

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Edna Lôbo Machado

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES, SÍNTESE E
FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO
MEGAGAMETÓFITO DE
*Araucaria angustifolia***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a)
<i>Edna Lôbo Machado</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Laura m. m. Ottoni

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoni

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M18e Expressão diferencial de genes, síntese e fosforilação de proteínas no megagametófito de *Araucaria angustifolia*/Edna Lôbo Machado. -- Campinas, SP:[s.n.], 2001
145f.:ilus.

Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Genes-expressão diferencial. 2. Fosforilação de proteínas. 3. Desenvolvimento. 4. Semente. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 20 de Julho de 2001

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora) Laura m. m. Ottoboni
(Assinatura)

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Dr. Carlos Augusto Colombo

Dr^a Mirian Perez Maluf

Laura M. M. Ottobon
(Assinatura)

(Assinatura)

Miriam Perez Maluf
(Assinatura)

Desde que nascestes não é mais
que um vôo no tempo.
Rumo do céu?
Que importa a rota.
Voa e canta enquanto resistirem as asas”.

(Menotti Del Picchia)

A minha família,

Pelo amor que nos une, pelo **carinho**, dedicação
e principalmente pelo respeito **que** existe entre
nós,

dedico

AGRADECIMENTOS

À Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, pelo carinho, oportunidade e orientação neste trabalho que foram de fundamental importância para a minha formação acadêmica;

Ao Professor Dr. Edson Rosa Pimentel e a Dra. Mirian Perez Maluf pelas valiosas críticas e sugestões no exame prévio do trabalho de tese;

Ao Dr. Carlos Augusto Colombo pela leitura cuidadosa e discussão do trabalho no exame prévio de tese e pelo seqüenciamento realizado em seu laboratório;

À Dra. Alba pela amizade e colaboração na elaboração do trabalho do segundo capítulo;

Ao Marcio, as secretárias do CBMEG Sandra, Tânia Fabiana e Patrícia que sempre mostraram disponibilidade e boa vontade de ajudar;

À secretária de Pós-Graduação do DBCE, Lillian, sempre prestativa e atenciosa;

Aos meus companheiros de laboratório pelo carinho, amizade e por compartilharem comigo os momentos de alegrias e de dificuldades durante a elaboração deste trabalho;

À Suzi pela amizade, incentivo e apoio;

À Larissa, Verusa, Kizzy e Maria pelo companheirismo;

Às minhas amigas especiais, Jussara e Soninha, sempre presentes em minha vida;

À FAPESP pelo apoio financeiro;

Enfim, a Robson, pelo amor, carinho, torcida e compreensão, sempre ao meu lado.

ÍNDICE

RESUMO.....	10
SUMMARY.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
1. <i>Araucaria angustifolia</i>	14
2. Considerações gerais sobre o desenvolvimento da semente de coníferas.....	15
3. Genes e desenvolvimento.....	19
4. Síntese e fosforilação de proteínas durante o desenvolvimento.....	21
OBJETIVOS.....	25
Capítulo 1. Estudo da expressão diferencial de genes no megagametófito de <i>Araucaria Angustifolia</i> durante o desenvolvimento da semente e embrião maduro.....	27
1. Introdução.....	28
2. Materiais e Métodos.....	30
2.1. Coleta e utilização do material biológico.....	30
2.2. Isolamento de RNA total.....	31
2.3. Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente no megagametófito e embrião maduro através de <i>display</i> diferencial de mRNA.....	31
2.4. Confirmação da expressão diferencial através de experimentos de <i>slot blot</i>	33
2.5. Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de <i>slot blot</i>	35
2.6. Clonagem dos cDNAs diferenciais.....	36
2.7. Isolamento de DNA plasmidial.....	36
2.8. Digestão do DNA plasmidial com <i>EcoR</i> I.....	37

2.9. Sequenciamento.....	37
2.10. Análise das seqüências.....	38
3. Resultados e Discussão.....	39
3.1. Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente através de <i>display</i> diferencial de mRNA.....	39
3.2. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados dos géis de <i>display</i> diferencial de mRNA através de <i>slot blot</i>	43
3.3. Análise dos cDNAs isolados através de <i>display</i> diferencial de mRNA com expressão diferencial confirmada por <i>slot blot</i>	51
3.4. Análise das seqüências dos cDNAs isolados através de <i>display</i> diferencial de mRNA.....	61
4. Referências Bibliográficas.....	91

Capítulo 2. Síntese e fosforilação de proteínas no megagametófito de *Araucaria angustifolia* durante o desenvolvimento da semente.....102

1. Introdução.....	103
2. Materiais e Métodos.....	106
2. 1. Material biológico.....	106
2.2. Preparação de extrato.....	106
2.3. Análise da síntese de proteínas através de SDS-PAGE.....	106
2.4. Fosforilação e eletroforese de proteínas endógenas.....	107
2.5. Fosforilação e eletroforese de proteínas endógenas usando inibidores de fosfatase.....	107
2.6. Fosforilação e eletroforese de proteínas endógenas usando inibidor para CK (caseína quinase).....	108
2.7. Fosforilação de caseína exógena.....	108
2.8. Ensaio de quinase em gel para CKII.....	109
2.9. <i>Slot blot</i> de RNA.....	110
3. Resultados e Discussão.....	112
3.1. Análise das proteínas em MG, MC e MM através de SDS-PAGE.....	112

3.2. Análise da fosforilação de proteínas de MG, MC e MM.....	112
3.3. Análise da fosforilação de proteínas endógenas usando inibidores de fosfatase.....	113
3.4. Análise da atividade de CKII nos extratos de MG, MC e MM.....	117
3.5. Identificação de CKII através de ensaio de quinase em gel.....	118
3.6. Análise através de <i>slot blot</i> de RNA dos transcritos de CKII durante o desenvolvimento da semente.....	123
4. Referências Bibliográficas.....	126
CONCLUSÕES	130
APÊNDICE.....	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À INTRODUÇÃO GERAL.....	139

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* é a única conífera nativa com importância econômica no Brasil. Originalmente a *A. angustifolia* representava 40%, 31% e 25% da superfície do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente. Manchas esparsas eram encontradas em São Paulo (3%), inteirando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%), em áreas de altitudes elevadas. Pequenas manchas desta espécie eram encontradas na Argentina e no Paraguai. Em plantas, o processo de desenvolvimento e diferenciação da semente é controlado direta ou indiretamente por mudanças no padrão da expressão de genes. Assim, o capítulo 1 do presente trabalho apresenta a análise da expressão diferencial de genes no megagametófito de *A. angustifolia* durante o desenvolvimento da semente e embrião maduro. Para isso, foi isolado RNA de MG (megagametófito contendo embrião no estágio globular), MC (megagametófito contendo embrião cotiledonar), MM (megagametófito contendo embrião maduro) e EM (embrião maduro). Os RNAs foram utilizados em experimentos de *display* diferencial de mRNA. Nos experimentos de *display* diferencial foram utilizados os *primers* ancoradores T₁₂VC e T₁₂VG e os *primers* arbitrários OPJ01, OPJ08 e OPJ10. Com a utilização destes *primers*, foram isolados 163 cDNAs diferenciais sendo 28 de MG, 54 de MC, 43 de MM e 38 de EM.

Os 163 cDNAs isolados foram analisados através de *slot blot* sendo que 129 tiveram a expressão diferencial confirmada: 15 de MG, 48 de MC, 31 de MM e 35 de EM. Os sinais de hibridização dos cDNAs diferenciais foram quantificados utilizando-se o programa CrazyQuant V. 1.3. As médias dos valores de intensidade de cada cDNA foram calculadas e a seguir, calculou-se o coeficiente de expressão (CE). Um total de 49 cDNAs com os maiores CEs foram clonados e seqüenciados. Alguns desses cDNAs apresentaram seqüências repetidas, restando assim, 36 seqüências. O alinhamento das seqüências foi feito com o auxílio do programa Clustal W (V. 1,75). As seqüências foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados, com o auxílio do programa BLAST X (V. 2,1,1). Um total de 21 fragmentos apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados, sendo 6 de MG, 5 de MC, 6 de MM e 4 de EM.

Desenvolvimento e diferenciação são também controlados através de fosforilação. Várias proteínas e enzimas são fosforiladas em plantas. Como exemplo, podemos citar:

ATPase, RNA polimerase, malato sintase, histona H1 e outras. No capítulo 2 é apresentada a análise da síntese e fosforilação de proteínas no megagametófito de *A. angustifolia* durante o desenvolvimento da semente. Para isso, foi realizada extração de proteína total do megagametófito nos estádios MG, MC e MM. As proteínas foram submetidas a fosforilação *in vitro* e analisadas através de SDS-PAGE. Um total de 19 proteínas foram fosforiladas. Os tamanhos relativos dessas proteínas variavam de 324 a 27,9 kDa. Para MG foram observadas 6 proteínas fosforiladas, enquanto que para MC e MM foram observadas um total de 14 e 17 proteínas, respectivamente.

A CKII (caseína quinase tipo II) é uma das principais proteínas quinases multifuncionais da célula com mais de 200 substratos conhecidos. Ela está envolvida no controle da replicação e transcrição, processamento de RNA, transdução e metabolismo celular. Assim, foram realizados ensaios de fosforilação *in vitro* utilizando heparina, caseína, ATP ou GTP (como doadores de fosfato) para identificação da atividade de CKII em MG, MC e MM. Fez-se também, ensaios de quinase em gel para CKII, utilizando caseína incorporada ao gel e ATP ou GTP para identificar a CKII no gel. Através desses ensaios foi observada a presença de atividade da CKII nos extratos das amostras analisadas, e a identificação de dois polipeptídeos de 35 e 15 kDa que representam a subunidade α' e β , respectivamente da CKII.

Com o objetivo de analisar a expressão temporal de transcritos de CKII durante o desenvolvimento da semente de *A. angustifolia*, RNA total isolado de MG, MC, MM, EG (embrião globular), EC (embrião cotiledonar) e EM (embrião maduro) foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com as sondas de CKII isoladas de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram uma maior quantidade de transcritos de CKII nos estádios iniciais de desenvolvimento, MG e EG, com as duas sondas utilizadas. A quantidade de transcritos de CKII diminuiu progressivamente tanto no megagametófito quanto no embrião nos dois estádios finais de desenvolvimento.

SUMMARY

Araucaria angustifolia is the only native conifer of economic importance in Brazil. Originally, it covered 40%, 31% and 25% of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, respectively. Sparse patches were also found in the States of São Paulo (3%), Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%), in areas with elevated altitudes.

In plants, the process of seed development is controlled direct or indirect by changes in gene expression. In this way, differential gene expression in the megagametophyte, during seed development, and in the mature embryo of *A. angustifolia* was investigated. The obtained results were presented in Chapter 1. For this investigation, total RNA was isolated from MG, MC, MM and EM and used in the mRNA differential display experiments with the anchor primers T₁₂VC and T₁₂VG and the arbitrary primers OPJ01, OPJ08 and OPJ10. A total of 163 differentially expressed cDNAs were isolated in the experiments (28 from MG, 54 from MC, 43 from MM and 38 from EM). From these 163 cDNAs, 129 (15 from MG, 48 from MC, 31 from MM and 35 from EM) had their differential expression confirmed by slot blot.

The hybridization signals of the differential expressed cDNAs were quantified using the CrazyQuant V. 1.3 program and used in the calculation of the expression coefficients. The 49 cDNAs exhibiting the highest CEs were cloned and sequenced. Some of the cDNAs presented repeated sequences leaving a total of 36 different sequences. The alignment of the sequences was performed with the Clustal W V. 1.75 program. The sequences were compared with GenBank sequences using the BLAST algorithm, BLASTX function (V.2.1.1). The sequence of 21 (6 from MG, 5 from MC, 6 from MM and 4 from EM) differentially expressed cDNAs showed similarity with GenBank sequences.

It is well known that protein phosphorylation plays an important role in development and differentiation. In this way, in Chapter 2, the synthesis and phosphorylation of proteins in the megagametophyte, during *A. angustifolia* seed development, was investigated. The proteins, isolated from MG, MC and MM, were analyzed by SDS-PAGE. These proteins were subjected to *in vitro* phosphorylation and after electrophoresis in a 10% acrylamide gel it was observed that 19 proteins, ranging from 32.4 to 27.9 kDa, were phosphorylated.

The CKII (casein kinase II) is an important kinase with more than 200 substrates known. It is involved in DNA replication, transcription control, RNA processing, signal transduction and cell metabolism. In this way, *in vitro* phosphorylation essays were performed using heparin, casein, and ATP or GTP to identify CKII in MG, MC and MM. In order to identify CKII in gel, kinase tests were performed in gel using casein and ATP or GTP. The obtained results indicated the presence of CKII activity in the extracts of MG, MC and MM. Two 35 and 15 kDa proteins observed in the gels corresponds to the α' and β subunit, respectively, of CKII.

To analyze the temporal expression of CKII during the *A. angustifolia* seed development, total RNA was isolated from MG, MC, MM, EG, EC and EM and transferred to nylon membranes. The RNA was hybridized with the CKII probes SCEQAM1039G02.g and QSD1077B01.g, isolated from sugarcane. According to the results, the amount of CKII transcripts are higher in the initial stages of development, MG and EG, decreasing in the final stages in both the megagametophyte and embryo.

INTRODUÇÃO

1. *Araucaria angustifolia*

O gênero *Araucaria* possui apenas duas espécies na América do Sul, *Araucaria araucana* e *Araucaria angustifolia*, sendo que somente *A. angustifolia* (Figura 1A) ocorre no Brasil (Joly & Hemogênes, 1979). *A. angustifolia* é a única conífera nativa com importância econômica no Brasil (Guerra *et al.*, 2000). Segundo Carvalho (1994), originalmente a *A. angustifolia* representava 40%, 31% e 25% da superfície do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente. Manchas esparsas eram encontradas em São Paulo (3%), inteirando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%), em áreas de altitudes elevadas. Pequenas manchas desta espécie eram encontradas na Argentina e no Paraguai.

As árvores da *A. angustifolia* atingem 20-50 m de altura sendo que o tronco, em geral cilíndrico, apresenta diâmetro de 1-2 m (Reitz *et al.*, 1978). A casca é grossa, resinosa no interior e no exterior, e se desprende em placas com coloração cinzento-escura (Reitz *et al.*, 1978). As árvores apresentam ramificação racemosa em verticilos que se ramificam formando as grimpas. A folhagem é rija, verde-escura e densa (Reitz *et al.*, 1978). A madeira serrada e laminada foi por um longo período, um dos produtos de exportação de grande importância. Em 1964, ela ocupou o 4º lugar entre os produtos brasileiros de exportação (Reitz *et al.*, 1978). A madeira era utilizada em construções em geral, fabricação de móveis, laminados e outros. A araucária produz 58,3% de celulose de fibra longa e 28,5% de lignina sendo assim, utilizada na indústria do papel. A resina exudada da casca serve para fabricação de vernizes, terebentina, acetona e outros. O pinhão tem alto valor nutritivo e é consumido por humanos e pela fauna silvestre, principalmente no inverno (Guerra *et al.*, 2000).

A araucária se encontra na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (Carvalho, 1994). A exploração da *A. angustifolia* se intensificou a partir de 1934 (Mattos, 1994). As reservas do Estado de São Paulo foram exauridas entre os anos 30 e 40 e as do Paraná nos anos 70 (Shimizu & Oliveira, 1981). Atualmente a vegetação natural representa de 0,7% (Longhi, 1993) a aproximadamente 1% (Lima & Capobianco, 1997) da

área original. Esta espécie necessita de grande demanda de nutrientes durante o desenvolvimento da planta, precisando de solos férteis muito mais que as outras espécies de coníferas (Handro, 1986). Este fator associado com o longo ciclo reprodutivo entre a polinização e a formação da semente, impossibilita o reflorestamento em grande escala (Guerra *et al.*, 2000). Assim, o reflorestamento da *A. angustifolia* declinou nos últimos anos sendo substituída por *Pinus elliottii*, *Pinus taeda* e *Eucaliptus*.

2. Considerações gerais sobre o desenvolvimento da semente de coníferas

O desenvolvimento da semente representa um modelo biológico interessante para estudos de organização celular, acúmulo de proteínas e expressão gênica diferencial (Goldberg *et al.*, 1989; Lindsay & Topping, 1993). Em plantas, o processo de desenvolvimento e diferenciação da semente é controlado direta ou indiretamente por mudanças no padrão da expressão de genes (Misra, 1994). Entre estes genes, os de proteínas de reserva e os genes *lea* (*late embryogenesis abundant*) tem sido extensivamente investigados e suas funções elucidadas (Dure, 1993; Thomas, 1993). A identificação de genes envolvidos no desenvolvimento da semente é altamente desejável.

Vários estudos envolvendo desenvolvimento da semente foram realizados em angiospermas (Goldberg *et al.*, 1989). No entanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento da semente de coníferas. O estudo do desenvolvimento deste tipo de semente é limitado pelo longo ciclo reprodutivo e a dificuldade em se obter sementes em desenvolvimento (Chatthai & Misra, 1998).

As sementes de araucária são grandes apresentando de 3-8 cm de comprimento, 1-2 cm de largura e 6,5-8,5 g de peso fresco (Figura 1C). Elas são compostas por uma casca densa que envolve o megagametófito (Espindola *et al.*, 1994). Os embriões da araucária possuem dois cotilédones longos e estão localizados dentro da cavidade de corrosão do megagametófito (Figura 1D). Os embriões não apresentam dormência e germinam facilmente em temperaturas variando de 10 a 30°C, sendo que a temperatura ótima fica ao redor de 25-30°C (Espindola *et al.*, 1994). A espécie é dióica, algumas vezes monóica com flores unissexuais. A flor masculina possui de 10-13 cm de comprimento. O cone feminino é oval, com uma casca consistente e diâmetro de 20 a 25 cm (Figura 1B; Rizzini, 1976).

O ciclo reprodutivo da *A. angustifolia* é de aproximadamente 4 anos (Guerra *et al.*, 2000). O desenvolvimento do cone feminino começa na primavera (entre agosto e outubro), estando pronto para a polinização em setembro do ano seguinte (Guerra *et al.*, 2000). A fertilização acontece somente no terceiro ano, entre outubro e dezembro e os cones iniciam a maturação no quarto ano (Guerra *et al.*, 2000).

A embriogênese em gimnospermas difere da embriogênese de angiospermas em vários aspectos. Por exemplo, o processo de fertilização dupla não ocorre em gimnospermas. Em coníferas, dois gametas masculinos são formados, contudo, um destes gametas não é funcional (Singh, 1978). O gameta funcional, após fusão com o gameta feminino, vai dar origem ao embrião diplóide. O desenvolvimento do embrião ocorre dentro da cavidade de corrosão do megagametófito haplóide cujo desenvolvimento ocorre antes do processo de fertilização.

Duas fases são observadas durante o processo de embriogênese em coníferas: (1) fase pró-embriônica que vai desde a fertilização até o rompimento da arquegônia pelo pró-embrião e (2) fase embriônica que vai desde o rompimento da arquegônia até a maturação do embrião (Owens & Moulder, 1984).

O embrião, no decorrer do desenvolvimento, forma um grupo globular compacto que resulta na formação do embrião globular. O embrião globular aumenta, aproximadamente duas vezes dando origem ao embrião globular tardio. A parte apical do embrião globular tardio sofre um alongamento, resultando na formação do estágio de desenvolvimento embriônico conhecido por torpedão. A seguir, com o alongamento posterior da região apical, são formados os cotilédones dando origem à fase cotiledonar de desenvolvimento. O embrião aumenta de tamanho, ocupando todo o eixo central do megagametófito. O ápice radicular se forma a partir da diferenciação de células próximas ao suspensor secundário e o ápice caulinar é formado a partir do ápice embriônico dando origem ao embrião maduro (Espindola *et al.*, 1994). Os estágios globular, cotiledonar e maduro de desenvolvimento do embrião são mostrados na Figura 1D.

A formação do arquegônio ocorre a partir de um único gametófito na família Araucariaceae, variando consideravelmente em número, dependendo da espécie (Gifford & Foster, 1989). Em *A. angustifolia*, o megagametófito contém quatro células do arquegônio, onde apenas uma vai ser fertilizada originando um número equivalente de células do

complexo embrionário. Este fenômeno é denominado de “poliembrionia simples” ou “poliembrionia polizigótica” (Dogra, 1978). Apenas um destes pró-embriões vai se desenvolver em embrião maduro (Gifford & Foster, 1989).

O megagametófito é uma fonte importante de nutrientes para o embrião em desenvolvimento e plântula. Neste tecido de origem materna são depositados a maior parte dos compostos de reserva, que são constituídos principalmente por proteínas e lipídios (Owens *et al.*, 1993). Em *Pseudotsuga menziessi*, os lipídios representam 50% e 30% e as proteínas aproximadamente 12% e 10% do peso seco do megagametófito e embrião, respectivamente (Owens *et al.*, 1993). A deposição de reservas no megagametófito coincide com o desenvolvimento do embrião (Favre-Duchartre, 1958).

No embrião zigótico de *Picea glauca* os produtos de reserva seguem uma ordem de deposição aonde o amido é o primeiro produto a acumular seguido pelos lipídios e finalmente pelas proteínas (Krasowski & Owens, 1993). No megagametófito e embrião de *Picea abies*, as proteínas de reserva começam a serem acumuladas em 15 DAF (dias após a fertilização) e 21 DAF, respectivamente (Hakman, 1993). Em *Picea glauca*, o tamanho e o número de corpúsculos protéicos no megagametófito aumentam nos estádios finais de maturação da semente (Misra, 1994). Na semente madura, os lipídios, os grãos de amido e os corpúsculos protéicos estão distribuídos de maneira uniforme no megagametófito (Misra, 1994).

