco desenvolvidas) (refletindo ausência do gene de resistência a canamicina). O teste estatístico do qui-quadrado foi o empregado.

3.25. Expressão da proteína PAE

3.25.1. Linhagem de *E. coli* utilizada para a expressão da proteína PAE

A construção pEXP17-PAEBt obtida foi utilizada para a transformação da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*, próprias para a expressão de proteínas recombinantes. As particularidades desta cepa são mostradas na tabela 3.

Tabela 3: Algumas características da linhagem de expressão utilizada no trabalho.

Linhagem bacteriana	Antibiótico/ Concentração	Promotor	Indutor
BL21(DE3) Rosetta	Cloranfenicol (34mg/ml)	T7 viral	IPTG

3.25.2. Indução da expressão da proteína PAE em *E. coli*

Após a transformação da construção pEXP17-PAEBt, em células da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*, foi submetida à indução de expressão das proteínas recombinantes.

Da placa contendo células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos de expressão, uma colônia isolada foi recuperada, e um pré-inóculo foi preparado com 5ml de meio CircleGrow suplementado com os antibióticos adequados e nas concentrações apropriadas. Após crescimento “overnight” (16-20horas), a 37°C, sob agitação (200rpm), foi feita uma diluição na proporção de 1:100, adicionando-se 500µl do pré-inóculo em um erlenmeyer de 125ml, contendo 50ml de meio CircleGrow, mais os antibióticos apropriados. A seguir, essa nova cultura foi incubada a 37°C, sob agitação (200rpm) por 2 horas, ou até atingir uma D.O.600nm ~ 0,4 – 0,6. Ao se atingir tal densidade, foi retirada uma alíquota de 1ml, que foi utilizada como tempo zero (pré-indução), e adicionou-se 0,4mM de IPTG, para início de indução da expressão. A proteína recombinante foi induzida por 3hs, a 37°C e, por 20hs, a 20°C. Ao término das induções, as culturas foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos, a 5.000rpm, para a obtenção dos precipitados celulares. Ao final das centrifugações, o sobrenadante foi descartado, e as células precipitadas foram estocadas em freezer - 20°C, para posterior lise celular, e análise dos extratos protéicos em SDS-PAGE.

3.25.3. Lise bacteriana para liberação das proteínas, utilizando sonicador

Após a obtenção dos precipitados celulares resultantes das induções, foi realizada a lise bacteriana para a análise da proteína recombinante.

Os precipitados bacterianos foram ressuspensos em 2ml de Tampão de Lise (Tris-HCl 50mM pH 8,0, NaCl 150mM), acrescido do Inibidor de Proteases (Protease Inhibitor Cocktail for General Use - 1mM (Sigma)) e Lisozima (10mg/ml). Após estes precipitados foram incubados no gelo por 30 minutos e, então, deu-se início ao processo de sonicação, para a lise celular. As amostras foram sonicadas, empregando-se 8 a 10 pulsos de 30 segundos cada, a 60W de potência, com intervalos de 30 segundos, em um Vibracell TM (Sonic & Materials Inc, Dunbury, CT,

USA). Ao final, as suspensões celulares resultantes foram centrifugadas por 30 minutos, a 10.500rpm, a 4°C, em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). O sobrenadante foi transferido para um tubo novo, e o precipitado, ressuspenso em 2ml do mesmo Tampão de Lise. Após o preparo, os extratos protéicos foram quantificados de acordo com o método de Bradford (1976) e, em seguida, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.25.4. Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes, seguindo a técnica de Laemmli (1970). Em tais condições, o SDS (Sodium Dodecyl Sulfate – Dodecyl Sulfato de Sódio), que é um detergente iônico, desnatura as moléculas de proteínas da amostra, e liga-se fortemente a elas. Assim, as moléculas de SDS provocam uma distribuição relativamente uniforme de cargas negativas ao longo das moléculas de proteínas, devido à presença de grupamentos sulfato no SDS. Dessa forma, quando uma corrente elétrica é aplicada na cuba de eletroforese, todas as moléculas de proteínas irão migrar através do gel, do pólo negativo em direção ao pólo positivo, baseadas em seu tamanho. As corridas, com duração de 90 minutos a 100V, foram realizadas no Sistema “Mini-Protean” tetra cell (BioRad), em tampão de corrida Tris-Glicina 1X, diluído a partir de uma solução estoque Tris-Glicina 5X (15,125g Tris-base (125mM); 25ml SDS 10% (0,5%); 72g Glicina (960mM) e água destilada para completar o volume para 1000ml). Antes da corrida eletroforética, as amostras foram preparadas, adicionando-se aos extratos protéicos, tampão de amostra 4X (1,25ml Tris-HCl 1M, pH 6,8 (125mM); 4ml SDS10% (4%); 1ml glicerol (10%); 20mg azul de bromofenol (0,2%); 400µL β-mercaptoetanol (4%) e água destilada para completar o volume para 10ml). Após a aplicação do tampão de amostra, os extratos protéicos foram fervidos a 100°C, por 5 minutos e, em seguida, aplicados no gel. Ao final da corrida eletroforética, os géis foram corados por azul de Coomassie 0,2% (Metanol 50%; ácido acético 10%; completar volume com água destilada para 100ml; Coomassie Blue R-250 0,2g - 0,2% p/v). Marcadores de baixo peso molecular (LMW Calibration – Amersham) foram utilizados nas corridas, sendo estas proteínas fosforilase b (97

kDa), albumina (66 kDa), albumina de ovo de galinha (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.25.5. Análise por Western blot

A transferência das bandas de proteína obtidas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para a membrana de nitrocelulose (HybondTM-C extra, Nitrocellulose, 45 Micron – Amersham Life Science), foi realizada no sistema Mini-V 8.10 Blot Module (Life Technologies TM). Para tanto, imediatamente após a corrida eletroforética, o gel foi incubado por 15 minutos em um recipiente contendo o tampão de transferência gelado (Tris-HCl 25mM, pH 8,3; glicina 192mM e 20% de metanol), juntamente com todos os acessórios da transferência, incluindo a membrana, as esponjas e os papéis de filtro. A transferência foi realizada por 1 hora e 30 minutos, à 100V. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,5g de Ponceau, 2,5ml de ácido acético para 250ml de água), com o intuito de visualizar as bandas transferidas e avaliar a eficiência do procedimento. Após a visualização das bandas, a membrana foi lavada em água corrente para retirada do Ponceau e, então, colocada na solução de bloqueio, contendo leite em pó desnatado 5% em tampão TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 0,05%), por no mínimo 1 hora em geladeira. Após sair da solução de bloqueio, a membrana foi submetida a uma lavagem de 5 minutos, com tampão TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 0,05%). Posteriormente, 5ml da solução de bloqueio, contendo 2 μ l (1:2500) do anticorpo primário anti-histidina produzido em camundongo (Monoclonal anti-polyHistidine Clone His 1 – Sigma), foram adicionados sobre a membrana, e a placa foi então incubada por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação. Após esta incubação, foram efetuadas quatro lavagens de 5 minutos cada, com o tampão de lavagem (TBS) e, a seguir, a mesma foi incubada por 1 hora em 5ml da solução de bloqueio, contendo 1 μ l (1:5000) do anticorpo secundário, produzido em cabra, contra IgG de camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Após esta incubação, a membrana passou por quatro lavagens de 5 minutos cada, e foi submetida ao procedimento de revelação. Para tanto, em 10ml de tampão de revelação (1ml de Tris-HCl 1M, pH 9,5; 0,2ml de NaCl 5M; 0,05ml de MgCl₂ 1M e água para 10ml),

adicionou-se 44 μ l de NBT (75mg/ml, em solução de dimetilformamida 70% v/v) e 33 μ l de BCIP (50mg/ml, em solução de dimetilformamida 100% v/v) (Gibco-BRL) e, então, esta solução foi adicionada sobre a membrana. Após 10 a 15 minutos de incubação no escuro, sob agitação, a membrana foi revelada por reação cromogênica, e as bandas puderam ser visualizadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de expressão de *NtPAE1* nos diferentes estágios do desenvolvimento de estigmas/estiletos de *Nicotiana tabacum*

Em experimentos anteriores, o gene *NtPAE1*, que codifica uma pectina acetiltransferase (PAE), demonstrou ser bem mais expresso no estigma/estilete do que nos outros órgãos (raiz, caule, folha, sépala, pétala, estame e ovário), apresentando uma expressão que varia de 7x mais expresso do que no ovário, chegando até 29.000x mais expresso do que na sépala (Quiapim, 2005). Portanto, *NtPAE1* é um gene específico do pistilo, com expressão predominante no estigma/estilete.

Para analisar a expressão do gene *NtPAE1*, ao longo do desenvolvimento floral, foram desenhados dois “primers” senso e antisense, baseado na sequência do cDNA 004A06 (Tabela 2, Material e Métodos). Posteriormente, foi extraído RNA total de estigmas/estiletos de *N. tabacum*, nos 12 estágios desenvolvimentais descritos por Koltunow *et al.* (1990). Estas amostras de RNA foram convertidas a cDNA por tratamento enzimático e, em seguida, foi feito o experimento por RT-PCR em tempo real (Figura 11).

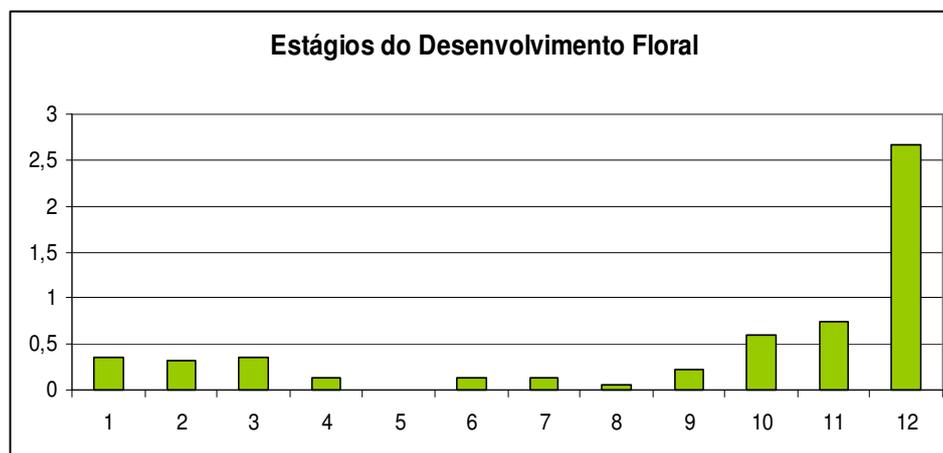


Figura 11: O gráfico representa a expressão do gene *NtPAE1* nos estigmas/estiletos em diferentes estágios do desenvolvimento floral de *N. tabacum*, em unidades arbitrárias (U.A.). A expressão de genes em unidades arbitrárias corresponde à razão do número de cópias do

cDNA do gene *NtPAE1* em relação ao número de cópias do gene constitutivo usado como controle (actina).

O gráfico acima mostra que a expressão do gene *NtPAE1* apresenta uma pequena expressão nos três primeiros estágios, decaindo um pouco no estágio 4 e praticamente nula no estágio 5. Nos estágios 6 e 7, a expressão aparece novamente decaindo um pouco no estágio 8 e, em seguida, um aumento nos demais estágios. O pico de expressão é atingido no estágio 12, quando ocorre a antese e a polinização. Este aumento pode ocorrer devido a uma indução da expressão no pistilo pela polinização. Outra possibilidade é que *NtPAE1* também se expresse em grãos de pólen maduros e/ou em tubos polínicos em crescimento, o que não foi testado neste trabalho. Existem diversos relatos da presença de pectinases específicas de pólen (Wakeley *et al.*, 1998; Bosch e Hepler, 2006; Francis *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2006), que têm um papel importante na polinização.

As investigações imunocitoquímicas, em pistilos não polinizados de *Petunia hybrida*, demonstraram altos níveis de pectinas desesterificadas (Lenartowska *et al.*, 2001; Bednarska *et al.*, 2005), o que reforça a importância da atividade de PMEs e PAEs na degradação de pectinas dos tecidos especializados do estigma/estilete. Desse modo, sugere-se que a expressão do gene *NtPAE1* no estágio 11, que antecede a antese, pode estar relacionada a um importante papel na dissociação das células da zona secretória do estigma e do tecido transmissor do estilete, facilitando a formação dos espaços intercelulares, que são preenchidos pelo exudato, onde ocorre o crescimento dos tubos polínicos.

4.2. Análise da expressão por hibridização “*in situ*” em estigmas/estiletos de *N. tabacum*

A análise por hibridização “*in situ*” tem sido usada para identificar mRNA em amostras de tecido em estudo, a qual possibilita observar a localização tecidual e a expressão temporal e espacial dos transcritos de um determinado gene. Esta análise compreende três etapas: a) hibridização, propriamente dita, onde há o

pareamento da sonda à sequência-alvo; b) imuno-histoquímica ou reação antígeno/anticorpo para detecção da sonda; c) revelação com o cromógeno desejado.

Para dar início a esta análise, foram feitas duas digestões com o DNA (15µg) referente ao cDNA 004A06, utilizando as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, afim de linearizar o plasmídeo. A partir do plasmídeo linearizado, foi feita a preparação das sondas senso e antisense, separadamente, como descrito a seguir. Para a sonda antisense, foi feita a digestão utilizando a enzima *EcoRI* e, para a sonda senso (controle), foi utilizada a enzima *BamHI*, que corta o extremo oposto do inserto a partir do promotor T7. Ambas as digestões foram checadas em gel de agarose (1%), para verificar se DNA plasmidial havia sido totalmente digerido (dados não mostrados). Após a linearização e limpeza do DNA, a sonda antisense foi obtida por reação de transcrição “*in vitro*” (DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7)-11175025910, Roche), a partir do promotor SP6 e a sonda senso (controle negativo) a partir do promotor T7. Na célula, o mRNA é senso, portanto sondas antisense devem ser utilizadas para detectá-lo. Assim, na etapa de transcrição deve-se obter sondas antisense, que pareiam com o mRNA em estudo, enquanto as sondas senso servirão como controle negativo. Desse modo, cortes longitudinais de estigmas/estiletos (estágio 11) de *N. tabacum* SR1 foram colocados em lâminas e hibridizados com as sondas e, em seguida, foram imuno-detectados adicionando o anticorpo anti-DIG AP (Roche).

A Figura 12 A e B mostra os cortes longitudinais de estigmas/estiletos (estágio 11) de SR1, para investigar a distribuição espacial do mRNA de *NtPAE1* nos tecidos do estigma/estilete. Após a hibridização com a sonda sense (A) e antisense (B), um forte sinal de hibridização foi observado com mRNA localizado nas células do tecido transmissor do estilete (Figura 12 B). Em contraste, nenhuma hibridização foi observada no controle (Figura 12 A). Estes resultados mostram que o RNAm de *NtPAE1* está localizado especificamente nas células do tecido transmissor do estilete de *N. tabacum*. Assim, é possível sugerir que o gene *NtPAE1* tenha um importante papel nos tecidos que são atravessados pelo tubo polínico em crescimento.

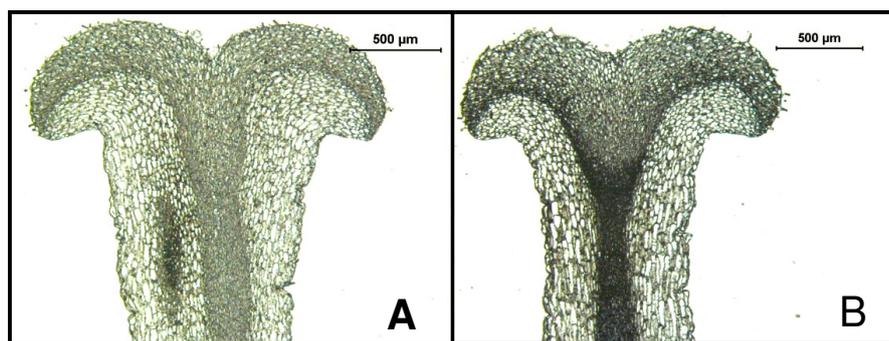


Figura 12: Expressão do gene *NtPAE1* em estigmas e estiletos de *N. tabacum* no estágio 11 (Koltunow *et al.*, 1990). **A:** “Background” do controle hibridizado com a sonda senso; **B:** Localização do mRNA de *NtPAE1* na zona secretória do estigma e no tecido transmissor do estilete. Hibridização “*in situ*” a partir de uma sonda antisenso (do gene *NtPAE1*) marcada com dioxigenina. A coloração mais forte representa regiões contendo híbridos RNA-RNA.

4.3. Análise de expressão de *NtPAE1* nos diferentes estágios do desenvolvimento do ovário de *Nicotiana tabacum*

A análise de expressão gênica, por RT-PCR em tempo real, nos diferentes órgãos de *N. tabacum*, demonstrou que o gene *NtPAE1* é especificamente expresso no pistilo e mostrou ser 7 vezes mais expresso no estigma/estilete do que no ovário (Quiapim, 2005). Devido a essa expressão do gene *NtPAE1* no ovário, foi feita a análise de expressão gênica ao longo do desenvolvimento do ovário, por RT-PCR em tempo real.

Para esta análise, foram coletadas amostras de ovário nos 12 estágios desenvolvimentais descritos por Koltunow *et al.* (1990), dos quais foram extraídos RNAs para a síntese de cDNA. O cDNA, sintetizado a partir do RNA extraído de cada amostra, foi analisado em uma PCR em tempo real, utilizando os “primers” RT-PAE-F e RT-PAE-R. A Figura 13 mostra o gráfico onde a expressão do gene *NtPAE1* apresenta uma pequena expressão nos três primeiros estágios do desenvolvimento, aumentando um pouco no estágio quatro. No estágio 5 a expressão aumenta ainda mais, permanecendo aproximadamente constante nos estágios 6, 7 e 8. O pico de

expressão é atingido no estágio 9, decaindo um pouco nos demais estágios em direção a antese.

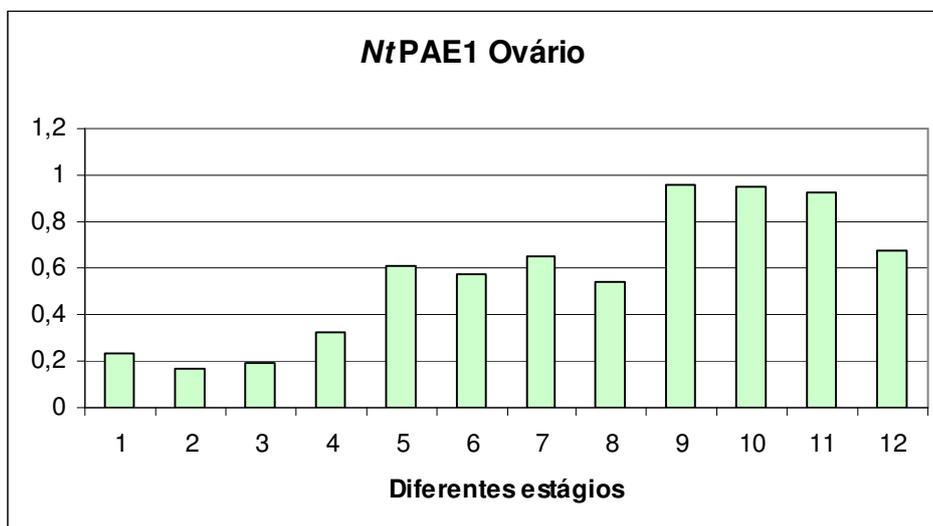


Figura 13: O gráfico representa a expressão do gene *NtPAE1* nos diferentes estágios do desenvolvimento do ovário de *N. tabacum* em unidades arbitrárias (U.A). A expressão de genes em unidades arbitrárias corresponde à razão do número de cópias do cDNA do gene *NtPAE1* em relação ao número de cópias do gene constitutivo usado como controle (β -aActina).

Desse modo, é possível sugerir que esta pectinase também tenha importância na dissociação entre as células presentes no ovário, permitindo a formação de espaços intercelulares e facilitando o crescimento do tubo polínico. Para um estudo mais detalhado sobre o papel de *NtPAE1* no ovário seria interessante realizar o experimento de hibridização “in situ” também neste órgão.

4.4. Sequenciamento completo do cDNA referente ao gene *NtPAE1*

Em análise de “macroarray” (Quiapim *et al.*, 2009) e RT-PCR em tempo real, o clone 004A06, que codifica uma pectina acetilesterase, apresentou expressão específica no pistilo de *N. tabacum* (Quiapim, 2005). Este cDNA, clonado no vetor pSPORT1, foi primeiramente sequenciado com os “primers” contidos no vetor, T7 e

SP6 e, posteriormente, sequenciado com o oligo dTV, que inicia o sequenciamento a partir da cauda poli-A do cDNA.

Durante o processo de sequenciamento, as sequências geradas foram analisadas no programa Phred/Phrap/Consed (Ewing *et al.*, 1998; Ewing e Green 1998; Gordon *et al.*, 1998). Este programa é capaz de analisar as sequências individuais, atribuindo notas a cada uma das bases e gerando uma sequência consenso a partir do alinhamento das sequências individuais. Após uma análise das sequências geradas com os “primers” mencionados acima, foi observada a formação de dois consensos referentes às duas extremidades do clone. Isto ocorreu devido ao tamanho longo (~1500 pb) do cDNA clonado. Para obter a sequência mais interna do cDNA, foram desenhados 2 “primers” PAE1 e PAE2, baseados na sequência dos dois consensos parciais formados (Figura 14). Após o sequenciamento com os “primers” PAE1 e PAE2, houve a formação de um único consenso, apresentando baixa qualidade na região 520 a 1040 pb. Desse modo, foi desenhado outro conjunto de “primers”, PAE3 e PAE4, para obter a sequência completa do cDNA, referente ao gene *NtPAE1* (Figura 15).

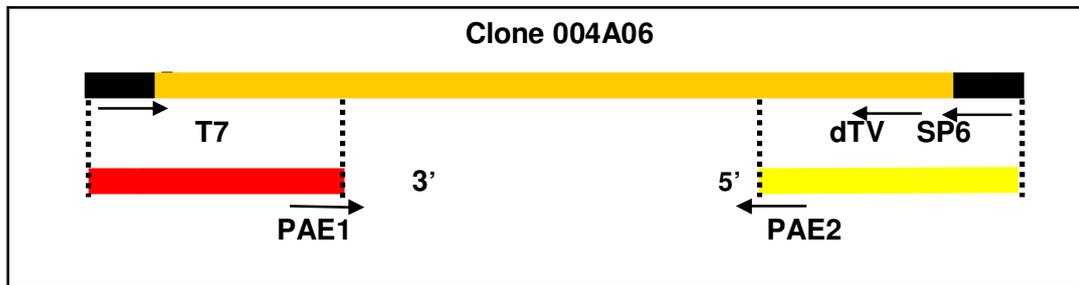


Figura 14: Esquema do sequenciamento do clone 004A06, inserido no plasmídeo pSPORT1. As extremidades em preto correspondem às sequências dos “primers” presentes no vetor (T7 e SP6). O bloco vermelho representa a formação do Consenso 1, após o sequenciamento com o “primer” T7, e o bloco amarelo representa a formação do Consenso 2, após o sequenciamento com os “primers” SP6 e dTV. Baseado nas sequências dos Consensos 1 e 2, foram desenhados os “primers” PAE1 e PAE2.

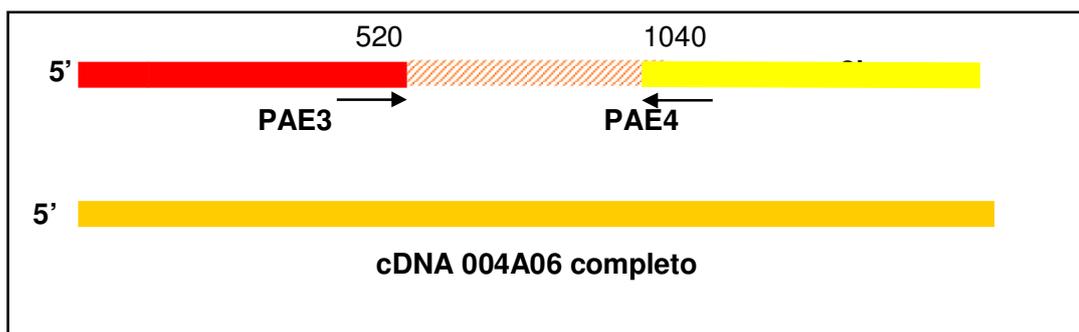


Figura 15: Esquema do cDNA 004A06 completo, cuja sequência foi obtida utilizando os “primers” PAE3 e PAE4 (bloco laranja). Os blocos vermelho e amarelo, que representam os consensos 1 e 2, após o sequenciamento com os “primers” PAE1 e PAE2, formaram um único consenso. Esse Consenso apresentou uma região interna de sequência com baixa qualidade. Desse modo, para obter a sequência completa do cDNA, foram desenhados os “primers” PAE3 e PAE4.

Após o sequenciamento completo do cDNA 004A06, foi feita uma análise da sequência pelo programa BlastX (Figura 16). Na Figura 16 pode ser observado que o cDNA possui 74% de similaridade com a pectina acetiltransferase (PAE) de *Litchi chinensis* e *Arabidopsis thaliana* (At4g19420), sendo que ambas atuam na

degradação de pectina presente na parede celular. A Figura 17 mostra a sequência completa de nucleotídeos, onde pode ser verificado que o cDNA possui um total de 1485 pb. Este codifica a metionina (ATG) inicial na posição 98, possui o códon de terminação (TAG) na posição 1274, uma região 5' UTR de 97 pb, uma região 3' UTR de 180 pb e uma cauda poli A de 29 pb. Este cDNA está completo e codifica uma proteína com 392 aminoácidos. A análise da sequência deduzida de aminoácidos indica a presença de um peptídeo sinal, com sítio de clivagem provável entre os aminoácidos 28 e 29 (Glicina e Aspartato). A presença deste peptídeo indica que a proteína é secretada para fora da célula, o que está de acordo com a atividade enzimática proposta de PAE. O gene correspondente a este clone de cDNA foi denominado de *NtPAE1* (*Nicotiana tabacum* Pectina Acetilesterase 1). A partir da sequência deduzida de aminoácido da PAE de *N. tabacum* (traduzida a partir do cDNA 004A06) foi feito um alinhamento com as proteínas homólogas da PAE de *Litchi chinensis* (EU717680.1.), de *Arabidopsis thaliana* (NM118062.6), de *Populus trichocarpa* (XM002328799.1), *Vitis vinifera* (XM002273884.1), *Zea mays* (EU969782.1) e *Solanum lycopersicum* (SGN-E745513) (Figura 18). Este alinhamento mostrou 36,5% (148/405) de identidade e 55,0% (223/405) de similaridade entre todas as espécies que codificam a PAE, considerando os domínios N-terminal e C-terminal conservados. A sequência deduzida de aminoácidos do gene *NtPAE1* apresentou 53,8% (218/405) de identidade e 72,1% (292/405) de similaridade com a sequência de *Litchi chinensis*, 53,6% (217/405) de identidade e 72,8% (295/405) de similaridade com a sequência de *Arabidopsis thaliana*, 52,6% de identidade e 72,1% (292/405) de similaridade com a sequência de *Vitis vinifera*, 51,8% (210/405) de identidade e 71,6% (290/405) de similaridade com a sequência de *Populus trichocarpa*, 52,6% (212/403) de identidade e 70,7% (285/403) de similaridade com a sequência de *Zea mays*, 44,1% (185/419) de identidade e 63,0% (264/419) de similaridade com a sequência de *Solanum lycopersicum*.

A.

Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
gb ACF05806.1 PAE [<i>Litchi chinensis</i>]	459	3e-127
ref NP_193677.2 pectinacetyltransferase family protein [Arabido...	448	8e-124
ref XP_002328835.1 predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>] >...	445	6e-123
gb EEF42515.1 pectin acetyltransferase, putative [<i>Ricinus commu...</i>	443	2e-122
ref XP_002273920.1 PREDICTED: hypothetical protein [<i>Vitis vi...</i>	441	9e-122
ref NP_001151183.1 carboxylic ester hydrolase [<i>Zea mays</i>] >gb...	439	3e-121
gb ACG39759.1 carboxylic ester hydrolase [<i>Zea mays</i>]	439	3e-121
gb ACJ85294.1 unknown [<i>Medicago truncatula</i>]	429	3e-118
ref NP_001047850.1 Os02g0702400 [<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cult...	429	3e-118
ref NP_974575.2 pectinacetyltransferase family protein [Arabido...	429	5e-118

B.

>[gb|ACF05806.1](#) PAE [*Litchi chinensis*]
Length=399

Score = 459 bits (1181), Expect = 3e-127
Identities = 216/367 (58%), Positives = 273/367 (74%), Gaps = 3/367 (0%)
Frame = +2

Query	173	TEGD LIVNITYLETAISKGAVCLDGSAPAFHFDPGTGSGIYSWLIHLQGGWCETISNCQ	352
Sbjct	22	TEG V ITY+E A++KGAVCLDGS PA+H D G G+GI +WL+H++GGWC ++ C	80
Query	353	YRALTDL-SSKNMQNISYFTGVLSSDPQLNPDFYNWNRVKVYCDGSSYTGDIIEVDPDT	529
Sbjct	81	SRKNTRLGSSKMKVVFVAFSGMLSNKQKFNPDFYNWNRKVRVYCDGASFTGDVEAVNPAT	140
Query	530	NLHFRGARIFEAIMYFLGQGMIIYAQNAILS GTSAGGLGAIHCDKFRFLPLTARVKCI	709
Sbjct	141	NLHFRGARVFLAIIEDLLAKGMKNAKNAVLGSGSAGGLTSLHCDKFTLLPTSTKVKCF	200
Query	710	SDAGFFVDLETISGEPLIEEMYKRVALHGS AKNLPLSCTALSSDPNLCCFFPQYVARHIC	889
Sbjct	201	ADAGYFINTKDVSGAQHIEAFYNEVVATHGS AKNL PASCTS-RLKPGLCFFPQYMARQIQ	259
Query	890	TPLFIVNSAYDSWQINNSLVPRVADPDEWYCKKDINVCSPSQIQTLDQFRLTFLEALN	1069
Sbjct	260	TPLFI+N+AYDSWQI N L P VADP W CK DIN CSP+Q+QT+Q FRL FL+AL+	319
Query	1070	ELGPSTSRGYFISSCHSHHGIEIQNYWSSKNSPTLDNKTI AEAVGDWFFDRSGFQEVYCP	1249
Sbjct	320	GLGNSTSKGLFIDSCYAHCQTEMQETWLRDDSPVLGKTTIAKAVGDWYYDRSPFQKIDCP	379
Query	1250	YPCGKFC 1270	
Sbjct	380	YPC C 386	

Figura 16: Resultado da análise da sequência de nucleotídeos do cDNA 004A06, quando comparada com o banco de dados, obtido através do programa BlastX (Altschul *et al.*, 1997).

A: Mostra as 10 sequências, presentes nos bancos de dados do NCBI, mais similares ao clone pesquisado. Observe a similaridade com genes que codificam PAEs. **B:** Alinhamento entre a sequência deduzida de aminoácidos do clone 004A06 e a sequência de aminoácidos da proteína PAE de *Litchi chinensis*.

1 ctttacagcttttcaaactcttggttcaacttcttctgctatagaaagagagaaagacaaat 61
62 agcccttaacttattttattgcttctggctggttaga**atg**gagaaagtgatggattgtaac 121
M E K V M D C N ↓
122 tcaattctcatggctgcagtgcttttttctctactgtgtctttggacaacaactgaagga 181
S I L M A A V L F S L L C L W T T T E G
182 gacctcattgtaataataacctacctcgagactgccatatctaagggtgcagtatgcttg 241
D L I V N I T Y L E T A I S K G A V C L
242 gatggaagtgtccagctttccactttgatcctggaactgggttcaggaatttatagctgg 301
D G S A P A F H F D P G T G S G I Y S W
302 cttattcaccttcagggtggaggatgggtgtgaaaccatttctaactgccaatatcgtgca 361
L I H L Q G G G W C E T I S N C Q Y R A
362 cttacggacttatcttcaaaaaatatgcaaaatatatcttattttactggagttttaagt 421
L T D L S S K N M Q N I S Y F T G V L S
422 agcgatcctcaacttaatccagacttctacaactggaacagagtcaaggttaagtattgt 481
S D P Q L N P D F Y N W N R V K V K Y C
482 gatgggtcatgatactggcgatattgagaagttgatcccgataactaacctcacttt 541
D G S S Y T G D I E E V D P D T N L H F
542 agaggagcaagaatttttgaagctatcatggagatatttttttaggtcaagggtatgattat 601
R G A R I F E A I M E Y F L G Q G M I Y
602 gctcaaaatgccatcctcagtggaacttcagcaggagggttgggtgcaatcatacattgt 661
A Q N A I L S G T S A G G L G A I I H C
662 gataagttcagactgtttctcccattaactgctagagtgaaatgcatctcggatgctgg 721
D K F R L F L P L T A R V K C I S D A G
722 ttctttgtcgaacttagaacaatatctggcgaaccacttattgaggaaatgtataaaaga 781
F F V D L E T I S G E P L I E E M Y K R
782 gttggtgctttgcacggatctgccaagaacctaccactctcttgcaactgccttgagctca 841
V V A L H G S A K N L P L S C T A L S S
842 gacccaaatttgcttcttccctcagtagtagcaagacatatttgcacaccacttttc 901
D P N L C F F P Q Y V A R H I C T P L F
902 atcgtcaactcggcctatgattccttggcagataaacaacagtttgggtcctcagattgct 961
I V N S A Y D S W Q I N N S L V P R V A
962 gatcctgacgatgagtgacgtattgcaagaaagatataaatgtatgctcaccaagtacag 1021
D P D D E W T Y C K K D I N V C S P S Q
1022 atccaaactctccaagatttcaggttgacatttttggaggcattgaacgaactaggacca 1081
I Q T L Q D F R L T F L E A L N E L G P
1082 agtacatcaagaggatatttcatttccctcttgcattcccaccacggcattgaaatacaa 1141
S T S R G Y F I S S C H S H H G I E I Q
1142 aattattggtcctccaaaaactctccaacttttagataacaagacgatcgctgaagctgtt 1201
N Y W S S K N S P T L D N K T I A E A V
1202 ggagattggtttttcgaccgaagtgggttccaagaagtttattgccccttatccctgtggc 1261
G D W F F D R S G F Q E V Y C P Y P C G
1262 aaattttgccaag**tag**agtttctcattttgtactactatttaagattatTTTTTTTTTatta 1321
K F C Q *
1322 ttatgtttttttacaagtggagtatctagcaatgcaagaagtttagtttagctctagtatct 1381
1382 tagatatttgttatccaactactcatgtaattgcttaacattggttcgtcaaacttgatt 1441
1442 tcgttttcacgtttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaaaaaaaa 1485

Figura 17: Sequência completa de nucleotídeos do cDNA 004A06, referente ao gene *NitPAE1*, presente no plasmídeo pSPORT1, e a sequência deduzida de aminoácidos. As bases, em negrito e grifado, correspondem ao códon do início de tradução e ao códon de


```

Solanum lycopersicum      SGTTIAKAVGDWYYERKRFQELDCPYPCNKTCKNRNFE----- 392
Litchi chinensis         GKTTIAKAVGDWYYDRSPFQKIDCPYPCNPTCHNRVFDPDDPHPGV 399
Vitis vinifera           GKTTIAKAVGDWYYDRSPFQKIDCAYPCDSTCHNRVFDPHHPEL 399
A.thaliana               NRTTIAKAVGDWYYDRLFQKIDCPYPCNPTCHHRVFTPLDAPPI 397
Populus trichocarpa     GKKKIAKAVGDWFYDRNPFQKIDCPYPCNPSCQNSLAPPDNPEV 399
Zea mays                 GNTTVANAVGDWFFDRSSFQKIDCPYPCDSTCHNRIYDDSSQA-- 398
N.tabacum                DNKTIAEAVGDWFFDRSGFQEYCPYPCGKFCQ----- 392
. . .:***** :*: **:: *.***. *:

```

Figura 18: Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácido de *N. tabacum* (*NtPAE1*), *Arabidopsis thaliana* (NM_1180626.6), *Litchi chinensis* (gb|EU7176801), *Vitis vinifera* (XM 002273884.1), *Populus trichocarpa*(XM 0023287991), *Zea mays* (EU969782.1), *Medicago truncatula* (BT052629.1), *Oryza sativa*(AK068668.1), *Vigna radiata*(X99348.1) e *Solanum lycopersicum* (AK324127.1), obtido pelo programa ClustalW. O asterisco indica que os resíduos presentes naquela coluna são idênticos em todas as proteínas usadas no alinhamento; os dois pontos indicam que uma substituição conservada é observada; o ponto indica que uma substituição semi conservada é observada. Aminoácidos idênticos estão grifados em cinza e os aminoácidos similares em cinza escuro. “Gaps” foram introduzidos para aumentar a similaridade entre as sequências e são mostrados por traços.