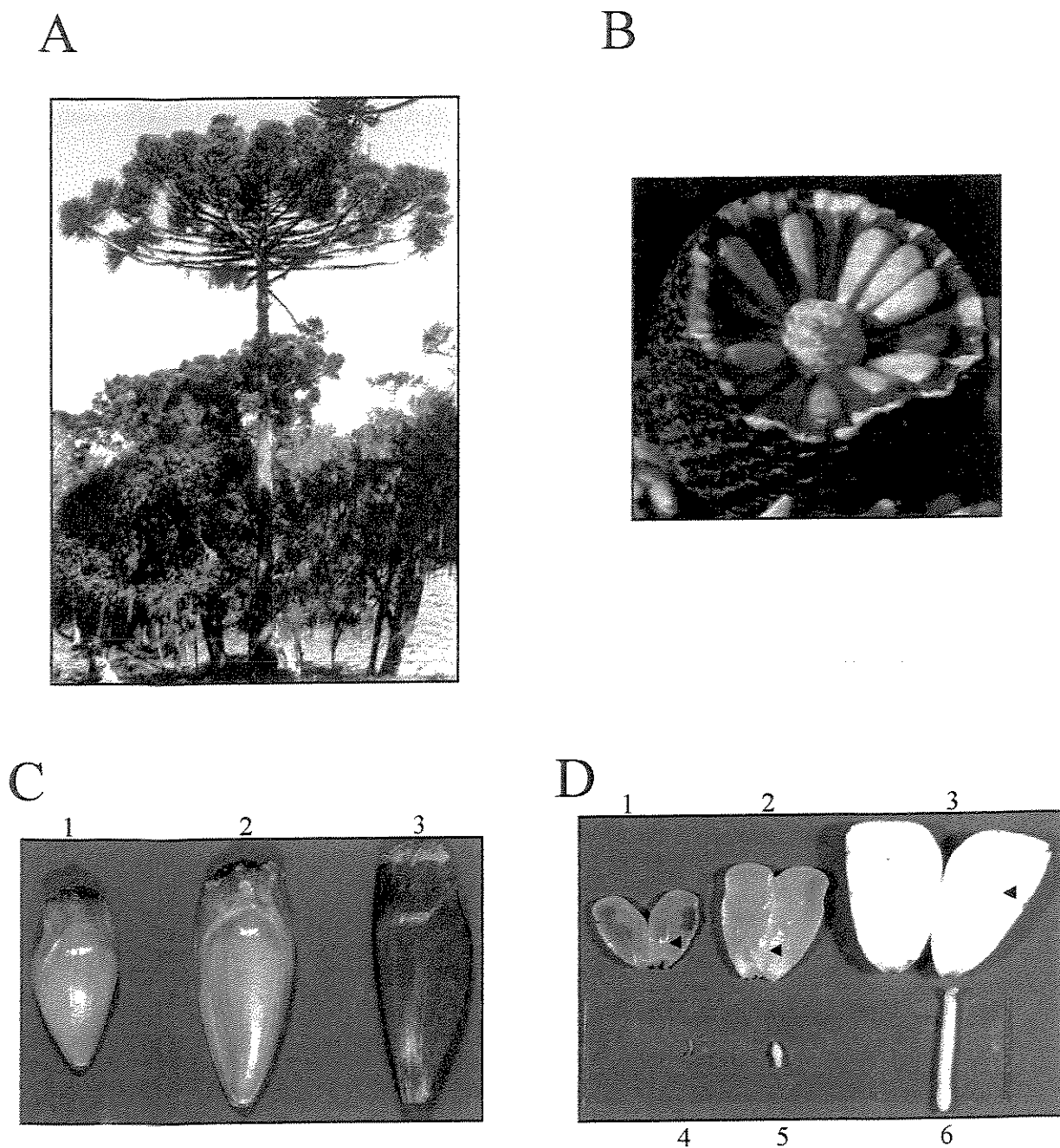


Figura 1. (A) árvore de *Araucaria angustifolia*. (B) cone feminino (pinha) de araucária contendo as sementes. (C) sementes de araucária nos estádios: 1- globular, 2- cotyledonar e 3- maduro. (D) 1, 2 e 3 - megagametófitos nos estádios globular, cotyledonar e maduro de desenvolvimento do embrião (MG, MC e MM, respectivamente), e 4, 5 e 6- embriões nos estádios globular, cotyledonar e maduro (EG, EC e EM, respectivamente). As setas mostram a cavidade de corrosão do megagametófito.

3. Genes e desenvolvimento

Progressos importantes foram feitos no que diz respeito ao conhecimento da estrutura e modo de ação de genes envolvidos no desenvolvimento do embrião e maturação da semente de angiospermas (Wobus & Weber, 1999). Assim sendo, três genes reguladores da maturação da semente foram isolados através da análise de mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Embriões apresentando mutações nestes genes, *ABA-INTENSIVE3* (*ABI3*), *FUSCA3* (*FUS3*) e *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*), entrariam em processo de germinação sem passar pelo processo de maturação (Parcy *et al.*, 1997). Müssig *et al.* (2000) caracterizaram o gene *SHL* de *A. thaliana* que codifica uma proteína nuclear, cuja expressão resulta na redução do crescimento, floração e senescência precoces e má formação da semente e flor. Dois genes embriões-específicos de *A. thaliana* foram identificados através de *display* diferencial de mRNA (Nuccio & Thomas, 1999). Esses genes foram denominados *ATS1* e *ATS3*. Através de hibridização *in situ*, observou-se que os genes *ATS1* e *ATS3* apresentaram padrão de expressão similar para o gene *GEA1* e os genes de proteínas de reservas da semente de *Arabidopsis*, respectivamente (Nuccio & Thomas, 1999). Transcritos do gene *GEA1* foram detectados na semente imatura, sendo que a maior quantidade foi observada na semente madura (Gaubier *et al.*, 1993).

Em coníferas os estudos envolvendo desenvolvimento e germinação da semente são poucos. Foram isolados cDNAs das principais proteínas de reserva de *Picea glauca/engelmannii* (Newton *et al.*, 1992) e *Pseudotsuga menziesii* (Leal & Misra, 1993). Um dos cDNAs de proteína de reserva de *Picea glauca/engelmannii* isolado representava uma proteína de 50 kDa, com 28-38% de identidade com as vicelinas 7S de angiospermas (Newton *et al.*, 1992). Leal & Misra (1993) isolaram um cDNA (*DF1*) que apresentava 29-38,5% de identidade com as globulinas 11-12S de angiospermas. A hibridização deste cDNA com RNA isolado do embrião e megagametófito em diferentes dias após a fertilização mostrou que a expressão deste gene era mais abundante nos estádios iniciais e intermediários de desenvolvimento (Leal & Misra, 1993).

Tranbarger & Misra (1996) isolaram um cDNA (*Pm3-3*) de *Pseudotsuga menziesii* que codificava para uma protease de cisteína (*CysP*). Análise através de *Northern blot* mostrou que os transcritos *CysP* eram abundantes no megagametófito após a germinação da

semente (Tranbarger & Misra, 1996). Estes transcritos não foram detectados no embrião e megagametófito durante a embriogênese (Tranbarger & Misra, 1996). Jarvis *et al.* (1996) isolaram os primeiros genes *lea* (*late embryogenesis abundant*) de sementes maduras de *Pseudotsuga menziesii*. Os genes isolados por Jarvis *et al.* (1996), *Df65*, *DF6* e *Df77*, apresentaram similaridade com as classes 2, 1 e 3 dos genes *lea*, respectivamente. Foi isolado também, de *Pseudotsuga menziesii*, um gene de metalotioneína (MT) cuja expressão ocorria principalmente no megagametófito durante a embriogênese (Chatthai *et al.*, 1997). Aparentemente, a expressão deste gene era modulada por ABA (Chatthai *et al.*, 1997). As metalotioneínas são proteínas ricas em Cys que se ligam a metais (Hernández *et al.*, 1998). A função das metalotioneínas em plantas está relacionada com a tolerância a metais pesados por destoxificação.

Larsson *et al.* (1998) isolaram de uma biblioteca de cDNA de embrião de *Picea abies* L. o primeiro cDNA correspondente a um gene *homeobox*, *HBK1*, em conífera. A sequência deste gene apresentou similaridade com os genes *homeobox KNOX* (*Knotted-like Homeobox*) encontrados em diferentes angiospermas. Os autores sugeriram que a função do gene *HBK1* é controlar a diferenciação celular no meristema apical (Larsson *et al.*, 1998).

Mullen & Gifford (1997), isolaram dois cDNAs completos, a partir de mRNA de megagametófito de *Pinus taeda* L., que codificam a enzima *isocitrate liase glyoxysomal* (ICL). Os cDNAs foram designados *Ptbs ICL 8* e *Ptbs ICL 12*. Análise de *Northern blot* e *slot blot* revelaram que mRNAs de *Ptbs ICL 8* e *Ptbs ICL 12* estavam presentes em baixo nível no megagametófito maduro, mas aumentavam significativamente após a germinação (Mullen & Gifford, 1997). A ICL é uma enzima chave na mobilização de lipídios. Após a germinação da semente, os lipídeos de reservas são hidrolisados através da atividade de lipases, e os ácidos graxos produzidos são convertidos em sacarose pela via da β - oxidação e ciclo do glioxalato (Ching, 1963). Após este processo, a sacarose é transportada do megagametófito para a plântula em desenvolvimento, sendo então utilizada como fonte primária de carbono e energia até a planta adquirir independência fotoautotrófica (Ching, 1972). Em *Picea glauca*, seis cDNAs denominados *PgEMB 2*, *6*, *7*, *8*, *24* e *34*, associados a embriogênese somática, foram caracterizados (Dong & Dunstan, 1999). Os transcritos *PgEMB 2*, *6*, *24* e *34* foram detectados durante o desenvolvimento de embriões somáticos e zigóticos, enquanto que os transcritos *PgEMB 7* e *8* só foram detectados durante o

desenvolvimento de embriões somáticos (Dong & Dunstan, 1999).

Um cDNA completo, que codifica uma proteína de transferência de lipídios (Pal8), foi isolado de *Picea abies* (Sabala *et al.*, 2000). Hibridização *in situ* mostrou que a expressão do gene *Pal8* ocorre em todas as células embriogênicas, contudo, a expressão é maior no embrião somático e zigótico maduros (Sabala *et al.*, 2000). Sabala *et al.* (2000), através de testes para avaliação da atividade antimicrobiana em linhagens de células mutantes para o gene *Pal8*, sugeriram que o gene *Pal8* está envolvido com função antimicrobiana.

Na família Araucariaceae, estudos sobre a expressão de genes durante o desenvolvimento e germinação da semente ainda são inéditos.

4. Síntese e fosforilação de proteínas durante o desenvolvimento

Estudos envolvendo a síntese e deposição de proteínas durante o desenvolvimento da semente assim como estudos sobre modificações que ocorrem após a tradução, como, por exemplo, fosforilação, ainda são inéditos em *Araucaria angustifolia*.

Muitos processos celulares, tais como divisão e diferenciação celular e transdução de sinal, são regulados através da fosforilação e desfosforilação de proteínas. Várias proteínas e enzimas são fosforiladas em plantas. Como exemplo podemos citar: ATPase, RNA polimerase, malato sintase, histona H1, ativadores de transcrição e outras (Trewavas & Gilroy, 1991).

Durante o desenvolvimento da semente, ocorre inicialmente uma rápida divisão celular seguida de diferenciação destas células e síntese de proteínas, principalmente as de reserva (Mukhopadhyay & Singh, 1997). Foi observada para várias espécies de plantas a ocorrência de mudanças drásticas na síntese de proteínas, durante o processo de desenvolvimento e germinação da semente. A modulação da síntese de proteínas requer um controle preciso a nível de tradução. Em células animal e de levedura, a regulação da tradução ocorre através de mudanças a nível de fosforilação dos fatores de iniciação (eIFs) (Le *et al.*, 1998). Gallie *et al.* (1997) observaram que dois fatores de iniciação, eIF2 e eIF4B, apresentavam diferenças nas sementes e nas folhas de trigo, no que diz respeito a fosforilação. Posteriormente, Le *et al.* (1998) mostraram que a fosforilação dos fatores

eIF4B e eIF2, subunidades α - e β -, era regulada diferencialmente durante o desenvolvimento e germinação da semente de trigo.

Mukhopadhyay & Singh (1997) observaram um aumento significativo na atividade de quinases, com concomitante aumento no número de polipeptídeos fosforilados, durante o desenvolvimento da semente de *Psophocarpus tetragonolobus*. Aparentemente, a fosforilação das proteínas estava correlacionada com o aumento do conteúdo de proteínas na semente em desenvolvimento.

Através de análise de *Western blot* e ensaio de proteína quinase, Anil *et al.* (2000), identificaram duas proteínas quinases cálcio dependentes (CDPKs) em *Santalum album* L. Estas proteínas com peso molecular de 55 e 60 kDa foram denominadas de swCDPKs (Anil *et al.*, 2000). Elas são proteínas solúveis e estavam presentes em todos os estádios da embriogênese somática, no endosperma da fruta madura e estádios avançados de desenvolvimento da semente (Anil *et al.*, 2000). A regulação das swCDPKs no endosperma parece ser temporal durante o desenvolvimento, dormência, e germinação da semente (Anil *et al.*, 2000). Em embriões zigóticos, a acumulação das swCDPKs foi alta no fruto maduro, sementes dormentes, estágio inicial da germinação, e plântulas. Frattini *et al.* (1999), identificaram através de *Western blot* duas CDPKs em arroz com peso molecular de 59 kDa (CDPK2) e 61 kDa (CDPK1).

Um clone de cDNA correspondente a uma CDC2 (CDC2 Pa) foi isolado de *Picea abies* L. Karst (Kvarnheden *et al.*, 1995). Apesar da função da CDC2 ser desconhecida em *Picea abies*, Kvarnheden *et al.* (1995) mencionaram que em fungos as proteínas quinases, p34^{cdc28} e p34^{cdc2} interagem com diferentes classes de ciclinas para regulação de transição das fases G1/S e G2/M durante o ciclo celular.

A CKII (caseína quinase II, assim chamada por fosforilar substrato artificial de caseína *in vitro*) é uma das principais proteínas quinases multifuncionais da célula (Lee *et al.*, 1999) com mais de 200 substratos conhecidos (Battistutta *et al.*, 2000a). A CKII reconhece resíduos de Ser/Thr situados em meio ácido no substrato (X-S/T-X-X-E/D) (Pinna, 1990; Litchfield & Luscher, 1993; Allende & Allende, 1995). Ela está envolvida no controle da replicação e transcrição, processamento de RNA, transdução e metabolismo celular (Litchfield & Luscher, 1993).

A CKII é uma holoenzima composta por duas subunidades catalíticas (α e/ α') e

duas subunidades β regulatórias (Battistutta *et al.*, 2000b) que estabilizam a subunidade catalítica e determinam a sua especificidade aos substratos (Espunya & Matínez, 1997). A estrutura primária e quaternária da CKII é altamente conservada nos organismos (Wirkner *et al.*, 1992). As CKII apresentam várias características em comum: (1) alta sensibilidade a poliânions como heparina, (2) habilidade de usar tanto ATP quanto GTP como doadores de fosfato, (3) preferência por substratos ácidos como a caseína e fosvitina e (4) são estimuladas por poliaminas (Pinna, 1990). A CKII reconhece vários sítios fosforeceptores e que são especificados através de múltiplas cargas negativas nos aminoácidos (Battistutta *et al.*, 2000b).

A fosforilação de proteínas que fazem parte da maquinaria de transcrição é um mecanismo importante de regulação da expressão de genes em sistemas animal (Klimczak *et al.*, 1992). A fosforilação pode afetar a ligação do fator de transcrição ao DNA (Prywes *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1988). Klimczak *et al.* (1992), demonstraram que o fator *GBF1* pode ser fosforilado através da atividade da CKII. A atividade de CKII na fosforilação do *GBF1* foi identificada através da utilização de GTP como doador de fosfato, baixa concentração de heparina, fosforilação de substratos ácidos (caseína e fosvitina) e ausência de fosforilação de substratos básicos (histonas) (Klimczak *et al.*, 1992).

Na semente em desenvolvimento de milho foi observada a fosforilação de fatores de transcrição (Ciceri *et al.*, 1997), como o *opaco 2*, que regula a expressão da zeína (proteína de reserva produzida durante o desenvolvimento do endosperma de milho). Uma proteína básica de milho rica em glicina, codificada pelo gene *rab-17*, foi encontrada altamente fosforilada *in vivo* e *in vitro* (Plana *et al.*, 1991). Plana *et al.* (1991), mostraram que a RAB-17 é fosforilada através da CKII, e que no máximo 4 moléculas de fosfato foram incorporadas por molécula de RAB-17 pela CKII. Experimentos envolvendo mapeamento do fosfopeptídeo mostraram que o peptídeo fosforilado pela CKII *in vitro* foi idêntico ao peptídeo fosforilado *in vivo* (Plana *et al.*, 1991). A purificação da proteína através de cromatografia líquida e seqüenciamento parcial do fosfopeptídeo, indicou que este corresponde à região da proteína contendo um grupo de resíduos de serina (resíduos 56-89).

Diferenciação e desenvolvimento são também controlados através de fosforilação. Uma vez que CKII está presente numa vasta gama de eucariotos superiores, incluindo as plantas, a análise da fosforilação de proteínas e a identificação de atividade CKII no

megagametófito durante o desenvolvimento da semente de *A. angustifolia* é importante para compreensão dos eventos que ocorrem na semente em desenvolvimento.

O estudo da expressão gênica, síntese e fosforilação de proteínas no megagametófito de *Araucaria angustifolia* é de fundamental importância. A araucária está na lista das espécies, da flora brasileira, ameaçadas de extinção e é de grande importância econômica. Assim, os resultados obtidos neste trabalho podem beneficiar estudos relacionados a embriogênese somática que poderão ser utilizados na produção de sementes sintéticas visando auxiliar na propagação da espécie.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Análise da expressão diferencial de genes, síntese e fosforilação de proteínas no megagametófito da semente de *Araucaria angustifolia*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Capítulo 1. Expressão de genes no megagametófito de *Araucaria angustifolia* durante o desenvolvimento da semente e embrião maduro

- Identificação de cDNAs expressos diferencialmente no megagametófito (MG, MC e MM) e embrião maduro (EM);
- Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados através de experimentos de *slot blot*;
- Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs diferenciais. Comparação das seqüências com seqüências disponíveis em bancos de dados.

Capítulo 2. Síntese e fosforilação de proteínas no megagametófito de *Araucaria angustifolia* durante o desenvolvimento da semente

- Análise do perfil eletroforético das proteínas do megagametófito (MG, MC e MM) durante o desenvolvimento da semente;
- Análise do perfil eletroforético das proteínas fosforiladas *in vitro* através de SDS-PAGE;
- Identificação da atividade de CKII (caseína quinase II) e análise através de ensaio de quinase em gel;

- Verificação do padrão do acúmulo de transcritos de CKII no megagametófito (MG, MC e MM) e embrião (EG, EC e EM) durante o desenvolvimento da semente.

CAPÍTULO 1

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NO MEGAGAMETÓFITO
DE *Araucaria angustifolia* DURANTE O DESENVOLVIMENTO
DA SEMENTE E EMBRIÃO MADURO**

1. INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia é a única espécie de conífera nativa do Brasil que possui importância econômica (Guerra *et al.*, 2000). As reservas naturais desta espécie foram quase que totalmente exauridas. Originalmente, as florestas de araucária cobriam uma área de 182.295 km² do território brasileiro (Guerra *et al.*, 2000) atualmente, somente 0,7% (Longhi, 1993) a 1% (Lima & Capobianco, 1997) da área original permanece. As árvores desta conífera podem fornecer semente, madeira, fibra e resina (Guerra *et al.*, 2000). As sementes apresentam alto valor nutritivo e são consumidas por humanos e animais. As sementes da araucária são grandes apresentando de 3-8 cm de comprimento, 1-2 cm de extensão e 6,5-8,5 g de peso fresco. Elas possuem uma casca densa que envolve o megagametófito (Espindola *et al.*, 1994). O embrião está localizado dentro da cavidade de corrosão de megagametófito.

O megagametófito é uma fonte importante de nutrientes para o embrião em desenvolvimento e plântula. Neste tecido de origem materna é depositada a maior parte dos compostos de reserva, que são constituídos principalmente por proteínas e lipídios (Owens *et al.*, 1993). A deposição de reservas no megagametófito coincide com o desenvolvimento do embrião (Favre-Duchartre, 1958).

Vários genes que se expressam no megagametófito de coníferas já foram isolados e caracterizados. Assim sendo, Newton *et al.* (1992) e Leal & Misra (1993) isolaram cDNAs das principais proteínas de reserva de *Picea glauca/engelmannii* e *Pseudotsuga menziesii*, respectivamente. Tranbarger & Misra (1996) isolaram um cDNA (PM3-3) de *Pseudotsuga menziesii* que codificava para uma protease de cisteína (*CysP*). Análise através de *Northern blot* mostrou que os transcritos *CysP* eram abundantes no megagametófito após a germinação (Tranbarger & Misra, 1996). Jarvis *et al.* (1996) isolaram os primeiros genes *lea* (*late embryogenesis abundant*) de sementes maduras de *Pseudotsuga menziesii*. Chatthai *et al.* (1997) isolaram um gene de metalotioneína de *Pseudotsuga menziesii* cuja expressão ocorria principalmente no megagametófito durante o processo de embriogênese.

Na família Araucariaceae, estudos sobre a expressão de genes durante o desenvolvimento e germinação da semente ainda são inéditos.

Assim sendo, neste capítulo é apresentado a identificação, através de *display* diferencial de mRNA, de genes expressos diferencialmente no megagametófito (MG, MC e MM) e embrião maduro da semente de *A. angustifolia*. A expressão diferencial dos genes foi confirmada através de experimentos de *slot blot* e os coeficientes de expressão (CE) foram calculados. Alguns dos cDNAs que apresentaram os maiores CEs, foram clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta e utilização do material biológico

Cones femininos foram coletados da planta A3 de *A. angustifolia* na localidade de Bom Retiro, Santa Catarina entre janeiro e abril de 2000. Os cones foram transportados para UNICAMP, desinfetados com álcool e as sementes (pinhões) foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C. Como em indivíduos da mesma espécie ocorre variabilidade genética, as sementes utilizadas nesse trabalho foram coletadas de uma mesma árvore contudo, embriões da mesma árvore podem ter pais diferentes. Assim sendo, foram utilizados vários embriões da mesma planta para minimizar este fator.

As coletas das sementes, nos diferentes estádios de desenvolvimento, foram realizadas nos meses que se seguem:

Coletas 2000:

Fevereiro - sementes contendo embrião no estágio globular

Março - sementes contendo embrião no estágio cotiledonar

Abril - sementes contendo embrião no estágio maduro

As sementes coletadas em 2000 e sementes coletadas por outros pesquisadores do laboratório em 1999 foram utilizadas nos experimentos.

Para os experimentos de *display* diferencial de mRNA, foi isolado RNA total de MG (megagametófito isolado de semente contendo embrião globular), MC (megagametófito isolado de semente contendo embrião cotiledonar), MM (megagametófito isolado de semente contendo embrião maduro) e de embrião de sementes maduras (EM). Os cDNAs que apresentaram padrão de expressão diferencial no megagametófito (expressão mais acentuada em MG, MC ou MM) ou embrião EM foram isolados dos géis de *display* e tiveram a expressão diferencial confirmada através de experimentos de *slot blot*.

2.2. Isolamento de RNA total

Foi isolado RNA total de megagametófitos MG, MC e MM e embriões zigóticos maduros (EM), segundo metodologia descrita por Precott & Martin (1987), com algumas modificações. Para isto, 50-100 mg de tecido foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 1 ml de solução contendo: Tris-HCl 50 mM, pH 9,0; EDTA 5 mM, pH 8,0; SDS 5%; LiCl 150 mM. A seguir, fez-se uma extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e uma extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). O RNA foi precipitado através da adição de 0,4 volumes de LiCl 8 M e incubação a -20°C por 2 h. Após centrifugação, o RNA foi ressuscitado em 50 µl de água DEPC. Nova precipitação foi efetuada com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,0 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O RNA foi incubado a -20°C durante a noite. Após centrifugação, o precipitado de RNA foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em 80 µl de água DEPC. O RNA foi armazenado a -70°C.

2.3. Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente no megagametófito e embrião maduro através de *display* diferencial de mRNA

O RNA total isolado do megagametófito (MG, MC e MM) e embrião (EM), foi utilizado em experimentos de *display* diferencial de mRNA (Liang & Pardee, 1992). Os padrões dos cDNAs obtidos nos géis de *display* foram comparados e os cDNAs com expressão diferencial em MG, MC, MM e EM foram isolados dos géis.

2.3.1. Síntese de cDNA

O RNA total foi tratado com DNase através da adição de: 0,5 µl de RNA guard (37,8 U/µl; Gibco BRL); 5 µl de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,3; 5 µl de KCl 0,5 M; 5 µl de MgCl₂ 15 mM; 1 µl de DNase (10 U/µl; Gibco BRL) e água q.s.p. 100 µl. A reação foi incubada por 1 h a 37°C. Acrescentou-se 100 µl de água e foi realizada uma extração com fenol: clorofórmio (3:1, v/v). O RNA, livre de DNA, foi precipitado através da adição de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e etanol absoluto. Após centrifugação, o RNA foi

ressuspendido em água DEPC e quantificado em gel. A concentração do RNA foi ajustada para 1 µg/µl.

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit *ready-to-go* RT-PCR *beads* (Amersham Pharmacia). Para isto, acrescentou-se a cada *bead* 44 µl de água DEPC. Após 5 minutos acrescentou-se: 5 µl de *primer* T₁₂VN (T₁₂VC ou T₁₂VG) 10 µM e 1 µl de RNA (1 µg/µl) tratado com DNase. A reação foi incubada por 30 min a 42°C. A enzima foi inativada a 95°C por 5 min e os cDNAs foram armazenados a -20°C.

2.3.2. PCR a partir do cDNA e eletroforese das amostras amplificadas

Os cDNAs foram amplificados em um termociclador Perkin Elmer 2400 utilizando-se *primers* ancoradores (T₁₂VC e T₁₂VG) e *primers* arbitrários (OPJ-01, OPJ-02, OPJ-08 e OPJ-10; Operon Technologies Inc.). As seqüências dos *primers* arbitrários são mostradas na Tabela 1. As reações, feitas em duplicata, eram compostas por: 2 µl de cDNA; 2 µl de *primer* ancorador (10 µM); 2 µl de *primer* arbitrário (10 µM) e 14 µl de uma mistura constituída por: tampão de amplificação 10 X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM; Gibco BRL); 0,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 2 µl de dNTP 20 µM (de cada um); 0,5 µl de (α-³³P) dATP, 8,7 µl de água e 0,3 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl; Gibco BRL). As condições de amplificação foram 94°C (3 min), seguido de 40 ciclos de 94°C (30 s), 40°C (2 min) e 72°C (30 s). A extensão final foi a 72°C por 20 min.

Após a amplificação, 7 µl do produto de cada reação de PCR foram misturados com 5 µl de tampão contendo: formamida deionizada 95% (v/v); EDTA 10 mM, pH 8,0; xilenocianol 0,9% e azul de bromofenol 0,9% (Xu *et al.*, 1997). As amostras foram desnaturadas a 80°C por 4 min e a seguir, 10 µl foram submetidos à eletroforese em gel de 5% de acrilamida e 50% de uréia. A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Sambrook *et al.*, 1989) a 1320 V–35 mA, até a frente de xileno cianol chegar ao final do gel. O gel foi colocado sobre uma folha de papel Whatman 3 MM e seco a vácuo. Os produtos de amplificação foram detectados através de exposição a filme de raio-X (Hyperfilm, Amersham Pharmacia).

Tabela 1: Seqüência dos *primers* arbitrários (Operon Technologies Inc.) utilizados nos experimentos de *display* diferencial de mRNA

<i>Primers</i>	<i>Seqüências (5'-3')</i>
OPJ01	CCCGGCATAA
OPJ08	CATACCGTGG
OPJ10	AAGCCCGAGG

2.3.3. Isolamento, eluição e reamplificação dos cDNAs diferenciais

O filme de raio-X foi posicionado sobre o gel de *display*, na mesma posição em que foi exposto, e as regiões contendo os cDNAs de interesse foram cortadas. O cDNA foi eluído do gel em 200 µl de água após incubação por 15 min a 95°C. O cDNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto durante a noite a -20°C. O DNA foi centrifugado e ressuspensionado em 10 µl de água. Quatro µl do DNA foram amplificados em reações (40 µl) contendo: Tris-HCl 2 mM, pH 8,3; KCl 5 mM; MgCl₂ 4 mM; 1 µM do *primer* arbitrário; 1 µM do *primer* ancorador; 0,8 µl de dNTP (concentração final 20 µM de cada um); 2,5 U de *Taq* polimerase (Gibco BRL). As condições de amplificação foram as mesmas empregadas na reação de *display*. Os produtos das amplificações foram separados em gel de 2% de agarose em tampão TAE 1 X (Sambrook *et al.*, 1989) para confirmação do tamanho e quantificação dos cDNAs. Como padrão de massa e peso molecular foram utilizados nos géis o *Ladder* 1 Kb (Gibco BRL) e o $\phi\chi 174/Hae$ III (Gibco BRL). Os cDNAs que apresentaram contaminação com fragmentos de tamanho aproximado ao esperado foram cortados do gel e purificados com o kit *Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco BRL).

2.4. Confirmação da expressão diferencial através de experimentos de *slot blot*

A expressão diferencial dos cDNAs isolados dos géis de *display* foi confirmada através de experimentos de *slot blot* (Xu *et al.*, 1997).

2.4.1. Transferência dos cDNAs isolados dos géis de *display* diferencial de mRNA para membranas de nylon

Dez ng de DNA de cada cDNA, em um volume final de 200 µl, foram desnaturados por 10 min a 95°C. A seguir, adicionou-se 200 µl de SSC 20 X filtrado. As amostras foram transferidas para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia) com o auxílio de um *slot blot* (Hybri-Slot, Gibco BRL). Antes da transferência das amostras, as membranas foram umedecidas em SSC 10 X. Após a transferência das amostras, os *slots* foram lavados com 500 µl de SSC 10 X filtrado. As membranas foram secas a temperatura ambiente e o DNA foi fixado a 80°C por 2 h. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

2.4.2. Obtenção de sondas radioativas e hibridização das membranas

Os cDNAs sintetizados a partir de RNA isolado de MG, MC, MM e EM foram amplificados, quantificados e utilizados como sonda nos experimentos de *slot blot* para confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados. A quantificação foi feita em gel de 2% de agarose através de comparação com o padrão de massa e peso molecular $\phi\chi 174/Hae$ III. Aproximadamente 30 ng dos cDNAs foram marcados com o kit *Megaprimer DNA labelling system* (Amersham Pharmacia), seguindo-se as especificações do fabricante.

As membranas foram pré-hibridizadas a 42°C por 5 h em: formamida deionizada 50%; SSC 5 X; Denhardt's 10 X (Sambrook *et al.*, 1989); Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; SDS 1% e DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/ml. As membranas foram hibridizadas durante a noite a 42°C em: formamida deionizada 50%; SSC 5 X; SDS 1%; sulfato de dextran 5%; Denhardt's 2 X; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/ml e 10^7 - 10^8 cpm/ml da sonda previamente desnaturada a 98-100°C por 5 min. As membranas foram lavadas a temperatura ambiente por 2 vezes, 15 min cada vez, em solução contendo SSC 2 X e SDS 0,1%. A seguir, as membranas foram lavadas por 2 vezes a 60°C, 30 min cada lavagem, em solução contendo SSC 0,1 X e SDS 0,1%. As membranas foram expostas pelo tempo necessário a filmes de raio-X (Hyperfilm,

Amersham Pharmacia).

2.5. Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de *slot blot*

Os sinais de hibridização dos cDNAs foram quantificados através da utilização do programa CrazyQuant V. 1,3 ([HYPERLINK http://chroma.mbt. Whashington. edu/ hood_www/crazyquant/Applet. htm](http://chroma.mbt. Whashington. edu/ hood_www/crazyquant/Applet. htm)). A análise dos dados da quantificação foi baseada em Gill *et al.* (1999). Após a quantificação, fez-se a média da intensidade do sinal das repetições de cada amostra hibridizada. A partir das médias obtidas calculou-se o coeficiente de expressão (CE). Para o cálculo de CE, o valor de intensidade do cDNA hibridizado com uma sonda específica (MG, MC, MM ou EM) foi dividido com a média dos sinais do cDNA hibridizado com as diferentes sondas (MG, MC, MM e EM). Esta análise foi feita para todos os cDNAs analisados nos experimentos de *slot blot*.

A partir do CE, os cDNAs foram agrupados através da utilização dos programas Gene Cluster (<http://rana.stanford.edu/software>) e Tree View V. 1,45 (<http://rana.stanford.edu/so...>). O padrão de expressão foi representado nas Figuras obtidas através de cores, onde o vermelho representa a expressão mais acentuada e o amarelo representa ausência de expressão. Expressões intermediárias entre a máxima (vermelha) e a ausência (amarela) são mostradas nas Figuras através da combinação das duas cores.

2.6. Clonagem dos cDNAs diferenciais

Após a quantificação da intensidade de sinal dos cDNAs, e análise dos dados, os cDNAs cujo padrão de expressão diferencial foi confirmado, foram selecionados tomando como base o CE para clonagem e seqüenciamento. Devido ao grande número de cDNAs com expressão diferencial confirmada, selecionamos 40 cDNAs (10 de cada estágio) que apresentaram os maiores CEs em MG, MC, MM e EM, para análise.

2.6.1. Reação de ligação

Os cDNAs selecionados foram clonados em pGEM-T *Easy* (Promega), seguindo-se

as especificações do fabricante.

Na reação, foi utilizado 3 µl de inserto, 5 µl de tampão de ligação 10 X, 1 µl de vetor pGEM-T (Promega) e 1 µl de enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi incubada a temperatura ambiente.

2.6.2. Transformação bacteriana

A reação de ligação foi adicionada a tubo eppendorf contendo 100 µl de células competentes (DH5α) em um fluxo laminar. A mistura foi incubada em gelo por 30 min e em seguida, à 42°C por 90 s. A seguir, a mistura foi colocada imediatamente no gelo. Adicionou-se a mistura 700 µl de meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) e incubou-se a 37°C por 1 h. As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido contendo X-Gal, 5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, (0,8 mg/placa) e ampicilina (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Dessas placas foram isoladas 12 colônias (brancas) de cada fragmento. Essas colônias foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ml). Para todas as colônias isoladas fez-se cultura permanente (750 µl de inóculo e 250 µl de glicerol estéril). As culturas permanentes foram armazenadas a -80°C.

2.7. Isolamento de DNA plasmidial

Para cada fragmento, seis colônias foram selecionadas para isolamento de DNA plasmidial. Elas foram inoculadas em 3 ml de meio LB líquido contendo ampicilina. Após incubação a 37°C durante a noite, 1,5 ml das culturas foram transferidas para tubos eppendorf, e centrifugadas por 1 min em uma microcentrífuga a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 300 µl de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase 100 µg/ml). Adicionou-se 300 µl de tampão P2 (NaOH 200 mM e SDS 1%) e agitou-se suavemente por inversão (aproximadamente 10 vezes). Deixou-se a temperatura ambiente por 5 min. O DNA genômico foi precipitado através da adição de 300 µl de tampão P3 (acetato de potássio 3

M, pH 5,5). As amostras foram centrifugadas por 15 min, e o sobrenadante foi transferido para tubos novos. O DNA plasmidial foi precipitado através da adição de 400 µl de isopropanol. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas por 15 min em uma microcentrífuga a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70%. O DNA plasmidial foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0).

2.8. Digestão do DNA plasmidial com *EcoR* I

A verificação da clonagem foi feita através de digestão do DNA plasmidial com a enzima de restrição *EcoR* I. Na reação de digestão utilizou-se 5 µl de DNA plasmidial, 12,3 µl de água milli-Q estéril, 2 µl de tampão da enzima 10 X (Promega), 0,2 µl de BSA (10 mg/ml Promega), 0,5 µl de *EcoR* I (12 U/µl Promega). As reações foram incubadas a 37°C por 2 h. Após incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de 1% de agarose em TAE 1 X. Os fragmentos utilizados na clonagem foram submetidos a eletroforese junto com os seus respectivos clones, para confirmação do tamanho. Um total de 6 clones para cada fragmento foram digeridos com *EcoR* I.

2.9. Seqüenciamento

Para cada fragmento clonado foram seqüenciados dois clones para confirmação da seqüência. Para a reação de seqüenciamento, os fragmentos foram amplificados em um termociclador (Perkin Elmer). Nas reações, utilizou-se o kit DNA *Sequencing Big Dye*™ (Perkin Elmer). As reações foram constituídas de 400 ng de DNA, 2 µl de *mix Big Dye* e 1 µl de *primer* (direto ou reverso). As condições de amplificação foram: 96°C (10 s), 50°C (5 s) e 60°C (4 min) em um total de 25 ciclos. Após a amplificação, as amostras foram precipitadas através da adição de 80 µl de isopropanol 75% (preparado na hora). As amostras foram centrifugadas por 20 min em uma microcentrífuga a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 180 µl de etanol 70% e as amostras foram centrifugadas por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do seqüenciamento. O

seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer).

2.10. Análise das seqüências

O alinhamento da seqüência dos clones de um mesmo cDNA diferencial foi feito através do programa Clustal W (V. 1,75). A seguir, as seqüências foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados através da utilização do programa BLAST X. O programa BLAST X deduz a seqüência de aminoácidos a partir da seqüência nucleotídica, e compara com seqüências de aminoácidos disponíveis em bancos de dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente através de *display* diferencial de mRNA

A caracterização da expressão gênica durante o desenvolvimento e germinação da semente de angiospermas vem sendo amplamente investigada (Reidt *et al.*, 2000; Fujii *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999; Delseny *et al.*, 1993; Skriver & Mundy, 1990; Galau *et al.*, 1987; Dure, 1993). Em coníferas, os estudos de expressão gênica durante o desenvolvimento da semente tem se concentrado, principalmente, nos genes de proteínas de reserva e *lea* (Leal e Misra, 1993; Hakman *et al.*, 1990; Flinn *et al.*, 1991; Misra & Green, 1991; Hakman, 1993; Dong & Dunstan, 1999). Na família *Araucariaceae*, estudos sobre a expressão de genes durante o desenvolvimento da semente ainda são inéditos.

A técnica de *display* diferencial descrita por Liang & Pardee (1992), vem sendo amplamente utilizada no isolamento de genes expressos diferencialmente em diversos organismos (Liang *et al.*, 1992; Sager *et al.*, 1993; Watson & Mergulies, 1993; Zhang & Medina, 1993; Donohue *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1995; Hutchison *et al.*, 1999; Brosché & Strid, 1999; Kuno *et al.*, 2000). Através da técnica de *display* diferencial de mRNA, várias amostras de RNA podem ser comparadas simultaneamente e assim, os cDNAs podem ser detectados (Kuno *et al.*, 2000).

Para realização dos experimentos de *display* diferencial foram utilizados cDNAs sintetizados a partir de RNA isolado de MG, MC, MM e EM. A comparação entre os padrões de cDNAs de MG, MC, MM e EM nos géis de *display*, permitiu o isolamento de cDNAs com expressão diferencial nos 3 estádios de desenvolvimento, e a comparação entre os padrões de expressão dos cDNAs obtidos para o megagametófito e para o embrião (EM) permitiu o isolamento de cDNAs com expressão diferencial no megagametófito.

Nos experimentos de *display* diferencial foram utilizados os *primers* ancoradores T₁₂VC e T₁₂VG e os *primers* arbitrários OPJ01, OPJ08 e OPJ10 (Operon Technologies Inc.) (Tabela 1). Com a utilização destes *primers*, foram isolados 163 cDNAs diferenciais sendo 28 de MG, 54 de MC, 43 de MM e 38 de EM (Tabela 2).

Tabela 2: Número de cDNAs isolados nos experimentos de *display* diferencial de mRNA com cada combinação de *primers*

<i>Primers</i>	MG ¹	MC ²	MM ³	EM ⁴	Total
T ₁₂ VC – OPJ01	9	5	4	2	20
T ₁₂ VG – OPJ01	3	5	5	6	19
T ₁₂ VC – OPJ08	1	15	11	7	34
T ₁₂ VG – OPJ08	2	10	11	11	34
T ₁₂ VC – OPJ10	7	17	10	3	37
T ₁₂ VG – OPJ10	6	2	2	9	19
Total	28	54	43	38	163

¹cDNAs com expressão mais acentuada em MG;

²cDNAs com expressão mais acentuada em MC;

³cDNAs com expressão mais acentuada em MM;

⁴cDNAs com expressão mais acentuada em EM.

Os experimentos de *display* diferencial de mRNA, com os diferentes *primers*, estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Alguns dos cDNAs diferenciais isolados estão indicados por setas nestas Figuras.

Os *primers* que permitiram a identificação de um maior número de cDNAs diferenciais foram: T₁₂VC – OPJ10 (37 cDNAs diferenciais, alguns desses mostrados na Figura 2B), T₁₂VC – OPJ08 (34 cDNAs diferenciais, alguns desses mostrados na Figura 1C) e T₁₂VG – OPJ08 (34 cDNAs diferenciais, alguns desses mostrados na Figura 2A). Todos os *primers* utilizados apresentaram cDNAs com padrões repetitivos nas duplicatas.

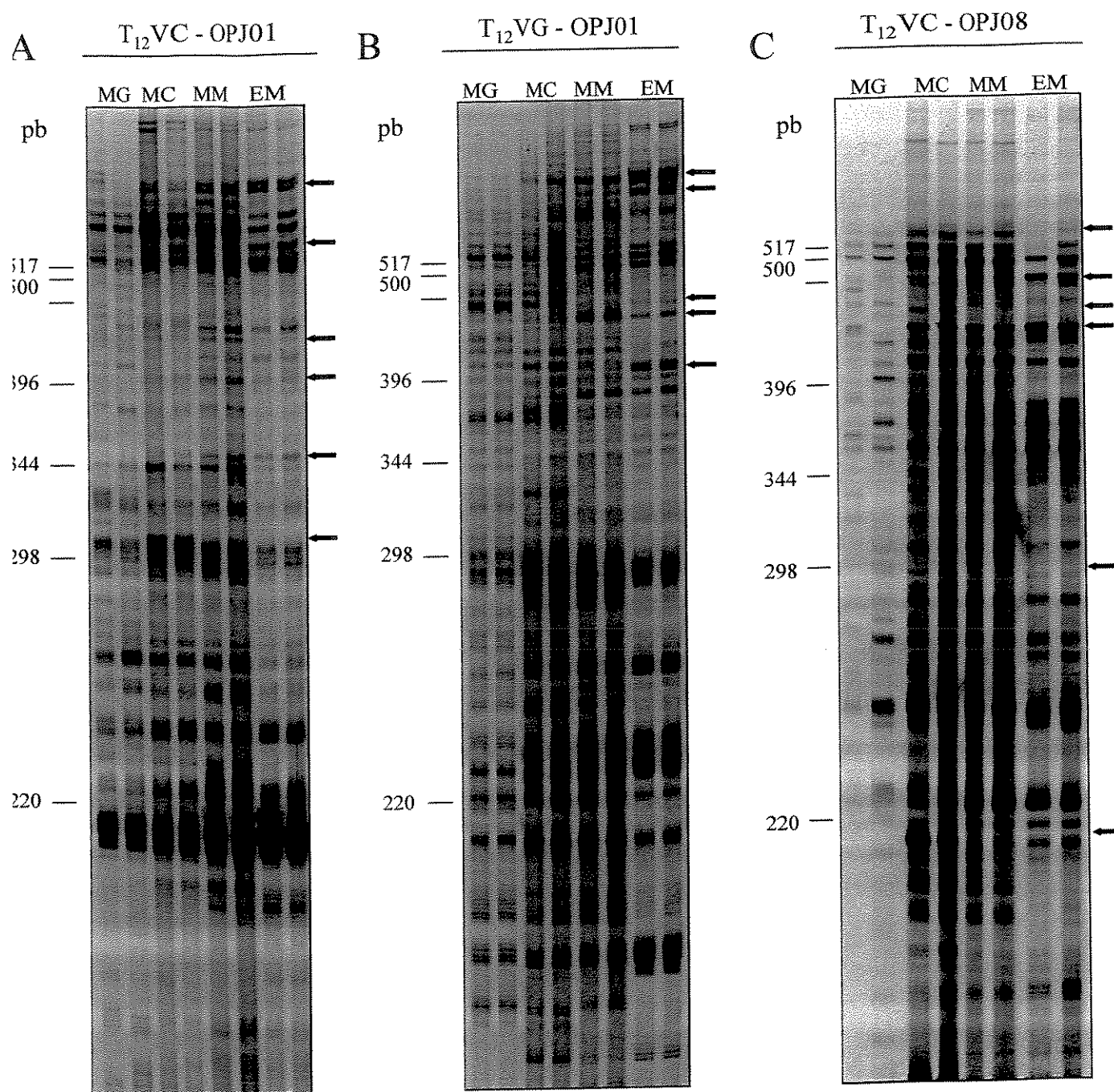


Figura 1. *Display* diferencial de mRNA a partir de RNA isolado de MG, MC, MM e EM. Em (A) foi utilizado o *primer* ancorador T₁₂VC e o *primer* arbitrário OPJ01, em (B) T₁₂VG e OPJ01 e em (C) T₁₂VC e OPJ08. As setas indicam alguns dos cDNAs diferenciais isolados com maior expressão em MG, MC, MM ou EM.