4.5. Construção para superexpressão do gene *NtPAE1*

Para todas as construções (superexpressão e RNAi) foi utilizado o sistema Gateway de recombinação. O sistema Gateway é um sistema relativamente simples e prático, onde o fragmento de DNA de interesse é transferido entre os vetores compatíveis com o sistema, através de recombinação sítio-específica, empregando-se uma mistura de recombinases (Landy, 1989). Assim, para que ocorresse a introdução da região codificadora do gene *NtPAE1* nesse sistema, foi necessária a incorporação de sequências dos sítios de recombinação nas extremidades da região codificadora, permitindo o reconhecimento na reação de recombinação. Desse modo, foram desenhados “primers”, destinados a amplificação do cDNA 004A06 por reação de PCR, originando os fragmentos de DNA adequados, ou seja, com o sítio de recombinação completo para serem introduzidos no sistema Gateway.

4.5.1. Amplificação da região codificadora do gene *NtPAE1*

Para analisar a superexpressão do gene *NtPAE1* em plantas transgênicas de *N. tabacum*, foram desenhados os “primers” PAE-ATT1 e PAE-ATT2. Cada “primer” é constituído por sequências idênticas às extremidades da região codificadora do cDNA 004A06 e, completados com sequências referentes ao sítio de recombinação (attB1 e attB2), permitindo a geração de um fragmento contendo o cDNA 004A06, nas condições adequadas para entrada no sistema.

Inicialmente, o clone de cDNA 004A06, flanqueado com as sequências de recombinação attB1 e attB2, foi obtido por meio da reação de PCR, utilizando os “primers” PAE-ATT1 e PAE-ATT2, a partir do molde de DNA, referente ao clone de cDNA 004A06. Esperava-se que tal reação de amplificação produzisse fragmentos de 1204 pb (raia 1), o que pode ser observado em gel de agarose 1% (Figura 19). Este fragmento, purificado do gel, foi submetido a uma segunda reação de PCR, utilizando os “primers” BP-1 e BP-2 específicos dos sítios attB, permitindo que a construção estivesse pronta para ser inserida no sistema Gateway. Com base na sequência dos “primers” BP-1 e BP-2 e do fragmento anterior, de 1204 pb, espera-se que esta segunda reação de amplificação produzisse fragmentos de 1241 pb (raia 2), o que pode ser observado em gel de agarose 1% (Figura 19).

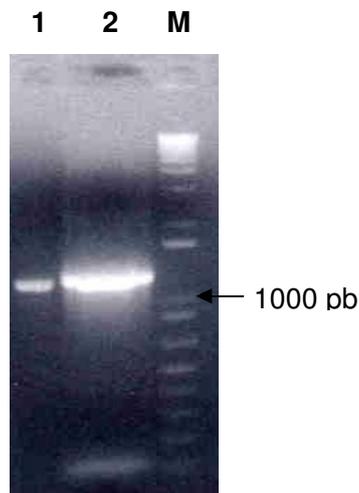


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando as amplificações do cDNA 004A06, referente ao gene *NtPAE1*, resultantes das duas reações de PCR, necessárias para a construção de superexpressão do gene. Raia 1: produto da primeira reação de PCR, utilizando os “primers” PAE-ATT1 e PAE-ATT2. Raia 2: produto da segunda reação de PCR, utilizando os “primers” BP-1 e BP-2. M: marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.5.2. Construção do vetor de plantas para superexpressão

O fragmento de 1241 pb, da segunda reação de PCR, foi purificado do gel e inserido em vetor de entrada (pDONR201) por recombinação, via reação BP. O produto desta recombinação foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* cepa DH10B, que resultou em colônias transformantes. Destas, 10 colônias isoladas foram escolhidas, ao acaso, e o DNA foi extraído pelo método de mini-preparação de DNA plasmidial. A confirmação da presença do inserto no vetor pDONR201 foi realizada com digestão enzimática, utilizando a enzima *Pst*I. Esta enzima digere o plasmídeo recombinado em duas regiões, uma na região do cDNA e outra na região do vetor, liberando um fragmento esperado de 1251 pb (Figura 20). Na Figura 21 pode-se observar as mini-preparações de DNA, digeridas com a enzima *Pst*I, todas confirmando a presença do inserto esperado de

aproximadamente 1251 pb. A raia 11 mostra o vetor pDONR201 sem o cDNA de interesse, apresentando fragmentos de aproximadamente 2641 pb e 1829 pb, que serve como controle negativo. Como o resultado da análise das digestões mostrou que todos os clones testados contêm o cDNA inserido no vetor de entrada (pDONR201), foi utilizado apenas o clone 1 para continuar os experimentos. Assim, este plasmídeo passou a ser chamado de pENTRY-PAESp e foi utilizado para recombinação com o vetor pK7WG2.

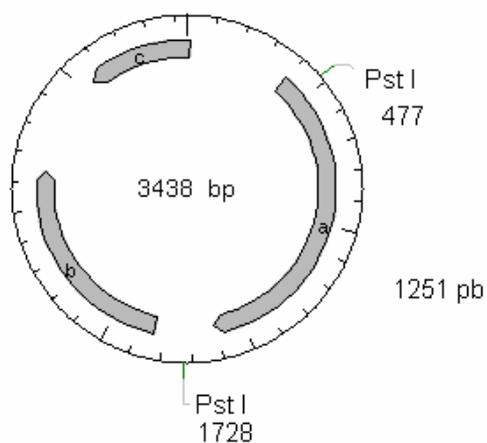


Figura 20: Estrutura esperada para o plasmídeo de interesse, resultante da recombinação BP.

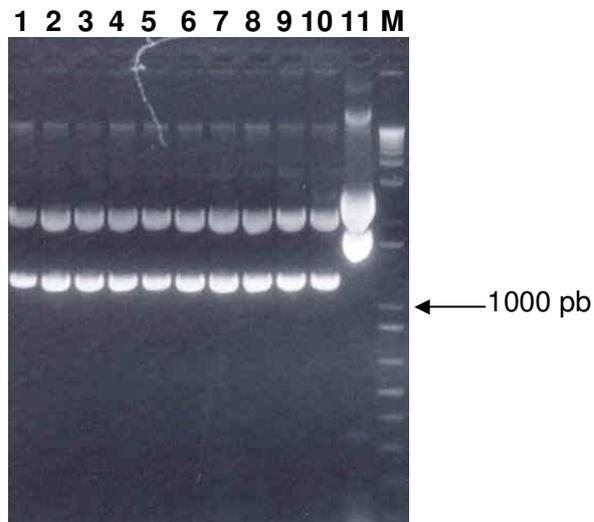


Figura 21: Mini-preparações de DNA das colônias originadas da reação BP, para a obtenção do vetor pENTRY-PAESp, referente a análise de superexpressão do gene. Tais amostras foram digeridas com a enzima *Pst*I e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, gerando fragmentos de aproximadamente 1251 pb e 2187 pb. Raia 11: plasmídeo do pDONR201 sem inserto, também digerido com a enzima *Pst*I, gerando dois fragmentos (1829 pb e 2641 pb). M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

O vetor pK7WG2 é destinado a superexpressão de sequências de DNA. Em tal vetor se encontra disposto o local de recombinação entre o promotor e o terminador do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S). Esse promotor constitutivo garante uma elevada taxa de transcrição, apresentando uma alta expressão na maioria das células das plantas transgênicas, o que resultaria em altos níveis de formação da proteína codificada pelo gene *NtPAE1*. O vetor pK7WG2 apresenta cerca de aproximadamente 12 kb de tamanho e possui os sítios attR1 e attR2, que permitem um evento de recombinação.

O vetor pENTRY-PAESp e pK7WG2 foram obtidos por midi-preparação de DNA plasmidial, e os DNAs, resultantes de cada vetor, foram utilizados em uma reação de recombinação LR. O produto desta recombinação foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* cepa DH10B, que resultou em colônias transformantes. Destas, 10 colônias isoladas foram escolhidas, ao acaso, e o

DNA foi extraído pelo método de mini-preparação de DNA plasmidial. Com a finalidade de verificar se a recombinação entre os vetores foi bem sucedida, realizou-se a digestão com a enzima de restrição *SacI*. Esta enzima corta em duas regiões do plasmídeo pK7WG2 recombinado com o plasmídeo pENTRY-PAESp, uma na região do cDNA e a outra na sequência localizada antes do promotor (Figura 22). Na Figura 23 pode-se visualizar as mini-preparações de DNA, digeridas com a enzima *SacI*, sendo confirmada a presença do inserto esperado de aproximadamente 1840 pb somente na amostra 6. Isto pode ter ocorrido devido a pouca quantidade de DNA extraído do plasmídeo. Este plasmídeo foi chamado de pEXP-PAESp.

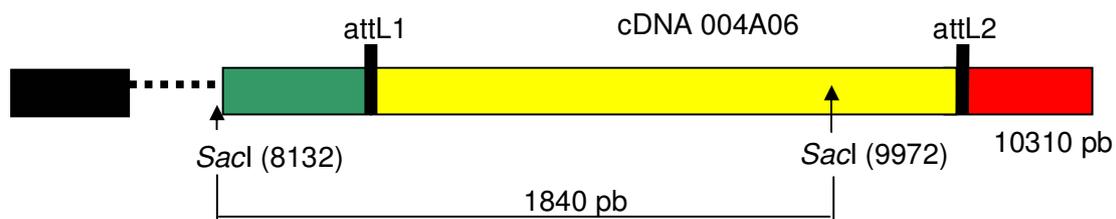


Figura 22: Esquema representativo do plasmídeo pEXP-PAESp, que mostra os sítios de recombinação nas extremidades do cDNA. A extremidade em verde representa o Promotor e em vermelho o Terminador. A enzima *SacI* corta em duas regiões, uma região localizada antes do promotor e a outra região localizada no cDNA 004A06, gerando um fragmento de 1840 pb.

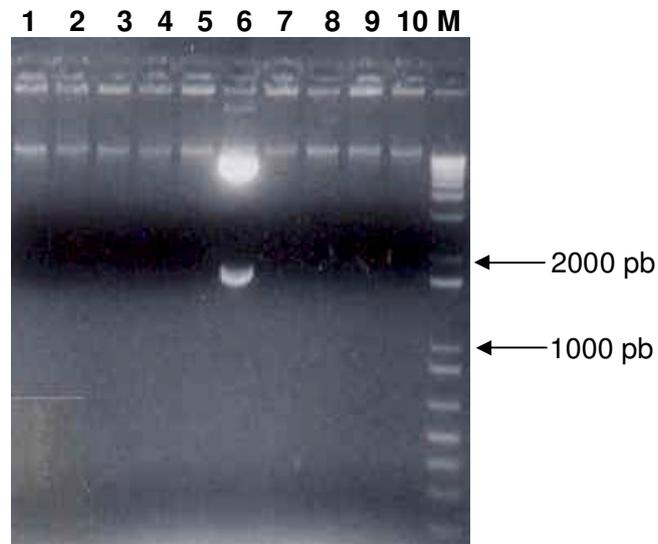


Figura 23: Mini-preparações de DNA das colônias originadas da reação LR (pEXP-PAESp), para análise de superexpressão do gene. Tais amostras foram digeridas com a enzima *SacI* e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Apenas uma das amostras apresentou o inserto esperado de aproximadamente 1840 pb M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.5.3. Sequenciamento do plasmídeo pEXP-PAESp

Antes de dar prosseguimento nos experimentos com o plasmídeo pEXP-PAESp, este foi seqüenciado com os “primers” P35S e T35S, que pareiam em locais específicos dos vetores de expressão, a fim de verificar se a seqüência do cDNA 004A06 havia sido corretamente introduzida no vetor de expressão (pK7WG2). Para isso, foi feita a extração de DNA do clone 6 (LR) adequada para sequenciamento.

A Figura 24 mostra uma parte inicial da seqüência de pEXP-PAESp, após o sequenciamento com o “primer” P35S, destacando a seqüência de uma parte do promotor e do sítio de recombinação attB1. A Figura 25 mostra uma parte da seqüência final de pEXP-PAESp, após o sequenciamento com o “primer” T35S, destacando a seqüência de uma parte do terminador e do sítio de recombinação attB2. Os resultados indicam a presença do cDNA 004A06 e os sítios de

recombinação (attB1 e attB2) nas posições corretas e sem presença de mutações. Este vetor pEXP-PAESp foi, então, utilizado na transformação de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* para os experimentos de transformação de plantas.

```

. . . . . CAAACAACAAACAACATTACAATTTACTATTCTAGTCGACCTGCAGGCGGCCGCA
CTAGTGATATCACAAAGTTTGTACAAAAAAGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCatggagaaa
                                         M E K
gtgatggattgtaactcaattctcatggctgcagtgcttttttctctactgtgtccttgg
V M D C N S I L M A A V L F S L L C L W
acaacaactgaaggagacctcatt. . . . .
T T T E G D L I. . . . .

```

Figura 24: Parte da sequência de nucleotídeos do cDNA 004A06, obtida pelo sequenciamento com o “primer” P35S, e a sequência deduzida de aminoácidos. A região em negrito é uma parte da sequência do promotor 35S e a região sublinhada corresponde à sequência do sítio de recombinação attB1. Após o sítio, encontra-se inserida corretamente a sequência do cDNA 004A06, iniciando com o códon de tradução (ATG).

```

. . . . . caagatttcaggttgacatTTTTGGAGGCATTGAACGAAGTACATCAAGA
Q D F R L T F L E A L N E L G P S T S R
ggatatttcatttccctctgtcattcccaccacggcattgaaatacaaaaattattgggcc
G Y F I S S C H S H H G I E I Q N Y W S
tccaaaaactctccaactttagataacaagacgatcgctgaagctggttgagattggttt
S K N S P T L D N K T I A E A V G D W F
ttcgaccgaagtgggttccaagaagtttattgccccttatccctgtggcaaattttgccag
F D R S G F Q E V Y C P Y P C G K F C Q
tagGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGATATCCCGCGGCCATGCTAGAGTCC
-
GCAAAAATCACCGT . . .

```

Figura 25: Parte da sequência de nucleotídeos do cDNA 004A06, obtida pelo sequenciamento com o “primer” T35S, e a sequência deduzida de aminoácidos. A região em negrito é uma parte da sequência do terminador 35S e a região sublinhada corresponde à sequência do sítio de recombinação attB2. Após o sítio, encontra-se inserida corretamente a sequência do cDNA 004A06.

4.6. Construção para bloqueio da expressão do gene *NtPAE1*

Com o objetivo de tentar bloquear a expressão do gene *NtPAE1*, por RNA de interferência, em plantas transgênicas de *N. tabacum*, foi amplificado parte do cDNA 004A06, a fim de introduzi-lo no sistema Gateway. Para que houvesse maior eficiência no bloqueio da expressão (Wesley *et al.*, 2001) do gene *NtPAE1*, foi escolhida uma região com apenas 800pb que começa a partir do códon de início de tradução (ATG), referente ao cDNA 004A06. Com esta finalidade, foram desenhados os “primers” PAE-ATT1 e PAE-ATT2new que incorporam os sítios de recombinação nas extremidades da região escolhida para ser usada no silenciamento.

4.6.1. Amplificação de parte da região codificadora do gene *NtPAE1*

Inicialmente, parte do clone de cDNA 004A06, flanqueado com as sequências de recombinação attB1 e attB2, foi obtido por meio da reação de PCR, utilizando os “primers” PAE-ATT1 e PAE-ATT2new, a partir do molde de DNA referente ao clone de cDNA 004A06. Esperava-se que tal reação de amplificação produzisse um fragmento de 825 pb, o que pode ser observado em gel de agarose 1% (Figura 26). Este fragmento, purificado do gel, foi submetido a uma segunda reação de PCR, empregando-se agora os “primers” BP-1 e BP-2 específicos dos sítios attB, permitindo que a construção estivesse pronta para ser inserida no sistema Gateway. Com base na sequência dos “primers” BP-1 e BP-2 e do fragmento anterior, de 825 pb, espera-se que esta segunda reação de amplificação produzisse fragmentos de 862 pb, o que pode ser observado em gel de agarose 1% (Figura 26).

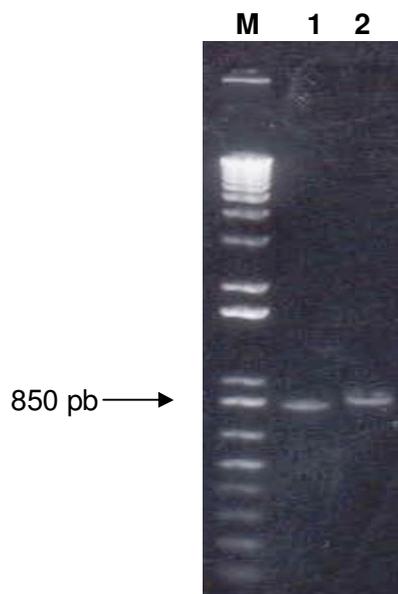


Figura 26: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando as amplificações de parte do cDNA referente ao gene *NtPAE1*, resultantes das duas reações de PCR, para a construção de RNAi. M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Raia 1: primeira reação de PCR, utilizando os “primers” PAE-ATT1 e PAE-ATT2new. Raia 2: segunda reação de PCR, utilizando os “primers” BP1 e BP2.

4.6.2. Construção do vetor de plantas para RNAi

O fragmento de 862 pb da segunda reação de PCR, purificado do gel, foi inserido em vetor de entrada (pDONR201) por recombinação, via reação BP. O produto desta recombinação foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* cepa DH10B, que resultou em colônias transformantes. Destas, 10 colônias isoladas foram escolhidas, ao acaso, e o DNA foi extraído pelo método de mini-preparação de DNA plasmidial. A confirmação da presença do inserto no vetor pDONR201 foi realizada com digestão enzimática, utilizando a enzima *Pst*I. Esta enzima digere em duas regiões do plasmídeo recombinado, uma na região do cDNA e outra na região do vetor, liberando um fragmento de 873 pb (Figura 27). Na Figura 28 pode-se observar as mini-preparações de DNA, digeridas com a enzima *Pst*I, sendo que nove amostras confirmaram a presença do inserto de

aproximadamente 873 pb. Assim, foi utilizado apenas o clone 1 para continuar os experimentos, o qual passou a ser chamado de pENTRY-PAERi, sendo utilizado para recombinação com o vetor pK7GWIWG2 (I).

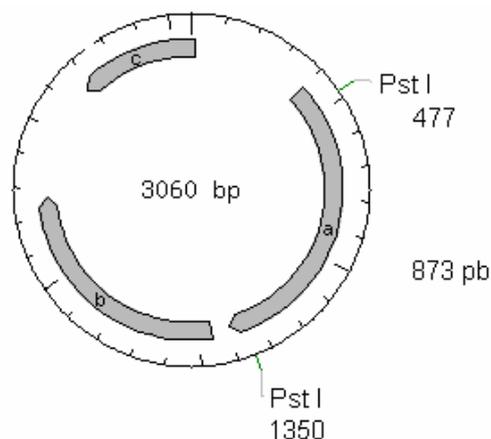


Figura 27: Estrutura esperada do plasmídeo de interesse, resultante da recombinação BP.

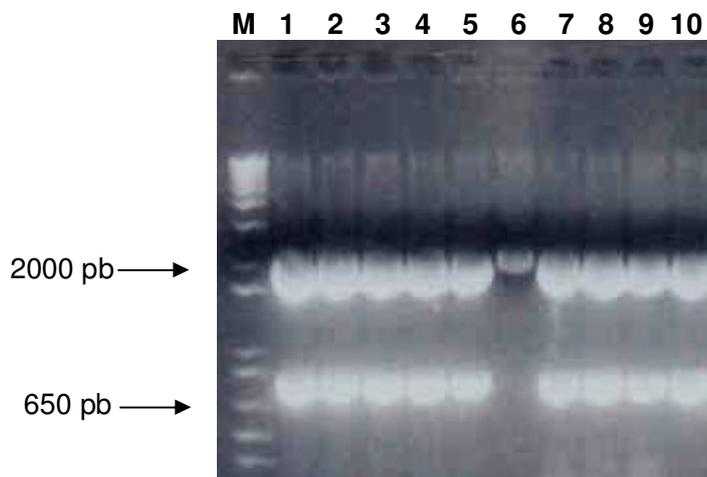


Figura 28: Mini-preparações de DNA das colônias originadas da reação BP (pENTRY-PAERi), para análise do bloqueio da expressão do gene *NtPAE1*. Tais amostras foram digeridas com a enzima *PstI* e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, gerando fragmentos de aproximadamente 873 pb e 2187 pb. M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Raia 6: amostra não apresentou o inserto do cDNA 004A06 no plasmídeo pENTRY-PAERi.

O vetor pK7GWIWG2(I) permite a recombinação de dois fragmentos de DNA idênticos, em orientação invertida, e intercalados por um íntron. Tal configuração permite que, após a transcrição do gene quimérico, ocorra a formação de um RNA em forma de “grampo”, o qual desencadeia um eficiente silenciamento gênico pós-transcricional. O vetor pK7GWIWG2(I) apresenta cerca de 13,5 kb de tamanho e possui dois sítios attR1-attR2 que permitem dois eventos de recombinação independentes, de maneira a resultar em duas sequências idênticas e complementares separadas por um íntron, permitindo a formação do RNAi.

O vetor pENTRY-PAERi e pK7GWIWG2(I) foram obtidos por mini-preparação de DNA plasmidial, e os DNAs, resultantes de cada vetor, foram utilizados em uma reação de recombinação LR. O produto desta recombinação foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* cepa DH10B, que resultou em colônias transformantes. Destas, 10 colônias isoladas foram escolhidas, ao acaso, e o DNA foi extraído pelo método de mini-preparação de DNA plasmidial. Com a finalidade de verificar se a recombinação entre os vetores foi bem sucedida, realizou-se a digestão com a enzima de restrição *SacI*. Esta enzima corta três regiões do plasmídeo pK7GWIWG2 (I) recombinado com o plasmídeo pENTRY-PAERi: duas na região do cDNA 004A06, tanto na orientação senso como na antisenso, e na sequência anterior ao promotor (Figura 29). Na Figura 30 pode-se visualizar as mini-preparações de DNA, digeridas com a enzima *SacI*, confirmando a presença dos insertos de aproximadamente 897 pb e 1850 pb. Este plasmídeo foi chamado de pEXP-PAERi.

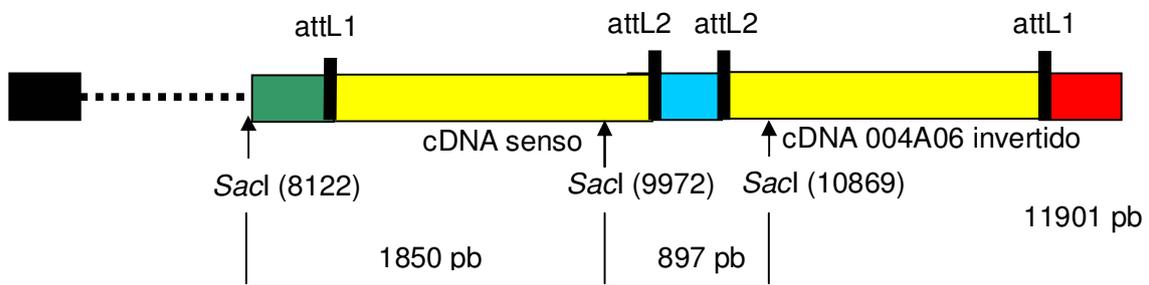


Figura 29: Esquema representativo do plasmídeo pEXP-PAERi, que mostra os sítios de recombinação (attL) nas extremidades do fragmento de cDNA. A extremidade em vermelho representa o Terminador 35S, em verde o Promotor 35S e, em azul, o intron localizado entre o cDNA senso e antisense. A enzima *SacI* corta na região senso e antisense do cDNA inserido no plasmídeo e na região anterior ao promotor.

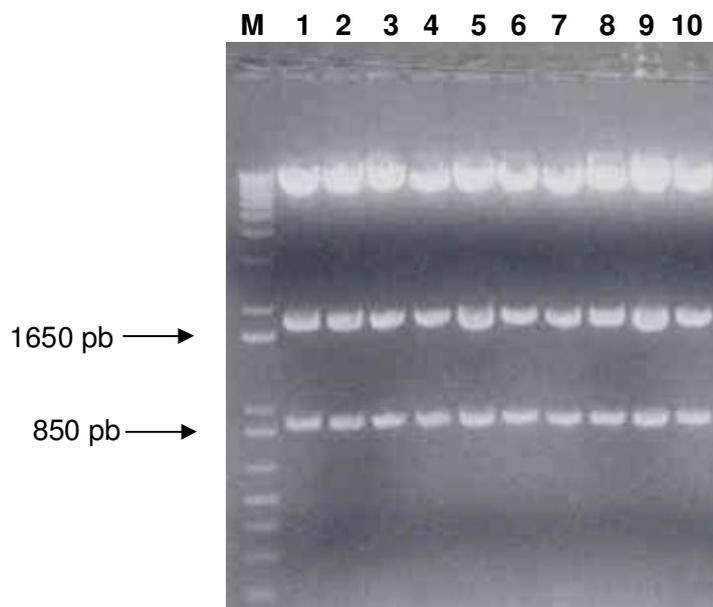


Figura 30: Mini-preparações de DNA das colônias originadas da reação LR (pEXP-PAERi), para análise de bloqueio da expressão do gene *NtPAE1*. Tais amostras foram digeridas com a enzima *SacI* e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Todas as amostras

apresentaram dois insertos de aproximadamente 897 e 1850 pb. M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.6.3. Sequenciamento do plasmídeo pEXP-PAERi

Para dar prosseguimento nos experimentos, foi feito um sequenciamento do plasmídeo pEXP-PAERi, para confirmar se o fragmento do cDNA 004A06 havia sido corretamente introduzido no vetor de expressão (pK7GWIWG2). O plasmídeo pEXP-PAERi foi seqüenciado com os “primers” P35S e T35S que hibridizam com o promotor (“forward”) e terminador (“reverse”) 35S, respectivamente.

A Figura 31 mostra a seqüência parcial de pEXP-PAERi, após o sequenciamento com o “primer” P35S, destacando a seqüência do sítio de recombinação attB1. A seqüência, na orientação sense, foi inserida entre o promotor e o íntron presente no vetor pK7GWIWG2. A Figura 32 mostra a seqüência parcial de pEXP-PAERi, após o sequenciamento com o “primer” T35S, destacando a seqüência do sítio de recombinação attB1. A seqüência, na orientação invertida, foi inserida entre o íntron e o terminador presente no vetor pK7GWIWG2. Esses resultados indicam a presença do cDNA 004A06 e os sítios de recombinação nas posições corretas e sem presença de mutações. Posteriormente, o plasmídeo pEXP-PAERi foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* para os experimentos de transformação de plantas.

```
CAAACAACATTACAATTTACTATTCTAGTCGACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATATCACA  
AGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCatggagaaagtgatggattgtaactcaattctc  
M E K V M D C N S I L  
atggctgcagtgcttttttctctactgtgtctttggacaacaactgaaggagac...  
M A A V L F S L L C L W T T T E G D....
```

Figura 31: Parte da seqüência do clone pEXP-PAERi obtida pelo sequenciamento com o “primer” P35S, e a seqüência deduzida de aminoácidos. A região em negrito é uma parte da seqüência do promotor 35S e a região sublinhada corresponde à seqüência do sítio de recombinação attB1. Após o sítio, encontra-se inserida corretamente a seqüência de parte do cDNA 004A06, na orientação senso.

TCTAGCATGGCCGCGGGATATCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCatggag
M E
aaagtgatggattgtaactcaattctcatggctgcagtgcttttttctctactgtgt
K V M D C N S I L M A A V L F S L L C
ctttggacaacaactgaaggagacctcatt....
L W T T T E G D L I.....

Figura 32: Sequência parcial do clone pEXP-PAERi, obtida pelo sequenciamento com o “primer” P35S, e a sequência deduzida de aminoácidos. A região em negrito é uma parte da sequência do terminador 35S e a região sublinhada corresponde à sequência do sítio de recombinação attB1. Após o sítio, encontra-se inserida corretamente a sequência de parte do cDNA 004A06, na orientação antisenso.

4.7. Obtenção de plantas transgênicas

4.7.1. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com as construções pEXP-PAESp e pEXP-PAERi

As construções pEXP-PAESp e pEXP-PAERi foram transferidas, separadamente, para *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1RifR (pGV2260), por eletroporação. Tal bactéria é responsável pela transferência do T-DNA para plantas, em nosso caso *N. tabacum*. Após as transformações, foram realizadas mini-preparações de DNA de oito colônias; três colônias obtidas na transformação do pEXP-PAESp e cinco colônias obtidas na transformação do pEXP-PAERi. Essas mini-preparações foram utilizadas como molde em reações de PCR, para confirmar a presença das construções pEXP-PAESp e pEXP-PAERi nas colônias de *Agrobacterium*.

Para checar a presença da construção pEXP-PAESp, foram realizadas três reações de PCR utilizando os “primers” PAE-4 e Term35S. As sequências de oligonucleotídeos PAE-4 e Term35S flanqueiam uma região de 946 pb. A Figura 33 mostra o resultado das reações, sendo que duas colônias (2 e 3) foram positivas, apresentando o fragmento esperado de aproximadamente 946 pb. Desse modo, o

Agrobacterium da mini-preparação 2 foi escolhido para transformar discos foliares de *N. tabacum*.

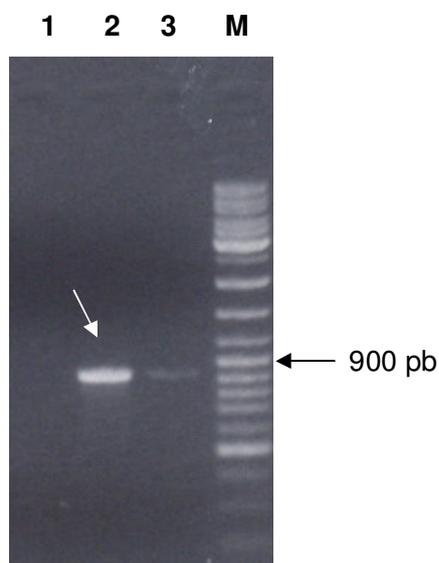


Figura 33: Eletroforese em gel de agarose (1%), mostrando os fragmentos amplificados nas reações de PCR, confirmando a presença da construção de superexpressão em *Agrobacterium tumefaciens*. Foram utilizados os primers PAE-4 e Term35S. Raias 2 e 3: amostras que apresentaram a banda de tamanho esperado de aproximadamente 946 pb, confirmando a presença do plasmídeo desejado. A seta indica a mini-preparação 2 escolhido para transformar discos foliares de *N. tabacum*. M: Marcador de peso molecular (DNA Ladder Mix – Fermentas).

Para checar a presença do vetor pEXP-PAERi nas colônias de *Agrobacterium*, foram realizadas cinco reações de amplificação utilizando os “primers” Prom35S e PAE-ATT2New, que flanqueiam uma região de 1022 pb. Na Figura 34 pode ser observado que todas as colônias amplificaram um fragmento esperado de 1022 pb, indicando que todas as amostras apresentam o vetor pEXP-PAERi. O *Agrobacterium* da mini-preparação 2 foi escolhido para transformar discos foliares de *N. tabacum*.

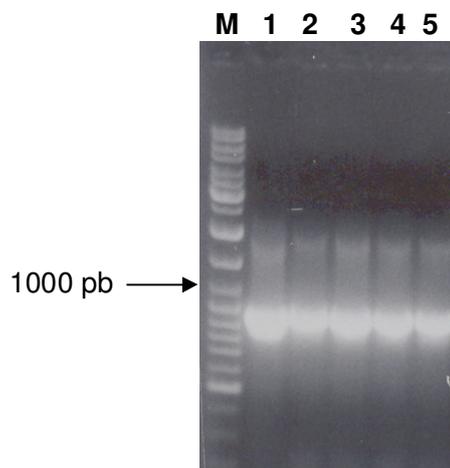


Figura 34: Eletroforese em gel de agarose (1%), mostrando fragmentos amplificados nas reações de PCR, confirmando a presença da construção de RNAi em *Agrobacterium tumefaciens*. M: Marcador de peso molecular (DNA Ladder Mix – Fermentas). Raias de 1 a 5: amostras amplificadas utilizando os “primers” Prom35S e PAE-ATT2New, amplificando um fragmento esperado de 1022 pb.

4.7.2. Infecção dos discos foliares de *N. tabacum* e obtenção dos calos

A partir de plântulas de *N. tabacum*, previamente cultivadas “*in vitro*”, foram cortados discos foliares da parte interna da lâmina foliar. Vinte e quatro discos foliares foram colocados em contato com o meio MS (Murashige and Skoog, 1962) contendo *Agrobacterium*; doze discos para cada construção. As placas foram deixadas no escuro, a 28 °C, por 2 dias. Após as transformações dos discos foliares de *N. tabacum* por *A. tumefaciens*, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura próprio para a formação de calos (Figura 35 A). Em aproximadamente duas semanas, começaram a surgir os calos, que foram sendo extraídos das folhas, e individualmente colocados uma nova placa de Petri (Figura 35 B), contendo meio de indução de calos. Foram obtidos 117 calos referentes à construção pEXP-PAESp e, após aproximadamente um mês, 107 desses calos, agora maiores, foram transferidos para meio de indução de parte aérea (Figura 35 C). Com relação à construção pEXP-PAERi), foram feitas duas infecções dos discos foliares de *N. tabacum*, para obtenção dos calos. Na primeira infecção foram obtidos

87 calos, sendo que 63 calos foram transferidos para meio de indução de parte aérea. Entretanto, apenas 3 calos originaram brotos e, após a transferência destes para o meio de indução de raiz, apenas um broto desenvolveu raiz. Desse modo, foi feita uma segunda infecção referente à construção pEXP-PAERi. Na segunda infecção foram obtidos 250 calos e, aproximadamente três semanas depois, 196 calos foram transferidos para meio de indução de parte aérea. Em certas etapas da transformação, algumas células podem não entrar em contato efetivo com o meio, de forma que estas originam calos que não passam pelo processo de seleção com o antibiótico. Portanto, quando os calos transferidos, em contato direto com o meio seletivo, não se desenvolvem, estes são descartados. A redução no número de calos também ocorreu devido à perda, por processos de manipulação, durante o processo de transferência entre os diferentes meios.

4.7.3. Obtenção de brotos transgênicos com as construções pEXP-PAESp e pEXP-PAERi

Após uma semana, os brotos que foram surgindo, a partir dos calos resistentes, foram identificados (maiores de 0,7cm) e excisados na base, procurando excluir tecidos do calo (Figura 35 A). Os brotos foram transferidos individualmente para meio de indução de parte aérea (Figura 36 A). Durante as semanas seguintes, os brotos resistentes ao agente de seleção foram isolados à medida que regeneraram, e transferidos para um meio de enraizamento (Figura 36 B). Os brotos que apresentaram ausência de resistência à canamicina foram eliminados. Aproximadamente um mês depois de estarem em meio de enraizamento, as raízes começaram a surgir e as plântulas se mantiveram nesse meio até o desenvolvimento completo das raízes.