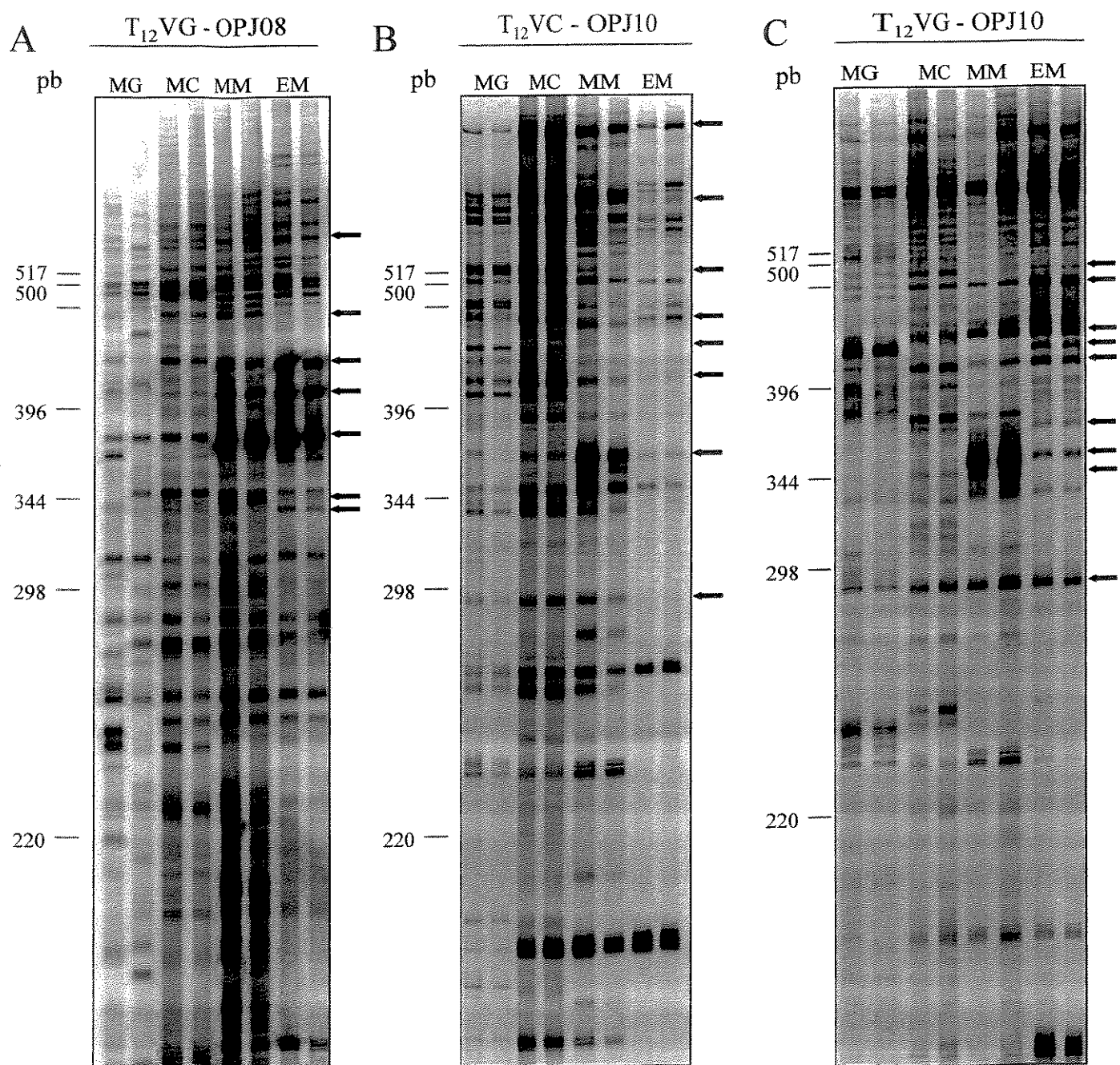


Figura 2. *Display* diferencial de mRNA a partir de RNA isolado de MG, MC, MM e EM. Em (A) foi utilizado o *primer* ancorador T₁₂VG e o *primer* arbitrário OPJ08, em (B) T₁₂VC e OPJ10 e em (C) T₁₂VG e OPJ10. As setas indicam alguns dos cDNAs diferenciais isolados com maior expressão em MG, MC, MM ou EM.

3.2. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados dos géis de *display* diferencial de mRNA através de *slot blot*

Devido ao grande número de cDNAs diferenciais isolados (163), a confirmação da expressão diferencial foi realizada através da técnica de *slot blot* que permite a confirmação da expressão diferencial de um grande número de cDNAs de uma só vez (Xu *et al.*, 1997). Nos experimentos, 10 ng de DNA de cada cDNA diferencial foram transferidos para membranas de nylon com o auxílio de um *slot blot*. As membranas foram hibridizadas com sondas radioativas de cDNAs obtidos a partir de RNA isolado de MG, MC, MM e EM. Os sinais de hibridização foram quantificados e analisados como descrito no item 2.5 de Materiais e Métodos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os 163 cDNAs isolados foram analisados através de *slot blot*, sendo que 129 tiveram a expressão diferencial confirmada (Tabela 3). Os resultados das hibridizações das membranas, os gráficos com as médias da quantificação da intensidade dos sinais, os gráficos com os valores dos coeficientes de expressão e as Figuras com o agrupamento dos cDNAs são mostrados nas Figuras de 3 a 8.

Os cDNAs considerados como diferenciais foram os que apresentaram coeficiente de expressão (CE) acima de 1. A Tabela 3 apresenta o número de cDNAs cuja expressão diferencial foi confirmada em MG, MC, MM e EM.

Tabela 3: Número de cDNAs diferenciais confirmados através de *slot blot*

<i>Primers</i>	Total de cDNAs analisados	Total de cDNAs confirmados por <i>slot blot</i>				Total de cDNAs confirmados
		MG	MC	MM	EM	
T ₁₂ VC – OPJ01	20	4	5	2	1	12
T ₁₂ VG – OPJ01	19	0	5	3	5	13
T ₁₂ VC – OPJ08	34	0	15	9	7	31
T ₁₂ VG – OPJ08	34	1	4	5	11	21
T ₁₂ VC – OPJ10	37	5	17	10	2	34
T ₁₂ VG – OPJ10	19	5	2	2	9	18
Total	163	15	48	31	35	129

$T_{12}VC$ - OPJ01

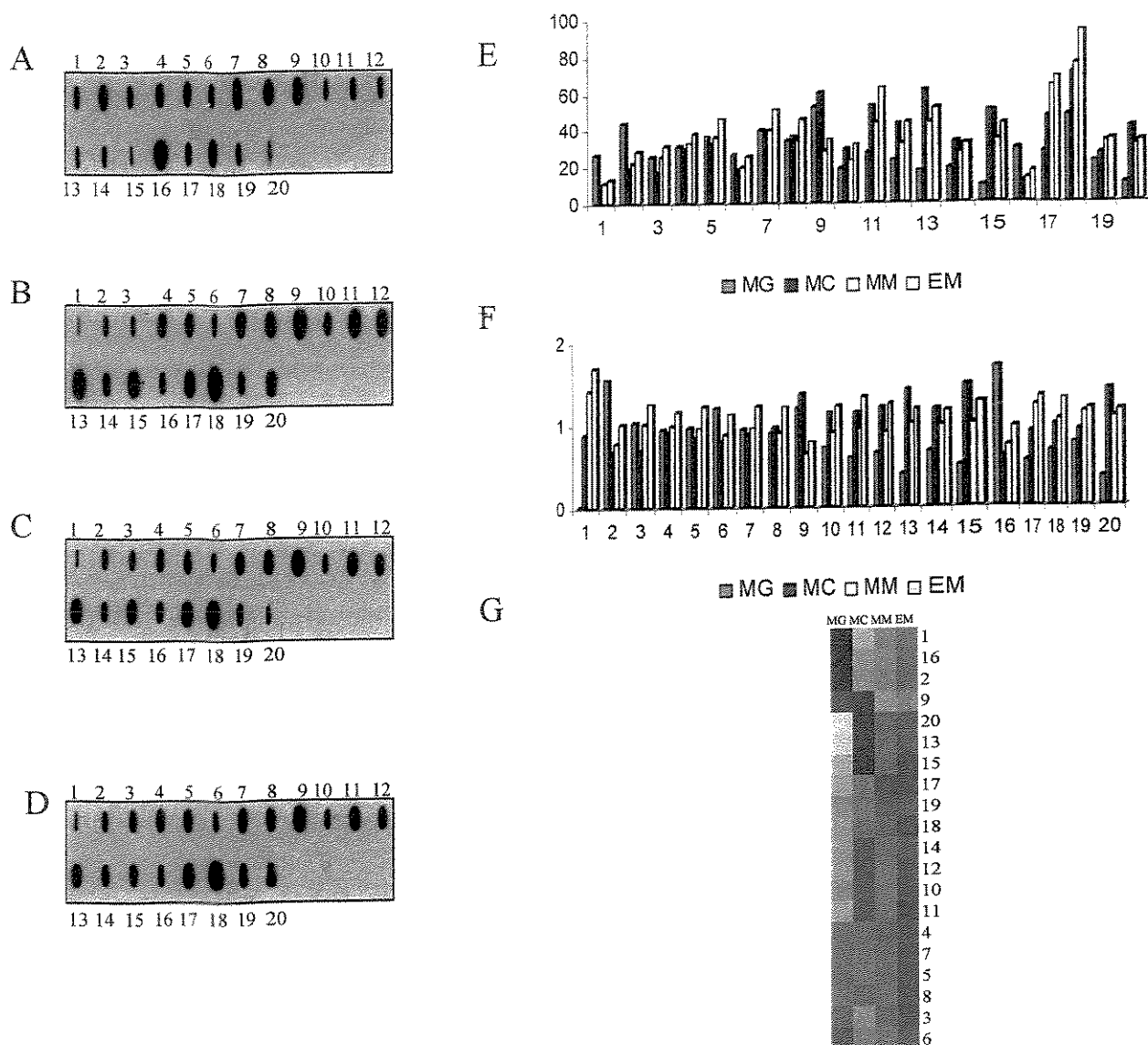


Figura 3. Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* $T_{12}VC$ - OPJ01. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MG. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MC. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MM. (D) membrana hibridizada com sonda de cDNA de EM. (E) representação gráfica das médias das intensidades dos sinais de hibridização. (F) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs. (G) agrupamento dos cDNAs. O agrupamento foi realizado tomando como base o CE dos cDNAs. O vermelho indica uma expressão mais acentuada e o amarelo ausência de expressão. Expressões intermediárias são mostradas através da combinação dessas 2 cores.

$T_{12}VG - OPJ01$

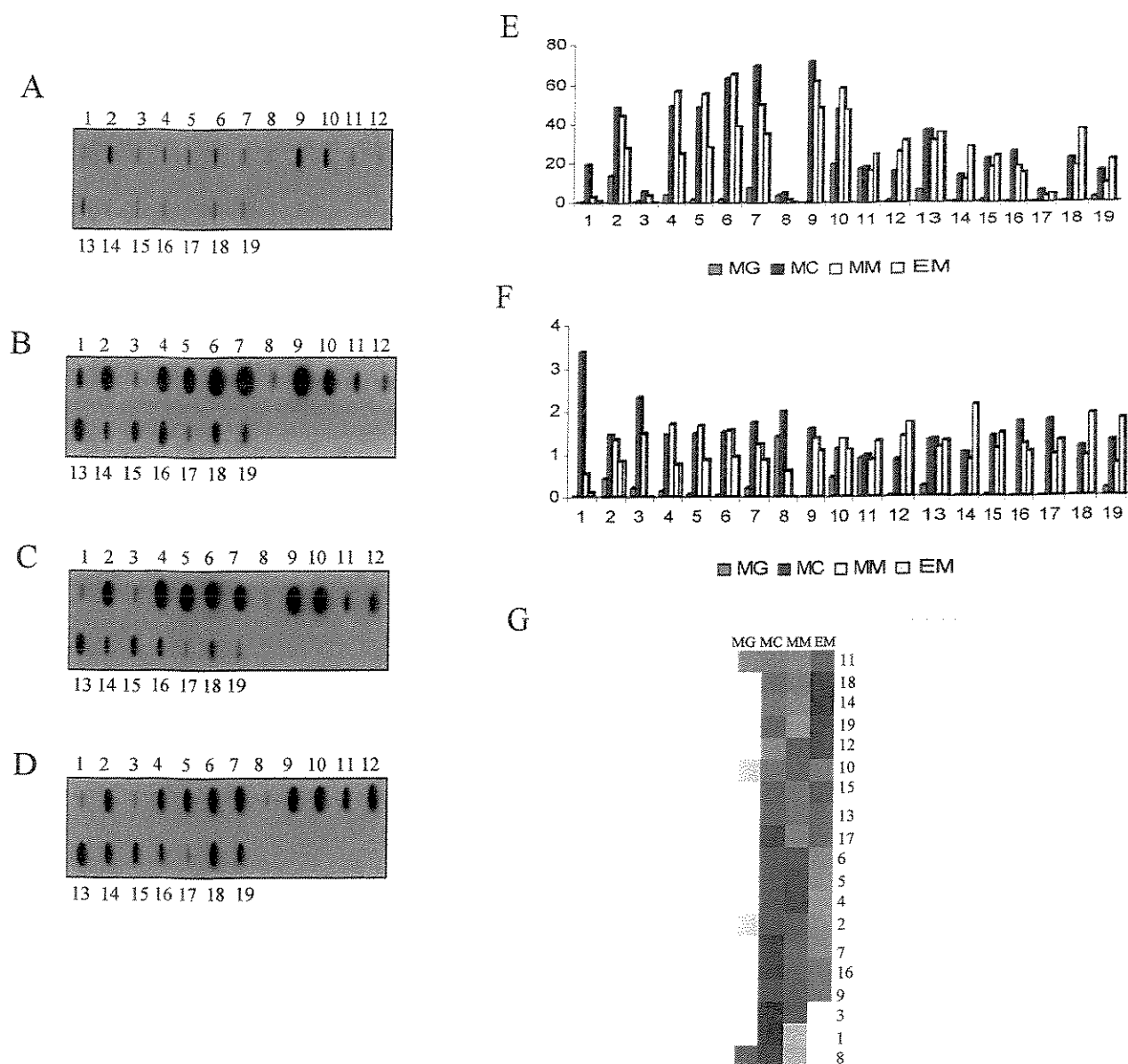


Figura 4. Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* $T_{12}VG - OPJ01$. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MG. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MC. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MM. (D) membrana hibridizada com sonda de cDNA de EM. (E) representação gráfica das médias das intensidades dos sinais de hibridização. (F) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs. (G) agrupamento dos cDNAs. O agrupamento foi realizado tomando como base o CE dos cDNAs. O vermelho indica uma expressão mais acentuada e o amarelo ausência de expressão. Expressões intermediárias são mostradas através da combinação dessas 2 cores.

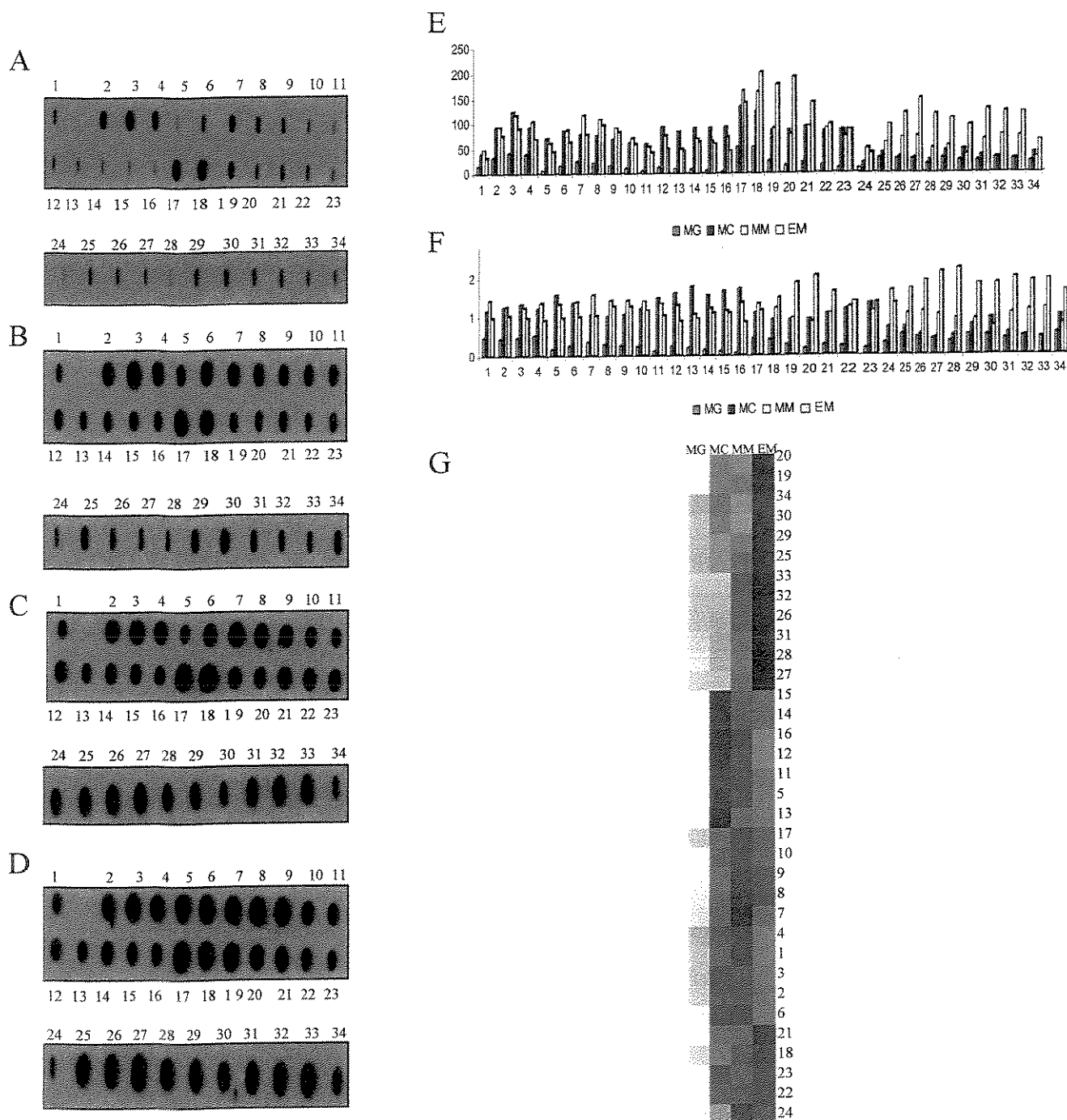
T₁₂VC-OPJ08

Figura 5. Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolado através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* T₁₂VC – OPJ08. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MG. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MC. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MM. (D) membrana hibridizada com sonda de cDNA de EM. (E) representação gráfica das médias das intensidades dos sinais de hibridização. (F) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs. (G) agrupamento dos cDNAs. O agrupamento foi realizado tomando como base o CE dos cDNAs. O vermelho indica uma expressão mais acentuada e o amarelo ausência de expressão. Expressões intermediárias são mostradas através da combinação dessas 2 cores.