Da construção pEXP-PAESp, foram obtidos um total de 37 brotos a partir de 19 calos (alguns calos originam mais de um broto, mas as plantas oriundas do mesmo calo são clones e, portanto, geneticamente idênticas). Cerca de um mês depois, as raízes dos brotos da construção pEXP-PAESp começaram a surgir, sendo os brotos transferidos para potes individuais, contendo meio MS com canamicina,

para o desenvolvimento completo das raízes (Figura 36 B). Da primeira infecção, referente à construção pEXP-PAERi, apenas um broto desenvolveu raiz, sendo transferido para um pote contendo meio MS com canamicina. Já a segunda infecção, referente à construção pEXP-PAERi, resultou em um total de 44 brotos a partir de 22 calos, mas somente 11 brotos referentes a 8 calos apresentaram desenvolvimento de raiz. Esse fato pode estar relacionado com uma das atividades das pectinases (PME e PAE), que podem desempenhar um papel crítico na modificação da parede celular durante o desenvolvimento de raízes (Wen *et al.*, 1999). Desse modo, genes com sequências semelhantes a do gene *NtPAE1*, e envolvidos na modificação da parede celular durante o desenvolvimento de raiz, podem ter sido silenciados pela construção de RNAi usada, causando os problemas encontrados.

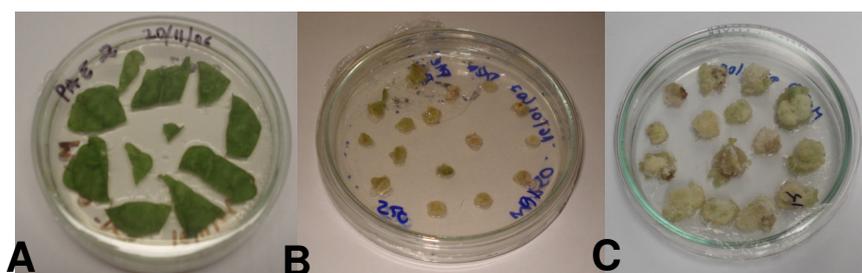


Figura 35: **A-** Discos foliares em meio de indução de calos (M300), após a infecção com *Agrobacterium*. **B-** Calos de *N. tabacum*, excisados das bordas dos discos foliares, em meio M300. **C-** Calos transferidos em meio de indução de parte aérea (M250).

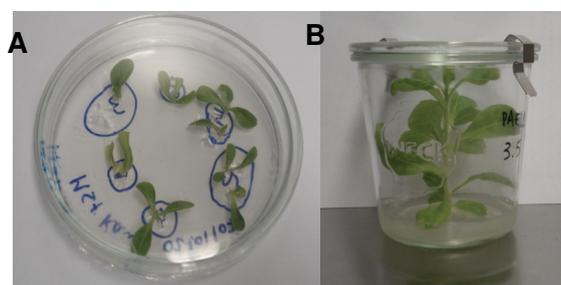


Figura 36: **A:** Brotos excisados dos calos e transferidos para o meio MS com canamicina (200 $\mu\text{g/ml}$). **B:** Plântula de *N. tabacum* em meio de indução de raiz (MS com canamicina), para o desenvolvimento completo da raiz.

4.7.4. Transferência das plântulas transgênicas para a terra

Após o completo desenvolvimento das raízes, as plântulas (de aproximadamente 13 cm) foram transferidas para a terra e levadas à casa de vegetação. Plantas transgênicas independentes são aquelas originadas de diferentes calos transformados. Em todo experimento de transformação de plantas deve-se trabalhar com um certo número de plantas transgênicas independentes, para poder analisar os efeitos que são comuns a maioria delas. Isto é necessário, pois como a inserção do T-DNA no genoma da planta é aleatória, cada inserção está sob efeito do DNA ao seu redor e podendo encontrar-se em locais que dificultam ou impedem a expressão do transgene (efeito de posição). Assim, com a análise de um certo número de plantas transgênicas, os efeitos de posição que afetam a expressão individual em cada planta transgênica podem ser descartados. Neste trabalho obteve-se um total de 25 plantas transgênicas com a construção pEXP-PAESp e, entre essas, 15 plantas transgênicas eram independentes. Cada planta transgênica independente recebeu uma denominação baseada na numeração do calo a partir do qual se regenerou. Para a construção pEXP-PAERi foi obtido um total de 11 plantas transgênicas, sendo que 8 plantas eram independentes. Cada planta independente recebeu uma denominação, também baseada na numeração do calo a partir do qual se regenerou. Todas as plantas transgênicas, das construções pEXP-PAESp e pEXP-PAERi, foram transferidas para a terra (Figura 37) e levadas à casa de vegetação. Após duas semanas, as plantas foram transferidas para os vasos definitivos (Figura 38). As Tabelas 4 e 5 mostram o número de plantas referentes a cada construção pEXP-PAESp e pEXP-PAERi, que foram transferidas para a terra com sucesso, a partir dos diferentes calos transformados.

Tabela 4: Número de plantas pEXP-PAESp transferidas para a casa de vegetação, obtidas a partir dose diferentes calos transformados.

Nº do calo	Nº de plantas na casa de vegetação
1	2
3	5
4	2
5	1
7	2
8	2
9	1
10	1

Nº do calo	Nº de plantas na casa de vegetação
11	2
12	1
13	2
15	1
16	1
17	1
19	1
----	----

Tabela 5: Número de plantas pEXP-PAERi, transferidas para a casa de vegetação, obtidas a partir de diferentes calos transformados.

Nº do calo	Nº de plantas na casa de vegetação
1	1
3	1
4	1
5	1
6	3
14	1
16	2
18	1



Figura 37: **A-** Aclimação das plantas recém transferidas para o solo. **B-** Fase de crescimento das plantas, aguardando um tamanho adequado para transferência aos vasos maiores e definitivos.



Figura 38: Plantas transgênicas contendo a construção de superexpressão do gene *NtPAE1*, transferidas para o vaso definitivo.

4.8. Análise das plantas de superexpressão contendo a construção pEXP-PAESp

4.8.1 - Verificação da presença do transgene

Para comprovar a presença do gene de interesse nas plantas obtidas, foi realizada uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos Prom35S e PAE-6. Estes oligonucleotídeos flanqueiam uma região do DNA de aproximadamente 1316pb (Figura 39), correspondendo à região do promotor 35S, localizado no vetor de expressão pK7WG2, e a região codificadora do gene (PAE-6). As plantas obtidas foram regeneradas na presença de canamicina, o que é uma maneira indireta de comprovar a presença do T-DNA. O gene *ntplI*, que é responsável por conferir às plantas transgênicas resistência ao antibiótico canamicina, faz parte da estrutura do T-DNA do vetor pK7WG2 (Figura 39), o qual foi transferido às células vegetais no processo de transformação.

Para as reações de PCR foi utilizado DNA genômico das plantas transgênicas, obtido pelo protocolo de mini-extração. A análise por eletroforese das amostras amplificadas demonstrou a presença da banda esperada (aproximadamente

1316 pb) em todas as plantas transgênicas, exceto na planta 8.1 (Figura 40). A presença desta banda confirma a presença do gene *NtPAE1* quimérico inserido no genoma das plantas transgênicas. A banda de 1316pb estava ausente nas plantas SR1 (linhagem original não transgênica), conforme esperado (controle negativo) (Figura 40).

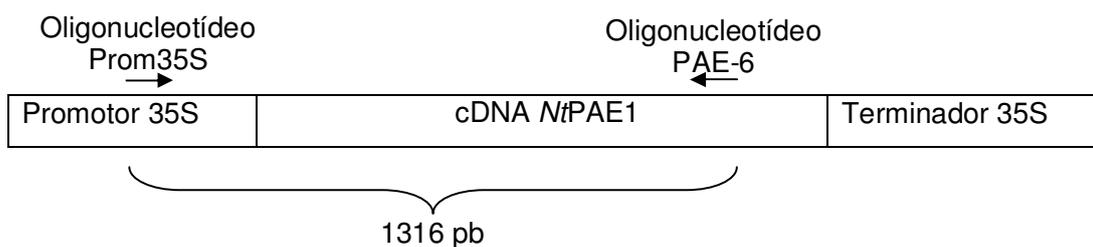


Figura 39: Esquema do gene quimérico presente no vetor pEXP-PAESp, mostrando os locais de pareamento dos oligonucleotídeos. Prom35S: Região promotora do vetor de expressão pK7WG2, a qual regula a expressão da PAE; cDNA *NtPAE1*: Região codificadora da pectina acetilsterase (PAE); Term35S: Terminador do vetor de expressão pK7WG2.

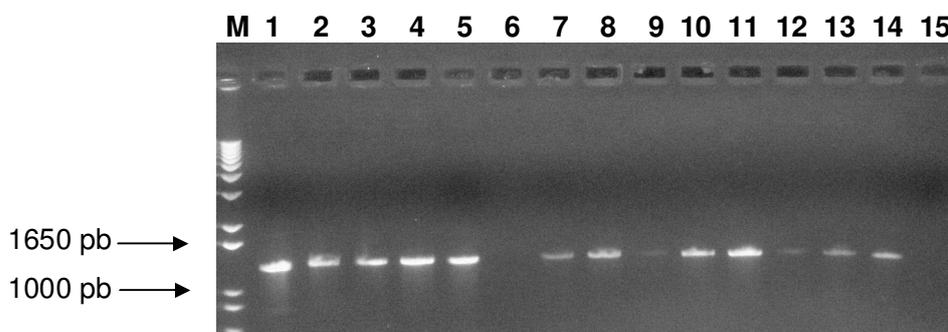


Figura 40: Reações de PCR a partir de mini-extrações de DNA genômico dos transgênicos PAESp de *N. tabacum*, utilizando os “primers” Prom35S e PAE-6, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras que resultaram em uma banda de 1316 pb apresentam o gene quimérico inserido em seu genoma. Apenas o transgênico PAESp 8.1 (raia 6) não apresentou a banda esperada. **M**: Marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder DNA Plus – Invitrogen). Nas raias 1 a 14: DNA genômico das plantas transgênicas 1.1; 3.5; 4.1; 5.1;

7.1; 8.1; 9.1; 10.1; 11.2; 13.1; 15.1; 16.1; 17.1; 19.1 e, na raia 15 cultivar Petit Havana SR1 de *N. tabacum* não transformada (controle negativo).

O fato do transgênico 8.1 não ter apresentado a banda esperada de 1316 pb, pode ter ocorrido por diferentes motivos. Uma possibilidade é que o DNA preparado contenha contaminantes que impediram a amplificação por PCR. Uma outra possibilidade é que tenha ocorrido a deleção de parte do T-DNA, mantendo o gene de resistência à canamicina e eliminando o gene quimérico da PAE. Como a planta PAESp 8.1 possuía fenótipo coerente com a superexpressão de PAE, é provável que tenha ocorrido apenas um problema de contaminantes que impediram a amplificação. Por este motivo, esta planta foi considerada nas análises seguintes.

4.9. Análise das plantas de silenciamento contendo a construção pEXP-PAERi

4.9.1. Verificação da presença do transgene

Para comprovar a presença do gene de interesse nas plantas obtidas, foi realizada uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos PAE-RT-R e Term35S. Estes oligonucleotídeos flanqueiam uma região do DNA de aproximadamente 866 pb (Figura 41), correspondendo à região do terminador 35S localizado no vetor de expressão pK7GWIWG2 e a região codificadora do gene antisense (PAE-RT-R). As plantas obtidas foram regeneradas na presença de canamicina, o que é uma maneira indireta de comprovar a presença do T-DNA.

Para tal reação de PCR foi utilizado DNA genômico das plantas transgênicas, obtido pelo protocolo de mini-extração. A análise por eletroforese das amostras amplificadas demonstrou a presença da banda esperada (aproximadamente 866 pb) em todas as plantas transgênicas, exceto nas plantas PAERi 5.1 e 14.1 (Figura 42). A presença desta banda confirma a presença do terminador 35S e parte da sequência do cDNA antisense, correspondente a uma parte do gene *NtPAE1* quimérico inserido no genoma das plantas transgênicas. Nas plantas SR1 (linhagem

original não transgênica) não houve amplificação da banda esperada de 866pb (controle negativo) (Figura 42).

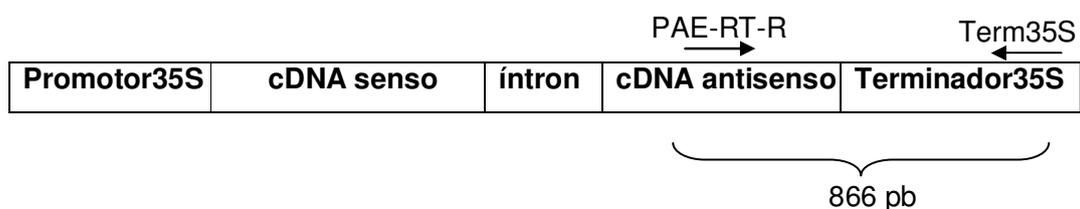


Figura 41: Esquema do gene quimérico presente no vetor pEXP-PAERi, mostrando os locais de pareamento dos oligonucleotídeos. Promotor 35S: Região promotora do vetor de expressão pK7GWIWG2, a qual regula a transcrição do gene quimérico; cDNA *NiPAE1* senso e antisenso: Parte da região codificadora da pectina acetilesterase (PAE); Íntron: Região entre o cDNA senso e antisenso e Terminador 35S: Terminador do vetor de expressão pK7GWIWG2.

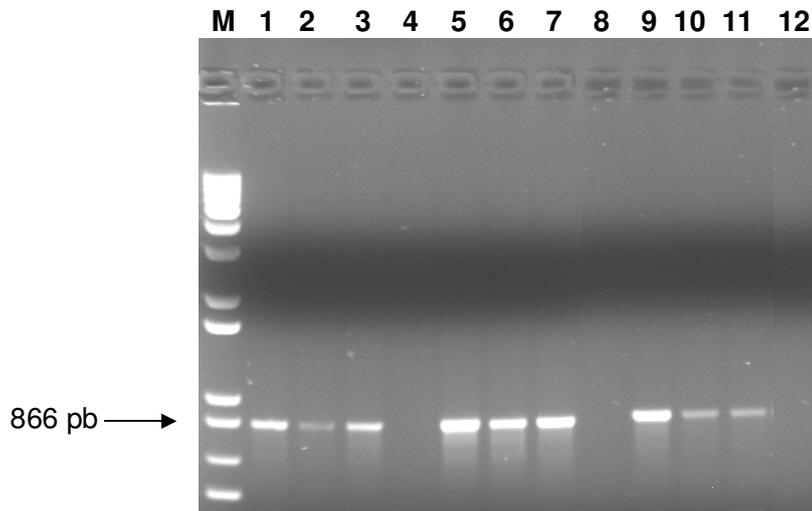


Figura 42: Reações de PCR a partir de mini-extrações de DNA genômico dos transgênicos PAERi de *N. tabacum*, utilizando os “primers” PAE-RT-R e Term35S, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras que resultaram em uma banda de 866 pb apresentam o gene *NtPAE1* quimérico inserido em seu genoma. Apenas os transgênicos PAERi 5.1 e 14.1 não apresentaram a banda esperada. **M:** Marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder DNA Plus – Invitrogen). Nas raias 1 a 11: DNA genômico das plantas transgênicas 1.1; 2.4; 3.1; 5.1; 6.1; 6.2; 6.4; 14.1; 16.1; 16.2 18.1 e, na raia 12 cultivar Petit Havana SR1 de *N. tabacum* não transformada (controle negativo).

4.10. Análise do nível de transcritos de *NtPAE1* nas plantas transgênicas de superexpressão e RNAi

Após a confirmação da presença do gene de interesse nas plantas transgênicas de superexpressão (15 plantas independentes) e RNAi (8 plantas independentes) foi feita uma análise por RT-PCR em tempo real para verificar o nível de transcritos de *NtPAE1* nas diferentes plantas transgênicas.

Para essa análise, foram coletadas amostras de estigmas/estiletos no estágio 11, das plantas transgênicas e da planta selvagem (SR1), dos quais foram extraídos RNAs para a síntese de cDNA. Os cDNAs sintetizados foram analisados em uma PCR em tempo real, utilizando os “primers” RT-PAE-F e RT-PAE-R, que

pareiam no cDNA. Todas as reações foram normalizadas utilizando os “primers” específicos para o gene da β -actina.

A Figura 43 mostra que o transgênico de superexpressão PAESp1.1 apresentou um nível de expressão de *NtPAE1* 18 vezes maior do que a planta selvagem. Nas demais plantas transgênicas o nível de expressão variou entre 1 a 6 vezes mais do que a planta selvagem. Apesar da planta transgênica PAESp 8.1 não ter confirmado a presença do transgene por PCR (resultado relatado no item anterior), nos experimentos de RT-PCR em tempo real o nível de expressão nesta planta transgênica foi 2,7 vezes maior do que na planta selvagem.

A Figura 44 mostra que o transgênico de RNAi PAERi16.1 (e seu clone PAERi 16.2) apresentou apenas 11% do nível endógeno de expressão do gene *NtPAE1* na planta selvagem (SR1). Nas demais plantas transgênicas o nível de expressão do gene *NtPAE1* variou entre 18 a 43% em relação à planta selvagem (100%).

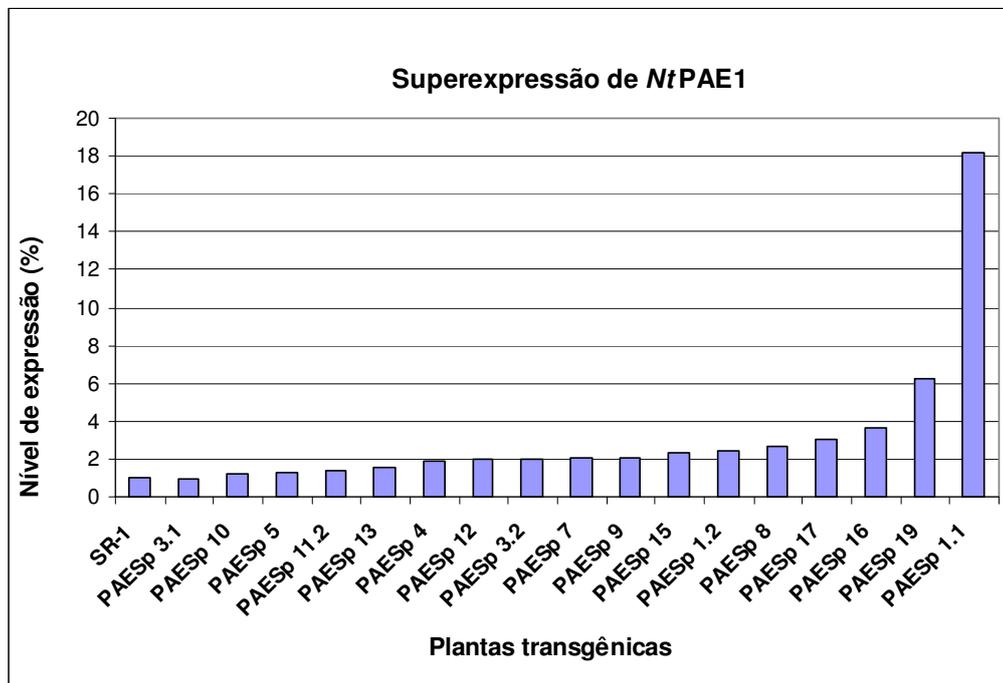


Figura 43: O gráfico representa o nível de expressão relativa do gene *NtPAE1*, em estigmas/estiletos no estágio 11 do desenvolvimento floral, nas diferentes plantas transgênicas de superexpressão (PAESp), em relação ao nível de expressão na planta controle (SR1), considerado igual a 1. A expressão de *NtPAE1* em todas as amostras foi normalizada pela expressão do gene da β -actina.

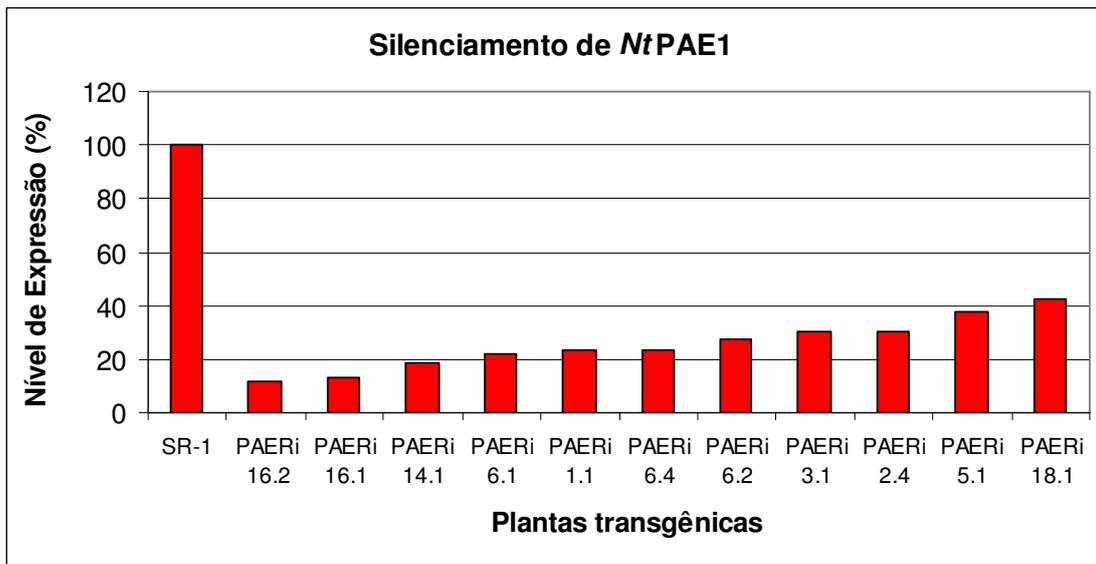


Figura 44: O gráfico representa o nível de expressão relativa do gene *NtPAE1*, em estigmas/estiletos do estágio 11 do desenvolvimento floral, nas diferentes plantas transgênicas de RNAi (PAERi), em relação ao nível de expressão na planta controle (SR1), considerado igual a 100%. A expressão de *NtPAE1* em todas as amostras foi normalizada pela expressão do gene da β -actina.

4.11. Análise do fenótipo e da fertilidade das plantas transgênicas (PAESp e PAERi)

A análise do fenótipo das plantas transgênicas se baseou em caracteres: 1) ontogenéticos, como o desenvolvimento e crescimento da planta como um todo; 2) morfológicos, através da análise estrutural das partes vegetativas e reprodutivas; 3) capacidade de efetuar o processo reprodutivo, observando se a planta foi capaz de produzir frutos e sementes. De um total de 15 plantas transgênicas de superexpressão, apenas duas plantas, PAESp 8.1 e PAESp 10.1, apresentaram um fenótipo diferenciado da planta selvagem. Ambas as plantas PAESp 8.1 e PAESp 10.1 apresentaram flores de tamanho menor e com tecidos aparentemente mais finos, do que as flores da planta selvagem (Figura 45 A e D). A superexpressão de uma PME de petúnia, em plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* L.), provocou modificação durante o desenvolvimento da planta, o que resultou em

tubérculo reduzido (Pilling *et al.*, 2000). É possível sugerir que a superexpressão do gene *NtPAE1* pode ter ocasionado o aumento de pectinas de baixo grau de esterificação (desesterificadas), resultando em alteração no desenvolvimento da flor e redução do seu tamanho final. Estes resultados corroboram a hipótese de que o grau de esterificação das pectinas tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento normal da planta.

É importante observar que as plantas PAESP 8.1 e PAESp 10.1 apresentaram um nível de transcritos de *NtPAE1* apenas 2,7 e 1,2 vezes maior do que a planta selvagem (SR1). Por outro lado, a planta PAESp 1.1, com um nível de expressão 18 vezes maior do que a planta selvagem, não apresentou um fenótipo evidente. É possível que, apesar do elevado nível de transcritos *NtPAE1*, não esteja ocorrendo um aumento proporcional da quantidade de proteína *NtPAE1* traduzida nesta planta, o que explicaria a ausência de fenótipo. Para esclarecer esta questão é necessário quantificar a proteína *NtPAE1*, por exemplo, através de experimentos de Western blot. Com a finalidade de obter anticorpos contra *NtPAE1* foram iniciados os experimentos descritos no item 4.20. Por outro lado, sabe-se que a redução no pH, gerada pelos prótons liberados durante o processo de desesterificação, ocasionado pela atividade de PME, pode inibir algumas isoformas de PME (Moustacas *et al.*, 1991). Assim, é possível especular que uma quantidade muito elevada de PAE na planta PAESp 1.1 pode ter ocasionado um efeito inverso na degradação de pectinas, por causar o aumento de prótons livres, reduzir o pH, e provavelmente, inibir outras pectinases.

Para analisar a fertilidade das plantas de superexpressão foram feitas várias polinizações controladas usando pólen de SR1 nos estigmas das plantas transgênicas. Após um mês, na planta PAESp 1.1 foi observado um padrão de frutos normais, enquanto as flores da planta PAESP 8.1 apresentaram frutos bem menores e com poucas sementes ou até ausência de sementes devido a má formação do fruto (Figura 46 B). Já as flores da planta PAESp 10.1, após várias polinizações controladas, não apresentaram a formação de frutos. Por outro lado, autopolinizações da planta PAESp 10.1 resultaram na formação de frutos pequenos e com poucas sementes (dados não mostrados). A Figura 46 A e B mostra uma comparação do

fruto de SR1 (A), após uma autopolinização, e o fruto mal formado da planta PAESp 8.1, após a polinização com o pólen de SR1.

É possível que a formação de frutos menores ou mal formados da planta PAESp 8.1 tenha sido ocasionada pelo aumento da atividade da PAE extracelular, que pode ter gerado um excesso de grupos carboxil nos resíduos de pectina na parede celular do tecido transmissor do estilete, os quais ligaram-se ao cálcio, e causaram o enrijecimento do tecido, dificultando o crescimento do tubo polínico (Bosch *et al.*, 2005; Krichevsky *et al.*, 2007). Experimentos detalhados feitos com a alteração de PME em tubos polínicos mostraram que atividade de PME acima de um determinado valor causa efeitos drásticos nos tubos polínicos, interrompendo o seu crescimento (Parre e Geitmann, 2005).

De um total de oito plantas transgênicas independentes de RNAi, apenas a planta PAERi 16, representada por PAERi 16.1 e seu clone putativo PAERi 16.2 (originadas do mesmo calo e, provavelmente, sendo idênticas), com o menor nível de expressão do gene *NtPAE1* (Figura 44), apresentou diferenças na morfologia e na fertilização. O fato das demais plantas não apresentarem um fenótipo alterado, pode estar relacionado com o fenômeno de compensação que poderia ocorrer entre as atividades de outras pectinases, ou seja, o bloqueio da atividade da PAE pode ter sido compensado pela atividade de outras PAEs, especialmente considerando que *N. tabacum* é uma espécie alotetraplóide (Goodspeed, 1954). Esse fenômeno de compensação foi sugerido entre as atividades de PME, devido ao grande número de genes existentes no genoma de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative 2000) (Lacoux *et al.*, 2003).

As plantas transgênicas de RNAi, PAERi 16.1 e 16.2, mostraram flores mais robustas e firmes em relação à selvagem (SR1) (Figura 45 C). Estas plantas são estéreis e incapazes de produzir frutos, mesmo após autopolinizações controladas (Figura 47). De acordo com o fenótipo observado, sugere-se que o bloqueio do gene *NtPAE1* pode ter ocasionado uma diminuição na desesterificação das pectinas. Dessa forma, o silenciamento do gene *NtPAE1* pode causar uma diminuição da atividade das pectina-hidrolases, resultando em uma matriz extracelular mais firme (Bosch, 2006). A baixa atividade de PAE poderia reduzir a eficiência de degradação

da parede dos tecidos femininos e a formação dos espaços intercelulares, o que dificultaria a passagem do tubo polínico através da zona secretória do estigma e do tecido transmissor do estilete em direção ao ovário.

Quando os grãos de pólen de SR1 foram utilizados em polinizações nos pistilos das plantas de RNAi (PAERi 16.1 e 16.2), foi observada a produção de frutos bem pequenos e com poucas sementes (dados não mostrados), evidenciando que a diminuição da expressão de *NtPAE1* ocasiona problemas no pistilo e no sucesso reprodutivo dessas plantas. Adicionalmente, mostra que os grãos de pólen das plantas PAERi 16.1 e 16.2 também apresentam problemas. Quando os grãos de pólen dessas plantas foram utilizados em polinizações de plantas selvagens (SR1) foram incapazes de produzir frutos, evidenciando uma alteração na formação dos grãos de pólen destas plantas transgênicas.



Figura 45: Flores no estágio 10 e pistilos no estágio 12 do desenvolvimento floral. **A e D** - Flor e pistilo da planta transgênica de superexpressão (PAESp 10.1); **B e E**- Flor e pistilo da planta selvagem (SR1) e **C e F** - Flor e pistilo da planta transgênica de RNAi (PAERi 16.2).

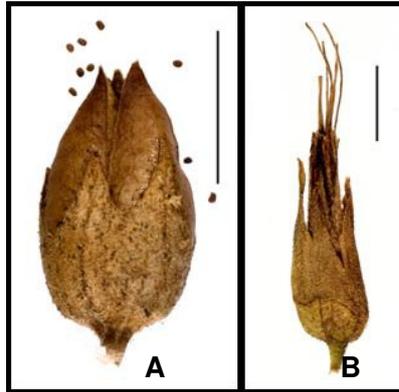


Figura 46: A- Fruto de SR1 após autopolinização controlada, B- Fruto da planta PAESp 8.1, após polinização controlada com pólen de SR1, evidenciando problemas na fertilização e na formação do fruto.



Figura 47: Planta transgênica de RNAi (PAERi 16.2), mostrando total ausência de frutos.

Os fenótipos, observados nas plantas de superexpressão e silenciamento do gene *NtPAE1*, foram discrepantes em relação ao tamanho e rigidez dos tecidos. Por outro lado, tanto as plantas de superexpressão quanto de silenciamento do gene *NtPAE1* mostraram inibição do crescimento do tubo polínico, causando problemas na fertilização. Isto indica a necessidade de um equilíbrio na composição das pectinas da

parede celular para proporcionar suporte e plasticidade adequados e, por menor que seja a perturbação deste equilíbrio pode comprometer o crescimento do tubo polínico (Bosch e Hepler, 2005).

4.12. Análise do crescimento do tubo polínico em polinizações controladas na planta transgênica PAERi 16.2

Para observar o crescimento do tubo polínico na planta transgênica PAERi 16.2 foram feitas análises por microscopia de fluorescência após polinizações controladas. A Figura 48 mostra os resultados obtidos em estigmas/estiletes de SR1 e de PAERi 16.2, sete horas após a polinização. Na Figura 48 (A e B) pode-se visualizar autopolinizações simultâneas de PAERi 16.2 e SR1, feitas no estágio 11 do desenvolvimento floral, sendo observado que a autopolinização da flor PAERi 16.2 apresentou uma quantidade bem menor de tubos polínicos emitidos pelos grãos de pólen, quando comparada com a autopolinização da flor selvagem (SR1). Além disso, os tubos polínicos também apresentaram tamanhos reduzidos (Figura 48 B, seta), demonstrando dificuldade no crescimento através dos tecidos do pistilo e resultando na ausência de frutos.

Para testar a hipótese de que o gene *NtPAE1* tem um importante papel na dissociação das células dos tecidos especializados do estigma/estilete, foram feitas polinizações cruzadas, ou seja, o pistilo de PAERi 16.2 foi polinizado com o pólen da planta selvagem (SR1) (Figura 48 D), afim de comparar o crescimento do tubo polínico no tecido transmissor do estilete. Sete horas após a polinização, o estigma/estilete da PAERi 16.2 foi cortado e corado com azul de anilina e, quando comparado com a autopolinização de SR1 (Figura 48 A), apresentou uma redução no comprimento durante o crescimento do tubo polínico “*in vivo*” (Figura 48 D). Desse modo, pode ser sugerido que o tecido do pistilo de PAERi 16.2 está mais compactado devido à ausência de uma das PAEs, dificultando o crescimento do tubo polínico. A atividade da PME em tubos polínicos em crescimento tem sido hipotetizado por Jauh e Lord (1996) e por Mollet *et al.* (2000), sugerindo que a adesão do tubo polínico na matriz extracelular do estilete poderia depender da desmetilação de pectinas. Assim,

o grau de esterificação de pectinas pode ser um fator que regula a adesão célula-célula (Bush e McCann, 1999).

Na Figura 48 (C) pode-se visualizar o pistilo da planta selvagem (SR1) polinizado com o pólen da flor PAERi 16.2, apresentando uma quantidade bem menor de tubos polínicos emitidos, como visto na autopolinização da PAERi 16.2. Entretanto, os tubos polínicos tiveram um crescimento um pouco maior do que em pistilos de PAERi 16.2, sugerindo um efeito aditivo no crescimento dos tubos polínicos nessas plantas, com dificuldades impostas pelo próprio pistilo assim como pelo tubo polínico. Então, sugere-se que o silenciamento do gene *NtPAE1* não só afetou a morfologia do pistilo, como também pode ter resultado em alterações nos grãos de pólen. Relatos de Mu *et al.* (1994), Kim *et al.* (1997) e Wakeley *et al.* (1998) tem mostrado que genes para PME foram ativos durante a maturação e germinação do pólen de milho, *Brassica napus* e *Petunia inflata*, respectivamente, sugerindo que a atividade da PME é necessária durante o crescimento do tubo polínico. Assim, é possível sugerir que a atividade de PAE também seja importante durante a maturação e germinação do pólen de *N. tabacum*.

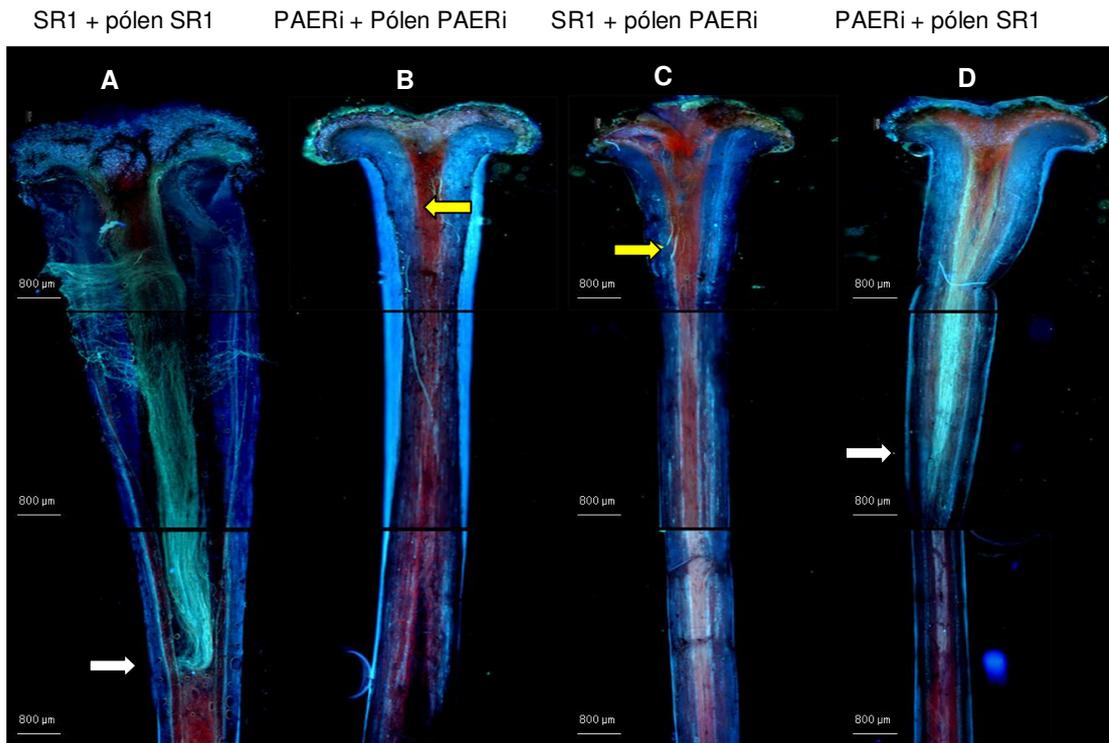


Figura 48: Microscopia de fluorescência em pistilos de plantas SR1 (selvagem) e em PAERi 16.2 (transgênica-RNAi), no estágio 11 do desenvolvimento floral. **A** e **B** representam autopolinizações de SR1 e de PAERi 16.2, respectivamente. **C** e **D** representam fecundação cruzada de pistilo de SR1 com pólen de PAERi 16.2 e pistilo de PAERi 16.2 com pólen de SR1, respectivamente. Setas brancas e amarelas demonstram o perfil de crescimento do tubo polínico, 7 horas após a polinização. Aumento de 4x, a barra corresponde a 800µm.