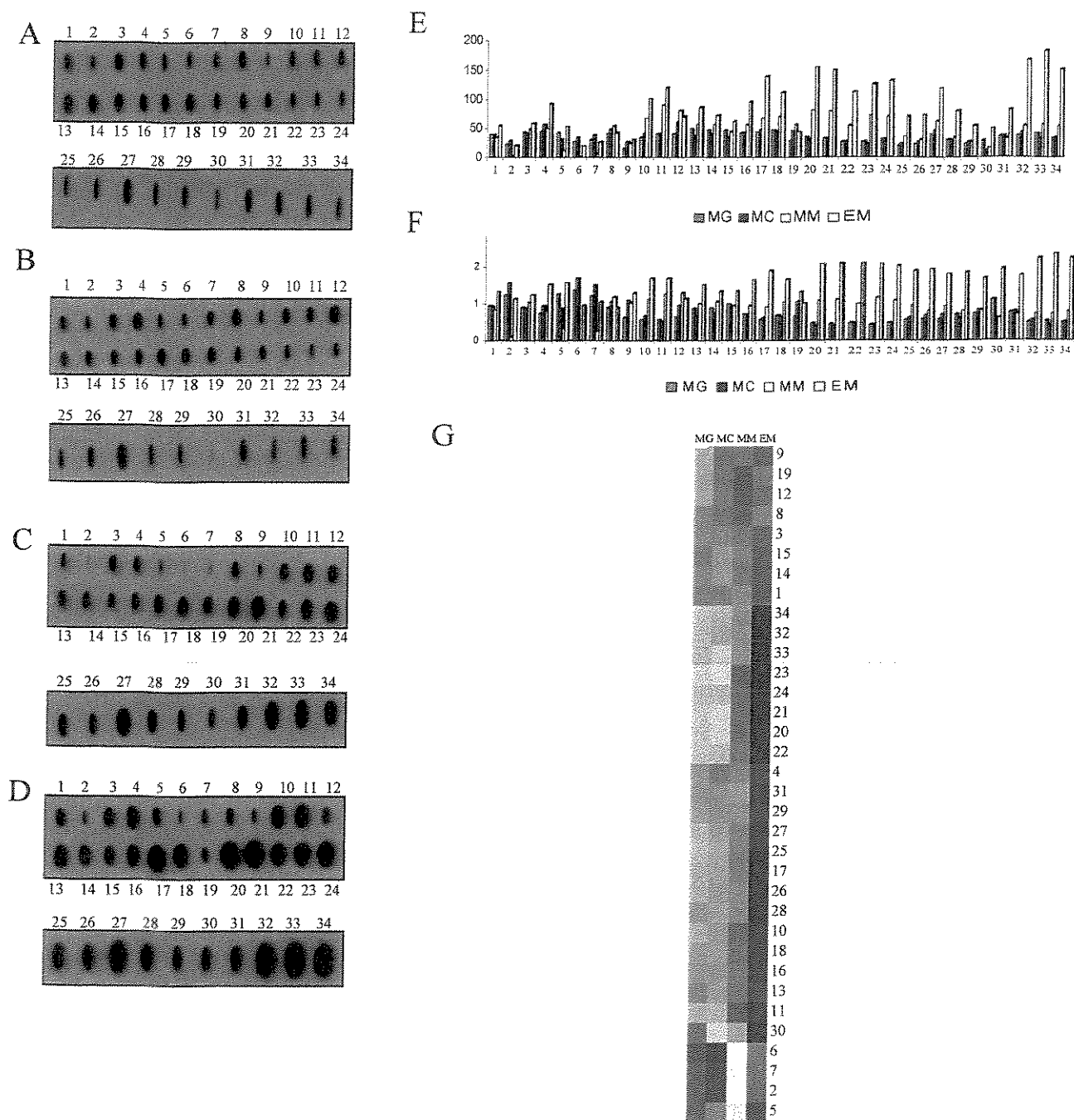
T₁₂VG - OPJ08

Figura 6. Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* T₁₂VG – OPJ08. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MG. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MC. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MM. (D) membrana hibridizada com sonda de cDNA de EM. (E) representação gráfica das médias das intensidades dos sinais de hibridização. (F) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs. (G) agrupamento dos cDNAs. O agrupamento foi realizado tomando como base o CE dos cDNAs. O vermelho indica uma expressão mais acentuada e o amarelo ausência de expressão. Expressões intermediárias são mostradas através da combinação dessas 2 cores.

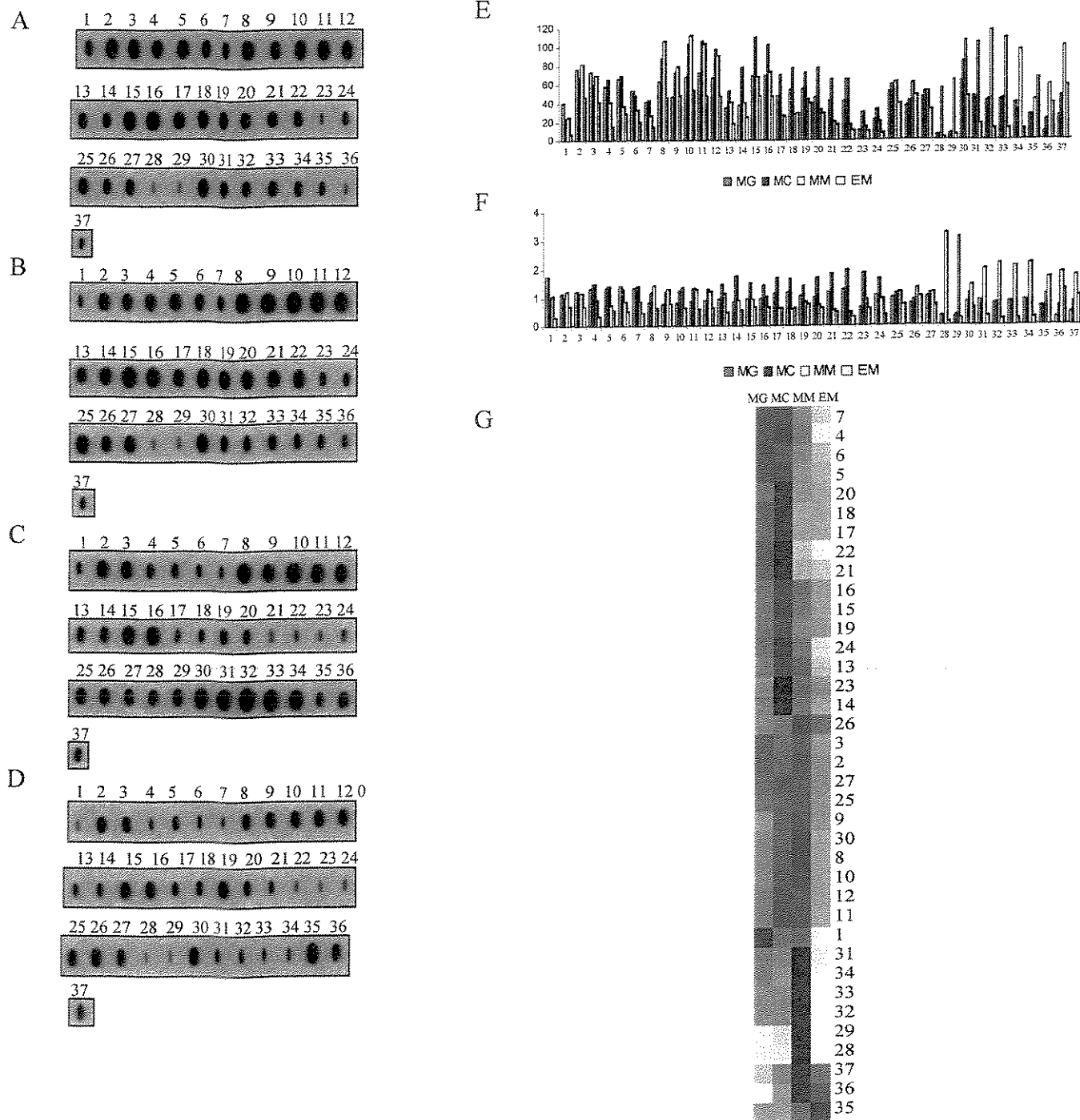
T₁₂VC -OPJ10

Figura 7. Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* T₁₂VC – OPJ10. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MG. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MC. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MM. (D) membrana hibridizada com sonda de cDNA de EM. (E) representação gráfica das médias das intensidades dos sinais de hibridização. (F) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs. (G) agrupamento dos cDNAs. O agrupamento foi realizado tomando como base o CE dos cDNAs. O vermelho indica uma expressão mais acentuada e o amarelo ausência de expressão. Expressões intermediárias são mostradas através da combinação dessas 2 cores.

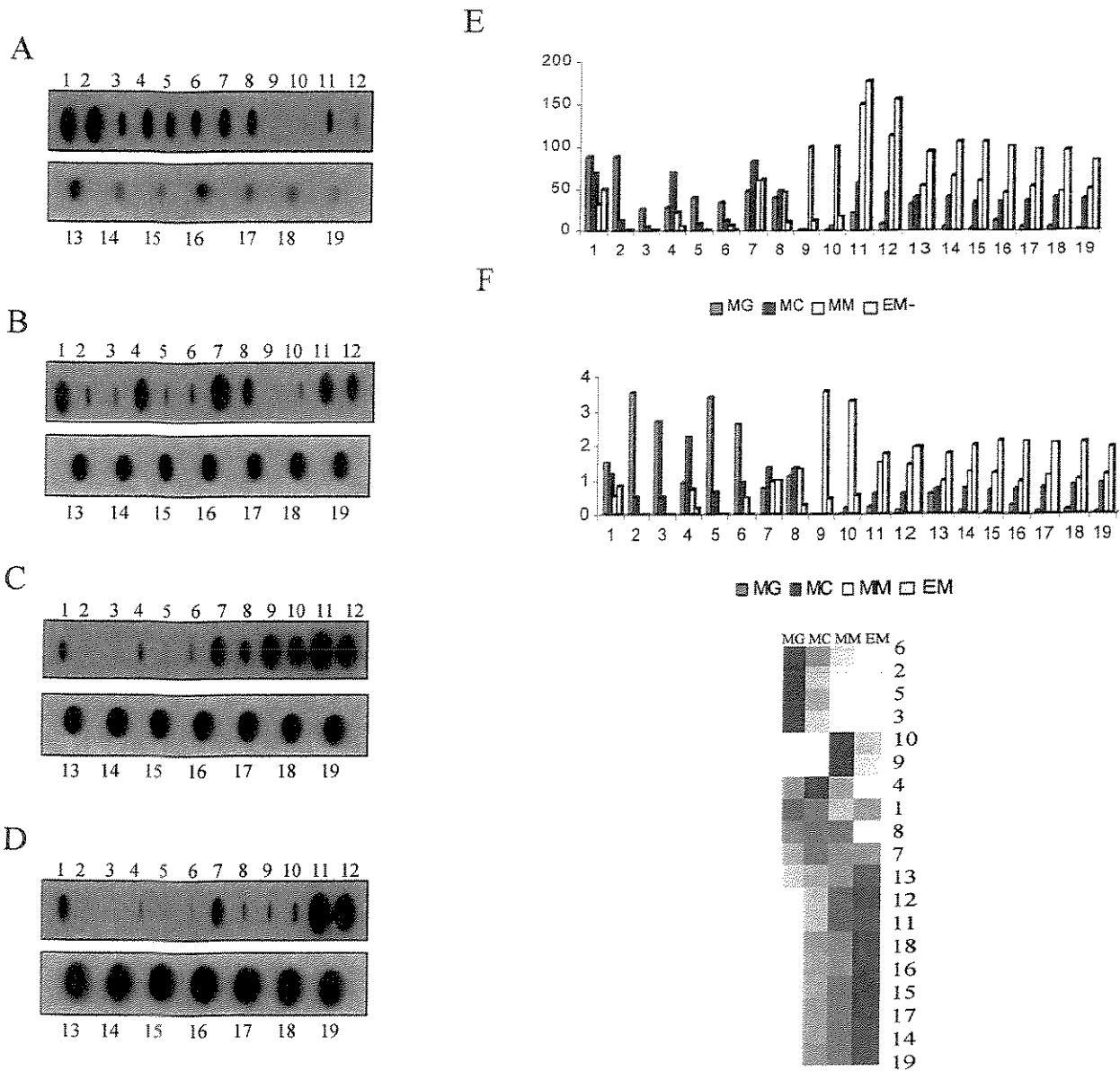
T₁₂VG - OPJ10

Figura 8. Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* T₁₂VG – OPJ10. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MG. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MC. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de MM. (D) membrana hibridizada com sonda de cDNA de EM. (E) representação gráfica das médias das intensidades dos sinais de hibridização. (F) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs. (G) agrupamento dos cDNAs. O agrupamento foi realizado tomando como base o CE dos cDNAs. O vermelho indica uma expressão mais acentuada e o amarelo ausência de expressão. Expressões intermediárias são mostradas através da combinação dessas 2 cores.

3.3. Análise dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com expressão diferencial confirmada por *slot blot*

Dos 163 cDNAs analisados através de *slot blot*, os *primers* que resultaram no maior número de cDNAs diferenciais confirmados foram T₁₂VC – OPJ10, de um total de 37 cDNAs isolados 34 tiveram a expressão diferencial confirmada, T₁₂VG – OPJ10, de um total de 19 cDNAs isolados 18 tiveram a expressão diferencial confirmada e T₁₂VC – OPJ08, de um total de 34 cDNAs isolados 31 tiveram a expressão diferencial confirmada (Tabela 3). Os maiores CEs (acima de 3) foram observados para os cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VC – OPJ10 e T₁₂VG – OPJ10 (Figuras 7F e 8F).

3.3.1. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VC – OPJ01

Como mencionado, um total de 20 cDNAs foram isolados com os *primers* T₁₂VC – OPJ01 (Tabela 2). Dos 20 cDNAs isolados, 12 tiveram a expressão diferencial confirmada através de *slot blot* (Figura 3A–D). São eles: 1, 2, 6 e 9 - expressão diferencial confirmada em MG; 10, 11, 12, 13 e 14 – expressão diferencial confirmada em MC; 17 e 18 – expressão diferencial confirmada em MM; 20 – expressão diferencial confirmada em EM. Os cDNAs 3, 4, 5, 7, 8, 15, 16 e 19 não tiveram a expressão diferencial confirmada.

Como pode ser visto nas Figuras 3F e 3G, foram observados os padrões de expressão descritos abaixo:

- cDNAs com expressão mais acentuada em MG: 1 (CE = 1,9) e 2 (CE = 1,6);
- cDNA com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento: 9 (CE = 1,2 em MG e 1,4 em MC);
- cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião: 6 (CE = 1,2 em MG e 1,1 em EM), 10 (CE = 1,2 em MC e EM), 11 (CE = 1,1 em MC e 1,3 em EM), 12 (CE = 1,2 em MC e EM), 13 (CE = 1,4 em MC e 1,2 em EM), 14 (CE = 1,2 em MC e EM), 17 (CE = 1,2 em MM e 1,3 em EM), 18 (CE = 1,1 em MM e 1,3 em EM) e 20 (CE = 1,4 em MC e 1,2 em EM).

Esses padrões de expressão são mostrados na Tabela 4.

Com os *primers* T₁₂VC – OPJ01, um total de 3 cDNAs (1, 2 e 6) foram selecionados para serem clonados e seqüenciados. Os cDNAs selecionados foram os que apresentaram os maiores CEs.

Os cDNAs 1 e 2 com expressão diferencial em MG (CE = 1,9, e 1,6, respectivamente) apresentaram baixa expressão em MC, MM (expressão temporal) e EM. Assim sendo, esses cDNAs representam genes que são mais expressos no início do desenvolvimento (Figuras 3A-D). O cDNA 6 com expressão diferencial em MG (CE = 1,2) também apresentou baixa expressão em MC e MM, no entanto, teve expressão alta em EM (CE = 1,1).

3.3.2. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VG – OPJ01

Dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VG – OPJ01, 13 tiveram a expressão diferencial confirmada (Figura 4). São eles: 4, 5, 6, 7 e 8 – expressão diferencial confirmada em MC; 9, 10 e 12 – expressão diferencial confirmada em MM; 14, 15, 17, 18 e 19 – expressão diferencial confirmada em EM.

Foram isolados 3 cDNAs de MG do gel de *display* (1, 2 e 3) contudo, esses cDNAs não foram considerados como diferenciais pois apresentaram CE abaixo de um para MG (Figura 4F). Os cDNAs 1, 2, 3, 11, 13 e 16 não tiveram expressão diferencial confirmada.

Como pode ser visto nas Figuras 4F e 4G, foram observados os padrões de expressão descritos abaixo:

- cDNA com expressão mais acentuada em MM: 10 (CE = 1,4);
- cDNA com expressão mais acentuada em EM: 14 (CE = 2,1);
- cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento: 4, 5, 6 e 7 (cDNAs isolados de MC com CE acima de 1 em MC e MM); 8 (cDNA isolado de MC com CE acima de um em MG e MC) e 9 (cDNA isolado de MM com CE acima de 1 em MC e MM);
- cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do

megagametófito e embrião: 12 (cDNA isolado de MM com CE acima de 1 em MM e EM); 15, 17, 18 e 19 (cDNAs isolados de EM com CE acima de 1 em EM e MC).

Os padrões de expressão descritos acima estão resumidos na Tabela 4.

Dos cDNAs descritos acima, 6 (8, 9, 10, 12, 14 e 18) foram escolhidos para serem clonados e seqüenciados. Os cDNAs escolhidos foram os que apresentaram os maiores CEs (Figura 4F).

O cDNA 8 com expressão diferencial em MC (CE = 2,0) apresentou expressão acentuada em MG (CE = 1,4), diminuição em MM e ausência em EM. Assim, esse cDNA apresentou expressão temporal (no megagametófito) e expressão espacial (megagametófito e embrião).

Os cDNAs com expressão diferencial em MM tiveram baixa expressão (10 e 12) e ausência de expressão (9, 14 e 18) em MG, com aumento significativo da expressão em MC, MM e EM, sugerindo assim que esses cDNAs representam genes característicos da fase final do desenvolvimento.

3.3.3. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VC – OPJ08

Um total de 31 cDNAs, isolados com os *primers* T₁₂VC – OPJ08, tiveram a expressão diferencial confirmada. Os cDNAs confirmados foram: MC: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16; MM: 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27 e EM: 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34 (Figura 5F). Apenas um cDNA foi isolado de MG (1). A expressão diferencial desse cDNA não foi confirmada. Os cDNAs que não tiveram a expressão diferencial confirmada foram: 1, 19 e 20. A intensidade do sinal de hibridização dos cDNAs pode ser observada nas Figuras 5A – D.

As Figuras 5F e 5G, mostram os padrões de expressão descritos abaixo:

- cDNAs com expressão mais acentuada em EM: 28, 29, 30 e 34;
- cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13 e 16 (cDNAs isolados de MC com CE acima de 1 em MC e MM);
- cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião: 18, 21, 24, 25, 26 e 27 (cDNAs isolados de MM com

CE acima de 1 em MM e EM); 31, 32 e 33 (cDNAs isolados de EM com CE acima de 1 em MM e EM);

-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento e em EM: 8, 9, 10, 14 e 15 (cDNAs isolados de MC com CE acima de 1 em MC, MM e EM); 17, 22 e 23 (cDNAs isolados de MM com CE acima de 1 em MC, MM e EM).

Os padrões de expressão descritos acima são mostrados na Tabela 4.

Os cDNAs selecionados para clonar e seqüenciar foram: 13, 14, 15, 16, 22, 24, 28 e 31. Esses cDNAs apresentaram uma baixa expressão em MG e um aumento significativo da expressão em MC, MM e EM com exceção, dos cDNAs 24, 28 e 31 que apresentaram baixa expressão também em MC (Figuras 5A – D, 5F e 5G). Esses cDNAs representam genes com expressão aumentada no estágio intermediário e final do desenvolvimento e apenas no estágio final, respectivamente.

3.3.4. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VG – OPJ08

Um total de 21 cDNAs tiveram a expressão diferencial confirmada com os *primers* T₁₂VG – OPJ08. Desses 21 cDNAs, 1 foi confirmado em MG (2); 4 em MC (6, 7, 8 e 9); 5 em MM (19, 20, 21, 22 e 23) e 11 em EM (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34). Os cDNAs 1, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 não tiveram a expressão diferencial confirmada. As membranas de *slot blot*, contendo os sinais de hibridização, são mostradas nas Figuras 6A – D.

Através das Figuras 6F e 6G pode-se observar os padrões de expressão descritos abaixo:

-cDNAs com expressão mais acentuada em EM: (25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33 e 34). Dentre esses cDNAs, o que apresentou menor CE foi o cDNA 29 (1,7) e o que apresentou maior CE foi o cDNA 33 (2,3).

-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento: 2 - cDNA isolado de MG com CE acima de 1 em MG e MC; 6 e 7 - cDNAs isolados de MC com CE acima de 1 em MG e MC e 8 - cDNA isolado de MC com CE acima de 1 em MC e MM; 19 - cDNA isolado de MM com CE acima de 1 em MC e MM;

-cDNA com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião: 9 - cDNA isolado de MC com CE acima de 1 em MC e EM; 14, 20, 21 e 23 - cDNAs isolados de EM com CE acima de 1 em MM e EM e 24 e 30 - cDNAs isolados de EM com CE acima de 1 em MG e EM.

Dos cDNAs descritos acima, 5 foram clonados e seqüenciados: 8, 19, 32, 33 e 34. O cDNA 8 apresentou uma baixa expressão em MG e EM e aumento da expressão em MC e MM (Figuras 6A– D, 6F e 6G). Esse cDNA representa um gene com expressão aumentada no megagametófito, no estágio intermediário e final do desenvolvimento e embrião. O cDNA 19 apresentou uma baixa expressão em MG e aumento da expressão em MC, MM e EM (Figuras 6A– D, 6F e 6G) sugerindo, que esse cDNA representa um genes com expressão aumentada no estágio final do desenvolvimento. Os cDNAs 32, 33 e 34 (diferenciais para EM), apresentaram baixa expressão para MG, MC e MM (expressão espacial).

3.3.5. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VC – OPJ10

De um total de 37 cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VC – OPJ10, 34 tiveram a expressão diferencial confirmada através de *slot blot* (Figuras 7A–D). São eles: 1, 4, 5, 6 e 7 - expressão diferencial confirmada em MG; 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24 – expressão diferencial confirmada em MC; 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34 – expressão diferencial confirmada em MM; 35 e 36 – expressão diferencial confirmada em EM. Os cDNAs que não tiveram a expressão diferencial confirmada foram: 2, 3, e 37. A representação gráfica dos CEs para esses cDNAs pode ser observada na Figura 7F.

Os cDNAs 28 e 29, isolados de MM, são os que apresentaram os maiores CEs (3,2 e 3,1, respectivamente). Esses cDNAs apresentaram CE bastante baixo em MG (0,3), MC (28 – CE = 0,3 e 29 – CE = 0,4) e EM (28 – CE = 0,1 e 29 – CE = 0,2).

A representação gráfica dos CEs para esses cDNAs pode ser observada na Figura 7F.

As Figuras 7F e 7G, mostram os padrões de expressão descritos abaixo:

- cDNA com expressão mais acentuada em MG: 1;
- cDNAs com expressão mais acentuada em MC: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 23;
- cDNAs com expressão mais acentuada em MM: 26, 28, 29, 31, 32, 33 e 34;
- cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento: 4, 5, 6 e 7 (cDNAs isolados de MG com CE acima de 1 em MG e MC); 8, 9, 10, 11, 12 e 13 (cDNAs isolados de MC com CE acima de 1 em MC e MM); 21, 22, e 24 (cDNAs isolados de MC com CE acima de 1 em MG e MC) e 25, 27 e 30 (cDNAs isolados de MM com CE acima de 1 em MC e MM);
- cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião: 35 e 36 (cDNAs isolados de EM com CE acima de 1 em MM e EM).

Dos cDNAs descritos acima, 15 foram clonados e seqüenciados (1, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 22, 23, 28, 29, 31, 32, 33 e 34). O cDNA 1 com expressão diferencial confirmada em MG apresentou uma baixa expressão em MC e MM e quase ausência de expressão em EM (Figuras 7A– D, 7F e 7G). Assim sendo, esse cDNA representa um gene com expressão aumentada no estágio inicial de desenvolvimento do megagametófito. Os cDNAs 4, 5, 6 e 7 com expressão diferencial em MG apresentaram expressão acentuada em MG e MC com diminuição da expressão em MM e EM (Figuras 7A– D, 7F e 7G). Os cDNAs 14 e 23 com expressão diferencial em MC apresentaram baixa expressão em MG, MM e EM sugerindo assim, que esses cDNAs representam genes que tem maior expressão no estágio intermediário do desenvolvimento. Os cDNAs 21 e 22 com expressão diferencial em MC apresentaram expressão acentuada em MG e MC e baixa expressão em MM e EM. Os cDNAs 28, 29, 31, 32, 33 e 34 com expressão diferencial em MM apresentaram diminuição acentuada da expressão em MG, MC e EM sugerindo assim, que esses cDNAs são específicos do megagametófito no estágio final do desenvolvimento.

3.3.6. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VG – OPJ10

Dos cDNAs isolados com os *primers* T₁₂VG – OPJ10, 18 tiveram a expressão diferencial confirmada através de *slot blot* (Figuras 8A - D). Os cDNAs com

expressão diferencial confirmada foram: 1, 2, 3, 5 e 6 – expressão diferencial confirmada em MG; 7 e 8 – expressão diferencial confirmada em MC; 9 e 10 – expressão diferencial confirmada em MM e 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 - expressão diferencial confirmada em EM (Figuras 8F e 8G). Apenas o cDNA 4 não teve a expressão diferencial confirmada.

Os padrões de expressão dos cDNAs são descritos abaixo:

- cDNAs com expressão mais acentuada em MG: 2, 3, 5 e 6;
- cDNA com expressão mais acentuada em MC: 7;
- cDNAs com expressão mais acentuada em MM: 9 e 10;
- cDNAs com expressão mais acentuada em EM: 13, 16 e 18;
- cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento: cDNA isolado de MG com CE acima de 1 em MG e MC – 1 e cDNA isolado de MC com CE acima de 1 em MC e MM - 8;
- cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião: cDNAs isolados de EM com CE acima de 1 em MM e EM - 11, 12, 14, 15, 17 e 19.

Dos cDNAs descritos acima, 11 foram clonados e seqüenciados (1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 15, 16, 17 e 18). O cDNA 1 com expressão diferencial confirmada em MG apresentou expressão acentuada em MG e MC e baixa expressão em MM e EM (Figuras 8A– D, 8F e 8G). Assim, esse cDNA representa um gene com expressão aumentada nos estádios inicial e intermediário do desenvolvimento. Os cDNAs 2, 3, 5 e 6 com expressão diferencial em MG apresentaram expressão acentuada em MG com diminuição da expressão em MC e ausência de expressão em MM e EM, com exceção do 6 que apresentou expressão, ainda que pequena em MM (8F e 8G). Esses cDNAs (2, 3, 5 e 6) representam genes específicos do estádio inicial do desenvolvimento. Os cDNAs 9 e 10 com expressão diferencial em MM apresentaram ausência de expressão em MG e MC (cDNA 9) e ausência e baixa expressão em MG e MC, respectivamente (cDNA 10). Esses cDNAs (9 e 10) tiveram expressão acentuada em MM e baixa expressão em EM. Os cDNAs 15, 16, 17 e 18 com expressão diferencial para EM apresentaram baixa expressão em MG e aumento progressivo em MC e MM.

É a primeira vez que uma grande quantidade de cDNAs expressos diferencialmente na semente de *Araucaria angustifolia* são isolados. Os cDNAs que apresentaram expressão

diferencial mais acentuada foram clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas em bancos de dados.

Tabela 4: Padrões de expressão dos cDNAs com expressão diferencial confirmada através de lot blot

<i>Primers</i>	<i>Padrões de expressão</i>	<i>Estádio que foi isolado o cDNA/nº do cDNA</i>	<i>CE acima de 1 em:</i>
T₁₂VC-OPJ01	-cDNAs com expressão mais acentuada em MG	MG (1 e 2)	MG
	-cDNA com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento	MG (9)	MG e MC
	-cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião	MG (6), MC (11-14), MM (17 e 18) e EM (20)	MG e MM (6); MC e EM (11 – 14); MM e EM (17 e 18) e MC e EM (20)
T₁₂VG-OPJ01	-cDNA com expressão mais acentuada em MM	MM (10)	MM
	-cDNA com expressão mais acentuada em EM	EM (14)	EM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento	MC (4-8) e MM (9)	MC e MM (4-7); MG e MC (8); MC e MM (9)
	-cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião	MM (12) e EM (15 e 17-19)	MM e EM (12) e EM e MC (15 e 17-19)
T₁₂VC-OPJ08	-cDNAs com expressão mais acentuada em EM	EM (28-30 e 34)	EM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento	MC (2-7, 11-13 e 16)	MC e MM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião	MM (18, 21 e 24-27) e EM (31-33)	MM e EM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento e em EM	MC (8-10 e 14-15) e MM (17, 22 e 23)	MC, MM e EM
T₁₂VG-OPJ08	-cDNAs com expressão mais acentuada em EM	EM (25-29 e 31-34)	EM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento	MG (2), MC (6, 7 e 8) e MM (19)	MG e MC (2); MG e MC (6 e 7) e MC e MM (8 e 19)
	-cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião	MC (9) e EM (14, 20, 21, 23, 24 e 30)	MC e EM (9); EM e MM (14, 20, 21 e 23) e MG e EM (24 e 30)

T₁₂VC-OPJ10	-cDNA com expressão mais acentuada em MG	MG (1)	MG
	-cDNAs com expressão mais acentuada em MC	MC (14-20 e 23)	MC
	-cDNAs com expressão mais acentuada em MM	MM (26, 28, 29 e 31-34)	MM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento	MG (4-7), MC (8-13, 21, 22 e 24) e MM (25, 27 e 30)	MG e MC (4-7, 21, 22 e 24) e MC e MM (8-13, 25, 27 e 30)
	-cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião	EM (35 e 36)	MM e EM
T₁₂VG-OPJ10	-cDNAs com expressão mais acentuada em MG	MG (2, 3, 5 e 6)	MG
	-cDNA com expressão mais acentuada em MC	MC (7)	MC
	-cDNAs com expressão mais acentuada em MM	MM (9 e 10)	MM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em EM	EM (13, 16 e 18)	EM
	-cDNAs com expressão mais acentuada em 2 estádios de desenvolvimento	MG (1) e MC (8)	MG e MC (1) e MC e MM (8)
	-cDNAs com expressão mais acentuada em um dos diferentes estádios do megagametófito e embrião	EM (11, 12, 14, 15, 17 e 19)	MM e EM

3.4. Análise das seqüências dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA

Um total de 49 cDNAs com os maiores CEs foram clonados e seqüenciados. Alguns desses cDNAs apresentaram seqüências repetidas, restando assim, 36 seqüências não repetidas. O alinhamento das seqüências foi feito com o auxílio do programa Clustal W (V. 1,75). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados, com o auxílio do programa BLAST X V. 2,1,1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=0>). O programa BLAST X deduz a seqüência de aminoácidos a partir da seqüência nucleotídica e compara com seqüências de aminoácidos disponíveis em bancos de dados. Um total de 21 fragmentos apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados.

3.4.1. Análise das seqüências dos cDNAs isolados de MG

Um total de 13 cDNAs isolados de MG foram clonados e seqüenciados. Os cDNAs selecionados foram isolados de MG com os *primers*: T₁₂VC – OPJ01 (3 cDNAs), T₁₂VC – OPJ10 (5 cDNAs) e T₁₂VG – OPJ10 (5 cDNAs). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados. Das 10 seqüências obtidas (não repetidas), 6 apresentaram similaridade com seqüências de bancos de dados. A Tabela 5 mostra as seqüências que apresentaram ou não similaridade com seqüências em bancos de dados.

3.4.1.1. Análise das seqüências dos cDNAs isolados de MG com os *primers* T₁₂VC – OPJ01

O fragmento MG1 (817 pb) corresponde ao cDNA de nº 1 da Figura 3. O fragmento MG1 teve a expressão diferencial confirmada com CEs de: 1,87 para MG, 0,47 para MC, 0,76 para MM e 0,9 para EM.

A comparação da seqüência deduzida de aminoácido do fragmento MG1 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 27% de identidade e 45% de

similaridade com um homeodomínio *zipper* de leucina de *Glycine max* (acesso AF184278, artigo submetido) (Tabela 5). A Figura 9 mostra a comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos de MG1 e a proteína de 288 resíduos de aminoácidos de *Glycine max*.

```

MG1      355 ENRRSLMAMGTRSKDQQDLVSM LAHLQSSMESLTQTSLKMQQDINQLRMEQVTTNRNHIEE 176
          +NRR+      KD  L +      L+S  ESL Q + K++ ++N L + +      EE
Sbjct:   75 QNRRARFKTKQLEKDYGV LKASYDRLKSDYESLVQENDKLKAEVNSLESKLILRDKEKEE 134

MG1      175 LTEVETKLQGNFTSGNQAENSERPHRRENPHYD 80
          ++      + +S + A NS  PH  + P D
Sbjct:   135 NSD-----DKSSPDDAVNSSSPHNNKEPMD 159

```

Figura 9: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos dos fragmentos MG1 e a sequência de aminoácidos de um homeodomínio *zipper* de leucina descrito para *Glycine max* (acesso AF184278). O “subject” representa a sequência de aminoácidos do homeodomínio *zipper* de leucina. As cruzes representam similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

Os *Homeodomain-leucine zipper* (HDZip) constituem uma grande família de fatores de transcrição. Alguns desses fatores de transcrição já foram correlacionados com a proliferação e diferenciação celular (Baima *et al.*, 2001), como é o caso do *REVOLUTA* (*REV*), também conhecido como *INTERFASCICULAR FIBERLESS1* (*IFL1*) (Zhong & Ye, 1999; Ratcliffe *et al.*, 2000).

Os estádios iniciais de desenvolvimento da semente são caracterizados por intensa proliferação celular. O transcrito MG1, que apresentou similaridade com um fator de transcrição HDZip, foi identificado em maior quantidade em MG. Esses resultados sugerem que o HDZip tem a função de promover o crescimento de MG favorecendo assim, a passagem do megagametófito para os estádios subsequentes de desenvolvimento. Um aumento significativo no tamanho do megagametófito é observado durante o seu desenvolvimento.

O fragmento MG13 corresponde ao cDNA de nº 6 da Figura 3. O fragmento MG13 (356 pb) teve um CE de 1,2 para MG, 0,8 para MC, 0,88 para MM e 1,13 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MG13 com sequências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência descrita até o momento (Tabela 5).

3.4.1.2. Análise das seqüências dos cDNAs isolados de MG com os *primers* T₁₂VC – OPJ10

O fragmento MG1,2 (597 pb) corresponde ao cDNA de nº 1 da Figura 7. Esse fragmento teve a expressão diferencial confirmada com CEs de 1,72 para MG, 0,96 para MC, 1,4 para MM e 0,28 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MG1,2 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 48% de identidade e 69% de similaridade com o transposon *MuDR* de milho (acesso F22O13), Tabela 5. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos de MG1.2 com *MuDR* (1591 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 10.

```
MG1,2: 87   DQAYFMDLIEIWDPHTNTFHLPIGEITVTLEDV 185
          D++      L++ W P T+TFHLP GE+   TL+DV
Sbjct: 945  DRSLAALVDRWRPETHTFHLPCGEMAPTLQDV 977
```

Figura 10: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MG1,2 e a seqüência de aminoácidos do transposon *MuDR* de milho (acesso F22O13). O “subject” representa a seqüência de aminoácidos do transposon *MuDR*. As cruzes representam similaridade entre os aminoácidos.

Segundo Rudenko & Walbot (2001), uma variedade de mecanismos regulatórios operam a nível transcricional e pós-transcricional resultando em padrões temporal e espacial específicos da atividade dos transposons. Esses mecanismos regulatórios ainda não são bem conhecidos. Assim, não é possível atribuir uma possível função ao *MuDR* no desenvolvimento do megagametófito.

O fragmento MG6 (598 pb) corresponde ao cDNA nº 4 da Figura 7. Esse fragmento foi isolado de MG e teve a expressão diferencial confirmada com CEs de 1,3 para MG, 1,5 para MC, 0,9 para MM e 0,33 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MG6 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 36% de identidade e 63% de similaridade com o *early B-cell factor* de *Gallus gallus* (acesso AJ238322, artigo submetido) (Tabela 5). A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos de MG6 com o *early B-cell factor* (591 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 11.

```

MG6   : 365 NRVIHFGLPSGNWMSAVLAVNITQSNHATWQNFSSK 258
        N  +H G+   N  S  LAVN+++++ AT Q F+++
Sbjct: 426 NTSVHAGMMGVNSFSGQLAVNVSEASQATSQGFTRN 461

```

Figura 11: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MG6 e a sequência de aminoácidos do *early B-cell factor* descrita para *Gallus gallus* (acesso AJ238322). O “subject” representa a sequência de aminoácidos do *early B-cell factor*. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

O *early B-cell factor* é um fator de transcrição com função essencial no desenvolvimento de células B (células do sangue) em *Gallus gallus*. Assim, a similaridade do transcrito MG6 com esse fator de transcrição pode ter sido ao acaso, pois teve baixa similaridade e *e-value* não significativo.

O fragmento MG7 (421 pb) corresponde ao cDNA nº 5 da Figura 9. Esse fragmento teve CEs de 1,32 para MG, 1,4 para MC, 0,7 para MM e 0,6 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácido do fragmento MG7 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 50% e 49% de identidade e 56% e 57% de similaridade, respectivamente, com a LP3 (induzida através de estresse hídrico) e LP3 — 1 (induzida por estresse hídrico e ácido abscísico) de *Pinus taeda* (acesso U67135, Padmanabhan *et al.*, 1997 e U52665, artigo submetido, respectivamente), Tabela 5. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos de MG7 com a LP3 (153 resíduos de aminoácidos) e a LP3-1 (126 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 12.

A

```

MG7   : 10  GELGAMAAGAFALYEKHEAKDPENARRHKIXXXXXXXXXXGSGGFAFXXXXXXXXXXXXX 189
          G LG +AAGAFAL+EKH +KKDPENA RHKI          G+GG+ F
Sbjct: 76  GGLGTVAAGAFALHEKHASKKDPENAHHRKIEEEIAAAAAVGAGGYVFHEHHEKESKEE 135

MG7   : 190 XXXASGKKHHHLF 228
          A GKKHHHLF
Sbjct: 136 EKEAEGKKHHHLF 148

```

B

```

MG7   : 10  GELGAMAAGAFALYEKHEAKDPENARRHKIXXXXXXXXXXGSGGFAFXXXXXXXXXXXXX 189
          GE+G +AAGAFAL+EKH  KKDPEN+A RHKI          G+GG+ F
Sbjct: 54  GEMGTVAAGAFALHEKHADKKDPEHAHRKIEEEVAAAAVGAGGYVFHEHHEKESKEE 113

MG7   : 190 XXXASGKKHHHLF 228
          A GKKHHHLF
Sbjct: 114 EKEAEGKKHHHLF 126

```

Figura 12: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MG7 e as sequências de aminoácidos das proteínas LP3 e LP3 - 1 descritas para *Pinus taeda*. Em A, comparação de MG7 com a LP3. Em B, comparação de MG7 com a LP3 - 1. O “subject” representa a sequência de aminoácidos da LP3 e LP3 - 1. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

Foi isolado de *Pinus taeda* L., um clone de cDNA (*lp3*) induzido através de estresse hídrico. Este cDNA é preferivelmente induzido na raiz com expressão basal constitutiva observada em estames e plântulas sob condições de estresse hídrico (Padmanabhan *et al.*, 1997). Através de *Northern blot*, os autores observaram que em sementes em germinação sob irrigação e tratamento com ABA, a expressão foi baixa quando comparada com sementes em germinação, submetidas ao estresse hídrico (Padmanabhan *et al.*, 1997). Entretanto, o *lp3* foi induzido através de ABA indicando que a sua expressão em raiz sob condições de estresse hídrico é parcialmente mediada por ABA (Padmanabhan *et al.*, 1997). O clone *lp3-1* corresponde a uma proteína putativa que apresenta um perfil hidrofílico similar ao *lp3*, exceto por duas deleções na região 5' (Padmanabhan *et al.*, 1997).

Vários clones induzidos por estresse hídrico tem sido identificados em *Pinus taeda* (Chang *et al.*, 1996; Dias, 1995). Estes clones são diferencialmente regulados em diferentes tecidos sob estresse hídrico (Padmanabhan *et al.*, 1997). Eles codificam várias proteínas que estão envolvidas na biosíntese de lignina, modificações da parede celular e na ligação a ácidos nucleicos e cálcio (Chang *et al.*, 1996).

Proteínas induzidas por estresse hídrico geralmente estão relacionadas com o desenvolvimento da semente. Durante o desenvolvimento, a semente passa por um processo natural de dissecação e acumulação de produtos de reserva. Numerosos eventos celulares e bioquímicos estão associados com a tolerância da dissecação da semente, tais como: síntese de proteínas envolvidas na dissecação ou *heat shock*, vacuolização, ativação de antioxidantes, acumulação de oligossacarídeos e manutenção da integridade do DNA (Bailly *et al.*, 2001). Assim sendo, a proteína LP3 pode estar envolvida na tolerância do megagametófito ao processo de dissecação.

O fragmento MG9 (412 pb) corresponde a cDNA nº 7 da Figura 7. Esse fragmento teve CEs de 1,32 para MG, 1,38 para MC, 0,85 para MM e 0,45 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácido do fragmento MG9 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 44% de identidade e 60% similaridade com uma poliproteína (217 resíduos de aminoácidos) de *Oryza sativa* (acesso AAK13122, submissão direta em bancos de dados), Figura 13.

```

MG9: 229 LQQYPILNNFRDMFFPKDLPLGHPKREFDFSLDLFPGETPIARTPYRMIPIXXXXXXXXXXXX 50
      L + PI+ F D+FP++LPG+ PKRE +F +DL PG TP+ + PYRM
Sbjct: 111 LSEIPIVREFGDVFPEELPGMPPKREIEFQIDLAPGTTPLCKRPYRMAANELAEVKKQLE 1160

MG9: 49 XXXEKGHIKPSVSP 8
      EKG+I+PS SP
Sbjct: 1161 ELKEKGYIRPSTSP 1174

```

Figura 13: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MG9 e a sequência de aminoácidos da poliproteína descrita para *Oryza sativa*. O “subject” representa a sequência de aminoácidos da poliproteína. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

O fragmento MG8 (449 pb) corresponde a cDNA nº 6 da Figura 8. Esse fragmento teve CEs de 1,4 para MG, 1,3 para MC, 0,85 para MM e 0,5 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MG8 com sequências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência conhecida até o momento (Tabela 5).

3.4.1.3. Análise das seqüências das cDNAs isolados de MG com os *primers* T₁₂VG – OPJ10

O fragmento MG1,3 (541 pb) corresponde ao cDNA nº 1 da Figura 9. Esse fragmento teve CEs de 1,49 para MG, 1,16 para MC, 0,53 para MM e 0,82 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácido do fragmento MG1,3 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 83% de identidade e 93% de similaridade com a histona H2B de milho (acesso X69960, artigo submetido), Tabela 5. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos de MG1,3 com a H2B é mostrada na Figura 14.

```

MG1,3: 94  TYKIYIFKVLKQVHPDIGISSKAMSIMNSFMSDIFEKLAESSKLVRYTKRNTTPSSREVQ 273
          TYKIYIFKVLKQVHPDIGISSKAMSIMNSF++DIFEKLAES+KL RY K+ T +SRE+Q
Sbjct: 65  TYKIYIFKVLKQVHPDIGISSKAMSIMNSFINDIFEKLAESA KLARYNKKPTVTSREIQ 124

MG1,3: 274 SAVKLSLPGELAKHAVSEGTKAVTKFT 354
          ++V+L LPGELAKHAVSEGTKAVTKFT
Sbjct: 125 TSVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFT 151

```

Figura 14: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MG1,3 e a seqüência de aminoácidos da histona H2B descrita para *Zea mays*. O “subject” representa a seqüência de aminoácidos da histona H2B. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

O fragmento MG1,3 também apresentou similaridade com a histona H2B descrita para outros organismos: *Oryza sativa* (153 resíduos de aminoácidos, acesso AP02522) com 83% de identidade e 93% de similaridade; trigo (136 resíduos de aminoácidos, acesso D37942) com 83% de identidade e 92% de similaridade; *Arabidopsis thaliana* (145 resíduos de aminoácidos, acesso AL162459) com 83% de identidade e 92% de similaridade; *Cicer arietinum* (139 resíduos de aminoácidos, acesso AJ40863) com 81% de identidade e 91% de similaridade; tomate (142 resíduos de aminoácidos, acesso AE00142) com 80% de identidade e 90% de similaridade e tabaco (146 resíduos de aminoácidos, acesso Y1128) com 80% de identidade e 89% de similaridade.

A estrutura e organização das histonas tem sido amplamente estudadas em vários organismos (Chaubet *et al.*, 1987; Hentschel & Birnstiel, 1981). Os genes de histona constituem uma família multigênica complexa (Chaubet *et al.*, 1987 & Hentschel Birnstiel, 1981). Minami *et al.* (1993), mostraram em trigo, que o padrão de expressão do gene *H2B*, durante a germinação e em vários tecidos da planta jovem, é quase idêntico ao padrão de expressão dos genes *H3* e *H4*. Através de análise de *Northern blot*, Minami *et al.* (1993),

usando sonda de cDNA de *wcH2B* – 4 mostraram que quase todos os genes *H2B* em trigo vão se expressar durante a proliferação celular, como observado para genes *H2B* de leveduras e animais. Resultado similar foi obtido com plantas de tabaco transgênicas (Yang *et al.*, 1995). Segundo Yang *et al.* (1995), os promotores para os genes *H2B* são preferencialmente ativados em tecidos proliferativos (meristema de raiz, folhas jovens e tecido ovular) e que a sua atividade provavelmente é regulada através do ciclo celular.