Apesar dos recentes avanços no estudo das pectinases nos tecidos masculinos, quase nada se conhece sobre o papel das pectinases nos tecidos reprodutivos femininos. Em 1990, Budelier *et al.* descreveram a identificação de um gene denominado MON9612, especificamente expresso no tecido transmissor do estilete de tomate. Hoje se sabe que este gene codifica uma pectato liase específica do pistilo, sugerindo que as pectinases desempenhem papel chave na reprodução vegetal, também nos tecidos femininos. Entretanto, até este momento nada se sabe sobre o papel da PAE nos tecidos femininos, o que ressalta a grande importância da caracterização do gene *NtPAE1*, realizada neste trabalho.

4.13. Análise dos grãos de pólen da planta transgênica PAERi 16.2 por microscopia de fluorescência

Para observar os grãos de pólen da planta transgênica PAERi 16.2 foram feitas análises por microscopia de fluorescência. Nove horas após a polinização, os grãos de pólen de PAERi 16.2 foram corados com azul de anilina e comparados com os grãos de pólen da planta selvagem (SR1). A Figura 49 mostra os resultados obtidos neste experimento. É possível observar que vários grãos de pólen da planta transgênica (PAERi 16.2) não deram origem ao tubo polínico (Figura 49 B), enquanto que na planta selvagem (SR1), os tubos já estavam emergidos (Figura 49 A). Estas análises demonstraram que os grãos de pólen da planta PAERi 16.2 sofreram alterações funcionais na germinação e crescimento do tubo polínico e, sugeriram alterações morfológicas nos grãos de pólen.

Existem relatos de genes que codificam PME's específicas de pólen de *Arabidopsis thaliana* (Jiang *et al.*, 2005; Pina *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006) e *Nicotiana tabacum* (Bosch *et al.*, 2005, 2006) que são importantes no crescimento e desenvolvimento do tubo polínico. Em *Arabidopsis*, o gene VANGUARD1 (VGD1) codifica uma PME expressa especificamente nos grãos de pólen e tubo polínico. A atividade da PME no pólen foi reduzida com a interrupção funcional do gene VGD1, causando uma diminuição do crescimento do tubo polínico no tecido transmissor do estilete, o que resultou em uma redução significativa na fertilidade (Jiang *et al.*, 2005). Este estudo sugere que o gene atue no papel do crescimento do tubo polínico nos tecidos florais femininos, possivelmente aumentando a interação entre o tubo polínico e os tecidos florais femininos através da modificação da parede celular do tubo polínico (Jiang *et al.*, 2005). Dessa forma, é possível que o gene em estudo *NtPAE1*, específico de pistilo, também possa aumentar a interação entre o tubo polínico e os tecidos florais femininos através da modificação da parede celular do pistilo.

A mutação do gene *AtPPME1*, específico do pólen comprometeu a forma e a razão de crescimento do tubo polínico de *Arabidopsis* que não afetou a estabilidade e a morfologia do tubo polínico e nem a fertilidade da planta (Tian *et al.*, 2006), ao contrário da mutação do gene VGD1 (Jiang *et al.*, 2005). Em *Nicotiana tabacum*, o

silenciamento do gene *NtPPME1* também específico de pólen, resultou em uma branda, mas significativa diminuição do crescimento do tubo polínico “*in vivo*”, enquanto que atividade total da PME no pólen não foi significativamente reduzida (Bosch e Hepler, 2006). Este estudo sugere que o crescimento normal do tubo polínico é dependente de um equilíbrio entre pectinas esterificadas e pectinas desesterificadas na parede celular e, por menor que seja, a perturbação desse equilíbrio compromete o crescimento do tubo polínico (Bosch e Hepler, 2006). Foi proposto que a diminuição da expressão do gene *NtPPME1* no pólen pode diminuir a ação de outras pectinases resultando em uma matriz extracelular mais firme e/ou uma diminuição na concentração de cálcio, que dificulta o crescimento do tubo polínico (Bosch e Hepler, 2006). Desse modo, é possível sugerir que o silenciamento do gene *NtPAE1* tenha provocado um desequilíbrio na esterificação das pectinas da parede celular do tecido transmissor do estilete, o que dificulta o crescimento do tubo polínico. No conjunto, pode ser sugerido que as enzimas PAE e PME sejam importantes para o crescimento do tubo polínico.

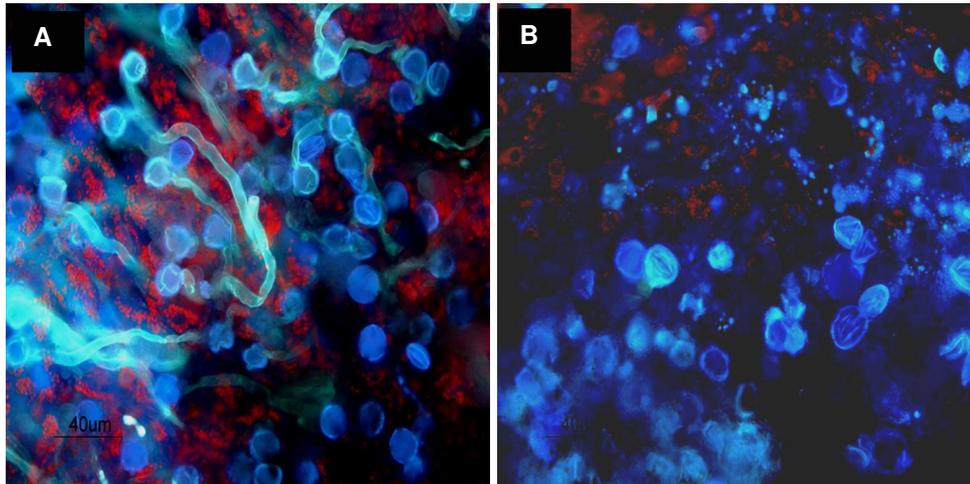


Figura 48: Microscopia de fluorescência em estigmas de plantas SR1 (selvagem) **(A)** e PAERi 16.2 (transgênica-RNAi) **(B)**, no estágio 11 do desenvolvimento floral. **A** e **B** mostram os grãos de pólen 9 horas após a autopolinização.

4.14. Análise dos grãos de pólen por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observar detalhadamente as alterações morfológicas nos grãos de pólen da PAERi 16.2, foram feitas análises por microscopia de varredura. Para essas análises, as anteras fechadas (estágio 11) da planta PAERi 16.2 e controle (SR1) foram fixadas e desidratadas em séries de etanol e, posteriormente, foram cobertas com ouro.

Os resultados obtidos demonstraram alterações morfológicas nos grãos de pólen da planta PAERi 16.2 (Figuras 49 e 50). A Figura 49 mostra as diferenças encontradas nos grãos de pólen da PAERi 16.2, comparando com a planta selvagem (SR1), em diferentes aumentos (200x, 750x e 3.500x), sendo possível observar grãos de pólen murchos, com aparência e tamanho bem heterogêneos, diferentes do pólen da planta selvagem (SR1), que mostra os grãos de pólen com forma e tamanho homogêneos.

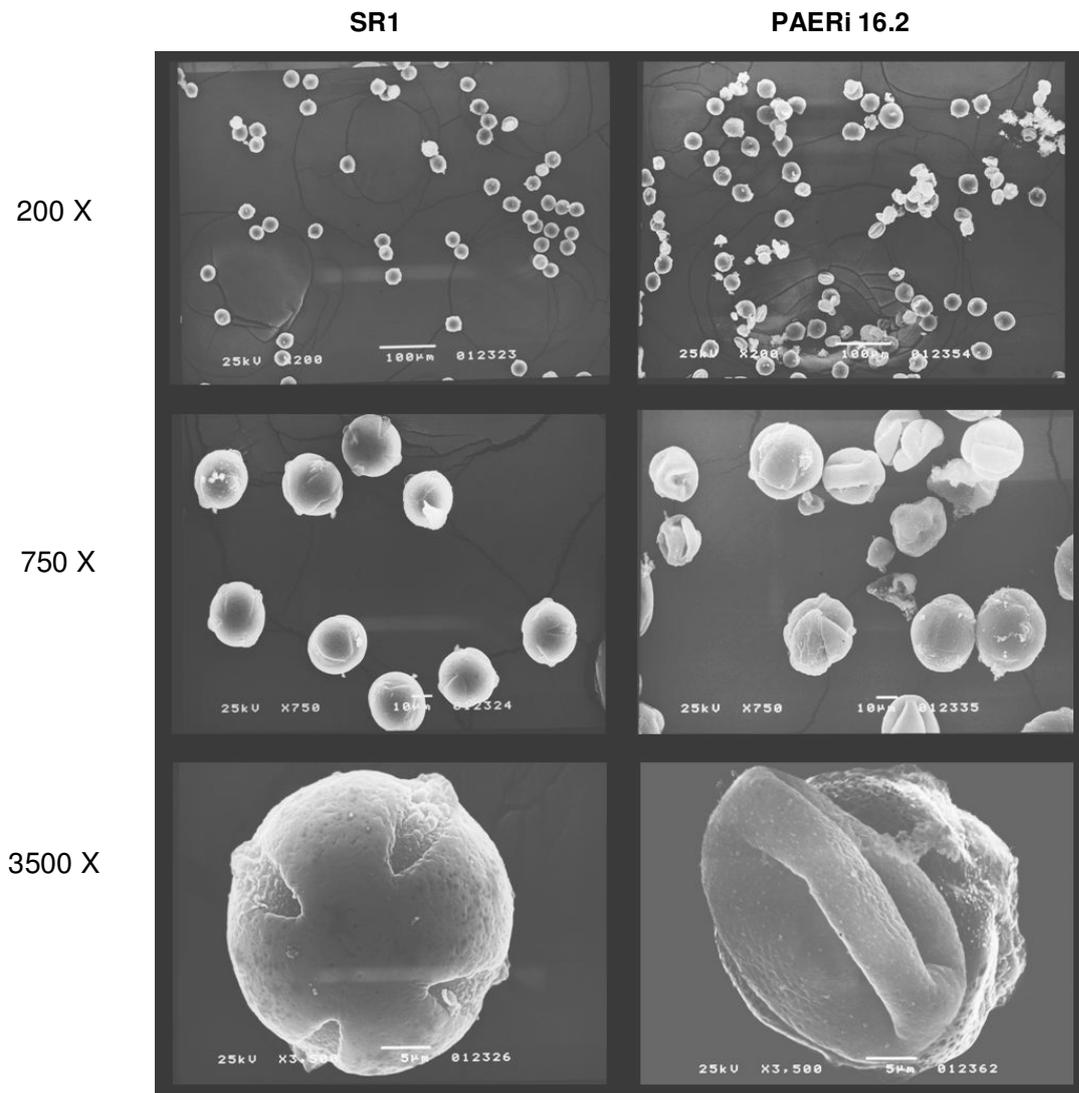


Figura 49: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos grãos de pólen da planta controle não transformada (SR1) e da planta de RNAi (PAERi-16.2) nos aumentos indicados.

A desesterificação de pectinas é mais acentuada na deiscência e na germinação do pólen (Suárez-Cervera *et al.*, 2002). O processo de germinação envolve mudanças na parede dos grãos de pólen que facilitam a formação do tubo polínico e seu subsequente crescimento. Neste estudo, alterações na parede do pólen foram correlacionadas com a ausência de pectina desesterificadas. Em pólen de *Euphorbia peplus* L., epítomos de pectinas desesterificadas são densamente localizados na parte interna da intina média e também na parte externa da intina,

sendo restritos ao centro e ao redor da abertura do pólen (Suárez-Cervera *et al.*, 2002). Comparando os grãos de pólen da planta PAERi 16.2 com a planta controle (SR1) (Figura 49), é possível sugerir que a alteração na desesterificação das pectinas tenha afetado a formação normal do pólen e o estabelecimento das aberturas. A Figura 50 mostra claramente as diferenças na escultura da parede celular dos grãos de pólen de SR1 e PAERi 16.2. Com o aumento de 15.000x pode ser observado que os sulcos da superfície do grão de pólen no mesocolpium, presentes em SR1, estão bem diminuídos em PAERi 16.2, apresentando uma superfície mais lisa.

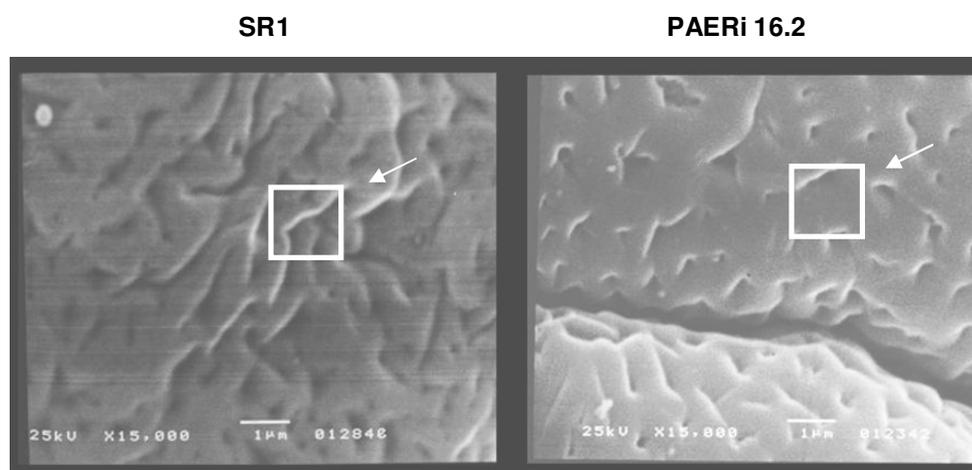


Figura 50: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos grãos de pólen da planta controle não transformada (SR1) e da planta de RNAi (PAERi 16.2). As setas mostram as diferenças da escultura da parede celular dos grãos de pólen em um aumento de 15.000X.

Estudos sobre uma pectina metilesterase de *Linum usitatissimum* L. (Lupme3), específica de pólen, em plantas transgênicas antisense de *N. tabacum*, demonstraram que a ornamentação de ondas da parede celular do grão de pólen foi dramaticamente reduzida, sugerindo um envolvimento da desmetilação da pectina na estrutura da parede celular do pólen e na diminuição na germinação do grão de pólen (Lacoux *et al.*, 2003). Desse modo, foi sugerido que a atividade da PME é necessária para o desenvolvimento normal do pólen e, provavelmente, tem um papel na elaboração peculiar da estrutura da parede celular do grão de pólen (Lacoux *et al.*, 2003). Apesar do gene *NtPAE1* ser específico do pistilo e não ser expresso em

estames, estes resultados podem ser explicados pelo fato da construção de RNAi ter sido feita com uma região conservada entre as pectina acetilesterases. Da mesma forma que uma sequência de PME de *L. usitatissimum* foi capaz de causar o silenciamento do gene de PME em pólen de *N. tabacum*, a construção de RNAi para *NtPAE1*, feita sob controle do promotor 35S (constitutivo), poderia resultar no silenciamento de outro gene que codifica uma PAE expressa em grãos de pólen, o que explicaria os resultados aqui encontrados. Embora o mecanismo preciso, responsável pelas alterações fenotípicas observadas na planta transgênica, não seja conhecido, é plausível propor que o silenciamento da PAE tenha afetado a morfologia do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico em direção ao ovário.

4.15. Análise estrutural dos tecidos do pistilo de *N. tabacum* através de microscopia óptica

Para complementar os estudos de análise fenotípica nas plantas transgênicas de superexpressão e silenciamento do gene *NtPAE1*, foram coletados estigmas/estiletos no estágio 11 do desenvolvimento floral (Koltunow *et al.*, 1990), de plantas transgênicas PAESp 8.1 e PAERi 16.2 e planta selvagem SR1. Este material vegetal foi imediatamente fixado, emblocado em parafina, cortado em 10µm de espessura e colocado em lâminas. Os cortes foram desidratados e corados com vermelho de rutênio 0,02% (Johansen, 1940), a fim de visualizar a presença de pectinas nas células da zona secretória e do tecido transmissor. O vermelho de rutênio é um corante que se liga nos espaços intramoleculares dos grupos carboxílicos da pectina (Hou *et al.*, 1999).

Na Figura 51 pode-se visualizar a zona secretória e o começo do tecido transmissor de PAERi 16.2 (A e D), SR1 (B e E) e PAESp 8.1 (C e F), corados com vermelho de rutênio, que evidenciou as pectinas presentes nos estigmas/estiletos de *N. tabacum*. Como pode ser observado, no tecido transmissor do estilete de PAERi 16.2 (Figura 51 D) a coloração mostrou-se mais intensa do que SR1 (Figura 51 E), o que indica um tecido mais compactado, devido a maior quantidade de pectina presente, provavelmente ocasionado pelo silenciamento do gene da *NtPAE1*. Este

fato também explicaria uma possível redução do crescimento do tubo polínico observada na planta PAERi 16.2. O silenciamento da PAE provavelmente causou a redução da atividade das pectinases responsáveis pela degradação das pectinas presentes na parede celular do tecido transmissor, diminuindo a formação dos espaços intercelulares e, conseqüentemente, dificultando o crescimento do tubo polínico até o ovário. Por outro lado, a coloração das células do tecido transmissor na planta PAESp 8.1 (Figura 51 F) mostrou uma marcação mais fraca do que na planta controle SR1 (Figura 51 E), mostrando uma diminuição de pectinas no tecido. As pectinas têm sido consideradas como moléculas de adesão entre as células, estando implicadas no desenvolvimento de espaços intercelulares (Jarvis *et al.*, 2003), através da degradação ocasionada e regulada pela atividade das pectinases. O resultado é coerente com o aumento da expressão da enzima PAE, responsável por hidrolisar especificamente os acetil ésteres, possuindo uma função crítica na modificação da parede celular (Breton *et al.*, 1996), o que resultou em uma maior dissociação celular no tecido transmissor de estilete.

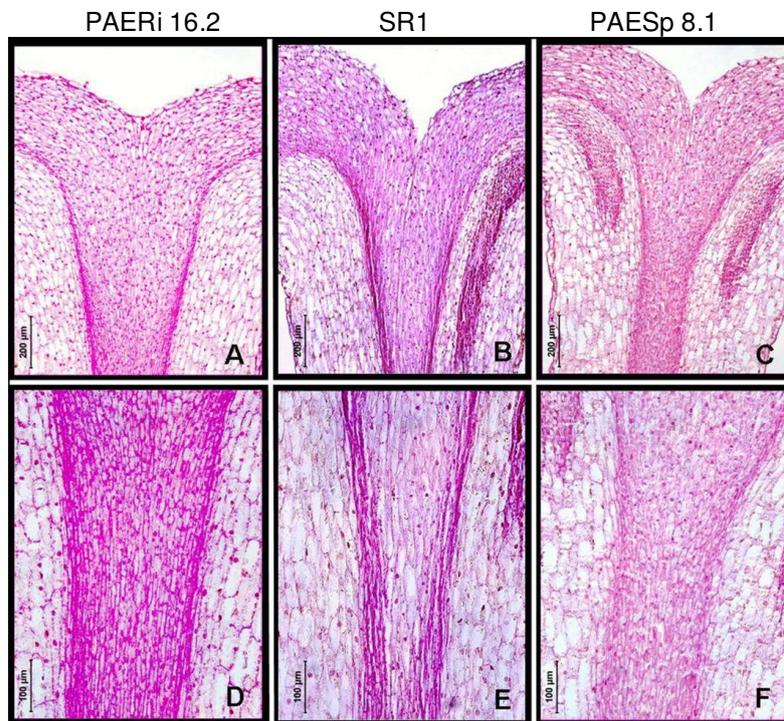


Figura 51: Microscopia óptica dos estigmas/estiletos (estágio 11), corados com vermelho de rutênio. (A) PAE1Ri-16.2, (B) SR1 controle e (C) PAE1Sp-8.1 (a barra corresponde a 200µm

(D) PAE1Ri-16.2, (E) SR1 controle e (F) PAE1Sp-8.1 (a barra corresponde a 100µm. Esta coloração evidencia a presença de pectinas.

Diversos relatos têm demonstrado a importância da atividade da PME no controle das propriedades da parede celular e, assim, no desenvolvimento e crescimento do tubo polínico e sua interação com os tecidos florais femininos (Wakeley *et al.*, 1998; Futamura *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Bosch e Hepler, 2005). Os resultados aqui relatados fortalecem a hipótese de que a PAE, preferencialmente expressa no estigma/estilete de *N. tabacum*, tenha uma importante função na dissociação das células do tecido transmissor do estilete, permitindo a formação de espaços intercelulares durante o desenvolvimento floral e possibilitando o adequado crescimento do tubo polínico. Embora muitas questões precisem ainda ser esclarecidas, está evidente que a atividade das pectina esterases (PAE e PME) tem um papel central no controle das propriedades da parede celular durante o processo reprodutivo das plantas.

4.16. Análise do fenótipo e dosagem de pectina nos estigmas/estiletos das plantas transgênicas da geração T1

A análise da dosagem de pectina foi feita com as plantas da geração T1, ou seja, oriundas das sementes das plantas transgênicas primárias (T0). Análises feitas em descendentes das plantas transgênicas primárias permitem verificar a estabilidade da expressão do transgene e eliminar possíveis efeitos advindos da cultura de tecidos (variação somaclonal). Com esta finalidade, algumas sementes das plantas transgênicas (PAESp 1.1; PAESp 8.1; PAESp 10.1 e PAERi 16.2) foram colocadas em meio seletivo contendo canamicina. As sementes resistentes à canamicina e, portanto, contendo o T-DNA, foram levadas para a casa de vegetação. Apenas uma planta T1 descendente dos transgênicos primários PAESp 1.1, 8.1 e PAERi 16.2 foi analisada. Como estas plantas foram originadas do cruzamento do transgênico primário com o pólen de SR1, elas são heterozigotas para o transgene e, teoricamente, idênticas ao transgênico primário. Entretanto, 4 plantas descendentes

da PAESp 10.1 foram levadas para a casa de vegetação, devido ao fato das sementes desta planta serem oriundas de uma autopolinização e estarem segregando (as plantas resistentes podem ser heterozigotas ou homozigotas para o transgene).

Ao analisar as plantas transgênicas (T1), foram observadas algumas alterações no fenótipo das plantas PAESp 8.1 e PAESp 10.1 com relação ao fenótipo das plantas transgênicas parentais (transgênicos primários). Por outro lado, as plantas T1 de PAESp 1.1 e PAERi 16.2 permaneceram com o mesmo fenótipo da geração T0. A planta PAESp 8.1 (T1) apresentou flores robustas e firmes, diferentes da geração T0 e parecidas com a flor de PAERi 16.2 (dados não mostrados), mas apresentou uma formação de frutos com tamanho similar ao do fruto de SR1 (Figura 52).

Inicialmente, a planta PAESp 10.1.A (uma das decedentes de PAESp 10.1) apresentou uma quantidade menor de flores e ramos, sendo que, na primeira florada apresentou uma certa anormalidade nos estigmas/estiletos (Figura 53), que pode ter sido causada pelo excesso de pectinas desesterificadas. A Figura 53 mostra estigmas/estiletos deformados na primeira florada da planta PAESp 10.1.A e, depois, as flores se tornam mais flexíveis. Mais tarde no desenvolvimento, os estigmas/estiletos desta planta voltaram a ter um aspecto normal, ou seja, um pouco menos rígidos, e formação de frutos pequenos se comparados com os de SR1. É possível especular que o excesso de atividade da PAE tenha causado um aumento na liberação de prótons, reduzindo o pH e, conseqüentemente, aumentado a atividade das pectinas hidrolases (PG e PL). Em adição, a atividade de PME em plantas também pode ser regulada por inibidores de PME (PMEIs; Giovanne *et al.*, 2004). PMEIs são proteínas que inibem a atividade da PME através da formação de um complexo reversível (1:1), onde a estabilidade é dependente do pH, sendo maior em condições ácidas, típicas do ambiente apoplástico (Bosch e Hepler 2005). Entretanto, até hoje nada se sabe sobre inibidores de PAE.

As demais plantas PAESp 10.1 (PAESp 10.1.B, 10.1.C e 10.1.D) apresentaram flores maiores que as da planta PAESp 10.1 (T0) e similares as da planta selvagem (Figura 54). Entretanto, na primeira florada também foi observada

uma alteração no tamanho de frutos, que eram maiores do que os frutos de SR1 (Figura 55). É possível que o aumento dos frutos possa estar relacionado com o aumento da expressão do gene *NtPAE1* e uma maior dissociação celular no tecido transmissor do estilete, facilitando a interação pólen-pistilo e aumentando o número de tubos polínicos que alcançam o ovário.

Estudos têm mostrado que muitos fatores interferem no modo de ação das PMEs, tais como pH, grau inicial de desmetilesterificação das pectinas e a presença de cátions (Catoire *et al.*, 1998; Denés *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2005). Baseado nos diferentes aspectos dos fenótipos das plantas transgênicas de superexpressão (nas gerações T0 e T1), é possível que esses fatores também estejam afetando o modo de ação da PAE. O modo de ação das PMEs pode ser ao acaso, em pH ácido, ou linear, que ocorre em pH básico (Micheli, 2001). A desmetilesterificação ao acaso dos homogalacturonanos libera prótons, que promovem a ação das enzimas despolimerases e contribui para a degradação da parede celular (Goldberg, 1996). A desmetilesterificação linear dos homogalacturonanos, através das PMEs, aumenta os blocos de carboxil livres que podem interagir com cálcio, criando o pectato gel, que limita a ação das despolimerases, contribuindo para o enrijecimento da parede celular (Micheli, 2001). Esses diferentes mecanismos de ação podem influenciar na interação pólen-pistilo, favorecendo ou inibindo o crescimento do tubo polínico. A Figura 56 mostra um esquema que representa as possibilidades no modo de ação das PMEs (Micheli, 2001), que também podem ser sugeridas como hipótese para a ação da PAE.

Devido aos fenótipos das plantas PAESp 10.1.B, PAESp 10.1.C e 10.1.D serem muito similares entre si, a dosagem de pectina foi feita somente nas plantas PAESp 10.1.A e PAESp 10.1.B.



Figura 52: **A:** Fruto da planta PAESp 8.1 (T1) e **B:** Fruto da planta selvagem (SR1). O tamanho dos frutos da planta transgênica, na geração T1, foi similar ao da planta selvagem.

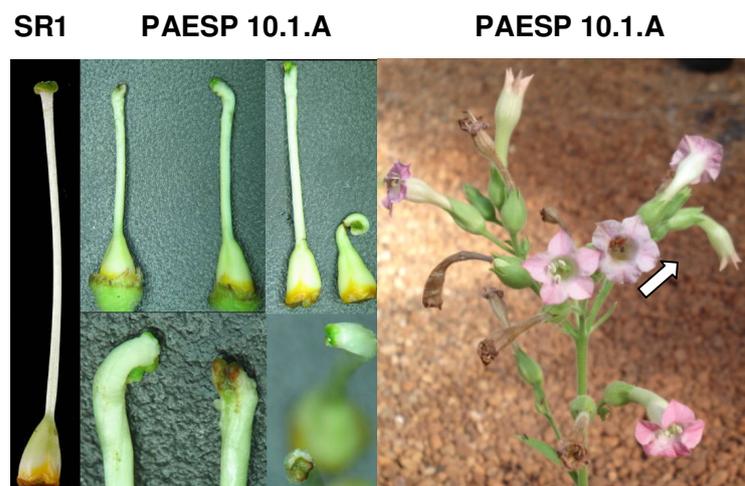


Figura 53: Pistilo da planta PAESp 10.1.A (T1), que apresenta anormalidade se comparado com o estigma/estilete de SR1. Ao lado é mostrado um ramo de flores da planta PAESp 10.1.A, com aspecto mais flexível (seta branca).

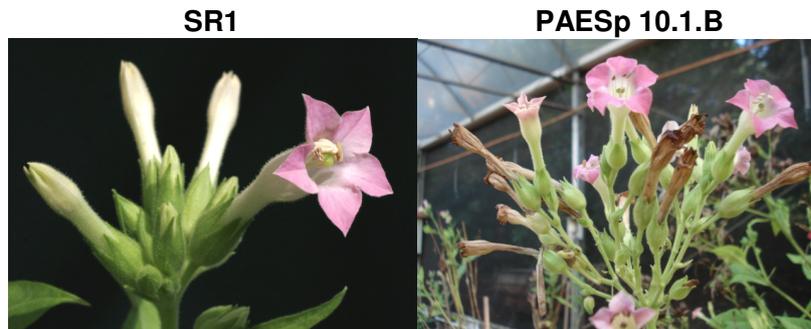


Figura 54: Ramo de flores de SR1 comparado com o ramo de flores da planta PAESp 10.1.B (T1). Pode ser visto que as flores apresentam um fenótipo similar ao de SR1. Entretanto, esta planta apresenta alteração na formação de frutos, quando comparada com o controle (SR1).



Figura 55: A: Fruto da planta PAESp 10.1.B (T1) e **B:** Fruto da planta selvagem (SR1). O tamanho dos frutos da planta transgênica, na geração T1, foi maior do que na planta selvagem.

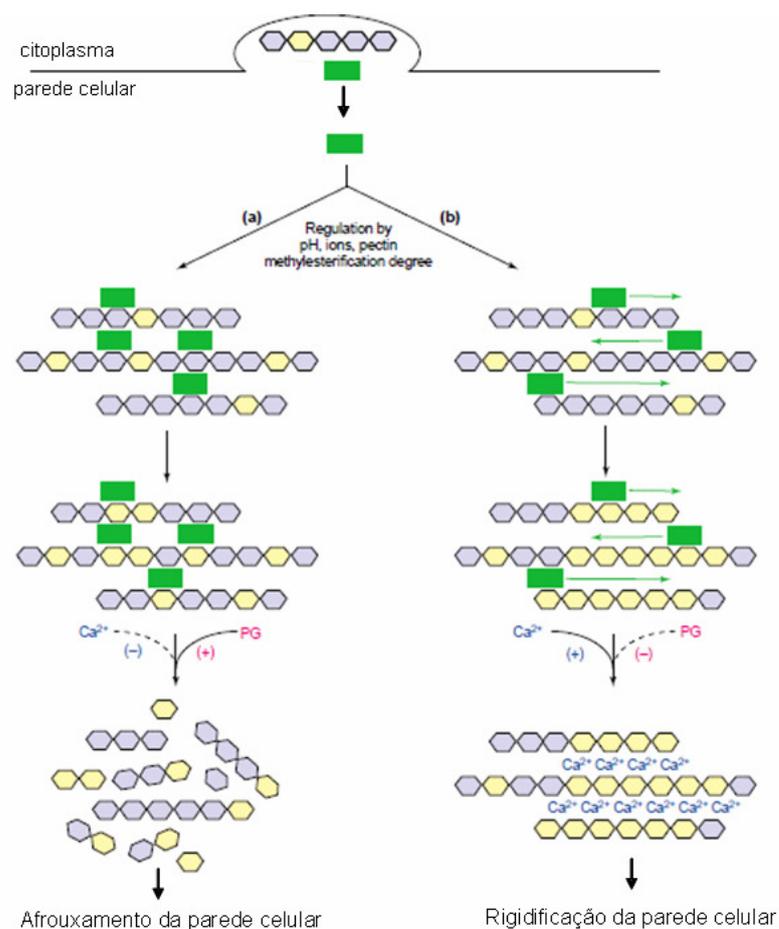


Figura 56: Modo de ação das PMEs (retângulos verdes) que depende das propriedades da parede celular, podendo agir ao acaso (a) ou de forma linear (b). Em azul aparecem os ácidos galacturônicos metilesterificados e em amarelo os ácidos galacturônicos desmetilesterificados. (Modelo modificado a partir de Micheli, 2001).

Para realizar a dosagem de pectina, os estigmas/estiletos das plantas transgênicas (estágio 11) e plantas controle (SR1) foram coletados e macerados. Após a maceração do tecido, foram adicionados ácido sulfúrico e carbazole, para a quantificação por espectrofotometria dos ácidos galacturônicos na sua forma livre, segundo Taylor (1993). Como pode ser visto na Figura 57, as plantas PAERi 16.2, PAESp 8.1 e PAESp 10.1.A apresentaram uma dosagem maior de pectina e as plantas PAESp 1.1 e PAESp 10.1.B uma dosagem menor de pectina, com relação à planta selvagem (SR1). O valor da dosagem de pectina na planta transgênica PAERi 16.2 foi 10 vezes maior em relação ao observado na planta SR1, o que está de

acordo com o silenciamento do gene *NtPAE1* e sua atividade de pectinase, causando o aumento do nível de pectina.

Surpreendentemente, as plantas PAESp 8.1 e PAESp 10.1.A (T1) apresentaram um nível mais alto de pectina, respectivamente, 3 e 8 vezes em relação ao nível na planta SR1. Entretanto, era esperado que estas plantas, com a superexpressão do gene *NtPAE1*, que participa da degradação de pectinas, apresentassem uma quantidade menor deste composto. Baseado nas análises dos fenótipos das plantas PAESp 8.1 e PAESp 10.1.A (T1) e na maior quantidade de pectina, pode-se supor que o gene *NtPAE1* endógeno e o transgene tenham sido silenciados por um mecanismo denominado de co-supressão (Taylor, 1997). Para verificar esta hipótese, as plantas de superexpressão (T1) foram analisadas por RT-PCR em tempo real (item.4.17).

Já as plantas PAESp 1.1 e 10.1.B mostraram um nível de pectina 3 e 2 vezes menor em relação ao observado na planta selvagem. Este fato está de acordo com o esperado para plantas com a superexpressão do gene *NtPAE1*.

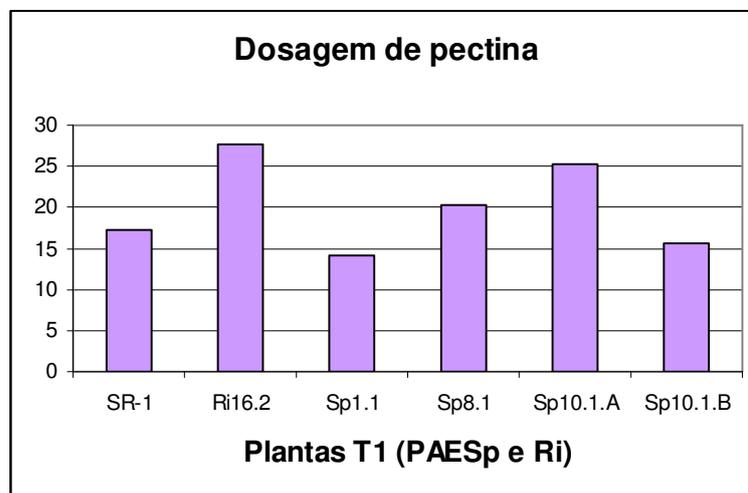


Figura 57: Dosagem de pectina a partir de estigmas/estiletos das plantas transgênicas (T1) de superexpressão e RNAi.

4.17. Análise das plantas de superexpressão (T1) por RT-PCR em tempo real

Para a análise da expressão do gene *NtPAE1* nas plantas da geração T1, foram coletadas amostras de estigmas/estiletos das plantas transgênicas PAESp 1.1, 8.1, 10.1.A, e 10.1.B e da planta selvagem (SR1), dos quais foram extraídos RNAs para a síntese de cDNA. O cDNA de cada amostra foi analisado em uma PCR em tempo real, utilizando os “primers” RT-PAE-F e RT-PAE-R, que pareiam na sequência codificadora do gene *NtPAE1*. Todas as reações foram normalizadas utilizando os “primers” específicos para o gene da β -actina.