A maior quantidade de transcritos para histona H2B detectada em MG e MC, pode ser decorrente da alta proliferação celular que ocorre nos estádios iniciais de desenvolvimento.

Os fragmentos MG2,2 (420 pb) e MG4 (258 pb) correspondem aos cDNAs nº 2 e 5 da Figura 8. Esses fragmentos tiveram CEs de: MG2,2 (3,5 para MG, 0,5 para MC, 0,0 para MM e EM) e MG4 (3,35 para MG, 0,64 para MC e 0,0 para MM e EM). A comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos dos fragmentos MG2,2 e MG4 com seqüências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma seqüência descrita até o momento (Tabela 5).

3.4.2. Análise dos cDNAs isolados de MC

Um total de 10 cDNAs isolados de MC foram clonados e seqüenciados. Os cDNAs selecionados foram isolados de MC com os *primers*: T₁₂VG – OPJ01 (1 cDNA), T₁₂VC – OPJ08 (4 cDNAs), T₁₂VG – OPJ08 (1 cDNA) e T₁₂VC – OPJ10 (4 cDNAs). Das dez seqüências obtidas, 5 apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados (Tabela 5).

3.4.2.1. Análise da seqüência do cDNA isolado de MC com os *primers* T₁₂VG – OPJ01

O fragmento MC14 (442 pb) corresponde ao cDNA nº 8 da Figura 4. Esse fragmento teve CEs de 1,4 para MG, 2,0 para MC, 0,6 para MM e 0,0 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC14 com seqüências de

aminoácidos disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência conhecida até o momento (Tabela 5).

3.4.2.2. Análise das seqüências dos cDNAs isolados de MC com os primers T₁₂VC – OPJ08

O fragmento MC13 (322 pb) corresponde ao cDNA nº 13 da Figura 5. Esse fragmento teve CEs de: 0,18 para MG, 1,8 para MC, 1,1 para MM e 0,96 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC13 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 60% e 51% de identidade e 75% e 67% de similaridade com uma gluconoquinase de *Oryza sativa*, similar a uma gluconoquinase de *Escherichia coli* (acesso P3928, artigo submetido), e *Arabidopsis thaliana* (acesso AC05825, artigo não publicado), respectivamente, Tabela 5. A Figura 15 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácido de MC13 com a gluconoquinase de *Oryza sativa* (220 resíduos de aminoácidos) e a de *Arabidopsis thaliana* (175 resíduos de aminoácidos).

A

```
MC13 : 48 LKASAEVIASRLETRAKEGEHFMSPSLLQSQIDLLQTDDETEGIFIDATLSSDLTV 215
      L+ +AEVIA+RL+ RA E EGEHFM SLLQSQ+DLLQ D+ EGI +DAT+ + V
Sbjct: 149 LEASAEVIADRIIRRSMEGEHFMSPASLLQSQDLDLLQIDEAEGITVVDATVRPNAIV 204
```

B

```
MC13 : 48 LKASAEVIASRLETRAKEGEHFMSPSLLQSQIDLLQTDDETEGIFIDATLSSDLTVKNIQ 227
      L+ +AEVIA+RL+ RA E EGEHFM +LLQSQ DLLQ D+ E IF I LS ++ V I
Sbjct: 17 LEGNAEVIAARLQKRASEEEHFMPLTLLQSQFDLLQADECEKIFKISVVLSPFVIVNTIL 166

MC13 : 228 RKLSDS 245
      +++S
Sbjct: 167 EMVANS 172
```

Figura 15: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC13 e a seqüência de aminoácidos de uma gluconoquinase descrita para *Oryza sativa* (acesso P3928) e *Arabidopsis thaliana* (acesso AC05825). Em A comparação entre MC13 e a gluconoquinase de *Oryza sativa*. Em B, comparação entre MC13 e a gluconoquinase de *Arabidopsis thaliana*. O “subject” representa a seqüência de aminoácidos da proteína gluconoquinase. As cruces mostram similaridade entre os aminoácidos.

Pouco se conhece sobre a ação da gluconoquinase em vegetais. Segundo Tong *et al.* (1996), a gluconoquinase é uma proteína termoestável, regulatória, que fosforila o gluconato. A gluconoquinase possui um sítio de ligação para ATP similar a outras quinases de açúcar (Tong *et al.*; 1996).

A função da gluconoquinase no megagametófito pode ser a imobilização do gluconato até o momento de germinação da semente. Durante a germinação da semente o megagametófito é uma fonte importante de nutrientes e energia para a plântula em desenvolvimento. A deposição de reservas no megagametófito começa no estágio intermediário de desenvolvimento (cotiledonar), o que explica uma baixa quantidade de transcritos de gluconoquinase em MG, e uma maior quantidade em MC e MM. No entanto, a ação da gluconoquinase em plantas ainda não é bem conhecida.

O fragmento MC16 (257 pb) corresponde ao cDNA nº 16 da Figura 5. Esse fragmento apresentou os seguintes CEs: 0,5 para MG, 1,73 para MC, 1,4 para MM e 0,85 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MC16 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 80% e 50% de identidade e 86% e 71% de similaridade com a CROC-1 de *Picea mariana* (acesso AF5129, Perry & Bousquet, 1998) e *Homo sapiens* (acesso AC05292, Xiao *et al.*, 1998), respectivamente (Tabela 5). A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MC16 com as sequências de aminoácidos da CROC-1 descrita para *Picea mariana* (140 resíduos de aminoácidos) e *Homo sapiens* (137 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 16.

As proteínas CROC-1 foram originalmente identificadas pela capacidade de induzirem a ativação transcricional no promotor *c-fos* de humanos (Sancho *et al.*, 1998). Estas proteínas foram localizadas no núcleo. Segundo Xiao *et al.* (1998), as proteínas CROC-1 fazem parte de uma família de proteínas Ubc-like. A família de proteínas Ubc-like é altamente conservada em células eucarióticas (Xiao *et al.*, 1998). As proteínas da família Ubc-like podem estar envolvidas em diversos processos celulares como: reparo de DNA, transdução de sinal e diferenciação celular (Xiao *et al.*, 1998). As CROC-1 não se ligam diretamente ao DNA através de sequência – específica (Rothofsky & Lin, 1997). Assim, a atividade delas poderia ser através de interações proteína-proteína que promovessem o aumento ou a estabilização de um ou mais ativadores transcacionais (Sancho *et al.*, 1998). A super expressão do gene *CROC-1* em células mamárias (HT – 29 –

M6) inibe a atividade da quinase mitótica (cdK1) e diferenciação celular (Sancho *et al.*, 1998). Assim, Os efeitos biológicos da CROC–1 seriam a transativação do promotor *c-fos* (Rothofsky & Lin, 1997) e a inibição da atividade de cdK1.

A proteína CROC-1 pode estar envolvida na inibição da proliferação celular, nos estádios MC (CE = 1,73) e MM (CE = 1,4) através da inativação da cdK1. A cdK1 é uma quinase mitótica envolvida na regulação do ciclo celular.

A

```
MC16 : 256 HTVEDILTQLKREMSTSHNRKLAQPPEGTFF 164
      +T+EDILT LKREM SHNRKL QPPEGTFF
Sbjct: 110 YTMEDILTHLKREMLASHNRKLVQPPEGTFF 140
```

B

```
MC16 : 256 HTVEDILTQLKREMSTSHNRKLAQPPEG 173
      H+++ IL +L+R M + N KL QPPEG
Sbjct: 15 HSIKVILQELRRLMMSKENMKLPQPEG 132
```

Figura 16: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC16 e a seqüência de aminoácidos da CROC–1 de *Picea mariana* e *Homo sapiens*. Em A, comparação entre MC16 e CROC–1 de *Picea mariana* (acesso AF5129). Em B, comparação entre MC16 e CROC–1 de *Homo sapiens* (acesso AC05292). O “subject” representa a seqüência de aminoácidos da CROC–1. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

Os fragmentos MC14,2 (321 pb) e MC15 (390 pb), correspondem ao cDNA nº 14 e 15 da Figura 5. Esses fragmentos apresentaram CEs de: MC14,2 (0,13 para MG, 1,56 para MC, 1,2 para MM e 1,1 para EM) e MC15 (0,8 para MG, 1,7 para MC, 1,2 para MM e 1,0 para EM). A comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos desses fragmentos com seqüências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma seqüência conhecida até o momento (Tabela 5).

3.4.2.3. Análise da seqüência do cDNA isolado de MC com os *primers* T₁₂VG – OPJ08

O fragmento MC6 (490 pb) corresponde ao cDNA nº 8 da Figura 6. Esse fragmento teve CEs de 0,9 para MG, 1,4 para MC, 1,17 para MM e 1,9 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC6 com seqüências disponíveis em

bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência descrita até o momento (Tabela 5).

3.4.2.4. Análise das sequências dos cDNAs isolados de MC com os *primers* T₁₂VC – OPJ10

O fragmento MC7 (650 pb) corresponde ao cDNA nº 14 da Figura 7. Esse fragmento teve CEs de 0,83 para MG, 1,73 para MC, 0,9 para MM e 0,55 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácido do fragmento MC7 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 50% de identidade e 62% de similaridade com a proteína glicosiltransferase de *Nicotiana tabacum* (acesso U32644, Horvath & Chua, 1996) (Tabela 5). A comparação da sequência de MC7 com a sequência da proteína glicosiltransferase de *Nicotiana tabacum* (476 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 17. O fragmento MC7 também apresentou similaridade com glicosiltransferases descritas para outros organismos: *Vigna mungo* (280 resíduos de aminoácidos, acesso AB12115) 47% de identidade e 63% de similaridade, *Manihot esculenta* (241 resíduos de aminoácidos, acesso X77460) 45% de identidade e 60% de similaridade; tomate (466 resíduos de aminoácidos, acesso X85138) 44% de identidade e 63% de similaridade; *Scutellaria baicalensis* (476 resíduos de aminoácidos, acesso AB31274) 44% de identidade e 60% de similaridade; *Phaseolus lunatus* (459 resíduos de aminoácidos, acesso AF11972) 42% de identidade e 57% de similaridade; *Arabidopsis thaliana* (481 resíduos de aminoácidos, acesso AC23628) 40% de identidade e 62% de similaridade; *Solanum berthaultii* (262 resíduos de aminoácidos, acesso AC24174) 40% de identidade e 60% de similaridade e *Oryza sativa* (497 resíduos de aminoácidos, acesso AP02843) 38% de identidade e 57% de similaridade.

```

MC7   : 4   PEGFKERTKERGLVIWGWAQQLLILSHPSVGAFMSHCGWNSTLESVTLGVPILAWPLHAE 183
          PEGF+ERTKE+GL+I GWAPQ+LIL H SVGAF++HCGWNSTLE V+ GVP++ WP+ AE
Sbjct: 325 PEGFEERTKEKGLIIRGWAPQVLILDHESVGAFVTHCGWNSTLEGVSGGVPMVTPVFAE 384

MC7   : 184 QHFNSKLVAEL---GVGVQICQHRDGIPDEGKXXXXXXXXXXNNKRGE---MRRSAEKVK 345
          Q FN KLV E+   G GV   Q +   + K                               EE   R A+ K
Sbjct: 385 QFFNEKLVTFLKTGAGVGSIQWKRSAEGVKREAIKAIKRVMVSEEADGFRNRAKAYK 444

MC7   : 346 ELARNTFQDGGG 381
          E+AR   ++GGG
Sbjct: 445 EMARKAIEEGG 456

```

Figura 17: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MC7 e a sequência de aminoácidos da glicosiltransferase descrita para *Nicotiana tabacum* (acesso U32644). O “sbjct” representa a sequência de aminoácidos da proteína glicosiltransferase. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

A glicosiltransferase age na glicosilação de compostos flavonóides e outros compostos fenólicos. A possível função dos flavonóides e outros compostos fenólicos e seus conjugados seria em resposta de defesa (Horvath & Chua, 1996). A glicosiltransferase responde não só a ácido salicílico (SA), mas também a auxina, jasmonato e peróxido de hidrogênio (Horvath & Chua, 1996). Através de *display* diferencial de mRNA, Horvath & Chua (1996), isolaram genes induzidos, após tratamento com SA, em tabaco. O acúmulo de SA em algumas plantas é um evento característico de defesa. Assim, a presença da glicosiltransferase no megagametófito pode estar relacionada com respostas de defesa para proteção da semente contra ataques de predadores. Duas sequências de genes induzidos em tabaco na presença de SA foram relatadas (Horvath & Chua, 1996). A dedução da sequência de aminoácido desses genes (denominados de *IS5a* e *IS10a*) mostrou similaridade com UDP-glicose e flavonóide glicosiltransferase (Horvath & Chua, 1996).

Segundo Horvath & Chua (1996), a região entre os aminoácidos 264-461, é altamente conservada entre as glicosiltransferases de plantas (Horvath & Chua, 1996). Essa região é também similar a UDP-glucuronosiltransferase de mamíferos. É essa região que parece ser o sítio catalítico desta enzima (Horvath & Chua, 1996). A análise através de *Southern blot* revelou que *IS5a* e *IS10a* fazem parte de uma pequena família no genoma do tabaco (Horvath & Chua, 1996).

O fragmento MC14,3 (428 pb) corresponde ao cDNA nº 21 da Figura 7. O fragmento MC14,3 teve CEs de 1,17 para MG, 1,82 para MC, 0,54 para MM e 0,47 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MC14,3 com

seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 27% de identidade e 49% de similaridade com uma oligopeptidase de *Arabidopsis thaliana* (acesso AB26639, artigo não publicado) (Tabela 5). A comparação da seqüência de MC14 com a seqüência da oligopeptidase (723 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 18. Ainda não se conhece a função dessa oligopeptidase.

```
MC14,3 260 YGHCKQH LAISADQGFRFGVS*RENNDWAC--LPAMILKSLPLHKDDLTF--HHSAGGA 93
      +GH  QH+   D+G   G+   N +W   LP+   +++   H+D L++   H+   G
Sbjct: 496 FGHALQHMLTKQDEGLVAGI---RNIEWDAVELPSQFMENWCYHRDTLMSIAKHYETGET 552

MC14,3 92  IPNK 81
      +P +
Sbjct: 553 LPEE 556
```

Figura 18: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC14 e a seqüência de aminoácidos da proteína oligopeptidase descrita para *Arabidopsis thaliana* (acesso AB26639). O “sbjct” representa a seqüência de aminoácidos da oligopeptidase. As cruces mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

O fragmento MC15,2 (421 pb) corresponde ao cDNA nº 22 da Figura 7. Esse fragmento teve CEs de 1,26 para MG, 1,95 para MC, 0,48 para MM e 0,31 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC15,2 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 56% de identidade e 77% de similaridade com uma citocinina oxidase de *Arabidopsis thaliana* (acesso AC02510, artigo não publicado) (Tabela 5). A comparação da seqüência deduzida de aminoácido de MC15,2 com a seqüência da citocinina oxidase de *Arabidopsis thaliana* (54 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 19.

```
MC15,2: 13  EWKXHFGRHWHQFLQRKITYDPQAMLAPGHRIFARSI 123
      EW+ HFG W +F++RK YDP A+LAPGHRIF +++
Sbjct: 465 EWRSHFGDKWGEFVRRKSRYPDLAILAPGHRIFQKAV 51
```

Figura 19: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC15,2 e a seqüência de aminoácidos da citocinina oxidase de *Arabidopsis thaliana* (acesso AC02510). O “sbjct” representa a seqüência de aminoácidos da citocinina oxidase. As cruces mostram similaridade entre os aminoácidos.

A citocinina (CK) regula os processos de desenvolvimento e crescimento da planta. Alguns desses processos são: ativação da divisão celular, estimulação do crescimento e inibição do crescimento de raiz (Benková *et al.*, 1999). Segundo Bilyeu *et al.* (2001) em

muitos tecidos de plantas a degradação da citocinina oxidase parece ser o principal meio de inativação da citocinina. Assim, a citocinina oxidase no megagametófito pode estar envolvida no processo de degradação da citocinina e conseqüentemente diminuição da divisão celular que começa no estágio cotiledonar de desenvolvimento.

O fragmento MC16,2 (351 pb) corresponde ao cDNA nº 23 da Figura 8. Esse fragmento teve CEs de 0,66 para MG, 1,84 para MC, 0,91 para MM e 0,6 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MC16 com seqüências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma seqüência descrita até o momento (Tabela 5).

3.4.3. Análise dos fragmentos isolados de MM

Um total de 15 cDNAs isolados de MM foram clonados e seqüenciados. Alguns desses cDNAs apresentaram seqüências repetidas. Os cDNAs selecionados foram isolados de MM com os *primers*: T₁₂VG – OPJ01 (3 cDNAs), T₁₂VC – OPJ08 (2 cDNAs), T₁₂VG – OPJ08 (1 cDNA), T₁₂VC – OPJ10 (7 cDNAs) e T₁₂VG – OPJ10 (2 cDNAs). As seqüências obtidas foram comparadas em bancos de dados. Das sete seqüências obtidas (não repetidas), 6 apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados. Os fragmentos que apresentaram ou não similaridades são mostrados na Tabela 5.

3.4.3.1. Análise das seqüências dos fragmentos isolados de MM com os *primers* T₁₂VG – OPJ01

O fragmento MM9 (411 pb) corresponde ao cDNA nº 9 da Figura 5. Esse fragmento teve CEs de 0,0 para MG, 1,6 para MC, 1,36 para MM e 1,1 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MM9 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 55% de identidade e 73% de similaridade com uma fosfotransferase de *Arabidopsis thaliana* (acesso AC02387, artigo submetido) (Tabela 5). A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos desse fragmento com a seqüência de aminoácidos da fosfotransferase de *Arabidopsis thaliana* (212 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 20.

O fragmento MM9 também apresentou similaridade com fosfotransferases descritas para outros organismos: *Schizosaccharomyces pombe* (361 resíduos de aminoácidos, acesso Z99259) 46% de identidade e 63% de similaridade; *Streptomyces coelicolor* (182 resíduos de aminoácidos, acesso AL34355) 33% de identidade e 48% de similaridade e *Pyrococcus abyssi* (183 resíduos de aminoácidos, acesso AP00001) 30% de identidade e 50% de similaridade.

```
MM9 : 16 IKXEELLKPISSREEVPVCVHGTYLKLKLSIKKEGLKSMGRLHIHFATGLAKEGGVISGM 195
      ++ E+LLKPI S EE PVCVHGTY K+L+SI GLK M R+H+HF+ GL +G VISG+
Sbjct: 95 VESEKLLKPILSPEEAPVCVHGTYRKNLLESILASGLKRMNRMHVHFCGLPTDGEVISGV 154

MM9 : 196 RSSCEVVIHLVDVQKYLEDGKLKLYQSEN 276
      R + V+I L ++K LEDG+ Y S+N
Sbjct: 155 RRNVNVIIIFLHIKKALEDGIAFYISDN 181
```

Figura 20: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MM9 e a sequência de aminoácidos da fosfotransferase de *Arabidopsis thaliana* (acesso AC02387). O “sbjct” representa a sequência de aminoácidos da fosfotransferase de *Arabidopsis thaliana*. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

O fragmento MM11 (558 pb) corresponde ao cDNA nº 10 da Figura 4. Esse fragmento apresentou CEs de 0,45 para MG, 1,1 para MC, 1,35 para MM e 1,0 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MM11 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 85% de identidade e 95% de similaridade com uma proteína *phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase* de *Arabidopsis thaliana* (acesso AB01568, artigo em submissão) (Tabela 5). A comparação da sequência deduzida de aminoácidos desse fragmento com a sequência da *phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase* de *Arabidopsis thaliana* (169 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 21. O fragmento MM11 também apresentou similaridade com *phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase* descritas para: *Hordeum vulgare* (237 resíduos de aminoácidos, acesso A1238697) 89% de identidade e 97% de similaridade; *Sweet orange* e *Citrus sinensis* (167 resíduos de aminoácidos, acesso S33618 e X66377, respectivamente) 85% de identidade e 92% de similaridade; *Avena fatua* (116 resíduos de aminoácidos, acesso U20000) 80% de identidade e 92% de similaridade; *Mesembryanthemum crystallinum* (170 resíduos de aminoácidos, acesso AJ25951) 78% de

identidade e 90% de similaridade e *Lycopersicon esculentum* (169 resíduos de aminoácidos, acesso Y14762) 75% de identidade e 94% de similaridade.

```
MM11 : 4   GIKWNFTKFLVDKDGNIERYAPTTSPLKIEKDIKLLGV 123
          GIKWNF KFLVDKDGNV++R+APTTSPL IEKD+KKLLGV
Sbjct: 128 GIKWNFAKFLVDKDGNVVDRFAPTTSPLSIEKDVKKLLGV 167
```

Figura 21: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MM11 e a sequência de aminoácidos da proteína *phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase* de *Arabidopsis thaliana* (acesso AB01568). O “sbjct” representa a sequência de aminoácidos da *phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase*. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

A *phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase* (PHGPX) é encontrada em mamíferos (Sugimoto *et al.*, 1997). Genes homólogos ao gene que codifica a PHGPX em mamíferos foram isolados em tabaco e *Citrus* (Sugimoto *et al.*, 1997). A PHGPX em mamíferos catalisa a redução do hidroperóxido de fosfolipídios e protege as membranas de danos oxidativos (Sugimoto *et al.*, 1997). A PHGPX de mamíferos é uma selenoenzima, onde o sítio ativo é uma selenocisteína (SeCys) codificado pelo códon de terminação UGA (Esworthy *et al.*, 1994; Pushpa-Rekha *et al.*, 1995). Em células de plantas a PHGPX seria componente de um sistema oxidativo (Sugimoto *et al.*, 1997). O Cys-44 de espinafre, o Cys-43 de tabaco e o Cys-41 de *Citrus* correspondem ao SeCys da PHGPXs de mamíferos (Esworthy *et al.*, 1994). Em plantas, o Cys é codificado por UGU (Sugimoto *et al.*, 1997). Sugimoto *et al.* (1997), sugere que o Cys de espinafre representa o resíduo catalítico da PHGPX.