A Figura 58 mostra que o transgênico de superexpressão PAESp10.1.A apresentou um nível de expressão de *NtPAE1* 2,5 vezes maior do que a planta selvagem, enquanto que o transgênico T1 PAESp 8.1 apresentou um nível de expressão de 0,4 vezes em relação ao nível da planta selvagem, considerado igual a 1. Nas demais plantas transgênicas o nível de expressão foi de 1,45 para a planta PAESp 1.1 e 1,2 vezes para a planta PAESp 10.1B, comparados com o da planta selvagem. Com esta análise, foi possível verificar que a planta transgênica PAESp 8.1 apresentou uma redução significativa na expressão do gene *NtPAE1* (Figura 58), o que explica o aumento observado na quantidade de pectina (Figura 57). Essas análises confirmam a ocorrência do fenômeno de co-supressão do gene *NtPAE1* na planta PAESp 8.1. O fenômeno de co-supressão foi inicialmente observado quando plantas de petúnia foram transformadas com uma construção contendo o gene da chalcone sintetase, sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (Napoli *et al.*, 1990). A superexpressão do gene chalcone sintetase, que participa da via biossintética de antocianinas, gerou flores onde as pétalas eram brancas e/ou com setores de cor azul clara (Napoli *et al.*, 1990). Outros trabalhos realizados com o objetivo de superexpressar um gene de interesse, para análises funcionais, relataram a ocorrência do fenômeno de co-supressão (Tsai *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002), o que sugere que este fenômeno é um evento que não está limitado a transgenes particulares ou a algumas espécies de plantas (Depicker e Van Montagu, 1997).

As plantas PAESp 1.1, e 10.1 (10.1.A e 10.1.B), de superexpressão do gene *NtPAE1*, mantiveram o mesmo padrão de expressão das plantas T0. Apesar da planta transgênica PAESp 10.1.A apresentar uma expressão maior do gene em

estudo, também apresentou uma maior quantidade de pectina. Isto pode ser explicado pelo suposto enrijecimento da parede celular, causado pelo excesso de pectinas desesterificadas, que forma o pectato que se liga ao cálcio, limitando a ação das despolimerases (Chen e Ye, 2007).

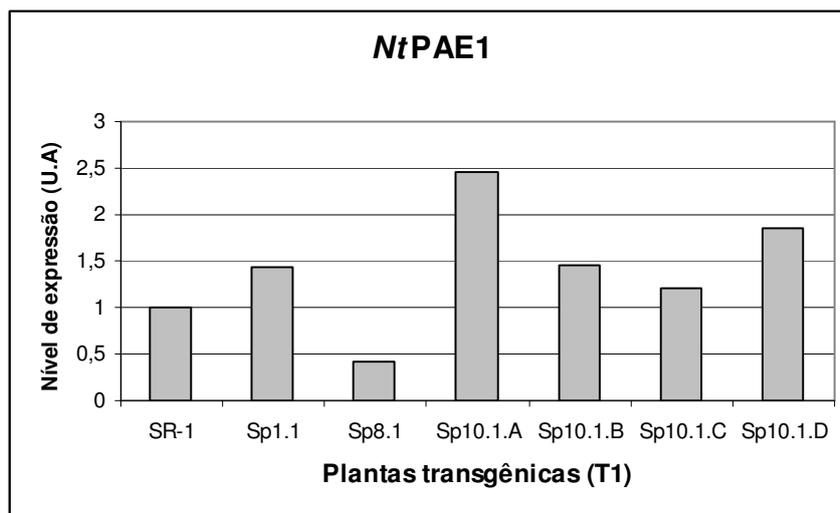


Figura 58: O gráfico representa a expressão do gene *NtPAE1* nos estigmas/estiletos (estágio 11) das plantas transgênicas de *N. tabacum* em unidades arbitrárias (U.A). A expressão de genes em unidades arbitrárias corresponde à razão do número de cópias do cDNA do gene *NtPAE1* em relação ao número de cópias do gene constitutivo usado como controle (β -actina).

4.18. Análise do estilete das plantas transgênicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para uma análise mais detalhada dos fenótipos das plantas transgênicas T1, estiletos foram coletados a partir destas plantas. Os tecidos foram fixados e preparados para os estudos de microscopia de varredura, a fim de verificar alterações morfológicas no tecido transmissor do estilete nas plantas transgênicas PAESp 8.1, PAESp 10.1.B e PAERi 16.2, em comparação com a planta selvagem SR1.

A Figura 59 mostra as diferenças encontradas no tecido transmissor das plantas transgênicas T1 PAESp 8.1 e PAERi 16.2, comparando com a planta selvagem (SR1). É possível observar que o tecido transmissor das plantas transgênicas (PAESp 8.1 e PAERi 16.2) apresenta-se mais compactado em relação ao tecido transmissor da planta selvagem (SR1). Isto está de acordo com a diminuição no nível de transcritos de *NtPAE1* nas plantas, o que resulta em uma parede celular mais rígida e com maior adesão. O efeito da co-supressão na planta PAESp 8.1 causou um aumento na adesão celular no tecido transmissor, mas este efeito não foi suficiente para impedir o crescimento do tubo polínico e a formação de frutos.

A Figura 60 mostra as diferenças na região do tecido transmissor das plantas transgênicas PAESp 10.1.B e PAERi 16.2, comparando com a planta selvagem (SR1). Podem ser observadas as diferenças na dissociação das células do tecido transmissor, sendo que na planta PAESp 10.1.B esta dissociação mostrou-se ainda maior que SR1. Desse modo, é possível sugerir que o gene *NtPAE1* está envolvido na dissociação das células do tecido transmissor, facilitando o crescimento do tubo polínico.

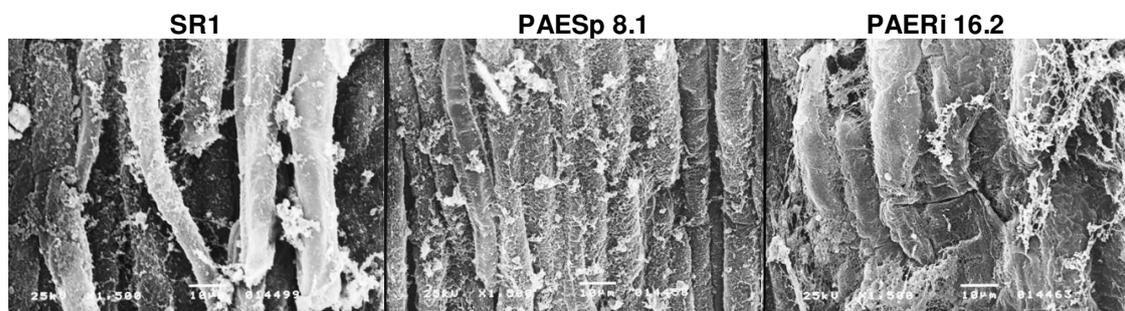


Figura 59: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de estiletos no estágio 11 da planta selvagem (SR1), e das plantas transgênicas (PAESp 8.1 e PAERi 16.2). A Figura evidencia as diferenças na região do tecido transmissor do estilete das plantas transgênicas em relação à planta selvagem, em um aumento de 1.500X.

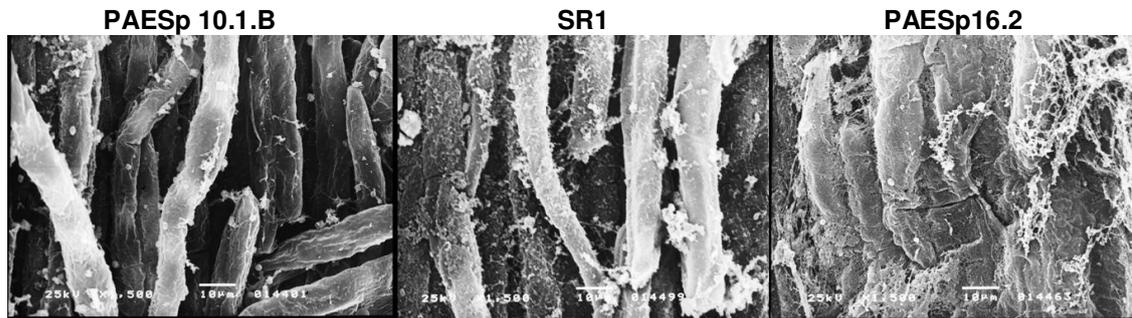


Figura 60: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de estiletes no estágio 11 da planta selvagem (SR1), e das plantas transgênicas (PAESp 10.1B e PAERi 16.2). A Figura evidencia as diferenças na região do tecido transmissor do estilete das plantas transgênicas em relação à planta selvagem, em um aumento de 1.500X.

4.19. Teste de segregação do transgene

Os princípios de Mendel dizem que, em um heterozigoto, um alelo pode encobrir a presença de outro. Alguns alelos evidentemente controlam o fenótipo, mesmo quando estão presentes em uma única cópia, e a inserção de uma única cópia de um transgene, no genoma de uma planta, é um exemplo deste tipo de dominância. O heterozigoto transgênico, possuidor de uma cópia do transgene, formará dois tipos de gametas: metade terá o transgene e metade não terá. Neste caso, o alelo transgênico é transmitido fielmente para a geração seguinte, por estar integrado no DNA de um dos cromossomos. A base biológica do fenômeno da segregação é o pareamento e subsequente separação de cromossomos homólogos durante a meiose.

A segregação teórica (esperada) do auto-cruzamento de um heterozigoto transgênico (p.ex.: transgênico primário), que possua apenas uma única cópia do transgene seria a segregação mendeliana (3:1), isto é, para cada 3 indivíduos que possuam o fenótipo do transgene, um não possuirá. Por outro lado, a segregação teórica (esperada) do cruzamento do transgênico primário, contendo uma única cópia do transgene, com a planta selvagem (SR1) seria de 1:1.

Para estabelecer o provável número de transgenes inseridos nas plantas PAESp 1.1, PAESp 8.1, PAESp 10.1 e PAERi 16.2 por meio da segregação dos mesmos, sementes destas plantas foram colocadas em meio MS (Murashige e Skog, 1962) contendo canamicina. Após um mês de desenvolvimento, foi feita uma contagem do número de plântulas que apresentaram resistência à canamicina e das que não apresentaram. Estas podem ser identificadas pela coloração esbranquiçada, causada pela ação da canamicina em plantas sensíveis.

As sementes da planta PAESp 10.1 foram geradas por autopolinização. Na Tabela 6 são mostrados os resultados obtidos e o teste estatístico aceitando a hipótese da segregação 3:1. A aceitação da segregação proposta ocorre quando os valores dos qui-quadrados, para cada planta analisada, é menor que o valor crítico. Portanto, pode-se concluir que esta planta possui um único transgene inserido em seu genoma.

As sementes das plantas PAESp 1.1, PAESp 8.1 e PAERi 16.2 foram geradas por cruzamentos com pólen de SR1 e, portanto, caso possuam um único transgene, deveriam apresentar uma segregação 1:1 (resistente:sensível). A Tabela 7 mostra os resultados obtidos para estas plantas e as respectivas análises estatísticas. Como pode ser verificado, as plantas PAESp 1.1, PAESp 8.1 e PAERi 16.2 apresentaram uma segregação na proporção 1:1, o que está de acordo com a hipótese de segregação testada. Assim, pode-se concluir que estas plantas também possuem apenas uma cópia do transgene.

Tabela 6: Análise de segregação das sementes que possuem e não possuem resistência à canamicina, em uma amostra de sementes da planta PAESp 10.1. Hipótese = 3 resistentes : 1 sensível.

Transgênico	Nº total de sementes	Observado		Esperado (3:1)		X ²	Valor crítico ^a	Hipótese
		R	S	R	S			
PAESp10.1	56	45	11	42	14	0,857143	3,841	Aceito

^a valor obtido utilizando 5 % de nível de significância e grau de liberdade um (1).

Tabela 7: Análise de segregação das sementes que possuem e não possuem resistência à canamicina, em uma amostra de diferentes plantas transgênicas independentes. Hipótese = 1 resistente : 1 sensível.

Transgênico	Nº total de sementes	Observado		Esperado (1:1)		X ²	Valor crítico ^a	Hipótese
		R	S	R	S			
PAESp 1.1	97	53	44	48,5	48,5	0,835052	3,841	Aceito
PAESp 8.1	129	65	64	64,5	64,5	0,007752	3,841	Aceito
PAERi 16.2	122	65	57	61	61	0,52459	3,841	Aceito

^a valor obtido utilizando 5 % de nível de significância e grau de liberdade um (1).

4.20. Amplificação da sequência codificadora do gene *NtPAE1* para entrada no sistema Gateway e expressão da proteína recombinante

Com a finalidade de expressar a proteína *NtPAE1* madura, em células *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, foram definidos os “primers” PAE1Bt e PAE ATT2, que permitem a incorporação das sequências attB1 e attB2 nas sequências internas do cDNA. O “primer” PAE1Bt contém parte da sequência do sítio de recombinação (attB1) e parte do cDNA referente ao gene *NtPAE1*, começando no códon que codifica o aminoácido de número 29 (D). Desta forma, o peptídeo sinal putativo é eliminado da sequência da PAE, resultando na expressão apenas da proteína madura. O “primer” PAE ATT2 contém parte da sequência do sítio de recombinação (attB2), e parte do cDNA referente ao gene *NtPAE1* contendo o códon de terminação.

Desse modo, foi feita a amplificação do cDNA 004A06 por meio de duas reações de PCR, originando o fragmento de DNA adequado, ou seja, com o sítio de recombinação completo para ser introduzido no sistema Gateway. Na Figura 61 é possível visualizar os fragmentos de DNA amplificados, após as duas reações de PCR. A raia 1 mostra o fragmento amplificado após a primeira reação de PCR (“primers” PAE1-Bt e PAE-ATT2). A partir de uma alíquota de 5 µl dessa reação

inicial, foi feita a segunda reação de PCR (“primers” BP1 e BP2) (raia 2). Ao final da segunda reação, o fragmento amplificado apresentou o tamanho esperado (aproximadamente 1116 pb), contendo em suas extremidades os sítios de recombinação attB1 e attB2 completos. Após a corrida eletroforética em gel de agarose, o fragmento foi isolado do gel e purificado. Posteriormente, este fragmento purificado de PCR foi introduzido, via reação de recombinação, no vetor de entrada pDONR201 do sistema Gateway (reação BP).

Uma alíquota de 1 µl do produto da reação BP foi utilizada para transformar células eletrocompetentes da cepa DH10B de *E. coli*. Após a eletroporação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina (50 µg/ml). Para confirmar a presença do inserto, foram escolhidas 10 colônias para mini-preparações de DNA e, posteriormente, foi verificada a eficiência da clonagem por digestão enzimática.

Na Figura 62 é possível visualizar os DNAs obtidos após as mini-preparações, digeridos com a enzima *Xho*I. Um total de nove clones (raias 1 a 5 e 7 a 10), confirmaram a presença dos dois fragmentos com os tamanhos esperados (um com aproximadamente 745 pb, e o outro com aproximadamente 2608pb). A raia 11 contém uma amostra de DNA do vetor pDONR201, sem o cDNA de interesse, que serve como controle negativo. Para a continuidade dos experimentos, foi utilizado o clone da raia 1, e este plasmídeo passou a ser chamado de pENTRY-PAE1Bt.

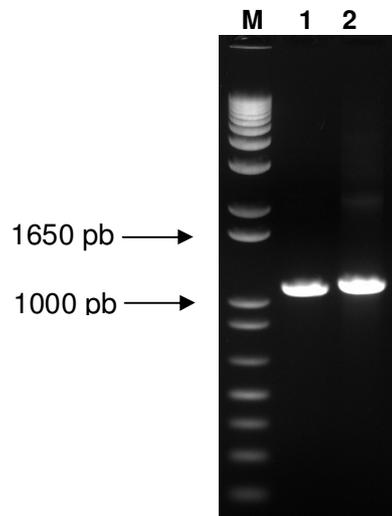


Figura 61: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando as ampliações do cDNA 004A06, referente ao gene *NtPAE1*, resultantes das duas reações de PCR, para a entrada no sistema Gateway. A raia 1 mostra a banda obtida após a primeira reação de PCR, utilizando os “primers” PAE1-Bt e PAE-ATT2, com o tamanho esperado (aproximadamente 1116pb). A raia 2 mostra a banda obtida após a segunda reação de PCR, utilizando os “primers” BP1 e BP2, com o tamanho esperado (aproximadamente 1130pb). M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

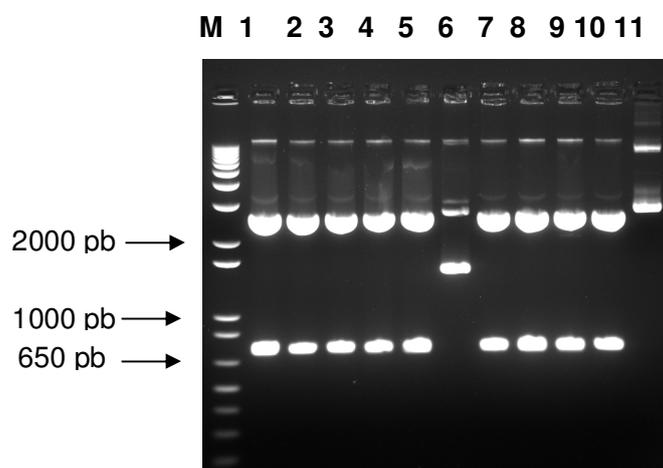


Figura 62: Mini-preparações de DNA das colônias originadas da reação BP, visando a obtenção do vetor de entrada pENTRY-PAE1Bt. Tais amostras foram digeridas com a enzima *Xho*I e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, gerando fragmentos com os tamanhos de banda de esperado (aproximadamente 745 pb e 2608 pb). M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A raia 11 mostra o plasmídeo pDONR201 sem inserto, utilizado como controle positivo.

4.21. Transferência da região codificadora da proteína NtPAE1 madura, para o vetor de expressão em *E. coli* (pDEST17)

Com o objetivo de transferir parte do cDNA 004A06, inserido no plasmídeo pENTRY-PAE1Bt, para o vetor de expressão (pDEST17), foi feita uma nova reação de recombinação (reação LR). Uma alíquota de 1 μ l do produto da reação LR foi utilizada para transformar células eletrocompetentes da cepa DH10B de *E. coli*. Após a eletroporação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo o antibiótico ampicilina (100 μ g/ml), obtendo-se um grande número de colônias. Das colônias obtidas, dez foram inoculadas e utilizadas para mini-preparações de DNA, os quais foram digeridas com as enzimas *Xho*I e *Hind*III. Após a digestão e corrida eletroforética, foram observados 3 fragmentos com os tamanhos de banda esperados (um de aproximadamente 745 pb, outro de 945 pb, e outro de 4325 pb), em todas as

amostras analisadas (Figura 63). Para a continuidade dos experimentos, foi feito o sequenciamento do clone 1, para verificar se houve uma correta recombinação nos sítios attB e a ausência de mutações que podem alterar a fase de leitura, ocasionando um erro durante a tradução da proteína desejada. Assim, após confirmação por sequenciamento, esse plasmídeo passou a ser chamado de pEXP17-PAE1.

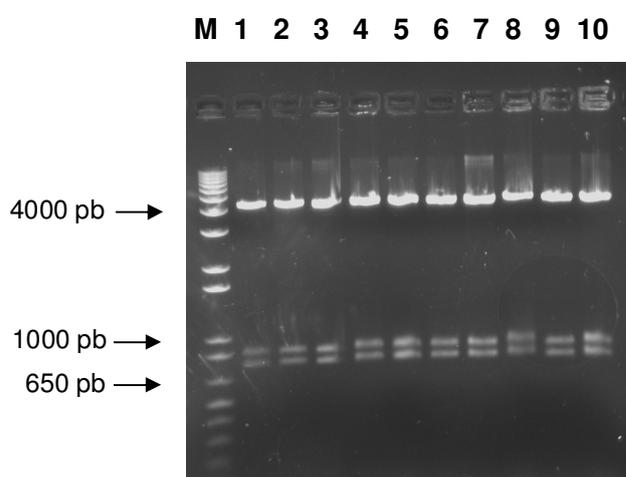


Figura 63: Mini-preparações de DNA das colônias originadas da reação LR, visando à obtenção do vetor pEXP17-PAE1. Tais amostras foram digeridas com as enzimas *Xho*I e *Hind*III, e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, gerando fragmentos com os tamanhos de bandas esperados (aproximadamente 745 pb, 945 pb e 4325 pb). M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.22. Expressão do clone pEXP17-PAE1 em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta

Escolheu-se a linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli* para a expressão da construção pEXP17-PAE1, devido a resultados bem sucedidos obtidos em nosso laboratório, com outras duas proteínas recombinantes, pEXP17-46B11 e pEXP17-134B02 (Avanci, 2006). Entretanto, antes de ser utilizado para a transformação de células dessa linhagem, a sequência de NtPAE1, a ser expressa a partir do

plasmídeo recombinante pEXP17-PAE1, foi submetida a uma análise quanto à presença de códons raros para *E. coli* (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/~sumchan/caltor.html>). A análise mostrou a presença de 43 códons raros na sequência do cDNA a ser expresso, destinado a produção da proteína recombinante pEXP17-PAE1 (Figura 64).

A linhagem BL21(DE3) Rosetta possui um plasmídeo adicional, que contém cópias extras de genes para RNAs transportadores (tRNAs), utilizados com menos frequência pela maquinaria de tradução da *E. coli*, tais como AGG e AGA para arginina, AUA para isoleucina, CUA para leucina, CCC para prolina e GGA para glicina. É derivada de cepas BL21 mutantes, contendo uma mutação no gene lacZY (lacY1 permease), a qual pode levar a níveis ajustáveis de expressão protéica por todas as células na cultura. Isso é possível, uma vez que essa mutação resulta em uma entrada uniforme e controlada de indutor nas células, o que favoreceria uma expressão mais bem regulada e homogênea da proteína recombinante. Tal regulação, associada à temperatura mais baixa de expressão (ex. 20°C), pode auxiliar e intensificar a solubilidade e a atividade da proteína de interesse (Novagen, 2002).

Número de bases da sequência nucleotídica = 1092

Número de códons totais = 364

Aminoácido	Códon raro	Frequência de ocorrência
Arginina	CGA	2
	CGG	0
	AGG	1
	AGA	8
Glicina	GGA	13
	GGG	4
Isoleucina	AUA	8
Leucina	CUA	2
Prolina	CCC	2
Treonina	ACG	3

Figura 64: Resultado da análise para a presença de códons raros na sequência do clone pEXP17-PAE1. Como pode ser verificado, um total de 43 códons raros estão presentes na sequência.

As células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta foram transformadas com o vetor pEXP17-PAE1, por eletroporação, e colônias isoladas foram obtidas em meio seletivo. Uma colônia isolada foi recuperada e cultivada por toda a noite, sob agitação, em 5 mL de meio LB, suplementado com ampicilina (100µg/ml) e cloranfenicol (34µg/ml). O antibiótico cloranfenicol é aqui utilizado como marcador de seleção para o plasmídeo contendo os genes para os RNAs transportadores dos códons raros nesta linhagem. Assim, após a indução da expressão e lise celular, os extratos protéicos obtidos, tanto para a fração precipitada (insolúvel), quanto para a fração sobrenadante (solúvel), foram submetidos à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A Figura 65 mostra os resultados obtidos após a aplicação dos extratos protéicos das frações sobrenadante e precipitado, resultantes da indução da expressão da proteína recombinante pEXP17-PAE1, variando a temperatura (37°C e 20°C) e o tempo de indução (3hs e 20hs). A análise do gel nos permite visualizar a

presença da banda com a massa esperada de 43,3 kDa, apenas nas frações precipitadas (raias 2 e 5).

A massa da proteína foi calculada com base na sequência de aminoácidos codificada pela parte clonada do cDNA 004A06 (proteína madura - 40,5 kDa), que juntamente com os aminoácidos do sítio attB1 de recombinação, e da "tag" de histidinas, presentes na região N-terminal da proteína (2,8 kDa), totaliza uma massa esperada de aproximadamente 43,3 kDa (www.expasy.org). A proteína madura (375 aminoácidos), correspondente a PAE de *Vigna radiata*, tem uma massa molecular calculada de aproximadamente 41,1 kDa (Breton *et al.*, 1996), bem similar a massa molecular da PAE de *N. tabacum*. Nas raias 3 e 6, correspondentes às frações sobrenadante, não é possível observar, visualmente, a presença da banda da proteína recombinante.

A ausência da proteína recombinante nas raias 1 e 4 era esperada, uma vez que estas amostras correspondem aos extratos proteicos obtidos antes da aplicação do indutor (T0h). Esta ausência indica que não houve expressão basal da proteína recombinante, fato esse que pode ocorrer em algumas linhagens celulares de expressão. A expressão basal, dependendo da proteína recombinante em estudo, pode ser tóxica para a célula, impedir o crescimento da cultura e, conseqüentemente, diminuir de maneira considerável a obtenção da proteína recombinante de interesse (Jana e Deb, 2005). Para a confirmação desse resultado, foi realizado um experimento de Western blot, por este ser mais sensível e apresentar maior especificidade, utilizando um anticorpo primário anti-histidinas na reação.

A Figura 66 mostra o resultado obtido ao final do experimento de Western blot, utilizando as frações celulares de *E. coli*, sendo possível observar a presença da banda da proteína recombinante pEXP17-PAE1 somente na fração celular insolúvel (precipitada), conforme indicado pelas setas (raias 2 e 5). A ausência da proteína recombinante na raia 1 era esperada, uma vez que esta amostra corresponde ao extrato proteico obtido antes da aplicação do indutor. É possível visualizar uma fraca marcação da proteína recombinante na raia 4, a qual corresponde a um pequeno vazamento da fração precipitada induzida a 20°C por 20h (raia 5).

Não foi possível visualizar a presença da banda da proteína recombinante nas frações solúveis (raias 3 e 6), o que pode estar relacionado com uma grande produção da proteína recombinante na fração precipitada, provavelmente na forma de corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são o resultado da agregação de proteínas recombinantes mal-dobradas, ou dobradas incorretamente, quando produzidas em altas taxas dentro das células de *E. coli* (Sorensen e Mortensen, 2005).

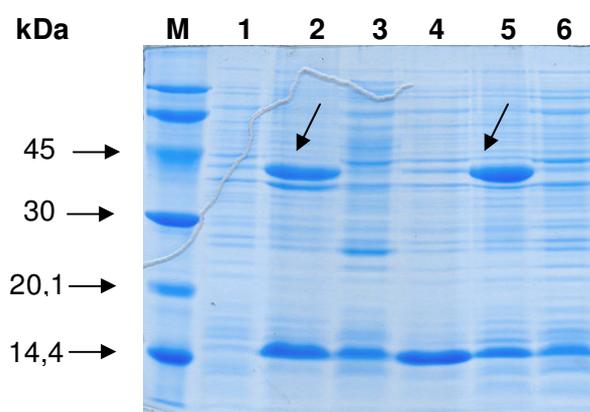


Figura 65: Eletroforese em SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue, contendo as frações precipitado e sobrenadante, resultantes da indução de expressão do clone pEXP17-PAE1, em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. M: marcador de massa molecular (LMW calibration – Amersham). Raias 1 e 4: amostras de precipitado+sobrenadante, retiradas antes da aplicação do indutor, e correspondentes ao T0hs (pré-indução), crescidas a 37° e 20°C, respectivamente; 2 e 5: frações insolúveis (precipitado), com 3hs de indução a 37°C, e 20hs de indução a 20°C, respectivamente; raias 3 e 6: frações solúveis (sobrenadante), com 3hs de indução a 37°C, e 20hs de indução a 20°C, respectivamente. As setas mostram as bandas com a massa esperada.

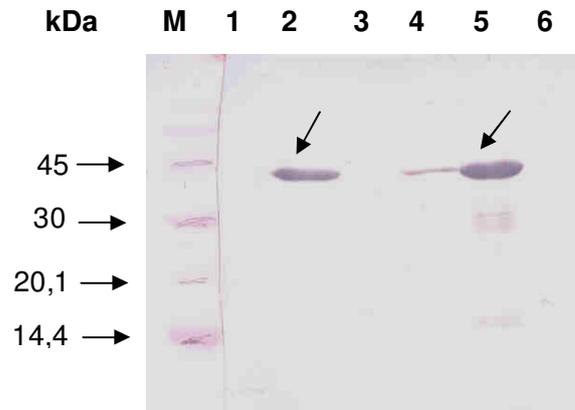


Figura 66: Análise por Western blot mostrando a presença das bandas da proteína recombinante pEXP17-PAE1, obtidas após a expressão em BL21(DE3) Rosetta. Todas as amostras apresentam 5 μ g de proteína total. Raias 1 e 4: amostras de precipitado+sobrenadante, retiradas antes da aplicação do indutor, e correspondentes ao T0hs (pré-indução) em 37 $^{\circ}$ C e 20 $^{\circ}$ C; Raias 2 e 5: precipitado após indução por 3hs a 37 $^{\circ}$ C, e após 20hs a 22 $^{\circ}$ C, respectivamente; Raias 3 e 6: sobrenadante após indução por 3hs a 37 $^{\circ}$ C, e após 20hs a 22 $^{\circ}$ C, respectivamente; kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM – Amersham). As setas indicam a presença da proteína recombinante nas amostras das raias 2 e 5.

Os resultados obtidos com a expressão do cDNA 004A06, clonado em vetor pDEST17, utilizando a linhagem BL21(DE3) Rosetta, mostraram a presença da proteína recombinante pEXP17-PAE1 apenas na fração precipitada (insolúvel) do extrato celular. Dessa forma, essa proteína insolúvel poderá ser utilizada para a produção de anticorpos policlonais que servirão para análises futuras, como por exemplo, Western blot, utilizando as proteínas nativas extraídas do próprio pistilo, e localização subcelular (imunolocalização). Anticorpos monoclonais são amplamente usados para análise de pectinas em plantas, porque eles permitem que os domínios estruturais definidos sejam precisamente localizados no contexto da arquitetura da parede celular intacta (Williats *et al.*, 2006). Estudos de localização imunocitoquímica de pectinas, utilizando anticorpos monoclonais primários, têm revelado que as pectinas desesterificadas foram localizadas principalmente na matriz extracelular do

tecido transmissor, em pistilos polinizados e não polinizados de *Petunia hybrida*. Após a polinização, o aumento temporário das pectinas desesterificadas permite a atuação das despolimerases de pectina que, conseqüentemente, causam uma diminuição das pectinas desesterificadas na região extracelular do tecido transmissor. Estas mudanças foram correlacionadas com mudanças na estrutura da matriz extracelular (Lenartowska *et al.*, 2001), facilitando o crescimento do tubo polínico.

Contudo, não foi possível obter a proteína recombinante pEXP17-PAE1 na fração solúvel para a realização de ensaios enzimáticos. Para se obter a proteína na forma solúvel, experimentos de otimização da expressão serão necessários no futuro.

4.23. Identificação de genes do TOBEST que codificam pectinases

Em nosso laboratório foi construída uma biblioteca de cDNAs de estigmas e estiletos de *N. tabacum*, os quais foram seqüenciados e cujas informações foram reunidas em um banco de dados denominado TOBEST (Quiapim *et al.*, 2009). Após uma análise deste banco de dados, várias seqüências que codificam pectinases (pectina acetilesterase, pectina metilesterase; pectato liase e poligalacturonase) foram encontradas e analisadas, confirmando a similaridade com seqüências depositadas no NCBI (BlastX) e no TAIR (TBlastX). No total, foi possível identificar 17 contigs e 30 singlets, expressos em estigma/estilete de *N. tabacum*, que codificam proteínas similares às pectinases.

A busca dos clones no TOBEST foi realizada por palavras chaves como “pectin”, “polygalacturonase” e “pectato lyase”. As seqüências de nucleotídeos dos clones encontrados foram analisadas em programas específicos. Inicialmente foi utilizado o programa BlastX do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), onde estas seqüências foram comparadas com outras já descritas no banco de dados internacionais, confirmando a identidade de cada seqüência como pectinase. Também foi feita uma análise comparando essas seqüências de pectinases do TOBEST com as seqüências de *Arabidopsis thaliana* depositadas no banco de dados TAIR (www.arabidopsis.org).

Além desta análise, foram identificadas várias seqüências, que codificam pectinases, originadas de uma biblioteca SSH de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum*. Esta biblioteca foi construída por hibridação subtrativa suprimida (SSH), que

permite retirar os transcritos expressos em outros tecidos e amplificar, por PCR, apenas os transcritos preferencialmente expressos no estigma/estilete de *N. tabacum* (De-Paoli, 2006). O fato de terem sido encontradas, nesta biblioteca, sequências codificando várias pectinases, provavelmente preferenciais do pistilo, indica a importância das pectinases no desenvolvimento deste órgão e seu funcionamento no processo reprodutivo.

A Tabela 8 (Anexo I) mostra 9 contigs e 9 singlets do TOBEST que apresentam similaridade com as pectinas acetilesterases (PAE). Dois contigs do TOBEST (TOBC009E01 e TOBC034B06) apresentaram identidade com sequências de contigs presentes na biblioteca de SSH (De-Paoli, 2006), sugerindo que os genes correspondentes tenham expressão preferencial no estigma/estilete de *N. tabacum*.

A Tabela 9 (Anexo I) mostra 3 contigs e 12 singlets do TOBEST que apresentam similaridade com a enzima pectina metilesterase (PME). Os clones TOBC010A01 e TOBS050F06 foram analisados por “macroarray”, para verificar se estes eram expressos de maneira preferencial no pistilo, mas nenhum apresentou tal padrão de expressão (Quiapim *et al.*, 2009). Além disso, a sequência TOBS100A01 do TOBEST apresentou total identidade com a sequência do clone SSH-001G05, demonstrando que ambos os clones pertencem ao mesmo gene. O clone SSH2-003C07 da biblioteca subtrativa, com putativa expressão preferencial no pistilo, é diferente das demais sequências encontradas no TOBEST. As enzimas pectina metilesterases (PMEs) têm sido implicadas em diferentes processos fisiológicos do desenvolvimento das plantas, modificando a parede celular (Bordenave and Goldberg, 1993; Kagan-Zur *et al.*, 1995; Guglielmino *et al.*, 1997; Wakeley *et al.*, 1998; Futamura *et al.*, 2000; Micheli *et al.*, 2000; Ren e Kermode, 2000; Li *et al.*, 2002). Além do mais, vários estudos têm identificado PMEs específicas do tubo polínico, as quais foram sugeridas como envolvidas no processo do crescimento do tubo polínico e sua interação com os tecidos especializados do pistilo (Wakeley *et al.*, 1998; Futamura *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002).

A Tabela 10 (Anexo I) mostra 2 contigs e 2 singlets do TOBEST, que apresentam similaridade com a enzima pectato liase. Os dois contigs TOBC058D03 e TOBC055B12 e o singlet TOBS079H11 foram analisados por “macroarray”, mas

nenhum apresentou expressão preferencial no estigma/estilete (Quiapim et al., 2009). O clone SSH-005D03, identificado por SSH, codifica uma proteína similar a pectato liase (De-Paoli, 2006). Em tomate, a enzima pectato liase foi identificada na ponta do tubo polínico e no citoplasma do pólen germinado “*in vitro*” (Ursin et al., 1989; Dircks et al., 1996).

A Tabela 11 (Anexo I) mostra 3 contigs e 7 singlets do TOBEST, que apresentam similaridade com a enzima poligalacturonase (PG). O clone TOBS023D02 é similar ao clone obtido a partir da biblioteca subtrativa (SSH3-001B06), podendo ser preferencial do pistilo. Já foi descrito que os tubos polínicos de milho, da planta do fumo e de *Oenothera organensis* contêm enzimas poligalacturonases (Brown e Crouch, 1990; Allen e Lonsdale, 1993; Dubald et al., 1993; Tebbutt et al., 1994). Dearnaley e Daggard (2001) descobriram, em *Brassica napus*, que o nível da enzima PG não aumenta no pólen germinado e sim na ponta do tubo polínico durante a penetração nas células papilares, apresentando um importante papel na modificação da parede do pistilo nesta espécie de estigma do tipo seco.

Como pode ser verificado, para cada uma das enzimas do grupo das pectinases foram encontradas várias sequências distintas no TOBEST, algumas com provável expressão preferencial no estigma/estilete. A presença de cDNAs codificando todas as principais enzimas da via de degradação das pectinas, representando genes expressos nos estigmas/estiletos, sugere a importância de controlar o afrouxamento entre as células destes tecidos para facilitar o crescimento dos tubos polínicos. Entretanto, a confirmação do significado biológico de todas estas sequências ainda precisa ser examinada experimentalmente.

4.24. Análise comparativa do gene *NtPAE1* em diferentes espécies do gênero *Nicotiana*

Sugere-se que a espécie *N. tabacum* seja um anfidiplóide natural ($2n = 48$), originado de hibridação interespecífica, com subsequente duplicação dos cromossomos, o que possibilitou a fertilidade do híbrido. Vários estudos têm sido

realizados sugerindo dois progenitores para *N. tabacum*, a espécie *N. sylvestris* como doador materno e *N. tomentosiformis* como doador paterno (Lee *et al.*, 1998; Volkov *et al.*, 1999; Fulnecek *et al.*, 2002; Murad *et al.*, 2002; Chase *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003). Entretanto, a hipótese de que *N. tabacum* é um anfidiplóide de *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis*, com adicional contribuição genômica a partir de *N. otophora* (Kenton *et al.*, 1993; Parokonny e Kenton, 1995; Papp *et al.*, 1996), é apoiado nos resultados de GISH (Hibridização Genômica “*in situ*”) (Chase *et al.*, 2003). Para contribuir com a análise desta questão e iniciar uma análise evolutiva do gene *NtPAE1*, homólogos deste gene foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de 5 espécies de *Nicotiana*, foram clonados e sequenciados, tendo suas sequências sido comparadas detalhadamente. Para esta finalidade, plantas das 5 espécies (*N. sylvestris*, *N. tabacum*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora* e *N. alata*) foram cultivadas em casa de vegetação e tiveram suas folhas coletadas, congeladas e usadas para extração de DNA genômico. Esta análise incluiu além das possíveis espécies ancestrais de *N. tabacum*, a espécie *N. alata*, que possui o sistema de auto-incompatibilidade de reconhecimento dos grãos de pólen, enquanto que *N. tabacum* é uma espécie auto-compatível (permite a auto-fecundação).

Através do alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes que codificam a pectina acetilesterase (PAE), de diferentes espécies, tais como: *Arabidopsis thaliana* (número de acesso gi|30690554-NM-130261.2), *Oryza sativa* (gi|115441562 – NM-001051596.1), *Vigna radiata* (gi|1431628 - X99348.1) e *N. tabacum* (*NtPAE1*, descrito neste trabalho), foram identificadas regiões de maior e de menor conservação (Figura 67). Baseado neste alinhamento, foram desenhados oligonucleotídeos (PAE7 e PAE8) em regiões com maior nível de conservação entre as sequências das diferentes espécies. O DNA genômico foi utilizado para amplificação, por PCR, das sequências homólogas ao gene *NtPAE1*, no genoma de *N. tabacum* e das quatro outras espécies do gênero *Nicotiana*, mencionadas acima (*N. sylvestris*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora* e *N. alata*).

<i>Oryza</i>	-----	
<i>Arabidopsis</i>	TCTCGCTATCAATCACACACATGCAACAGTACAAGATTTGTCAGAGTCCACAGAAATCGA	60
<i>Vigna</i>	-----	
<i>NtPAE1</i>	-----	
<i>Oryza</i>	-----ATGGGTT	7
<i>Arabidopsis</i>	TCTTTTCGAGTCAAGATTTTCAGCTCTGTTTCCAGACTCCGGCGGAGATGAAGAGTGTGT	120
<i>Vigna</i>	-----TCAACACCACACCTATCTTCCTCTGTGAAGACTTGTCTGTTAGCT	44
<i>NtPAE1</i>	-----	
<i>Oryza</i>	GT-TCTTGGGCTCTTGCTGCTCTGGTTCTTGGCTTCTTG--GTGGTGGCAGTCCATGGCT	64
<i>Arabidopsis</i>	GCGTATTGCGGCGCGATATTCTGGCT-TTGGCTGTTTTACGTGTTAGGTGTGATTGGGA	179
<i>Vigna</i>	GAAGCATTTTACAG-GCCACCATTTTCTTGACTACCTTT--CACTTACCATTTAAGAAT	101
<i>NtPAE1</i>	-----ATGGAGAAAGTGATGGATT	19
	* * *	
<i>Oryza</i>	CTGAGC-CGTGGCTGAATCAGACGC--AGGTCT-ACTCCACCAATGCCA--ACTC-TGGT	117
<i>Arabidopsis</i>	GTGGGAATGTGAGAGATACAGACGATGAGATCTCGTTACTCGAAAGTCA--ATTGGTGGT	237
<i>Vigna</i>	GGAGACCAGTAGAAAAGGGCCAATGGTTAAGTGTGCTGATATGTGTGGTACTATTACTAAA	161
<i>NtPAE1</i>	GTAECTCAATTCATGGCTGCAGT--GCTTTTTCTCTACTGTGTCT--TTG--GAC	71
	* * * * *	
<i>Oryza</i>	AGCA-----ATGGCGTCTTCGTCGGGA-----TTACGCTCATCCAGTCGGCGGCCGCCAA	167
<i>Arabidopsis</i>	GACATCTCCGTCGCGAGCTTCTTATGGTGCCTCTCACTTTGATTTCAGGCTGCTGCCTCCAA	297
<i>Vigna</i>	GGCA-----GAAGGAGTTCCTGTGGAA-----TCACTTTTGTGAAAATGCAGTGGCAAA	212
<i>NtPAE1</i>	AACAAGT-AAGGAGACCTCATGTGTA--TATAACCTACCTCGAGACTGCCATATCTAA	128
	** * * * * *	
<i>Oryza</i>	GGGAGCCGTATGCTTGGATGGGAGCTTACCAGGGTATCACCTACACCGAGGGTTGGATC	227
<i>Arabidopsis</i>	AGGAGCTGTGTGCCCTGGATGGAACTACTCTGGTTATCATCTACACCTGTTCTGGATC	357
<i>Vigna</i>	AGGAGCTGTTTGTGGATGGGAGTCCACCAGCTTACCCTTCCATAAGGGATCTGGAGC	272
<i>NtPAE1</i>	GGGTGCAGTATGCTTGGATGGAAAGTGTCCAGCTTTCCACTTTGATCCTGGAACCTGGTTC	188
	* * * * * * * * * * *	
<i>Oryza</i>	AGGGGCAACAGTTGGCTTGTCAATTTGGAGGGTGGAGGCTGGTGCAACGATGTTAAAAG	287
<i>Arabidopsis</i>	AGGAGCTAACCGTGGCTCATCAACTCGAGGGTGGAGGATGGTGCAACACACGTAGGAG	417
<i>Vigna</i>	AGGGATTAACAAGTGGATTGTTCACTTTGAGGGTGGAGGATGGTGCAACACGTTACTTC	332
<i>NtPAE1</i>	AGGAATTTATAGCTGGCTTATTCACCTTCAGGGTGGAGGATGGTGTGAACCATTTCATA	248
	*** * * * * * * * * *	
<i>Oryza</i>	CTGCGTGTTCGCAAGAGCAGTCGCGTGGTTTCATCAAAATCACATGGAGACCAACTCCA	347
<i>Arabidopsis</i>	CTGTATCTTCCGAAAACCACTCGCCGTGGTTTCATCAAAATCATATGGAGAAAAGTTTTGGC	477
<i>Vigna</i>	TTGCCTTCTCGTAGGGACACTCGATTAGGCTCATCTAAAAAATGGATACCAACTTTC	392
<i>NtPAE1</i>	CTGCCAATATCGTGCACTTACG-GACTTA--TCTTCAAAAAATATGCAAAATATATCTTA	305
	* * * * * * * * * *	
<i>Oryza</i>	GTTTACTGGGATAATGAGTAACAGGCCTGAAGAAAATCCTGATTTCTACAACCTGGAACAG	407
<i>Arabidopsis</i>	CTTCACTGGAATATGAGCAATAAATCTAATGAGAATCCTGACTTCTTCAACTGGAACAG	537
<i>Vigna</i>	CTTTTCTGGATTTTATAGTAACAGTAAAAAGTTCAATCCAGATTTCTACGATTGGACAG	452
<i>NtPAE1</i>	TTTTACTGGAGTTTTAAGTAGCGATCCTCAACTT <u>AATCCAGACTTCTACAACCTGGAACAG</u>	365
	* * * * * * * * * *	
<i>Oryza</i>	AGTGAAGGTTTCGATATTGTGATGGCGGATCCTTCACTGGTGATGGGGCTGATGCGTCTGC	467
<i>Arabidopsis</i>	AGTCAAATTCGTTACTGCGATGGTGCCTTTCACCGCGGATAGTCAGGATGAGAGCTC	597
<i>Vigna</i>	AATCAAGGTTAGGTATTGTGATGGGTTCATCAATTTACTGGTGATGTTGAAGCTGTTGATCC	512
<i>NtPAE1</i>	AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTTCATCGTATACTGGCGATATTGAAGAAGTTGATCC	425
	* * * * * * * * * *	
<i>Oryza</i>	AG-----GCCTTTATTTCCGAGGTCAGCGTATTTGGCAGGCTGCTATGGATGATCTGAT	521
<i>Arabidopsis</i>	AC-----AACTTACTATAGAGGACAACGAATCTGGCATTGAGCTATGGAAGAACTACT	651
<i>Vigna</i>	AGCAACCAATTTGCACTTCAGAGGATCAAGGGTTTTTGTGCTGTTGTTGATGATTTACT	572

<i>Oryza</i>	GAGAATTGCTGAAGCAGTAGGGCGACTGGTTTTTCGATAGGGCAGACGCGAAGTACACAGA	1163
<i>Arabidopsis</i>	GACCGTTGCTGAAICTGTTGGTGATTGGTACTTTGACAGAACACAGTGAAAGCCATTGA	1308
<i>Vigna</i>	AACAATTGCGAAGGCAGTTGGAGACTGGTATTATGATCGAAAGCCATTAAAGCAGATAGA	1229
<i>NtPAE1</i>	GACGATCGCTGAAGCTGTTGGAGATGGTTTTTCGACCGAAGTGGGTTCCAAGAAGTTTA	1145
	* * ** * * ** ** * ** * * * *	
<i>Oryza</i>	CTGTGCATACCCTTGTGATGGTACCTGCCATCATCTTACATTAGGGGAGATTACTAA--	1221
<i>Arabidopsis</i>	CTGTCCTTACCCCTGTGACAAAAACATGTCACAATCTCATCTCAAGTGAGATGACAAATG	1368
<i>Vigna</i>	TTGTGCCTACCCTTGCAACCCCACTTGCCACAATCGTATTTTGTGATCAGAATGAGCGTCC	1289
<i>NtPAE1</i>	TTGCCCTTATCCCTGTGGCAAATTTGCCAGTAGAGT-TTCTATTTTGTACTACTATTT	1204
	** * ** ** ** * ** * * * * *	
<i>Oryza</i>	-----	
<i>Arabidopsis</i>	ACATATACTCTTCAAACCTCAAACAGCTTACTTGATTCTTATACCATACTACCATTAGTAA	1428
<i>Vigna</i>	AGACGTATAGATTTCAAATTAAGCAGTATG-TGAATTATCACTACAAACTATCAT-----A	1343
<i>NtPAE1</i>	AAGATTATTTTTTTTATTATTATGTTTT-TTACAAGTGGAGTATCTAGCAAT-----G	1258
<i>Oryza</i>	-----	
<i>Arabidopsis</i>	CAACAATTCCTGAAAAACCGCATTTCATCTTTTACATAATATGTGCTATTTTACTCAAA	1488
<i>Vigna</i>	TAATAGTTGTTGGTGATTCTTCTCAAATGTGTTTGTGATGATTTA-GAAATGTAAGCGTATG	1402
<i>NtPAE1</i>	CAAGAAGTT-----AGTTAGCTCTAGTATCTTAGAT-ATTTGTTATCCAACACTACTCATG	1311
<i>Oryza</i>	-----	
<i>Arabidopsis</i>	TAAAGTTAGTTTTTCGTGTGTTTTGTTTTAATCCTTGGATTCATTGTATCTAATACACAA	1548
<i>Vigna</i>	CACCCCTCA--TAAAAGGATGCTAAATGTCA-CCATGCAACCACAAAATCTATCAAAAAA	1459
<i>NtPAE1</i>	TAATTGCTTAACATTGTTTCGTCAAACCTTGCAATTCGTTTTTCACGTTTTAAAAA	1371
<i>Oryza</i>	-----	
<i>Arabidopsis</i>	AGCATCAGACTCTGCTTTTCATAAAAAGAGTAACTGATTTTATATGTGATTGTAGAATTG	1608
<i>Vigna</i>	AAAAAAAAA-----	1469
<i>NtPAE1</i>	AAAAAAAAA-----	1380

Figura 67: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos genes que codificam pectina acetilesterases (PAE) de diferentes espécies, tais como: *Arabidopsis thaliana* (gi|30690554 – NM-130261.2), *Oryza sativa* (gi|115441562 – NM-001051596.1), *Vigna radiata* (gi|1431628 – X99348.1) e *N. tabacum* (*NtPAE1*). As regiões em negrito e grifadas correspondem as seqüências dos “primers” PAE7 e PAE8.

Após a reação por PCR, foi feito um gel de eletroforese em agarose 1%, para verificar se ocorreu a amplificação das seqüências homólogas ao gene *NtPAE1*. Baseado na seqüência do cDNA de *NtPAE1*, esperava-se que os “primers” desenhados amplificassem uma seqüência de 506pb, na ausência de possíveis íntrons. Na Figura 68, pode-se visualizar a amplificação das seqüências homólogas ao gene *NtPAE1*, observando, nas raias 1 a 5, os fragmentos de ~500pb amplificados

no DNA genômico de *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora* e *N. alata*, respectivamente. Além do fragmento de aproximadamente 500pb, foi possível observar a amplificação de outros fragmentos nas demais espécies de *Nicotiana*. *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *N. tomentosiformis* e *N. otophora* apresentaram ainda a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000pb, e um fragmento adicional de aproximadamente 850pb em *N. otophora*. Em *N. alata* foram observados dois fragmentos, um de aproximadamente 850pb e outro maior que 1000pb.

As bandas adicionais podem corresponder a outras cópias do gene para pectina acetiltransferase nas diferentes espécies, sugerindo a existência de uma família multigênica. Entretanto, para a confirmação dessa hipótese, as bandas adicionais teriam que ser analisadas.

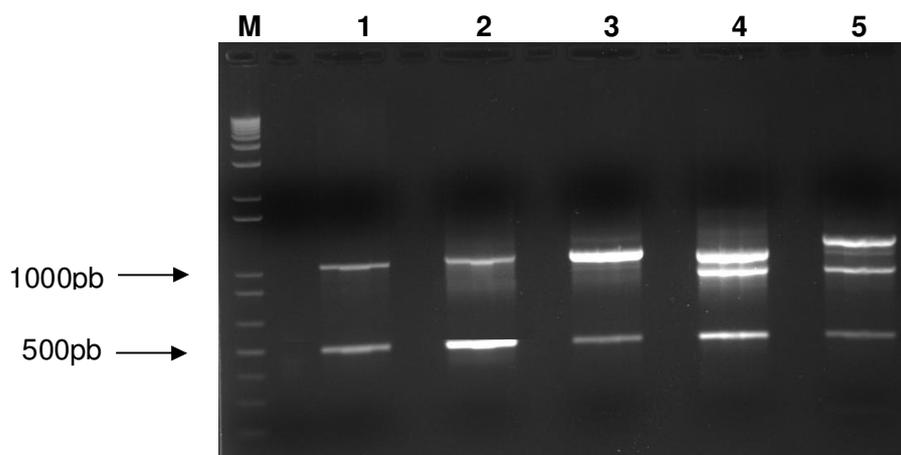


Figura 68: Eletroforese em gel de agarose 1%, de amostras de DNA genômico de *N. sylvestris* (1), *N. tabacum* (2), *N. tomentosiformis* (3), *N. otophora* (4) e *N. alata* (5), amplificadas por PCR, utilizando “primers” desenhados em regiões conservadas para as sequências de PAE (PAE-7 e PAE-8). M: Marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen).

4.25. Análise dos fragmentos de aproximadamente 500pb, amplificados a partir do DNA genômico das diferentes espécies de *Nicotiana*

Os fragmentos de ~500pb, amplificados nas diferentes espécies de *Nicotiana*, foram cortados do gel de agarose e purificados com fenol/clorofórmio. Após a purificação, o DNA foi ressuspenso em 10 µl de água destilada autoclavada e foram feitas, separadamente, 5 reações de ligação no vetor de clonagem (TOPO TA cloning – Invitrogen), utilizando 1µl de cada um dos produtos de PCR.

Para analisar a presença do inserto (~500pb) no vetor, as colônias originadas a partir das transformações foram usadas para mini-preparações de DNA plasmidial. Foram feitas mini-preparações de 16 colônias de *N. tabacum*, 5 colônias de *N. tomentosiformis*, 58 colônias de *N. sylvestris*, 36 colônias de *N. otophora* e 6 colônias de *N. alata*. As amostras foram digeridas com a enzima *EcoRI*, e aplicadas em gel de agarose (1%) para confirmar a presença do inserto nas colônias.

As Figuras 69 e 70 mostram 16 amostras de *N. tabacum*, 1 de *N. sylvestris* e 5 de *N. tomentosiformis*, digeridas com a enzima *EcoRI*, e separadas em gel de agarose (1%). Todas as amostras de *N. tabacum* e 4 amostras de *N. tomentosiformis* apresentaram o inserto com tamanho esperado (~500pb). A Figura 71 mostra 6 amostras de *N. alata*, 6 de *N. otophora* e 6 de *N. sylvestris* digeridas com a enzima *EcoRI* em gel de agarose (1%). Todas as amostras de *N. sylvestris*, 5 de *N. otophora* e 5 de *N. alata* apresentaram o inserto com tamanho esperado (~500pb).

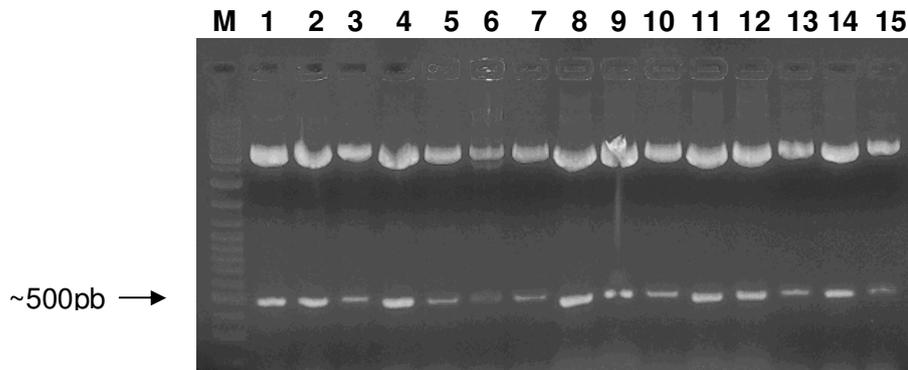


Figura 69: Eletroforese em gel de agarose 1%, contendo as mini-preparações de DNA, obtidas das colônias originadas da transformação com o vetor PCR2.1, ligado aos fragmentos genômicos amplificados. As amostras foram digeridas com a enzima *EcoRI*. Raias 1 a 15: amostras correspondentes à espécie *N. tabacum*. M: marcador de massa molecular (DNA Ladder Mix – Fermentas). A seta indica os insertos com o tamanho de banda esperado (506pb).

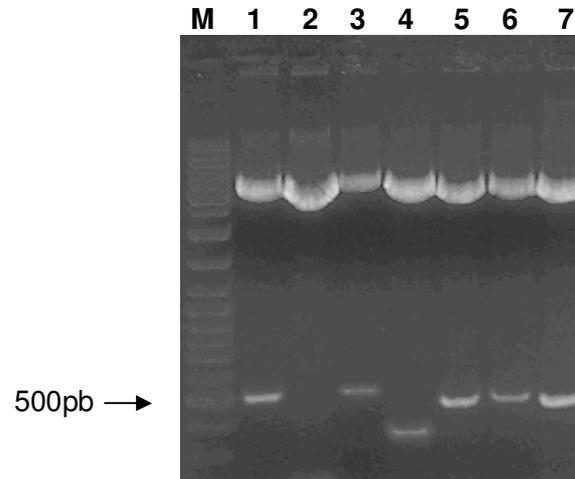


Figura 70: Eletroforese em gel de agarose 1%, contendo as mini-preparações de DNA, obtidas das colônias originadas da transformação com o vetor pCR2.1, ligado aos fragmentos genômicos amplificados. As amostras foram digeridas com a enzima *EcoRI*. A raia 1 corresponde à espécie *N. tabacum*, na raia 2 encontra-se material da espécie *N. sylvestris* e as raias 3 a 7 correspondem à espécie *N. tomentosiformis*. M: marcador de massa molecular

(DNA Ladder Mix – Fermentas). Nas raias 2 e 4 não foi observado o fragmento esperado de ~500 pb, assim as amostras foram descartadas.

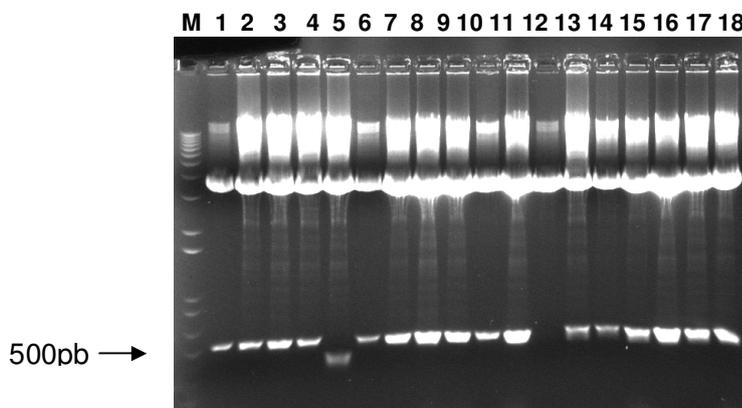


Figura 71: Eletroforese em gel de agarose 1%, contendo as mini-preparações de DNA, obtidas das colônias originadas da transformação com o vetor PCR2.1, ligado aos fragmentos genômicos amplificados. As amostras foram digeridas com a enzima *EcoRI*. As raias de 1 a 6 correspondem à espécie *N. alata*, nas raias de 7 a 12 encontram-se as amostras da espécie *N. otophora* e as raias 13 a 18 correspondem à espécie *N. sylvestris*. M: marcador de massa molecular (1 Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen). Nas raias 5 e 12 não foi observado o fragmento esperado de ~500pb, assim as amostras foram descartadas.

Após a confirmação do tamanho dos insertos clonados (~500 pb), em 16 amostras de *N. tabacum*, 4 de *N. tomentosiformis*, 41 de *N. sylvestris*, 30 de *N. otophora* e 5 de *N. alata*, estas foram seqüenciadas em um sentido, utilizando o “primer” M13R, a partir do vetor pCR2.1 (Invitrogen). Após o sequenciamento, as identidades das seqüências foram analisadas através do programa BlastX (Altschul *et al.*, 1997). Todas as seqüências obtidas a partir do genoma *N. tabacum*, *N. tomentosiformis* e *N. alata* apresentaram similaridade com a PAE. Entretanto, somente 7 seqüências de *N. sylvestris* e 1 de *N. otophora*, apresentaram similaridade com a PAE.

Devido à dificuldade de encontrar clones de *N. otophora* com similaridade a PAE, foi feita uma nova amplificação a partir do DNA genômico desta espécie. Após a

ligação ao vetor plasmidial, da nova banda de 500pb, esta foi introduzida em *E. coli*. Foram feitas mini-preparações de DNA plasmidial de 9 colônias de *N. otophora* e, posteriormente, essas amostras foram digeridas com *EcoRI*. A Figura 72 mostra que os clones de *N. otophora* apresentaram diferenças em relação ao tamanho do inserto, sendo que um clone apresentou um tamanho de banda acima de 500pb, quatro clones apresentaram bandas de ~500pb e três clones apresentaram bandas abaixo de 500pb. Devido às diferenças no padrão esperado de bandas, todas as amostras foram seqüenciadas e analisadas pelo programa BlastX. De 9 clones de *N. otophora*, somente 6 clones apresentaram similaridade com a PAE. Nas raias 1, 2, 3, 5, 6 e 9 pode-se visualizar os clones que apresentaram identidade com a PAE, os quais representam heterogeneidade de tamanhos.

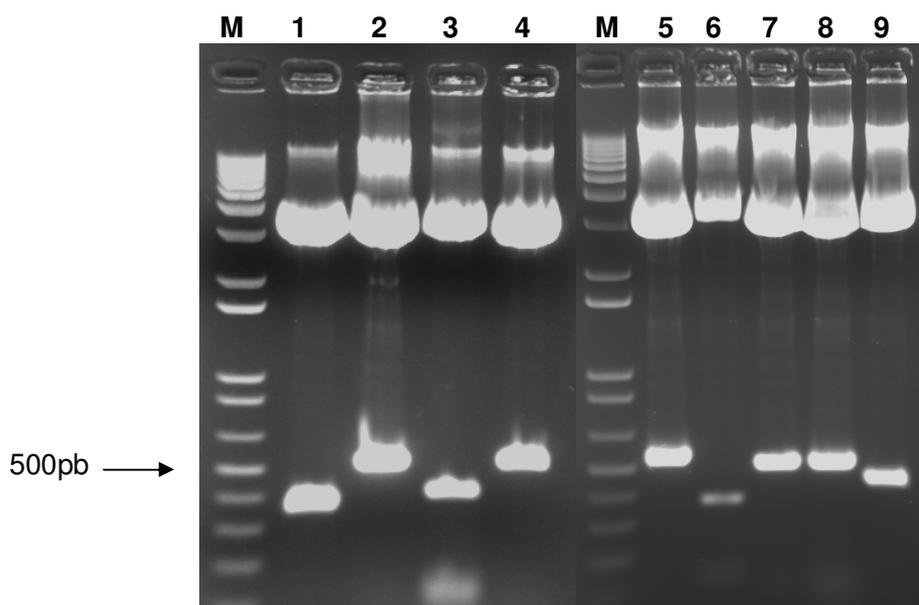


Figura 72: Eletroforese em gel de agarose 1%, contendo as mini-preparações de DNA, obtidas das colônias originadas da transformação com o vetor pCR2.1, ligado ao fragmento genômico amplificado. As amostras foram digeridas com a enzima *EcoRI*. As raias de 1 a 9 correspondem à espécie *N. otophora*. M: marcador de massa molecular (1 Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen).

Devido à grande semelhança entre as sequências dentro de cada espécie, apenas 4 clones referentes a cada espécie foram seqüenciados nos dois sentidos, utilizando mais uma vez o “primer” M13R e o “primer” T7. Entretanto, as sequências de *N. otophora*, diferentemente das 4 outras espécies, apresentaram grandes diferenças entre si. Assim, todos os 6 clones foram totalmente seqüenciados. Após o seqüenciamento completo dos clones de todas as espécies, as sequências foram analisadas e montadas pelo programa Phred/Phrap/Consed (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998), formando um consenso de seqüência para cada clone. Posteriormente, foi feito um alinhamento dos 4 consensos de sequências referentes a cada uma das espécies (*N. sylvestris*, *N. tabacum*, *N. tomentosiformis* e *N. alata*), mostrando a identidade entre as sequências (Anexo II). A análise das sequências de *N. otophora* permitiu a divisão das 6 sequências em 4 grupos, baseados em suas similaridades: 1) formado pelos clones 3 e 6, que são praticamente idênticos entre si (463 em 465 bases); 2) formado pelos clones 5 e 10, que também são praticamente idênticos (412 em 417 bases); 3) o clone 2 parecido com os clones 3 e 6, mas apresentando vários “gaps” em relação a estas duas outras sequências; e 4) o clone 9, muito diferente dos outros 3 grupos de sequências de *N. otophora*, mas muito semelhante às sequências de PAE das outras 4 espécies de *Nicotiana* analisadas. O alinhamento entre um representante de cada um dos 4 grupos de sequências de *N. otophora* também pode ser visto no Anexo II.

O alinhamento das sequências mostrou a presença de algumas diferenças de bases mesmo entre as sequências dentro de uma mesma espécie (Anexo II). Com a finalidade de verificar se as diferenças entre estas sequências são estatisticamente diferentes, optou-se por uma análise probabilística através do programa *Hyphy* (*Hypothesis Testing Using Phylogenies*) desenvolvido por Pond *et al.* (2005), considerando 2 sequências, possivelmente distintas, de *N. tabacum*, 3 de *N. sylvestris*, 3 de *N. tomentosiformis*, 4 de *N. alata* e 6 de *N. otophora*. A análise adotada foi a “*standard relative rate pairwise*”, com o modelo HKY85. A partir deste método, foi feita uma comparação de sequências par a par, utilizando a seqüência de PAE em tomate (*Solanum lycopersicum*) como grupo externo. A análise resultou em

154 comparações referentes à comparação de cada sequência com as demais, e um valor associado (*p-value*) para cada comparação.

A análise do programa mostrou os seguintes resultados: (1) nas comparações realizadas entre as diferentes sequências de *N. otophora*, 73,3% (11/15) são estatisticamente diferentes, assumindo $p < 0,05$; (2) comparando *N. otophora* com as demais sequências, 83,3% (60/72) foram significativamente diferentes; (3) nas demais comparações, nenhum valor de *p-value* mostrou-se estatisticamente relevante, indicando que nenhuma diferença entre as sequências (*N. tabacum*, *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis* e *N. alata*) pode ser estatisticamente considerada, assumindo *S. lycopersicum* como referência.

Tabela 12: Análise de comparação entre as sequências da PAE, obtidas a partir do genoma das diferentes espécies de *Nicotiana*, pelo programa HyPhy, utilizando a sequência da PAE em tomate como grupo externo. *valores de P-Value considerados estatisticamente diferentes.

Grupo externo			P-Value
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. tabaco-3</i>	0,653
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. tomentosiformis-3</i>	0,653
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. tomentosiformis-5</i>	0,996
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. tomentosiformis-1</i>	0,450
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. sylvestris-18</i>	0,834
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. sylvestris-20</i>	0,838
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. sylvestris-44</i>	0,655
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. otophora-2</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. otophora-3</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. otophora-5</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. otophora-6</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. otophora-10</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. otophora-9</i>	0,415
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. alata-4</i>	0,774
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco-5</i>	<i>N. alata-21</i>	0,803

<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -5	<i>N. alata</i> -1	0,480
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -5	<i>N. alata</i> -3	0,655
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. tomentosiformis</i> -3	1,000
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. tomentosiformis</i> -5	0,625
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. tomentosiformis</i> -1	0,225
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. sylvestris</i> -18	0,423
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. sylvestris</i> -20	0,426
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. sylvestris</i> -44	1,000
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. otophora</i> -2	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. otophora</i> -3	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. otophora</i> -5	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. otophora</i> -6	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. otophora</i> -10	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. otophora</i> -9	0,631
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. alata</i> -4	0,382
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. alata</i> -21	0,403
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. alata</i> -1	0,554
<i>Solanum</i>	<i>N. tabaco</i> -3	<i>N. alata</i> -3	1,000
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. tomentosiformis</i> -5	0,625
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. tomentosiformis</i> -1	0,225
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. sylvestris</i> -18	0,423
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. sylvestris</i> -20	0,426
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. sylvestris</i> -44	1,000
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. otophora</i> -2	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. otophora</i> -3	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. otophora</i> -5	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. otophora</i> -6	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. otophora</i> -10	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. otophora</i> -9	0,631
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. alata</i> -4	0,382
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. alata</i> -21	0,403
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. alata</i> -1	0,554
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -3	<i>N. alata</i> -3	1,000

<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. tomentosiformis</i> -1	0,476
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. sylvestris</i> -18	0,885
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. sylvestris</i> -20	0,889
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. sylvestris</i> -44	0,627
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. otophora</i> -2	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. otophora</i> -3	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. otophora</i> -5	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. otophora</i> -6	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. otophora</i> -10	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. otophora</i> -9	0,396
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. alata</i> -4	0,832
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. alata</i> -21	0,858
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. alata</i> -1	0,465
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -5	<i>N. alata</i> -3	0,627
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. sylvestris</i> -18	0,828
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. sylvestris</i> -20	0,833
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. sylvestris</i> -44	0,225
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. otophora</i> -2	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. otophora</i> -3	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. otophora</i> -5	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. otophora</i> -6	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. otophora</i> -10	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. otophora</i> -9	0,418
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. alata</i> -4	0,545
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. alata</i> -21	0,796
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. alata</i> -1	0,477
<i>Solanum</i>	<i>N. tomentosiformis</i> -1	<i>N. alata</i> -3	0,225
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. sylvestris</i> -20	0,999
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. sylvestris</i> -44	0,425
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. otophora</i> -2	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. otophora</i> -3	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. otophora</i> -5	0,001*

<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. otophora</i> -6	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. otophora</i> -10	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. otophora</i> -9	0,275
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. alata</i> -4	0,901
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. alata</i> -21	0,997
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. alata</i> -1	0,339
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -18	<i>N. alata</i> -3	0,425
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. sylvestris</i> -44	0,428
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. otophora</i> -2	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. otophora</i> -3	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. otophora</i> -5	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. otophora</i> -6	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. otophora</i> -10	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. otophora</i> -9	0,276
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. alata</i> -4	0,904
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. alata</i> -21	0,996
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. alata</i> -1	0,341
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -20	<i>N. alata</i> -3	0,428
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. otophora</i> -2	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. otophora</i> -3	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. otophora</i> -5	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. otophora</i> -6	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. otophora</i> -10	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. otophora</i> -9	0,629
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. alata</i> -4	0,386
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. alata</i> -21	0,404
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. alata</i> -1	0,555
<i>Solanum</i>	<i>N. sylvestris</i> -44	<i>N. alata</i> -3	1,000
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -2	<i>N. otophora</i> -3	0,497
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -2	<i>N. otophora</i> -5	0,015*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -2	<i>N. otophora</i> -6	0,604
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -2	<i>N. otophora</i> -10	0,001*

<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-2</i>	<i>N. otophora-9</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-2</i>	<i>N. alata-4</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-2</i>	<i>N. alata-21</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-2</i>	<i>N. alata-1</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-2</i>	<i>N. alata-3</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. otophora-5</i>	0,011*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. otophora-6</i>	0,514
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. otophora-10</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. otophora-9</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. alata-4</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. alata-21</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. alata-1</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-3</i>	<i>N. alata-3</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-5</i>	<i>N. otophora-6</i>	0,010*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-5</i>	<i>N. otophora-10</i>	0,132
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-5</i>	<i>N. otophora-9</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-5</i>	<i>N. alata-4</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-5</i>	<i>N. alata-21</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-5</i>	<i>N. alata-1</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-5</i>	<i>N. alata-3</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-6</i>	<i>N. otophora-10</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-6</i>	<i>N. otophora-9</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-6</i>	<i>N. alata-4</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-6</i>	<i>N. alata-21</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-6</i>	<i>N. alata-1</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-6</i>	<i>N. alata-3</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-10</i>	<i>N. otophora-9</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-10</i>	<i>N. alata-4</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-10</i>	<i>N. alata-21</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-10</i>	<i>N. alata-1</i>	0,001*
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora-10</i>	<i>N. alata-3</i>	0,001*

<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -9	<i>N. alata</i> -4	0,391
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -9	<i>N. alata</i> -21	0,262
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -9	<i>N. alata</i> -1	0,452
<i>Solanum</i>	<i>N. otophora</i> -9	<i>N. alata</i> -3	0,629
<i>Solanum</i>	<i>N. alata</i> -4	<i>N. alata</i> -21	0,874
<i>Solanum</i>	<i>N. alata</i> -4	<i>N. alata</i> -1	0,458
<i>Solanum</i>	<i>N. alata</i> -4	<i>N. alata</i> -3	0,386
<i>Solanum</i>	<i>N. alata</i> -21	<i>N. alata</i> -1	0,323
<i>Solanum</i>	<i>N. alata</i> -21	<i>N. alata</i> -3	0,404
<i>Solanum</i>	<i>N. alata</i> -1	<i>N. alata</i> -3	0,555

Considerando a possível função da enzima PAE durante o desenvolvimento floral e sua associação com o sucesso reprodutivo, pouco se pode inferir a respeito da história evolutiva das espécies consideradas a partir da análise realizada. Considerando a importância funcional da enzima, assume-se que a mesma esteja sob grande pressão seletiva, de tal forma que sua conformação funcional muito provavelmente deve estar sendo mantida, mesmo que as espécies tenham divergido de um ancestral há muito tempo. Entretanto, os dados obtidos permitem que algumas inferências a respeito da história evolutiva da PAE nas espécies consideradas sejam feitas. 1) A significativa diferença observada nas sequências da PAE de *N. otophora* pode ser explicada por alterações de nucleotídeos que não talvez levem a alterações de função, e/ou expressão. Por outro lado, a existência de pelo menos um gene funcional para a PAE (clone 9) no genoma de *N. otophora* pode ser demonstrada e as demais sequências podem representar pseudogenes, em processo de evolução. 2) As diferenças ou semelhanças observadas nas sequências de nucleotídeos que codificam a enzima nas diferentes espécies não podem ser consideradas como parâmetros para estimativa do tempo de divergência das espécies de um ancestral comum. 3) A semelhança entre as sequências sugere que a enzima possui uma grande importância funcional e, por isso, sua sequência foi mantida durante a evolução.

O alinhamento das sequências altamente conservadas, referentes a cada uma das espécies, feito pelo programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), pode ser visto no Anexo III.

5. CONCLUSÕES

1. O sequenciamento completo do cDNA TOBS004A06 foi realizado e demonstrou ser este um clone completo, possuindo os códons inicial e final de tradução, além das sequências 5' e 3'UTRs.
2. A análise da sequência completa permitiu confirmar que a proteína codificada tem similaridade significativa com pectina acetilesterases e, como esperado para uma enzima que atua na pectina da parede celular, esta sequência possui um peptídeo sinal putativo, para secreção pelo sistema de endomembranas.
3. O gene *NtPAE1* é regulado durante o desenvolvimento floral e atinge os maiores níveis de transcritos, nos estigmas/estiletes e ovários, nos estágios mais tardios, próximos à antese.
4. O gene *NtPAE1* é expresso na zona secretória do estigma e no tecido transmissor do estilete, tecidos especializados do pistilo e atravessados pelos tubos polínicos durante o crescimento em direção ao ovário.
5. As análises dos fenótipos das plantas transgênicas de superexpressão e silenciamento por RNAi permitem sugerir que a enzima codificada pelo gene *NtPAE1* tem um papel no afrouxamento dos tecidos especializados do pistilo, contribuindo para a formação dos espaços intercelulares, que são preenchidos pelo exudato. As alterações ocorridas nestas plantas causaram modificações na eficiência do processo reprodutivo, resultando em frutos maiores, menores e, até mesmo, ausência de frutos.
6. A análise comparativa das sequências para PAE, em diferentes espécies do gênero *Nicotiana*, permitiu verificar que ocorre uma alta conservação desta sequência ao longo da evolução, sugerindo uma grande importância funcional para esta enzima.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albani, D.; Altosaar, I.; Arnison, P. G. e Fabijanski, S. F. 1991. A gene showing sequence similarity to pectin esterase is specifically expressed in developing pollen of *Brassica napus*: sequences in its 5' flanking region are conserved in other pollen-specific promoters. **Plant Mol Biol** 16: 501–513.
- Allen, R. L. e Lonsdale, D. M. 1993. Molecular characterization of one of the maize polygalacturonase gene family members which are expressed during late pollen development. **Plant J.** 3:261-271.
- Al-Qsous, S.; Carpentier, E.; Klein-Eude, D.; Burel, C.; Mareck, A.; Dauchel, H.; Gomord, V. e Balangé, A. P. 2004. Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. **Planta** 219: 369-378.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. e Lipman, D. J. 1997. Gapped blast and Psi-Blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 25:3389–3402.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature** 408: 796-815.
- Avanci, N. C. 2006. Análise das metiltransferases do pistilo de *Nicotiana tabacum*: expressão heteróloga em sistema recombinante, e comparação de seqüências genômicas em *N. tabacum* e seus prováveis parentais, *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis*. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Bass, B. L. 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. **Cell** 101: 235-238.
- Becker, J. D.; Boavida, L. C.; Carneiro, J.; Haury, M. e Feijó, J. A. 2003. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. **Plant Physiol.** 133:713-725.
- Bell, J. e Hicks, G. 1976. Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. **Planta** 131: 187–200.
- Bednarska, E.; Lenartowska, M. e Niekraś, L. 2005. Localization of pectins and Ca²⁺ ions in unpollinated and pollinated wet (*Petunia hybrida* Hort.) and dry (*Haemanthus albiflos* L.) stigma. **Folia Histochem Cytobiol.** 43: 249-259.
- Bernstein, E.; Denli, A. M. e Hannon, G. J. 2001. The rest is silence. **RNA** 7:1509-1521.
- Bih, F. Y.; Wu, S. S. H.; Ratnayake, C.; Walling, L. L.; Nothnagel, E. A.; Huang, A. H. C. 1999. The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with a long 5' leader. **Journal of Biological Chemistry** 274: 22884-22894.

- Bochek, A. M.; Zabivalova, N. M. e Petropavlovskii, G.A. 2001. Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. **Russian Journal of Applied Chemistry** 75: 796-799.
- Bordenave, M. e Goldberg, R. 1993. Purification and characterization of pectin methylesterases from mung bean hypocotyl cell walls. **Phytochemistry** 33: 999–1003.
- Bosch, M. e Hepler, P. K. 2005. Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. **Plant Cell** 17: 3219–3226.
- Bosch, M.; Cheung, A. Y. e Hepler, P. K. 2005. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. **Plant Physiol.** 138: 1334–1346.
- Bosch, M. e Hepler, P.K.. 2006. Silencing of the tobacco pollen pectin methylesterase NtPPME1 results in retarded in vivo pollen tube growth. **Planta**. 223:736-745.
- Bosch, M. e Franklin-Tong, V. E. 2008. Self-incompatibility in Papaver: signalling to trigger PCD in incompatible pollen. **Journal of Experimental Botany** 59: 481-490.
- Bosher, J. M. e Labouresse, M. 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. **Nat. Cell Biol.** 2: 31-36.
- Brantl, S. 2002. Antisense-RNA regulation and RNA interference. **Biochimica et Biophysica Acta** 1575: 15- 25.
- Breton, C.; Bordenave, M.; Richard, L.; Pernollet, J. C.; Huet, J. C.; Perez, S. e Goldberg, R. 1996. PCR cloning and expression analysis of a cDNA encoding a pectinacetylerase from *Vigna radiata* L. **FEBS Letters** 388: 139-142.
- Brett, C. e Waldron, K. 1996. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 2^a ed. Cambridge: Chapman & Hall Books, p.255.
- Brown, S. M. e Crouch, M. L. 1990. Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. **Plant Cell**. 2: 263–274.
- Buchanan, B.; Gruissem, W. e Jones, R. L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **Rockville: American Society of Plant Physiologists**, p.1408.
- Budelier, K. A.; Smith, A. G. e Gasser, C. S. 1990. Regulation of a stylar transmitting tissue-specific gene in wild-type and transgenic tomato and tobacco. **Mol Gen Genet.** 224:183-192.
- Brummell, D. A. e Harpster, M. H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology** 47: 311-340.
- Bush, M. S. e McCann, M. C. 1999. Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Physiol. Plant.** 107: 201–213.

Camardella, L.; Carratore, V.; Ciardiello, M. A.; Servillo, L.; Balestrieri, C. e Giovane, A. 2000. Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. **Eur. J. Biochem.** 267: 4561-4565.

Carpita, N. C., e Gibeaut, D. M. 1993. Structural models of primary cell walls of flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.** 3: 1–30.

Catoire, L.; Pierron, M.; Morvan, C.; du Penhoat, C. H.; e Goldberg, R. 1998. Investigation of the action patterns of pectin methylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. **J. Biol. Chem.** 50: 33150-33156.

Chase, M. W.; Knapp, S.; Cox, A. V.; Clarkson, J. J.; Butsko, Y.; Joseph, J.; Savolainen, V. e Parokony, A. S. 2003. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). **Ann Bot (Lond)**, 92: 107-127.

Chen, C. G.; Cornish E. C. e Clarke A. E 1992. Specific expression of an extensin-like gene in the style of *Nicotiana glauca*. **Plant Cell.** 4:1053-1062.

Chen, L-Q. e Ye, D. 2007. Role of Pectin Methylesterases in Pollen-Tube Growth (Review). **Journal of Integrative Plant Biology** 49: 94-96.

Cheung, A. Y.; May, B.; Kawata, E. E.; Gu, Q. e Wu, H. M. 1993. Characterization of cDNAs for stylar transmitting tissue- specific proline rich proteins in tobacco. **Plant J.** 3(1):151-160.

Cheung, A. Y. 1996. Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. **Trends Plant Sci** 1:45-51.

Chincinska, I. A.; Liesche, J.; Krügel, U.; Michalska, J.; Geigenberger, P.; Grimm, B.; Kuhn, C. 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. **Plant Physiol.** 146: 515-528.

Cornish, E. C.; Anderson, M. A. e Clarke, A. E. 1988. Molecular aspects of fertilization in flowering plants. **Annu. Rev. Cell Biol.** 4: 209-228.

daSILVA, I. (2004). Estudo de transportadores ABC expressos em estigmas/estiletos de *Nicotiana tabacum*. **Tese de Doutorado**, apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – UNESP. p.114.

De Graff, B. H. J. 2000. Pistil proline-rich proteins in *Nicotiana tabacum*, their involvement in pollen-pistil interaction. **PhD thesis**. University of Nijmegen, The Netherlands.

De Paoli, H. C. 2006. Análise da expressão gênica no pistilo de *Nicotiana tabacum*: identificação de genes específicos por hibridização subtrativa e caracterização temporal e celular. **Dissertação de Mestrado**, apresentada à faculdade de Medicina, FMRP.

Dearnaley, J. D. W. e Daggard, G. A. 2001. Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. **Sex Plant Reprod.** 13: 265–271.

Dellaporta, S. L.; Wood, J. e Hicks, J. B. 1983. A plant DNA mini-preparation: version II. **Plant. Mol. Biol. Rep.**, 1: 19-21.

Denés, J. M.; Naron, A.; Renard, C. M.; Pean, C.; e Drilleau, J. F. 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. **Carbohydr. Res.** 327: 385-393.

Depicker, A. e Van Montagu, M. 1997. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Curr Opin Cell Biol.** 9:373-82. Review.

Dias, N. e Stein, C. A. 2002. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. **Mol. Cancer Ther.** 1: 347–355.

Dircks, L. K.; Vancanneyt, G. e McCormick, S. 1996. Biochemical characterization and baculovirus expression of the pectate lyase-like LAT56 and LAT59 pollen proteins of tomato. **Plant Physiol. Biochem.** 34: 509-520.

Doblin, M.S.; De Melis, L.; Newbigin, E.; Bacic, A. e Read, S.M. 2001. Pollen tubes of *Nicotiana glauca* express two genes from different b-glucan synthase families. **Plant Physiology** 125: 2040-2052.

Dubald, M.; Barakate, A.; Mandaron, P. e Mache, R. 1993. The ubiquitous presence of exopolysaccharidase in maize suggests a fundamental cellular function for this enzyme. **Plant J.** 4:781-791.

Dumas, C.; Rougier, M.; Zandonella, P.; Ciampolini, F.; Cresti, M. e Pacini, E. 1978. The secretory stigma in *Lycopersicon peruvianum* Mil.: ontogenesis and glandular activity. **Protoplasma** 96:173-187.

Esau, K. 1997. **Anatomy of Seed Plants.** Edgard Blucher Ltda., New York.

Ewing, B. e Green, P. 1998. Base calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Res** 8:196–194

Ewing, B.; Hillier, L. e Wendl, M. C.; Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res** 8:175–185.

Foot, H. C. C.; Ride, J. P.; Franklin-Tong, V. E.; Walker, E. A.; Lawrence, M. J.; Franklin, F. C. H. 1994. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Phalaris coarulescens*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 2265-2269.

Francis, K. E.; Lam, S. Y. e Copenhaver, G. P. 2006. Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. **Plant Physiol.** 142:1004-1013.

Freeman, W. M.; Walker, S. J. e Vrana, K. E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques.** 26:112-122, 124-125.

Fry, S. C. 1988. **The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis.** (London: Longman Scientific and Technical).

Fulnecek, J.; Lim, K. Y.; Leitch, A. R.; Kovarik, A. e Matyasek, R. 2002. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. **Heredity**. 88:19-25.

Futamura, N.; Mori, H.; Kouchi, H.; Shinohara, K. 2000. Male flower-specific expression of genes for polygalacturonase, pectin methylesterase and b-1,3-glucanase in a dioecious willow (*Salix gilgiana* Seemen). **Plant Cell Physiol**. 41:16-26.

Gasser, C. S. e Robinson-Beers, K. 1993. Pistil development. **Plant Cell** 5: 1231-1239.
Janson, J.; Reinders, M. C.; Valkering, A. G. M.; Van Tuyl, J. M. e Keijzer, C. J. 1994. Pistil exudate production and pollen tube growth in *Lilium longiflorum* Thunb. **Ann Bot**. 73: 437-446.

Giovane, A.; Servillo, L.; Balestrieri, C.; Raiola, A.; D'Avino, R.; Tamburrini, M.; Ciardiello, M.A. e Camardella, L. 2004. Pectin methylesterase inhibitor. **Biochim. Biophys. Acta** 1696, 245–252.

Goldberg, R. 1996. Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In J Vesser, AGJ Voragen, eds, Pectins and Pectinases. **Elsevier Science**, New York, pp 151-172.

Goldman, M. H. S.; Pezzotti, M.; Seurinck, J. e Mariani, C. 1992. Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. **Plant Cell**. 4: 1041-1051.

Goldman, M. H.; Goldberg, R. B. e Mariani, C. 1994. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. **Embo J**. 13: 2976-2984.

Goodspeed, T. H. 1954. **The genus *Nicotiana***. University of California, Bekerley, California.

Gordon, D.; Abajian, C. e Green, P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res** 8:195–202.

Guglielmino, N.; Liberman, M.; Catesson, A.M.; Mareck, A.; Prat, R.; Mutaftschiev, S.; e Goldberg, R. 1997. Pectin immunolocalization and calcium visualization in differentiating derivatives from poplar cambium. **Protoplasma** 199: 151-160.

Gulfi, M.; Arrigoni, E. e Amado, R. 2007. *In vitro* fermentability of pectin fraction rich in hairy regions. **Carbohydrate Polymers** 67: 410-416.

Hannon, G. J. 2002. RNA interference. **Nature** 418: 244-251.

Hawes, C. e Satiat-Jeunemaitre, B. 2001. **Plant Cell Biology** – Practical Approach, 2^{ed}.

Higuchi, M.; Yoshizumi, T.; Kuriyama, T.; Hara, H.; Akagi, C.; Shimada, H. e Matsui, M. 2009. Simple construction of plant RNAi vectors using long oligonucleotides. **J Plant Res**. [Epub ahead of print].

Hiscock, S. J.; Dewey, F. M.; Coleman, J. O. D. e Dickinson, H. G. 1994. Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. **Planta** 193: 377-384.

Hiscock, S. J. e Allen, A. M. 2008. Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. **New Phytol.** 179: 286-317. Review.

Hong HP, Ross JH, Gerster JL, Rigas S, Datla RS, Hatzopoulos P, Scoles G, Keller W, Murphy DJ, Robert LS. 1997. Promoter sequences from two different *Brassica napus* tapetal oleosin-like genes direct tapetal expression of beta-glucuronidase in transgenic *Brassica* plants. **Plant Mol Biol.** 34: 549-555.

Hong, S. B.; Sexton, R. e Tucker, M. L. 2000. Analysis of Gene promoters for Two Tomato Polygalacturonases Expressed in Abscission Zones and the Stigma. **Plant Physiology** 123: 869–881.

Honys, D. e Twell, D. 2003. Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. **Plant Physiol.** 132: 640-652.

Hou, W. C.; Chang, W. H. e Jiang, C. M. 1999. Qualitative distinction of carboxyl group distributions in pectins with ruthenium red. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 40: 115-119.

Huang, B. Q. e Russel, S. D. 1992. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. **Sex. Plant Reprod.** 5: 151-155.

Huang, X. e Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research** 9: 868-877.

Hulskamp, M.; Kopczak, S. D.; Horejsi, T. F.; Kihl, K. B. e Pruitt, R. E. 1995. Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 8: 703-714.

Iwai, H.; Masaoka, N.; Ishii, T. e Satoh, S. 2002. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. **Proc Natl Acad Sci** 99: 16319-16324.

Jana, S. e Déb, J. K. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol** 67: 289-298. Review.

Jarvis, M. C.; Briggs, P. H. e Knox, J. P. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. **Plant Cell Environ** 26:977–989.

Jauh, G.Y. e Lord, E.M. 1996. Localization of pectins and arabinogalactanproteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. **Planta** 199: 251–261.

Jauh, G. Y.; Eckard, K. J. Nothnagel, E. A. e Lord, E. M. 1997. Adhesion of lily pollen tubes on an artificial matrix. **Sex. Plant Reprod.** 10: 173-180.

Jiang, L.; Yang, S; Xie, L.; Puah, C. S.; Zhang., X.; Yang, W.; Sundaresan, V. e Yea, D. 2005. VANGUARD1 Encodes a Pectin Methyltransferase That Enhances Pollen Tube Growth in the *Arabidopsis* Style and Transmitting Tract. **The Plant Cell** 17: 584-596.

Jiménez-Bermúdez, S.; Redondo-Nevado, J.; Muñoz-Blanco, J.; Caballero, J. L.; López-Aranda, J. M.; Valpuesta, V.; Pliego-Alfaro, F.; Quesada, M. A. e Mercado, J. A. 2002.

Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. **Plant Physiol.** 128: 751-759.

Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique **McGraw-Hill Book**. p. 523.

Kagan-Zur, V.; Tieman, D. M.; Marlow, S. J. e Handa, A. K. 1995. Differential regulation of polygalacturonase and pectin methylesterase gene expression during and after heat stress in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. **Plant Mol. Biol.** 29: 1101-1110.

Kandasamy, M. K. e Kristen, U. 1987. Developmental aspects of ultrastructure histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana glauca*. **Ann. Bot.** 60: 427-437.

Kandasamy, M. K.; Dwyer, K. G.; Paolillo, D. J.; Doney, R. C.; Nasrallah, J. B. e Nasrallah, M. E. 1990. *Brassica* S-proteins accumulate in the intercellular matrix along the path of pollen tubes in transgenic tobacco. **Plant Cell** 2: 39-49.

Kenton, A.; Parakony, A. S.; Gleba, Y. Y. e Bennett, M. D. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. **Mol. Gen. Genet.** 240: 159-169.

Kenton, A.; Khashoggi, A.; Parokony, A.; Bennett, M. D. e Lichtenstein, C. 1995. Chromosomal location of endogenous geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana tabacum* L. **Chromosome Res.** 3: 346-350.

Kim, H. U.; Park, B. S.; Jin, Y. M. e Chung, T. Y. 1997. Promoter Sequences of Two Homologous Pectin Esterase Genes from Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) and Pollen-specific Expression of the GUS Gene Driven by a Promoter in Tobacco Plants. **Mol Cells** 7: 21-27.

Kim, H. J.; Kim, Y. K.; Park, J. Y. e Kim, J. 2002. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J** 29: 693-704.

Kjoniksen, A. L., Hiorth, M. e Nystrom, B. 2005. Association under shear flow in aqueous solutions of pectin. **European Polymer Journal** 41: 761-771.

Knox, P.J. 1997. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. **Int. Rev. Cytol.** 171: 79-120.

Koltunow, A. M.; Truettner, J.; Cox, K. H.; Wallroth, M. e Goldberg, R. B. 1990. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. **Plant Cell** 2: 1201-1224.

Kotake, T.; Li, Y-Q; Takahashi, M. e Sakurai, N. 2000. Characterization and function of wall-bound exo- β -glucanases of *Lilium longiflorum* pollen tubes. **Sexual Plant Reproduction** 13: 1-9.

Krichevsky, A.; Kozlovsky, S. V.; Tian, G. W.; Chen, M. H.; Zaltsman, A. e Citovsky, V. 2007. How pollen tubes grow. **Dev Biol.** 303: 405-420.

Kuboyama, T. 1998. A novel thaumatin-like protein gene of tobacco is specifically expressed in the transmitting tissue of stigma and style. **Sex. Plant Reprod.** 11: 251-256.

Kulikauskas, R. & McCormick, S. 1997. Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato. **Plant Molecular Biology** 34: 809–814.

Lacoux, J.; Gutierrez, L.; Dantin, F.; Beaudoin, B.; Roger, D. e Lainé, E. 2003. Antisense transgenesis of tobacco with a flax pectin methylesterase affects pollen ornamentation. **Protoplasma** 222: 205–209.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

Lee B. H.; Tanaka, Y.; Iwasaki, T.; Yamamoto, N.; Kayano, T. e Miyao, M. 1998. Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. **Plant Mol Biol.** 37: 1035-1043.

Lee, L. K. e Roth, C. M. 2003. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. **Curr. Opin. Biotechnol.** 14: 505-511.

Lenartowska, M.; Rodríguez-García, M. I. e Bednarska, E. 2001. Immunocytochemical localization of esterified and unesterified pectins in unpollinated and pollinated styles of *Petunia hybrida* Hort. **Planta.** 213: 182-119.

Levitin, B.; Richter, D.; Markovich, I. e Zik, M. 2008. Arabinogalactan proteins 6 and 11 are required for stamen and pollen function in *Arabidopsis*. *Plant J.* [Epub ahead of print].

Linko, M.; Poutanen, K. e Vikari, L. 1989. New developments in the application of enzymes for biomass processing. In: Enzyme systems for lignocellulose degradation. Londres, **Elsevier Applied Science.**

Li, Y-Q.; Chen, F.; Linskens, H. F. e Cresti, M. 1994. Distribution of unesterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. **Sex. Plant Reprod.** 7: 145-152.

Li, Y-Q.; Faleri, C.; Geitmann, A.; Zhang, H. Q. e Cresti, M. 1995. Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. **Protoplasma** 189: 26–36.

Li, Y. Q., Mareck, A., Faleri, C., Moscatelli, A., Liu, Q. e Cresti, M. 2002. Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. **Planta** 214: 734–740.

Lind, J. L.; Bonig, I.; Clarke, A. E. e Anderson, M. A. 1996. A style-specific 120-kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo. **Sex Plant Reprod.** 9:75–86.

Liners, F.; Gaspar, T. e Van Cutsem, P. 1994. Acetyl- and methylesterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. **Planta** 192: 545–556.

Linskens, H. F. 1983. Pollination processes: understanding fertilization and limits to hybridization. In **Strategies of Plant Reproduction**, W. J. Meudt, ed. (Granada: Beltville Symposia in Agricultural Research) 6: 35-49.

Linskens, H. F. 1986. Recognition during the progamic phase. In: **Biology of Reproduction and Cell Motility in Plants and Animals**. (Ed. Cresti, M. & Dallai, R.) pp.21-31. University of Siena Press., Viena (Italy).

Lionetti, V.; Raiola, A.; Camardella, L.; Giovane, A.; Obel, N.; Pauly, M.; Favaron, F.; Cervone, F. e Bellincampi, D. 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiol.** 143: 1871–1880.

Lord, E.M. 2000. Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. **Trends in plant science** 5:368-373.

Lush, W.; Spurck, T. e Joosten, R. 2000. Pollen tube guidance by the pistil of a solanaceous plant. **Annals of Botany** 85: 39-47.

McCann, M. C.; Bush, M.; Milioni, D.; Sado, P.; Stacey, N. J.; Catchpole, G.; Defernez, M.; Carpita, N. C.; Hofte, H.; Ulvskov, P.; Wilson, R. H. e Roberts, K. 2001. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. **Phytochemistry**. 57: 811-821.

McGinnis K. 2009. Use of Transgene-Induced RNAi to Regulate Endogenous Gene Expression. **Methods Mol Biol.** 526: 1-9.

Marín-Rodríguez, M. C.; Orchard, J. e Seymour, G. B. 2002. Pectate lyase, cell wall degradation and fruit softening. **Journal of Experimental Botany** 53: 2115–2119.

Marín-Rodríguez, M. C.; Smith, D. L.; Manning, K.; Orchard, J. e Seymour, G. B. 2003. Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. **Plant Mol Biol.** 51: 851-857.

Matthew, J. A.; Howson, S.J.; Keenan, M. H. J. e Belton, P. S. 1990. Improvement of the gelation properties of sugarbeet pectin following treatment with an enzyme preparation derived from *Aspergillus niger* - Comparison with a chemical modification. **Carbohydr. Polym.** 12: 295-306.

Mauseth, J. D. 2003. Flower and strobilus. In: **Plant anatomy**. 2 ed., pp. 383-413, Saunders College Publishing (USA).

Mesbahi, G.; Jamalian, J. e Farahnaky, A. 2005. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in foods systems. **Food Hydrocolloids** 19: 731-738.

Micheli, F.; Sundberg, B.; Goldberg, R. e Richard, L. 2000. Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. **Plant Physiol.** 124:191-199.

Micheli, F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. **Trends Plant Sci.** 6: 414-419.

Mollet, J. C.; Park, S. Y.; Nothnagel, E. A. e Lord, E. M. 2000. A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. **Plant Cell**. 12:1737-1750.

Morris, E. R.; Powell, D. A.; Gidley, M. J. e Rees, D. A. 1982. Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. **J Mol Biol**. 155: 507-516.

Moustacas, A. M.; Nari, J.; Borel, M.; Noat, G. e Ricard, J. 1991. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. **Biochem.J**. 279: 351–354.

Mu J. H.; Stains, J. P. e Kao, T. H. 1994. Characterization of a pollen expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. **Plant Molecular Biology** 25: 539-544.

Murad, L.; Bielawski, J. P.; Matyasek, R.; Kovarík, A.; Nichols, R. A.; Leitch, A. R. e Lichtenstein, C. P. 2004. The origin and evolution of geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana*. **Heredity**. 92: 352-358.

Murashige, T. e Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol Plant** 15:473-497.

Napoli, C.; Lemieux, C. e Jorgensen, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **DNA Plant Technology Corporation** 2: 279-289.

Nari, J.; Noat, G.; Diamantidis, G.; Woudstra, M. e Ricard J. 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. **Eur J Biochem**. 155: 199-202.

Nasrallah, J. B.; Stein, J. C.; Kandasamy, M. K. e Nasrallah, M. E. 1994. Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. **Science** 266: 1505-1508.

Novagen 2002. Competent cells – expression hosts: host strain competent cell: **selection guide**. Pp 1-3.

Novoa de Armas, H; Rabijns, A; Verboven, C; Desair, J; Broek, A. V.; Vanderleyden, J. e De Ranter, C. 2002. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel pectate lyase from *Azospirillum irakense*. **Acta Cryst**. 58: 292-295.

Nykänen, A.; Haley, B. e Zamore, P. D. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell** 107: 309-321.

Oosterveld, A.; Beldman, G.; Schols, H. A. e Voragen, A. G. 2000. Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. **Carbohydr Res**. 328:185-197.

Park, S.Y.; Jauh, G. Y.; Mollet, J. C.; Eckard, K. J.; Nothnagel, E. A.; Walling, L. L. e Lord, E. M. 2000. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. **Plant Cell** 12: 151-163.

Papp, I.; Iglesias, V. A.; Moscone, E. A.; Michalowski, S.; Spiker, S.; Park, Y. D.; Matzke, M. A. e Matzke, A. J. 1996. Structural instability of a transgene locus in tobacco is associated with aneuploidy. **Plant J.** 10: 469-478.

Parre, E. e Geitmann, A. 2005. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. **Planta.** 137: 274-86.

Pelloux, J.; Rustérucchi, C. e Mellerowicz, E. J. 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. **Trends Plant Sci** 12: 267-277.

Penna, A. L. B. 2002. Hidrocolóides – Uso em alimentos. **Food Ingredients**, v. 17, p. 58-64.

Pilatzke-Wunderlich, I. e Nessler, C. L. 2001. Expression and activity of cell-wall-degrading enzymes in the latex of opium poppy, *Papaver somniferum* L. **Plant Mol Biol.** 45: 567-576.

Pilling, J.; Willmitzer, L. e Fisahn, J. 2000. Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. enhances stem elongation and modifies cation distribution. **Planta** 210: 391-399.

Pina, C.; Pinto, F.; Feijo, J. A. e Becker, J. D. 2005. Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. **Plant Physiol.** 138: 744-756.

Pond, S. L. K.; Frost, S. D. W. e Muse, S. V. 2005 HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. **Bioinformatics** 21: 676–679.

Pressey, R. e Reger, B. J. 1989. Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. **Plant science** 59: 57-62.

Pressey, R. 1991. Polygalacturonase in tree pollens. **Phytochemistry** 26: 1867-1870.

Preuss, D. 2002. Sexual signaling on a cellular level: lessons from plant reproduction. **Mol. Biol. Cell** 13: 1803-1805.

Qiu, X. e Erickson, L. 1995. A pollen-specific cDNA (P65, Accession No. U28148) encoding a putative pectin esterase in Alfalfa1 (PGR95–094). **Plant Physiol.** 109: 1127.

Quiapim, A. C. 2005. Estudo comparativo da expressão gênica nos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Nicotiana tabacum* L. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Pós-Graduação em Biologia Comparada, FFCLRP/USP.

Quiapim, A. C.; Brito, M. S.; Bernardes, L. A.; Dasilva I.; Malavazi, I.; DePaoli, H. C.; Molfetta-Machado, J. B., Giuliatti, S.; Goldman, G. H. e Goldman, M. H. 2009. Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. **Plant Physiol.** 149: 1211-1230.

Raiola, A.; Camardella, L.; Giovane, A.; Mattei, B.; De Lorenzo, G.; Cervone, F. e Bellincampi, D. 2004. Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. **FEBS Lett.** 557: 199–203.

Ren, C. e Kermodé, A. R. 2000. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. **Plant Physiol.** 124: 231-242.

Rhee, S. Y. e Somerville, C. R. 1998. Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. **Plant J.** 15: 79–88.

Ridley, B. L.; O'Neill, M. A. e Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry.** 57: 929-67.

Robert, L. S.; Allard, S.; Gerster, J. L.; Cass, L. e Simmonds, J. 1993. Isolation and characterization of a polygalacturonase gene highly expressed in *Brassica napus* pollen. **Plant Mol Biol.** 23: 1273-1278.

Roberts, K. 1994. The plant extracellular matrix: In a new expansive mood. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:1020–1027.

Röckel, N.; Wolf, S.; Kost, B.; Rausch, T. e Greiner, S. 2008. Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reXects the distribution of esterified and de-esterified pectins. **Plant J.** 53: 133–143.

Rodríguez-Llorente I. D.; Perez-Hormaeche, J.; El Mounadi, K.; Dary, M.; Caviedes, M. A.; Cosson, V.; Kondorosi, A.; Ratet, P. e Palomares, A. J. 2004. From pollen tubes to infection threads: recruitment of *Medicago Xora* pectic genes for symbiosis. **Plant J.** 39: 587–598.

Roger, D.; Lacoux, J.; Lamblin, F.; Gaillet, D.; Dauchel, H.; Klein, D.; Balange, A. P.; David, A. e Lainé, E. 2001. Isolation of a flax pectin methylesterase promoter and its expression in transgenic tobacco. **Plant Science** 160: 713–721.

Said, S. e Pietro, R. C. L. R. 2004. Pectinases. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Editora Legis Summa.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning 2nd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Estados Unidos.

Sanchez, A. M.; Bosch, M.; Bots, M.; Nieuwland, J.; Feron, R. e Mariani, C. 2004. Pistil Factors Controlling Pollination. **The Plant Cell** 16: 98–106.

Santiago-Doménech, N.; Jiménez-Bemúdez, S.; Matas, A. J.; Rose, J. K.; Muñoz-Blanco, J.; Mercado, J. A. e Quesada, M. A. 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. **J Exp Bot.** 59: 2769-2779.

Sasaki T.; Yukawa, Y.; Miyamoto, T.; Obokata, J. e Sugiura, M. 2003. Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts from the maternal and paternal progenitors of tobacco (*Nicotiana tabacum*): comparative analysis shows the involvement of distinct trans-factors for ndhB editing. **Mol Biol Evol.** 20:1028-1035.

Satoh, S. 1998. Functions of the cell wall in the interaction of plant cells: Analysis using carrot cultured cells. **Plant Cell Physiol.** 39: 361–368.

Scherr, M.; Battmer, K.; Winkler, T.; Heidenreich, O.; Ganser, A. e Eder, M. 2003. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. **Blood** 101: 1566-1569.

Schindler, T.M. 1998. The new view of the primary cell wall. **Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.** 161, 485–498.

Semighini, C. P.; Marins, M.; Goldman, M. H.; Goldman, G. H. 2002. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. **Appl Environ Microbiol.** 68: 1351-1357.

Sessa, G. e Fluhr, R. (1995). The expression of an abundant transmitting tract-specific endoglucanase (Sp41) is promoter-dependent and not essential for the reproductive physiology of tobacco. **Plant Molecular Biology** 29: 969-982.

Shevchik, V. E. e Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2003. PaeX, a second pectin acetyltransferase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Journal of Bacteriology**, 185: 3091–3100.

Shevell, D. E.; Kunkel, T.; Chua, N. H. 2000. Cell wall alterations in the *arabidopsis emb30* mutant. **Plant Cell.** 12: 2047-2060.

Shuey, D. J.; McCallus, D. E. e Giordano, T. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. **Drug Discov Today** 7: 1040-1046.

Sinha, N.; Lynch, M. 1998. Fused organs in the adherent1 mutation in maize show altered epidermal walls with no perturbations in tissue identities. **Planta** 206: 184–195.

Sobry, S.; Havelange, A. e Cutsem, P. V. 2005 Immunocytochemistry of pectins in shoot apical meristems: consequences for intercellular adhesion. **Protoplasma** 225: 15-22.

Sorensen, H. P. e Mortensen, K. K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology** 115: 113-128.

Stachel, S. E.; An, G.; Flores, C. e Nester, E. W. 1985. A Tn3 lacZ transposon for the random generation of beta-galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. **EMBO J.** 4: 891-898.

Steinmetz, A.; Baltz, R.; Domon, C.; Dudareva, N.; Evrard, J. L. e Krauter, R. 1992. Gametophytic and sporophytic gene expression in *Helianthus annuus* L. in: **Reproductive Biology and Plant Breeding**, y. Dattee, C. Dumas, and a. Gallais, eds. (Berlin: Springer-Verlag), 59-68.

Stepka, M.; Ciampolini, F.; Charzynska, M.; Cresti, M. 2000. Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? **Planta** 210: 630-635.

Sterling, J. D.; Quigley, H. F.; Orellana, A. e Mohnen, D. 2001. The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme alpha-1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. **Plant Physiol.** 127: 360–371.

Sterling, J. D.; Atmodjo, M. A.; Inwood, S. E.; Kolli, V. S. K.; Quigley, H. F.; Hahn, M. G. e Mohnen, D. 2006. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. **Proc Natl Acad Sci** 103: 5236-5241.

Stone, S.L.; Anderson, E. M.; Mullen, R. T. e Goring, D, R. 2003. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. **Plant Cell**. 15: 885-898.

Stratilova, E.; Markovic, O.; Dzurova, M.; Malovikova, A.; Capek, P. e Omelkova J. 1998. The pectolytic enzymes of carrots. **Bratislava** 53: 731-738.

Suárez-Cervera, M.; Arcalís, E.; Thomas, A Le. e Seoane-Camba, J. A. 2002. Pectin distribution pattern in the apertural intine of *Euphorbia peplus* L. (*Euphorbiaceae*) pollen. Sexual Plant Reproduction, **14: 291–298**.

Swanson, R.; Edlund, A. F. e Preuss, D. 2004. Species specificity in pollen-pistil interactions. **Annu Rev Genet**. 38:793-818. Review.

Taylor, K. A. C. C. 1993. A Colorimetric Method for the Quatification of Galacturonic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 43: 52-54.

Taniguchi, Y.; Ono, A.; Sawatani, M.; Nanba, M.; Kohno, K.; Usui, M.; Kurimoto, M. e Matuhasi, T. 1995. Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. **Allergy**. 50: 90-93.

Taylor, C. B. 1997 Comprehending Cosuppression. **The Plant Cell** 9: 1245-1249.

Taylor, L.P. e Hepler, P.K. 1997. Pollen germination and tube growth. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**. 48: 461–491.

Tebbutt, S. J.; Rogers, H. J. e Lonsdale, D. M. 1994. Characterisation of a tobacco pollen specific polygalacturonase gene. **Plant Mol Biol** 25: 283–299.

Thompson, J. D.; Higgins, D. G. e Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.

Tian, G. W.; Chen, M. H.; Zaltsman, A. e Citovsky, V. 2006. Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. **Dev Biol**. 294: 83-91.

Tsai, C. J.; Popko, J. L.; Mielke, M. R.; Hu, W. J.; Gopi K. Podila, G. K. e Vincent L. Chiang, V. L. 1998. Suppression of *O*-Methyltransferase Gene by Homologous Sense Transgene in Quaking Aspen Causes Red-Brown Wood Phenotypes. **Plant Physiol**. 117: 101-112.

Tsao, T. H. e Linskens, H. F. 1986. Role of growth substances in fertilization. In: Hormonal regulation of plant growth and development. 3: 91-117. **Agro Botanical Publishers** (India).

Tyagi, S.; Bratu, D. P. e Kramer, F. R. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nat Biotechnol**, 16: 49-53.

Ursin, V. M.; Yamaguchi, J. e McCormick, S. 1989. Gametophytic and sporophytic expression of anther specific genes in developing tomato anthers. **Plant Cell**. 1: 727-736.

Van Buren, J. P. 1991. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. **Chemistry Technology of Pectin** 1: 56-62.

Van Eldik, G. J.; Ruiter, R. K.; Colla, P. H. W. N.; Van Herpern, M. M. A.; Schrauwen, J. A. M.; Wullems, G. J. 1997. Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. **Plant Mol. Biol.** 33: 923-929.

Vercauteren, I.; de Almeida Engler, J.; De Groodt, R. e Gheysen, G. 2002. An *Arabidopsis thaliana* pectin acetyltransferase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. **Mol Plant Microbe Interact.**15: 404-407.

Vidal, S. D.; T.; Williams, P.; Pellerin, P.; York, W. S. e O'Neil, M. A. 2000. Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan. II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. In: **Carbohydrate Research** 326: 277-294.

Vincken, J. P.; Schols, H. A.; Oomen, R. J.; McCann, M.C.; Ulvskov, P. e Voragen, A.G. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology** 132: 1781-1789.

Volkov R. A.; Borisjuk, N. V.; Panchuk, I. I.; Schweizer D. e Hemleben, V. 1999. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. **Mol Biol Evol.** 16:311-320.

Wakeley, P. R.; Roger, H. J.; Rozycka, M.; Greenland, A. J. e Hussey, P. J. 1998. A maize pectin methylesterase like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. **Plant Molecular Biology** 37: 187-192.

Walsh, G. e Headon, D. 1994. **Protein Biotechnology**. 1.ed. Inglaterra, Wiley Publishers.

Wen, F.; Zhu Y. e Hawes, M. C. 1999. Effect of Pectin Methylesterase Gene Expression on Pea Root Development. **The Plant Cell** 11: 1129-1140.

Wesley, S. V.; Helliwell, C. A.; Smith, N. A.; Wang, M.; Rouse, D. T.; Liu, Q.; Gooding, P. S.; Singh, S. P.; Abbott, D.; Stoutjesdijk, P. A.; Robinson, S. P.; Gleave, A. P.; Green, A. G. e Waterhouse, P. M. 2001. Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. **The Plant Journal** 27: 581-590.

Wilhelmi, L.K. e Preuss, D. 1996. Self-sterility in *Arabidopsis* due to defective pollen tube guidance. **Science** 274:1535-1537.

Wilhelmi, L. K. e Preuss, D. 1997. Pollen tube guidance in flowering plants. **Plant Physiol.** 113: 307-312.

Wilhelm, L. K. e Preuss, D. 1999. The mating game: pollination and fertilization in flowering plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** 2: 18-22.

Willats, W. G. T.; Gilmartin, P. M.; Mikkelsen, J. D. e Knox, J. P. 1999. Cell wall antibodies without immunization: Generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. **Plant J.** 18: 57–65.

Williansson, G. 1991. Purification and characterization of pectin acetylerase from orange peel . **Phytochemistry.** 30: 445-449.

Willats, W. G. T.; Knox, J. P. e Mikkelsen, J. D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology** 17: 97-104.

Wing, R.A.; Yamaguchi, J.; Larabell, S.K.; Ursin, V.M.; McCormick, S. 1989. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. **Plant Mol Biol.** 14:17–28.

Wolf, S.; Grsic-Rausch, S.; Rausch, T. e Greiner, S. 2003. Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. **FEBS Lett.** 555: 551–555.

Wu, H. M.; Wang, H. e Cheung, A. Y. 1995. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. **Cell.** 82: 395-403.

Wu, Y.; Qiu, X.; Du, S. e Erickson, L. 1996. PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa. **Plant Mol Biol.** 32: 1037-1042.

Yadav, S.; Yadav, P. K.; Yadav, D. e Yadav, K. D. S. 2009. Pectin lyase: A review **Process Biochemistry** 44: 1-10.

Zamore, P.D. e Aronin, N. 2003. siRNAs knock down hepatitis. **Nat Med.** 9: 266-267.

Zamore, P. D. 2004. Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA. **Curr. Biol.** 14: 198-200.

7. ANEXOS

ANEXO I

Tabela 8: Clones do TOBEST (biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos), codificando pectina acetilesterases e suas sequências de maior similaridade no NCBI e no genoma de *Arabidopsis* (TAIR), identificadas pelo programa BlastX.

TOBEST	BLASTX	NCBI	E-value	TAIR	E-value
TOBC009E01 (009E10)	pectinacetylerase family protein [<i>Ipomoea nil</i>]	BAF46305.1	3e-10	AT3G09410	2e-09
TOBC009H03 (106B01, 055G08)	pectinacetylerase family protein [<i>Ipomoea nil</i>]	BAF46305.1	9e-16	AT4G19420	3e-14
TOBC020B01 (020D09)	PAE [<i>Litchi chinensis</i>]	ACF05806.1	4e-66	AT4G19420	4e-45
TOBC048E06 (023E09)	putative pectin acetylerase [<i>Oryza sativa</i>]	ID:4330443 Os02g07024 00	2e-20	AT4G19420	4e-19
TOBC131D02 (036D09)	pectin acetylerase [<i>Eucalyptus globulus</i>]	ABG34280.1	4e-61	AT5G26670	1e-59
TOBC034B06 (062A10, 110E04, 032D12, 027D03, 029D11, 002H10, 033E03, 032F10, 105E04, 033A05, 037E04)	pectinacetylerase [<i>Medicago truncatula</i>]	ABD33181.1	2e-18	AT5G23870	7e-18
TOBC051B04 (005A12, 001F03)	putative pectin acetylerase [<i>Oryza sativa</i>]	ID:4330443 Os02g07024 00	2e-50	AT5G45280	7e-33
TOBC133C04 (066B10)	PAE [<i>Litchi chinensis</i>]	ACF05806.1	7e-13	AT4G19420	9e-14

TOBS080G07	pectinacetylerase precursor [<i>Vigna radiata</i>]	CAA67728.1	2e-57	AT4G19420	1e-57
TOBS129G04	pectin acetylerase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	EEF42515.1	1e-58	AT4G19420	2e-57
TOBC077E02 (081A11)	pectin acetylerase [<i>Lactuca sativa</i>]	AAP72959.1	2e-38	AT2G46930	3e-36
TOBS004A06	PAE [<i>Litchi chinensis</i>]	ACF05806.1	3e-127	AT4G19420	e-125
TOBS014H07	pectin acetylerase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	AAM65412.1	2e-24	AT5G45280	6e-26
TOBS021H06	PAE [<i>Litchi chinensis</i>]	ACF05806.1	4e-65	AT4G19420	2e-86
TOBS028F09	pectinacetylerase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	ID: 827683 AT4G19420	1e-19	AT4G19420	3e-21
TOBS034G09	pectinacetylerase family protein [<i>Ipomoea nil</i>]	BAF46305.1	2e-07	AT4G19420	1e-04
TOBS103D01	putative pectin acetylerase [<i>Oryza sativa</i>]	ID: 4330443 Os02g07024 00	3e-53	AT5G45280	1e-53
TOBS093A11	pectin acetylerase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	AAM65412.1	1e-52	AT2G46930	6e-06

Tabela 9: Clones do TOBEST (biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos), codificando pectina metilesterases e suas sequências de maior similaridade no NCBI e no genoma de *Arabidopsis thaliana* (TAIR), identificadas pelo programa BlastX.

TOBEST	BLASTX	NCBI	E-value	TAIR	E-value
TOBC015G11 (080H02)	pectin methylesterase 4 [<i>Pyrus communis</i>]	BAF42041.1	2e-38	AT4G33220	2e-34
TOBC010A01 (058F12, 089G06)	pectin methylesterase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	AAX13972.1	2e-45	At3G05610	2e-34
TOBC086F11 (093E12, 102B06)	pectin methylesterase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	AAX13972.1	2e-45	AT5G49180	4e-41
TOBS015G06	pectin methyl esterase [<i>Solanum tuberosum</i>]	AAF23891.1	2e-99	AT1G11580	4e-75
TOBS027A04	similar to pectinesterase, putative [<i>Vitis vinifera</i>]	XP 002273427.1	1e-58	AT3G10720	1e-19
TOBS027D09	pectinesterase-like; strong similarity to pollen-specific protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	BAB08664.1	4e-30	AT4G38420	3e-16
TOBS028D09	Pectinesterase precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	EEF45574.1	4e-31	At3G05610	3e-24
TOBS050F06	pectin methyl esterase [<i>Solanum tuberosum</i>]	AAF23891.1	1e-61	AT1G11580	5e-42
TOBS057E09	pectinesterase like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	BAB08634.1	1e-95	AT5G66920	3e-97
TOBS066D12	pectin methylesterase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	CAB95025.1	3e-101	AT3G14310	1e-77
TOBS070A06	pectin methylesterase isoform alpha [<i>Vigna radiata</i>]	AAF35897.1 AF229849_1	3e-78	T14P8.1	5e-66
TOBS100A01	Pectinesterase [<i>Medicago truncatula</i>]	ABN08343.1	8e-24	AT4G33220	1e-21

TOBS103F03	Pectinesterase-2 precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	EEF50348.1	1e-16	AT3G49220	6e-16
TOBS103G02	pectin methylesterase [<i>Cicer arietinum</i>]	CAE76634.1	3e-85	AT3G49220	9e-79
TOBS100A01	Pectinesterase [<i>Medicago truncatula</i>]	ABN08343.1	8e-24	AT4G33220	9e-79

Tabela 10: Clones do TOBEST (biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos), codificando pectato liases e suas sequências de maior similaridade no NCBI e no genoma de *Arabidopsis thaliana* (TAIR), identificadas pelo programa BlastX.

TOBESTs	BLASTX	NCBI	E-value	TAIR	E-value
TOBC058D03 (055A03)	Pectate lyase precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	EEF47591.1	2e-45	AT1G67750	4e-43
TOBC055B12 (042E01, 122G02)	pectate lyase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	CAA47630.1	1e-95	At3G01270	8e-78
TOBS079H11	Pectate lyase precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	EEF47591.1	4e-90	AT1G67750	2e-87
TOBS084D10	Pectate lyase precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	EEF41281.1	0,001	AT1G04680	6e-04
TOBS013A08	Probable pectate lyase P59 precursor [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	P15722.1	2e-111	At1G14420	6e-90

Tabela 11: Clones do TOBEST (biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos), codificando poligalacturonases e suas sequências de maior similaridade no NCBI e no genoma de *Arabidopsis thaliana* (TAIR), identificadas pelo programa BlastX.

TOBESTs	BLASTX	NCBI	E-value	TAIR	E-value
TOBC107C01 (061F03)	polygalacturonase isoenzyme 1 beta subunit <i>[Solanum lycopersicum]</i>	ID:543991 LOC543991	4e-96	AT1G70370	7e-46
TOBC062D09 (094C03)	polygalacturonase, putative <i>[Ricinus communis]</i>	EEF51237.1	2e-56	AT3G62110	3e-18
TOBC110G11 (133H10)	polygalacturonase 7 <i>[Lycopersicon esculentum]</i>	AAC70951.1	6e-59	AT3G59850	5e-37
TOBS039G06	polygalacturonase precursor, putative <i>[Ricinus communis]</i>	EEF47203.1	6e-89	AT1G02460	7e-80
TOBS051E04	polygalacturonase <i>[Solanum lycopersicum]</i>	CAA32235.1	4e-11	AT2G41850	2e-07
TOBS058D11	polygalacturonase, putative <i>[Ricinus communis]</i>	EEF36999.1	7e-34	AT1G10640	2e-33
TOBS069C11	polygalacturonase, putative <i>[Ricinus communis]</i>	EEF36999.1	8e-37	AT1G60590	1e-23
TOBS098G08	polygalacturonase, putative <i>[Ricinus communis]</i>	EEF50572.1	3e-90	AT3G62110	6e-64
TOBS121A08	polygalacturonase, putative <i>[Ricinus communis]</i>	EEF51336.1	8e-86	At5G41870	2e-77

ANEXO II: Alinhamento obtido através do programa ClustalW, das sequências amplificadas a partir do DNA genômico das espécies de *Nicotiana* (*N. tabacum*, *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis*, *N. alata* e *N. otophora*). Foram utilizadas 4 sequências referentes a cada espécie. As regiões em negrito são as sequências ou parte dos “primers” (PAE7 e PAE8) utilizados na amplificação do fragmento. Este alinhamento mostra que as sequências são conservadas entre si, exceto na espécie de *N. otophora*.

Sequências de *N. sylvestris*

```

Pae-sylvestris-500-18      CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAGAGTGG 50
Pae-sylvestris-500-20      CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
Pae-sylvestris-500-44      CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
Pae-sylvestris-500-45      CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
*****

Pae-sylvestris-500-18      TGTGCAAAATATGCTTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAATTTGGGT 100
Pae-sylvestris-500-20      TGTGCAAAATATGCTTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAATTTGGGT 100
Pae-sylvestris-500-44      TGTGCAAAATATGCTTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAATTTGGGT 100
Pae-sylvestris-500-45      TGTGCAAAATATGCTTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAATTTGGGT 100
*****

Pae-sylvestris-500-18      CTGAGCTCAAGGCAGTGAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
Pae-sylvestris-500-20      CTGAGCTCAAGGCAGTGAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
Pae-sylvestris-500-44      CTGAGCTCAAGGCAGTGAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
Pae-sylvestris-500-45      CTGAGCTCAAGGCAGTGAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
*****

Pae-sylvestris-500-18      AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
Pae-sylvestris-500-20      AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
Pae-sylvestris-500-44      AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
Pae-sylvestris-500-45      AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
*****

Pae-sylvestris-500-18      TGTTCCTAAGTCGACAAA-----TCACTCTAG 250
Pae-sylvestris-500-20      TGTTCCTAAGTCGGCAA-----TCACTCTAG 250
Pae-sylvestris-500-44      TGTTCCTAAGTCGACAAAAGAAACCAGCATCCGAGATGCATTTCACTCTAG 250
Pae-sylvestris-500-45      TGTTCCTAAGTCGACAAAAGAAACCAGCATCCGAGATGCATTTCACTCTAG 250
*****

Pae-sylvestris-500-18      CAGTTAATGGGAGAAAACAGTCTGAACCTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
Pae-sylvestris-500-20      CAGTTAATGGGAGAAAACAGTCTGAACCTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
Pae-sylvestris-500-44      CAGTTAATGGGAGAAAACAGTCTGAACCTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
Pae-sylvestris-500-45      CAGTTAATGGGAGAAAACAGTCTGAACCTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
*****

Pae-sylvestris-500-18      AACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTACTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCAT 350
Pae-sylvestris-500-20      AACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTACTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCAT 350
Pae-sylvestris-500-44      AACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTACTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCAT 350
Pae-sylvestris-500-45      AACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTACTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCAT 350
*****

Pae-sylvestris-500-18      CCCTTGACCTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATTCCTTGCTCCTC 400
Pae-sylvestris-500-20      CCCTTGACCTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATTCCTTGCTCCTC 400
Pae-sylvestris-500-44      CCCTTGACCTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATTCCTTGCTCCTC 400
Pae-sylvestris-500-45      CCCTTGACCTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATTCCTTGCTCCTC 400
*****

Pae-sylvestris-500-18      TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATAC 450
Pae-sylvestris-500-20      TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATAC 450
Pae-sylvestris-500-44      TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATAC 450
Pae-sylvestris-500-45      TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATAC 450
*****

```

Pae-sylvestris-500-18 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTTCCAGT 490
Pae-sylvestris-500-20 GATGGCCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTTCCAGT 490
Pae-sylvestris-500-44 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTT----- 485
Pae-sylvestris-500-45 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTT----- 485
*** *****

Sequências de *N. tabacum*

Pae-tabaco-500-1 --CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGGTGTGCAAA 58
Pae-tabaco-500-2 --CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGGTGTGCAAA 58
Pae-tabaco-500-3 --CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGGTGTGCAAA 58
Pae-tabaco-500-5 TTCTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGGTGTGCAAA 60

Pae-tabaco-500-1 TATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAAATTTGGGTCTGAGCTCAAGGCAGTGC 118
Pae-tabaco-500-2 TATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAAATTTGGGTCTGAGCTCAAGGCAGTGC 118
Pae-tabaco-500-3 TATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAAATTTGGGTCTGAGCTCAAGGCAGTGC 118
Pae-tabaco-500-5 TATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAAAATTTGGGTCTGAGCTCAAGGCAGTGC 120

Pae-tabaco-500-1 AAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGCAAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCCCT 178
Pae-tabaco-500-2 AAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGCAAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCCCT 178
Pae-tabaco-500-3 AAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGCAAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCCCT 178
Pae-tabaco-500-5 AAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGCAAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCCCT 180

Pae-tabaco-500-1 CAATAAGTGGTTCGCCAGATATTGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGC 238
Pae-tabaco-500-2 CAATAAGTGGTTCGCCAGATATTGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGC 238
Pae-tabaco-500-3 CAATAAGTGGTTCGCCAGATATTGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGC 238
Pae-tabaco-500-5 CAATAAGTGGTTCGCCAGATATTGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGC 240

Pae-tabaco-500-1 ATTTCACTCTAGCAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCAC 298
Pae-tabaco-500-2 ATTTCACTCTAGCAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCAC 298
Pae-tabaco-500-3 ATTTCACTCTAGCAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCAC 298
Pae-tabaco-500-5 ATTTCACTCTAGCAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCAC 300

Pae-tabaco-500-1 CCAACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCATCCCTTGAC 358
Pae-tabaco-500-2 CCAACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCATCCCTTGAC 358
Pae-tabaco-500-3 CCAACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCATCCCTTGAC 358
Pae-tabaco-500-5 CCAACCCCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTTTGAGCATAAATCATCCCTTGAC 360

Pae-tabaco-500-1 CTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAAATCTTGCTCCTCTAAAGTGGAGGTTAGTAT 418
Pae-tabaco-500-2 CTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAAATCTTGCTCCTCTAAAGTGGAGGTTAGTAT 418
Pae-tabaco-500-3 CTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAAATCTTGCTCCTCTAAAGTGGAGGTTAGTAT 418
Pae-tabaco-500-5 CTAAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAAATCTTGCTCCTCTAAAGTGGAGGTTAGTAT 420

Pae-tabaco-500-1 CGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATACGATGACCCATCACAATACTTAACCTTGA 478
Pae-tabaco-500-2 CGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATACGATGACCCATCACAATACTTAACCTTGA 478
Pae-tabaco-500-3 CGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATACGATGACCCATCACAATACTTAACCTTGA 478
Pae-tabaco-500-5 CGGGATCAACTTCTTCAATATCGCCAGTATACGATGACCCATCACAATACTTAACCTTGA 480

Pae-tabaco-500-1 CTCTGTT----- 485
Pae-tabaco-500-2 CTCTGTT----- 485
Pae-tabaco-500-3 CTCTGTTCCAGT----- 490
Pae-tabaco-500-5 CTCTGTTCCAGTTGTAGAAGTCTGGATTAAGCGGAATTCAGCAC 525

Sequências de *N. tomentosiformis*

Pae-tom-500-3 **ACTGGAACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 60
Pae-tom-500-5 -----**AACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 55
Pae-tom-500-4 **ACTGGAACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 60
Pae-tom-500-1 **ACTGGAACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 60

Pae-tom-500-3 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 120
Pae-tom-500-5 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 115
Pae-tom-500-4 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 120
Pae-tom-500-1 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 120

Pae-tom-500-3 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 180
Pae-tom-500-5 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 175
Pae-tom-500-4 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 180
Pae-tom-500-1 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 180

Pae-tom-500-3 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAAGCTG 240
Pae-tom-500-5 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAAGCTG 235
Pae-tom-500-4 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAAGCTG 240
Pae-tom-500-1 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAAGCTG 240

Pae-tom-500-3 CTAGAGTGAAATGCATCTCGGATGCTGGTTTCTTTGTCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 300
Pae-tom-500-5 CTAGAGTGAAATGCATCTCGGATGCTGGTTTCTTTGTCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 295
Pae-tom-500-4 CTAGAGTGAAATGCATCTCGGATGCTGGTTTCTTTGTCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 300
Pae-tom-500-1 CTAGAGTGAAATGCATCTCGGATGCTGGTTTCTTTGTCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 300

Pae-tom-500-3 AACCCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTCACCGGATCTGCCAAGAACC 360
Pae-tom-500-5 AACCCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTCACCGGATCTGCCAAGAACC 355
Pae-tom-500-4 AACCCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTCACCGGATCTGCCAAGAACC 360
Pae-tom-500-1 AACCCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTCACCGGATCTGCCAAGAACC 360

Pae-tom-500-3 TACCCTCTCTTGCCTGACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 420
Pae-tom-500-5 TACCCTCTCTTGCCTGACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 415
Pae-tom-500-4 TACCCTCTCTTGCCTGACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 420
Pae-tom-500-1 TACCCTCTCTTGCCTGACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 420

Pae-tom-500-3 TAGCAAGACATATTTGCACACCACTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTC TTGGCAGA** 480
Pae-tom-500-5 TAGCAAGACATATTTGCACACCACTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTC TTGGCAGA** 475
Pae-tom-500-4 TAGCAAGACATATTTGCACACCACTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTC TTGGCAGA** 480
Pae-tom-500-1 TAGCAAGACATATTTGCACACCACTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTC TTGGCAGA** 480

Pae-tom-500-3 **TAAACAACAG** 490
Pae-tom-500-5 **TAAACAACAG** 485
Pae-tom-500-4 **TAAACAACAG** 490
Pae-tom-500-1 **TAAACAACAG** 490

Sequências de *N. alata*

Pae-alata-500-1 **ACTGGAACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 60
Pae-alata-500-21 **ACTGGAACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 60
Pae-alata-500-3 -----**AACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 55
Pae-alata-500-4 -----**AACAG**AGTCAAGGTTAAGTATTGTGATGGGTCATCGTATACTGGCGATATTGAAG 55

Pae-alata-500-1 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 120
Pae-alata-500-21 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 120
Pae-alata-500-3 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 115
Pae-alata-500-4 AAGTTGATCCCAGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTTGAAGCTATCATGG 115

Pae-alata-500-1 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 180
Pae-alata-500-21 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 180
Pae-alata-500-3 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 175
Pae-alata-500-4 AGTATTTTTTAGGTCAAGGGATGATTTATGCTCAAAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAG 175

Pae-alata-500-1 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATAACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAACCTG 240
Pae-alata-500-21 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATAACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAACCTG 240
Pae-alata-500-3 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATAACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAACCTG 235
Pae-alata-500-4 CAGGAGGGTTGGGTGCAATCATAACATTGTGATAAGTTCAGACTGTTTCTCCATTAACCTG 235

Pae-alata-500-1 CTAGAGTGAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTTTGTGCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 300
Pae-alata-500-21 CTAGAGTGAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTTTGTGCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 300
Pae-alata-500-3 CTAGAGTGAAATGCATCTCGGATGCTGGTTTCTTTGTGCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 295
Pae-alata-500-4 CTAGAGTGAAATGCATCTCGGATGCTGGTTTCTTTGTGCGACTTAGAAACAATATCTGGCG 295

Pae-alata-500-1 AACCACCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTGCACGGATCTGCCAAGAACC 360
Pae-alata-500-21 AACCACCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTGCACGGATCTGCCAAGAACC 360
Pae-alata-500-3 AACCACCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTGCACGGATCTGCCAAGAACC 355
Pae-alata-500-4 AACCACCTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTTGCTTTGCACGGATCTGCCAAGAACC 355

Pae-alata-500-1 TACCACTCTCTTGCACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 420
Pae-alata-500-21 TACCACTCTCTTGCACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 420
Pae-alata-500-3 TACCACTCTCTTGCACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 415
Pae-alata-500-4 TACCACTCTCTTGCACTGCCTTGAGCTCAGACCCAAATTTGTGCTTCTTCCCTCAGTATG 415

Pae-alata-500-1 TAGCAAGACATATTTGCACACCTCTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTCTTTGGCAGA** 480
Pae-alata-500-21 TAGCAAGACATATTTGCACACCACTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTCTTTGGCAGA** 480
Pae-alata-500-3 TAGCAAGACATATTTGCACACCACTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTCTTTGGCAGA** 475
Pae-alata-500-4 TAGCAAGACATATTTGCACACCACTTTTCATCGTCAACTCGGCC**TATGATTCTTTGGCAGA** 475

Pae-alata-500-1 **TAAACAACAG** 490
Pae-alata-500-21 **TAAACAACAG** 490
Pae-alata-500-3 **TAAACAACAG** 485
Pae-alata-500-4 **TAAACAACAG** 485

Sequências de *N. otophora*

Pae-otophora-500-2 CAGTCAAATGCATCTCTCTGATGCTGGTTTCTTTATTAATGCGTAAGTTCATGAATCTGA 60
Pae-otophora-500-3 -----CGAATGATTTTCT 13
Pae-otophora-500-9 -----ACTGGAACAGA 11
Pae-otophora-500-10 -----

Pae-otophora-500-2 GAAAAATTTCAAAGTGTGTTTCTTTTTTAA-----CTAATCTGTATGAGTTTATG 114
Pae-otophora-500-3 GATCTACGCTACAATTGAGTTTTTTTTTTGGGGGGGGGCTAACTCTCTAATGAGTTTATG 73
Pae-otophora-500-9 GTCAGGGTTAAGTATTGATGGGTCACTCGTATACTGGCGA--TATTGAAGAAGTTGATC 69
Pae-otophora-500-10 -----ATTTGACTCTAGCAGTCAAAGAGAAAAAAGTCT----GAATTTGTC 43
** * * * * *

Pae-otophora-500-2 CAGAAA--AACTATAACT---GGTGAGCCACATATTAAGAGTATTTAAGAGAATTGTT 169
Pae-otophora-500-3 CAGAGA--AACTATACT--GGCGAACCACTTATTGAGGAAATGTATAAAAAGAGTTGTT 128
Pae-otophora-500-9 CCGATACTAACCTCCACTTTAGAGGAGCAAGAATTTTGAAGCTATCATGGAGTATTTT 129
Pae-otophora-500-10 ACAATGTAGGATTGCACC-----CAACC-CTCCTTCTGAAGTTCCACTAAGGATGGCCT 96
* * * * *

Pae-otophora-500-2 ACTTTGCATGTAAGAACCATCATTAGTAAATGTTTCTCTTTTATTATTCTT----- 222
Pae-otophora-500-3 GCTTTGCACGTAAGAAGCATCACTTA--AAATAGTTTCTTTTCTTATCATATTATTA 186
Pae-otophora-500-9 TAGGTCAAGGGATGATTTAT-GCTCA--AAATGCCATCCTCAGTGGAACTTCAGCAGGAG 186
Pae-otophora-500-10 ATCATCGATGTTTAAA-ATTTCTTA-----TATTTT TAGCCATATAAATTAGAGAGAAT 150
* * * * * * * * * * *

```

Pae-otophora-500-2 -----TATTGCTTTTTATA-----AACATTATTGACTCTCTTTGGGGT 262
Pae-otophora-500-3 ATTTAATCTCAATTATAGTTTCTTGTACCTATATAAACATTGTTGACCCCTTTCTTGGGGT 246
Pae-otophora-500-9 GGTTGGGTGCAATCATACATTGTGATA-----AGTTCAGACTGTTTCTCCCAATTAAC 239
Pae-otophora-500-10 AAGAGG----ACTATATATGAGGGGG-----AAATGGGACGTACATTTTCAGCATAT 198
                ** * * * *
Pae-otophora-500-2 GTA----CTTAGGGATCTGCCAAGACCCTACCATTCTTGCACATTCTTG-AGCTTAG 317
Pae-otophora-500-3 AC-----TTAGGGATCTGCCAAGACCCTACCCTCTTGCACCTGCCTTG-ACCTCAG 298
Pae-otophora-500-9 GC-----TAGAGTGAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTTTGTGCGACTTAG-AAACAAT 292
Pae-otophora-500-10 ACCATCCCTTCATGGTATAATAATTCCCTCATGATTCCTTTGAATATCTTGCACCTCTG 258
                * * * * *
Pae-otophora-500-2 ACCCAA-GTTTGGTAAG---AACAGTTTTATTTAT---TTATTTATT-GTGTAAT--AA 367
Pae-otophora-500-3 ACCCAA-ATTTGGTAAGTCGAACAATTTTGTTTATAATTTATTTCTTTGTGAAAAA--AA 355
Pae-otophora-500-9 ATCTGGCGAACCACTTATTGAGGAAATGTATAAAAGAGTTGTTGCTTTGCACGGATCTGC 352
Pae-otophora-500-10 AAGTGGAGATTAGTAGCTTGAAAATTTTGGTA-----CTTCTAATTAGAAAAGTTACAC 313
* * * * *
Pae-otophora-500-2 -ATTGACCAACATGATCTTTCTAACTAATAAGTATAACAATCCAATGATTTGGCAGTGCTT 426
Pae-otophora-500-3 TATTATCCAACATGATCTTTCAACTAATAATAAATG-AATTCAATGATTTGGCAGTGCTT 414
Pae-otophora-500-9 CAAGAACCCTAC-CACTCTCTTGCACCTGCCTTGAGCTCAGACCCA-AATTTG----TGCTT 406
Pae-otophora-500-10 CAATACAAATTCGAAGCACTAAATAAGAAGAT-AGTCCAACCTACGGGGTCAATTTCTTCT 372
* * * * *
Pae-otophora-500-2 CTTCCTCAGTATGCGACACCACATATTTGCACGCCACTTTTCATCATTAAATTCGGCTTA 486
Pae-otophora-500-3 CTTCCTCAGTATGTAGCAAGACATATTTGCACACCCTTTTCATCGTCAACTCGGCCTA 474
Pae-otophora-500-9 CTTCCTCAGTATGTAGCAAGACATATTTGCACACCCTTTTCATCGTCAACTCGGCCTA 466
Pae-otophora-500-10 ATATCTCCGGTATATGATGATCCATCGCAGTGAACCTGTTCCAGT----- 417
* * * * *
Pae-otophora-500-2 TGATTCTTGGCAGATAAACAACAGG 511
Pae-otophora-500-3 TGATTCTTGGCAGATAAACAACAG- 498
Pae-otophora-500-9 TGATTCTTGGCAGATAAACAACAG- 490
Pae-otophora-500-10 -----

```

ANEXO III: Alinhamento obtido através do programa ClustalW, das sequências amplificadas a partir do DNA genômico das diferentes espécies de *Nicotiana* (*N. tabacum*, *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis*, *N. alata* e *N. otophora*). As regiões em negrito são as sequências ou parte dos “primers” (PAE7 e PAE8) utilizados na amplificação do fragmento. Este alinhamento mostra que as sequências entre as diferentes espécies são conservadas.

```

Pae-sylvestris-500-44 CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
Pae-tabaco-500-1 CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
Pae-alata-500-3 CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
Pae-tomentosiformis-500-3 CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
Pae-otophora-500-9 CTGTTGTTTATCTGCCAAGAATCATAGGCCGAGTTGACGATGAAAAGTGG 50
*****
Pae-sylvestris-500-44 TGTGCAAAATATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAATTTGGGT 100
Pae-tabaco-500-1 TGTGCAAAATATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAATTTGGGT 100
Pae-alata-500-3 TGTGCAAAATATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAATTTGGGT 100
Pae-tomentosiformis-500-3 TGTGCAAAATATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAATTTGGGT 100
Pae-otophora-500-9 TGTGCAAAATATGTCTTGCTACATACTGAGGGAAGAAGCACAATTTGGGT 100
*****
Pae-sylvestris-500-44 CTGAGCTCAAGGCAGTGCAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
Pae-tabaco-500-1 CTGAGCTCAAGGCAGTGCAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
Pae-alata-500-3 CTGAGCTCAAGGCAGTGCAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
Pae-tomentosiformis-500-3 CTGAGCTCAAGGCAGTGCAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
Pae-otophora-500-9 CTGAGCTCAAGGCAGTGCAAGAGAGTGGTAGGTTCTTGGCAGATCCGTGC 150
*****

```

Pae-sylvestris-500-44 AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
Pae-tabaco-500-1 AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
Pae-alata-500-3 AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
Pae-tomemtosiformis-500-3 AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200
Pae-otophora-500-9 AAAGCAACAACCTCTTTTATACATTTCTCAATAAGTGGTTCGCCAGATAT 200

Pae-sylvestris-500-44 TGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGCATTTCACTCTAG 250
Pae-tabaco-500-1 TGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGCATTTCACTCTAG 250
Pae-alata-500-3 TGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGCATTTCACTCTAG 250
Pae-tomemtosiformis-500-3 TGTTTCTAAGTCGACAAAGAAACCAGCATCCGAGATGCATTTCACTCTAG 250
Pae-otophora-500-9 TGTTTCTAAGTCGACAAA-----TCACTCTAG 250

Pae-sylvestris-500-44 CAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
Pae-tabaco-500-1 CAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
Pae-alata-500-3 CAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
Pae-tomemtosiformis-500-3 CAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCACCC 300
Pae-otophora-500-9 CAGTTAATGGGAGAAACAGTCTGAACTTATCACAATGTATGATTGCACCC 300

Pae-sylvestris-500-44 AACCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTGAGCATAAATCAT 350
Pae-tabaco-500-1 AACCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTGAGCATAAATCAT 350
Pae-alata-500-3 AACCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTGAGCATAAATCAT 350
Pae-tomemtosiformis-500-3 AACCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTGAGCATAAATCAT 350
Pae-otophora-500-9 AACCTCCTGCTGAAGTTCCTGAGGATGGCATTGAGCATAAATCAT 350

Pae-sylvestris-500-44 CCCTTGACCTAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATCTTGCTCCTC 400
Pae-tabaco-500-1 CCCTTGACCTAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATCTTGCTCCTC 400
Pae-alata-500-3 CCCTTGACCTAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATCTTGCTCCTC 400
Pae-tomemtosiformis-500-3 CCCTTGACCTAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATCTTGCTCCTC 400
Pae-otophora-500-9 CCCTTGACCTAAAAATACTCCATGATAGCTTCAAAAATCTTGCTCCTC 400

Pae-sylvestris-500-44 TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTCAATATCGCCAGTATAC 450
Pae-tabaco-500-1 TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTCAATATCGCCAGTATAC 450
Pae-alata-500-3 TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTCAATATCGCCAGTATAC 450
Pae-tomemtosiformis-500-3 TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTCAATATCGCCAGTATAC 450
Pae-otophora-500-9 TAAAGTGGAGGTTAGTATCGGGATCAACTTCTCAATATCGCCAGTATAC 450

Pae-sylvestris-500-44 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTT---- 485
Pae-tabaco-500-1 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTT---- 485
Pae-alata-500-3 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTT---- 485
Pae-tomemtosiformis-500-3 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTTCCAG 489
Pae-otophora-500-9 GATGACCCATCACAATACTTAACCTTGACTCTGTTCCAG 489

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)