A PHGPX pode ter a função de proteger o megagametófito de danos oxidativos. A ativação de antioxidantes está associada com a tolerância da semente a dissecação (Bailly *et al.*, 2001). A detecção do transcrito MM11, que apresentou similaridade com a PHGPX, em maior quantidade em MC, MM e EM e em menor quantidade em MG pode estar associada com o processo de dissecação da semente.

O fragmento MM17 (496 pb) corresponde ao cDNA nº 12 da Figura 4. O fragmento MM17 foi isolado de MM e teve CEs de 0,3 para MG, 0,86 para MC, 1,41 para MM e 1,7 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácido do fragmento MM17 com sequências disponíveis em bancos de dados, não revelou similaridade com nenhuma sequência descrita até o momento (Tabela 5).

3.4.3.2. Análise da sequência do fragmento isolado de MM com os *Primers* T₁₂VC – OPJ08

O fragmento MM8 corresponde ao cDNA n° 19 da Figura 6. A sequência do fragmento possui 472 pb. O fragmento teve CEs de: 0,28 para MG, 0,69 para MC, 1,67 para MM e 1,34 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácido do fragmento MM8 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 77% de identidade e 85% de similaridade com a proteína álcool desidrogenase classe III de *Arabidopsis thaliana* (acesso U63931, artigo em submissão), Tabela 5. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos desse fragmento com a sequência da proteína álcool desidrogenase classe III de *Arabidopsis thaliana* (379 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 22.

```
MM6,8,7: 2   IPWLVEKYMKEIKVDEYITHNLTLDQINEAFHLMHGGNCLRVVL 136
            +PWLVEKYM KEIKVDEYITHNLTL +IN+AF L+H G CLR VL
Sbjct:      331 VPWLVEKYMNKEIKVDEYITHNLTLGEINKAFDLLHEGTCLRCVL 375
```

Figura 22: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MM8 e a sequência de aminoácidos da proteína álcool desidrogenase classe III de *Arabidopsis thaliana* (acesso U63931). O “subject” representa a sequência de aminoácidos da proteína álcool desidrogenase classe III. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

A álcool desidrogenase classe III (ADH) faz parte de uma família de álcool desidrogenases, onde as proteínas são formadas através de cadeias de tamanho médio, são dimericas e contém zinco (Fliegmann & Sandermann Jr., 1997). Esta família tem seis classes, as quais diferem na especificidade de substrato, distribuição no tecido e espécime evolucionária (Fliegmann & Sandermann Jr., 1997). A ADH está envolvida na eliminação do formaldeído. A destoxificação do formaldeído é necessária a vida de todas as células (Estonius *et al.*, 1993; Hjelmqvist *et al.*, 1995). Este composto é formado no metabolismo normal, mas também pode ter origem exógena (Hjelmqvist *et al.*, 1995). O verdadeiro substrato para a enzima ADH mostrou ser o S – hidroximetilglutathione (HMGS), o qual é formado espontaneamente através da redução do GSH (glutathione) e formaldeído (Mason *et al.*, 1986; Uotila *et al.*, 1989).

Durante o processo de germinação da semente ocorre grande atividade metabólica nas células do megagametófito, e embrião maduro. A grande atividade metabólica que

ocorre no megagametófito maduro é para mobilização de nutrientes necessários ao desenvolvimento da plântula. Assim, grande quantidade de ADH é necessária em MM e EM, pois decorrente dessa grande atividade metabólica há alta formação de formaldeído. Como o formaldeído é tóxico para as células a ADH em MM e EM pode estar envolvida na eliminação do formaldeído e conseqüentemente destoxificação das células.

3.4.3.3. Análise das seqüências dos fragmentos isolados de MM com os *primers* T₁₂VC, T₁₂VG – OPJ10

O fragmento MM3 (374 pb) corresponde ao cDNA n° 27 da Figura 7. O fragmento MM3 foi isolado de MM com os *primers* T₁₂VC – OPJ10. O fragmento MM3 teve CEs de 1,0 para MG, 1,13 para MC, 1,15 para MM e 0,72 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MM3 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 35% de identidade e 54% de similaridade com um gypsy-type retrotransposon de *Oryza sativa* (acesso AP02484, artigo submetido) (Tabela 5). A comparação da seqüência de MM3 com a seqüência do retrotransposon (132 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 23.

```
MM3 : 7 EDPEPVSNDFWKLFEDGAHCKNGVGAGVVLVAPSGEQKVYSYRLTWSYMNNAEYEALCL 186
      ED + + W + FDG+ +G GAGVVL++P+GE+ Y + +S +N AEYEAL
Sbjct: 448 EDTPAENMEHWTMHFDGSKRLSGTGAGVVLISPTGERLSYVLWIHFSASHNVAEYEALLH 57

MM3 : 187 RLKKAELGLIKQLQIFSDFELICRQITNKCCAKQHLYLKAYRNKVWDLFESFTALSVQTIP 366
      L+ A LGIK+L + D +L+ Q+ + + + AYR +V L + F L + +
Sbjct: 58 GLRIAISLGIKRLIVRGDSQLVNVQVMKEWSCLDNMMAYRQEVKLEDKFDGLELSHVL 567

MM3 : 367 R 369
      R
Sbjct: 568 R 568
```

Figura 23: Comparação entre a seqüência de aminoácidos do fragmento MM3 e a seqüência de aminoácidos do gypsy-type retrotransposon de *Oryza sativa* (acesso AP02484). O “subject” representa a seqüência de aminoácidos do retrotransposon. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

O fragmento MM1 isolado de MM com os *primers* T₁₂VG– OPJ10 corresponde ao cDNA 9 da Figura 8. O fragmento MM1 teve CEs de: 0,0 para MG, 0,0 para MC, 3,6 para MM e 0,43 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento MM1 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 47% de identidade e

62% de similaridade com uma lectina que se liga a manose descrita para *Convolvulus arvensis* (artigo em submissão, acesso AF233284), Tabela 5. A comparação da sequência deduzida de aminoácido desse fragmento com a sequência da lectina (152 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 24.

```
MM      1      EYVTKIKGTVGTYAGNQVVTALTIITNVKQYGPYGIGGGTAFTSKG--DGKVVGFHGRNG 186
          EYVT I GT G Y N V+ ++ ITN+K YGPYG GT F+S+ ++VGF GR+G
Sbjct:   80    EYVTGISGTFGIYLDNNVLRSIKFITNLKAYGPYGPVNGTFFSSENVVGNEIVGFLGRSG 139

MM      1      187 DNLDQIGVF 213
          +D IG +
Sbjct:   140 YYVDAIGTY 148
```

Figura 24: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MM2 e a sequência de aminoácidos da lectina que se liga a manose descrita para *Convolvulus arvensis* (acesso AF233284). A lectina possui uma sequência de 152 resíduos de aminoácidos. O “subject” representa a sequência de aminoácidos da lectina. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

As lectinas são glicoproteínas que interagem reversivelmente e especificamente com carboídratos (Peumans & Van Damme, 1995). As lectinas tem sido encontradas em vírus, microrganismos, plantas e animais (Cavada et al.; 1998). Em plantas as lectinas tem sido bastante investigadas em legumes. Centenas destas proteínas tem sido isoladas e caracterizadas com relação às propriedades química, físicoquímica, estrutural e biológica. As proteínas que se ligam a carboídratos tem preferência exclusiva ou parcial por manose (Van Damme *et al.*, 2000). Essas proteínas estão divididas em três famílias: lectinas de legumes, lectinas–associadas a *jacalin* (*jacalin–related lectin*) e lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose (*monocot manose–binding*) (Van Damme *et al.*, 2000). As evidências experimentais sugerem que as lectinas de semente das leguminosas são proteínas de defesa que protegem a semente madura contra ataque de predadores como insetos e mamíferos (Gatehouse *et al.*, 1995). O transcrito MM1, que apresentou similaridade com a lectina, não foi detectado em MG e MC, foi detectado em pequena quantidade em EM (CE = 0,43) e em grande quantidade em MM (megagametófito da semente madura, CE = 3,6). Sendo assim, a lectina em MM pode estar relacionada com a proteção da semente de araucária contra ataques de predadores.

O fragmento MM11,1 isolado de MM com os *primers* T₁₂VC – OPJ10 corresponde ao cDNA de nº 34 da Figura 7. O fragmento teve CEs de: 0,89 para MG, 0,7 para MC, 2,2

para MM e 0,25 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MM11,1 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 34% de identidade e 43% de similaridade com uma proteína *homeobox* (HOX) descrita para *Danio rerio* (acesso AF71240, artigo em submissão), Tabela 5. A comparação da sequência de aminoácidos do fragmento com a sequência de aminoácidos da proteína HOX (315 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 25.

```
MM11,1      216 DNSYKPAAVRRKPNGSKHTE*KAPTIFPSGHRRTLTSQAVRAGGRNPQRNPTYTESGYR 37
              DN Y  A R K + SK +T  AP  P G R  TS  + G N ++  +  S Y
Sbjct:      156 DNDY---AARDKMHSKQSTPAPAPEQQPEGKERPETSSPSSSGNNEEK'T-SGANSKYE 211

MM11,1      36  LPK 28
              L K
Sbjct:      212 LNK 214
```

Figura 25: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento MM11,1 e a sequência de aminoácidos da proteína *homeobox* (HOX) descrita para *Danio rerio* (AF71240). O “subject” representa a sequência de aminoácidos da proteína *homeobox*. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

Os genes *homeobox* codificam fatores de transcrição que tem função importante em processos de desenvolvimento em animais e vegetais (Takumi *et al.*, 2000).

O primeiro cDNA correspondente a um gene *homeobox*, *HBK1*, em conífera foi isolado através de uma biblioteca de cDNA de embrião de *Picea abies* L. A sequência deste gene apresentou similaridade com os genes *homeobox* KNOX (*Knotted-Like Homeobox*) encontrados em diferentes angiospermas. Os autores sugeriram que a função do gene *HBK1* é controlar a diferenciação celular no meristema apical (Larsson *et al.*; 1998).

Devido a baixa similaridade e *e-value* não significativo do fragmento MM11,1 com a proteína HOX (Tabela 5), não se pode afirmar que esse fragmento represente um transcrito deste *homeobox* em araucária.

3.4.4. Análise dos cDNAs isolados de EM

Um total de 11 cDNAs isolados de EM foram clonados e sequenciados. Alguns cDNAs apresentaram sequências repetidas. Os cDNAs selecionados foram isolados de EM com os *primers*: T₁₂VG – OPJ01 (2 cDNAs), T₁₂VC – OPJ08 (2 cDNAs), T₁₂VG – OPJ08

(3 cDNAs) e T₁₂VG – OPJ10 (4 cDNAs). Das 9 seqüências obtidas (não repetidas), 4 apresentaram similaridade com seqüências em bancos de dados (Figuras 26-30).

3.4.4.1. Análise das seqüências dos cDNAs isolados de EM com os *primers* T₁₂VG – OPJ01

O fragmento EM11 (448 pb) corresponde ao cDNA nº 18 da Figura 4. O fragmento EM11 teve CEs de 0,0 para MG, 1,2 para MC, 0,94 para MM e 1,91 para EM. A comparação da seqüência deduzida de aminoácido do fragmento EM11 com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 60% de identidade e 65% de similaridade com a *thiamin biosynthetic enzyme* descrita para *Glycine max* (acesso AB3491, artigo em submissão), Tabela 5. A comparação da seqüência deduzida de aminoácido do fragmento EM11 com a seqüência da proteína *thiamin biosynthetic enzyme* (349 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 26.

```
EM11 : 1   PGXIVTGMEVAEIDGAPRMGPTFGAMLVSGQXXXXXXXXXXXXPNALDGSLNVQ-QLTLA 177
          PG IVTGMEVAEIDGAPRMGPTFGAM++SGQ                      PNALD  NV  +L LA
Sbjct: 280 PGMIVTGMEVAEIDGAPRMGPTFGAMMISGQKAAHLALRSLGLPNALDSVGNVHPELVIA 339

EM11 : 178 SAEDENTASA 27
          +AE      A A
Sbjct: 340 AAESAELIADA 349
```

Figura 26: Comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento EM11, e a seqüência de aminoácidos da *thiamin biosynthetic enzyme* descrita para *Glycine max* (acesso AB3491). O “subject” representa a seqüência de aminoácidos da *thiamin biosynthetic enzyme*. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

A tiamina (vitamina B1) é um constituinte essencial das células (Belanger *et al.*, 1995), e é um cofator essencial requerido para atividade de várias enzimas associadas com a maioria dos processos metabólicos como: ciclo de krebs, piruvato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase, via da pentose fosfato, respiração anaeróbica e biosíntese de pigmentos (Wilk *et al.*, 1997; Belanger *et al.*, 1995). Plantas mutantes de *Nicotiana sylvestris* deficientes em tiamina não produzem clorofila a e b e carotenóides (McHale *et al.*, 1988). A síntese de β -caroteno ocorre através de via metabólica envolvendo a conversão do piruvato para acetil-CoA através do piruvato desidrogenase presente no

plastídio, sendo esse processo dependente de tiamina (Schulze & Schultz, 1987). As mudanças na pigmentação, degradação da clorofila e aumento na síntese de carotenóides, são características de processo de maturação em frutos climatéricos e não climatéricos (Goldschmidt, 1980). Em frutos cítricos o processo de maturação passa por mudanças na pigmentação, a qual é aumentada através de etileno exógeno (Wilk *et al.*, 1997). O gene *c-thil* foi identificado como gene induzido através de etileno em casca de frutos cítricos (Wilk *et al.*, 1997). Foi observado que o mRNA correspondente ao *c-thil* aumenta gradualmente na casca durante a maturação natural do fruto e em resposta ao etileno (Wilk *et al.*, 1997). O *c-thl* é homólogo a genes que codificam uma enzima envolvida na biosíntese de tiamina em leveduras e plantas (Wilk *et al.*, 1997). O *c-thl* é regulado durante o desenvolvimento de frutos cítricos (Wilk *et al.*, 1997). Assim, os autores sugerem que a tiamina está envolvida na maturação de frutos (Wilk *et al.*, 1997).

Em grãos de cereais a tiamina encontra-se concentrada no embrião (Sherwood *et al.*, 1941). Através de *Northern blot* foi encontrado alto nível de transcritos *thil* em milho, durante o desenvolvimento do embrião (Belanger *et al.*, 1995). Assim sendo, a *thiamin biosynthetic enzyme* também pode estar envolvida na biosíntese da tiamina no embrião maduro de araucária.

O fragmento EM3 (460 pb) corresponde ao cDNA nº 14 da Figura 4. Esse fragmento teve CEs de 0,0 para MG, 1,0 para MC, 0,87 para MM e 2,11 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácido do fragmento EM3 com sequências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência descrita até o momento (Tabela 5).

3.4.4.2. Análise das sequências dos cDNAs isolados de EM com os primers T₁₂VC – OPJ08

O fragmento EM1 (572 pb) corresponde ao cDNA nº 28 da Figura 5. Esse fragmento teve CEs de 0,3 para MG, 0,45 para MC, 0,95 para MM e 2,23 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM1 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 72% de identidade e 92% de similaridade com o fator de transcrição-II pertencente à família bZIP (*basic leucine zipper*) que se liga ao

promotor do gene *Dc3* de *Helianthus annuus* (acesso AF01454, Kim *et al.*, 1997), Tabela 5. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos de EM1 com a sequência de aminoácidos da *basic leucine zipper* (174 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 27.

```

EM1:      4  TVERRQKRMKNRESAARSARKQAYTNELENEVMQLKEENERLKKQQFLEKLLPSIPPP 183
           TVERRQKRMKNRESAARSARKQAYT+ELEN+V +L+EENERL++++ +EK++P +PPP
Sbjct:   11  TVERRQKRMKNRESAARSARKQAYTHELENKVSRLLEEENERLRREKEVEKVIPWVPPP 160

EM1   : 184 QPKHTLRRTNSASF 225
           +PK+ LRRT+SA F
Sbjct: 161 KPKYQLRRTSSAPF 174

```

Figura 27: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM1, e a sequência de aminoácidos da *basic leucine zipper* de *Helianthus annuus* (acesso AF01454) O “subject” representa a sequência de aminoácidos da *basic leucine zipper*. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

O fragmento EM1 também apresentou similaridade com fator de transcrição pertencente à família das proteínas bZIP descrita para outros organismos: *Arabidopsis thaliana* (297 resíduos de aminoácidos, acesso AC04261) com 77% de identidade e 90% de similaridade, *Vitis vinifera* (447 resíduos de aminoácidos, acesso AJ237992) com 78% de identidade e 90% de similaridade, *Oryza sativa* (318 resíduos de aminoácidos, acesso AB23288) com 58% de identidade e 67% de similaridade e *Petroselinum crispum* (41 resíduos de aminoácido, acesso AC07212) com 56% de identidade e 71% de similaridade.

O fragmento EM1 também apresentou similaridade para o fator de transcrição G-box de *Arabidopsis thaliana* (Choi *et al.*, 2000, acesso AB0673). O fator de transcrição G-box de *Arabidopsis thaliana* possui um tamanho de 315 resíduos de aminoácidos. O fragmento EM1 apresentou 50% de identidade com o G-box e 61% de similaridade. A comparação do fragmento EM1 com o G-box é mostrada na Figura 28.

```

EM1   : 13  RRQKRMIKNRESAARSARKQAYTNELENEVMQLKEENERLKK-----QQFLLEKL 162
          +RQ+RMIKNRESAARS RKQAY  ELE      +L+EENE L K          Q+ +E +
Sbjct: 233  QRQRRMIKNRESAARSRRKQAYQVELEALAAKLEENELLSKEIEDKRKERYQKLMEFV 292

EM1   : 163  LPSI--PPPQPKHTLRRRTNS 216
          +P +  P  QP   LRR  S
Sbjct: 293  IPVVEKPKQQPPRFLRRIRS 312

```

Figura 28: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM1, e a sequência de aminoácidos do fator de transcrição do tipo G - box de *Arabidopsis thaliana* (acesso AB0673). O “subject” representa a sequência de aminoácidos do fator de transcrição do tipo G - box. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de *gaps* para maximizar a identidade.

A *Dc3* é uma classe de gene *lea* que é abundantemente expresso durante a embriogênese somática e zigótica. A expressão do *Dc3* é embrião-específico, mas pode ser induzido através de estresse hídrico ou na presença de ácido abscísico, tanto em semente quanto em tecido vegetativo (Kim *et al.*, 1997). Os elementos chaves regulatórios para a expressão de *Dc3* embrião-específico, fica na região próxima ao promotor (*PPR*-117 para +26) (Kim *et al.*, 1997). As regiões básicas das proteínas bZIPs interagem com o G/ABRE (elemento G-box que responde ao ácido abscísico) (Choi *et al.*, 2000). Os DPBFs interagem não só com o G/ABRE, mas também com o C/ABRES (elemento CGCGTG-containing que responde ao ácido abscísico) (Choi *et al.*, 2000). Nove clones foram isolados de uma biblioteca de cDNA de girassol, os quais codificam proteínas (elementos cis-regulatórios), que se ligam especificamente ao promotor *Dc3* (Kim *et al.*, 1997). A análise destes clones mostrou que eles são derivados de três espécies de mRNA diferentes que codificam duas proteínas básicas zipper de leucina (Kim *et al.*, 1997). As regiões básicas dessas proteínas são DPBF-1 e 2 (fator 1 e 2 que se ligam ao promotor *Dc3*) (Kim *et al.*, 1997). As regiões básicas dessas proteínas são similares ao fator de transcrição G-box de planta (GBF-4), no entanto, essas regiões DPBF-1 e 2 diferem significativamente de outros fatores de transcrição (Kim *et al.*, 1997).

A maturação da semente é caracterizada pelo processo de dissecação. As propriedades físico-química das proteínas LEA sugerem, que elas podem estar envolvidas na tolerância da semente a dissecação (Vicent *et al.*, 2000). As proteínas LEA são altamente hidrofílicas. Assim sendo, o fator 2 que se liga ao promotor *DC3* provavelmente tem função na regulação da transcrição do gene *Dc3*.

O fragmento EM5 (416 pb) corresponde ao cDNA nº 31 da Figura 5. Esse fragmento teve CEs de 0,4 para MG, 0,55 para MC, 1,1 para MM e 2,0 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM5 com sequências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência conhecida até o momento (Tabela 5).

3.4.4.3. Análise das sequências dos cDNAs isolados de EM com os primers T₁₂VG – OPJ08

Os fragmentos EM9 (417 pb) e EM10 (448 pb) correspondem aos cDNAs de nº32 e 33 da Figura 6. Os fragmentos tiveram CEs de: EM9 (0,49 para MG, 0,56 para MC, 0,72 para MM e 2,22 para EM) e EM10 (0,53 para MG, 0,42 para MC, 0,72 para MM e 2,33 para EM). A comparação das sequências deduzida de aminoácidos dos fragmentos EM9 e EM10 com sequências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência conhecida até o momento (Tabela 5).

3.4.4.4. Análise das sequências dos cDNAs isolados de EM com os primers T₁₂VG – OPJ10

O fragmento EM6 (530 pb) corresponde ao cDNA de nº 16 da Figura 8. O fragmento teve CEs de: 0,25 para MG, 0,71 para MC, 0,94 para MM e 2,1 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 40% de identidade e 51% de similaridade com uma RNA-binding de *Arabidopsis thaliana* (acesso AAG2644.1, artigo submetido), Tabela 5. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM6 com a sequência de aminoácidos da RNA-binding (51 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 29. A função da RNA-binding ainda não é conhecida.

```

EM6   : 73  TKTDSYKKGKFGKSMHSTKRNNKGVSS---KRSGGSIADKILSQKRKGSAGATRANKKRRK 243
          +K+   KK  + KS   TK   +G SS   K+SG + A K  SQKR  A A +A   K
Sbjct: 49  SKSGDDKKTTPYQKSSAQTKMRPRGSSSNDNKKSGNNSASKERSQKRPAVA-ARKAKANAK 467

EM6   : 244  GS 249
          GS
Sbjct: 468  GS 469

```

Figura 29: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM6 e a sequência de aminoácidos da RNA-binding de *Arabidopsis thaliana* (acesso AAG2644.1). O “subject” representa a sequência de aminoácidos da RNA-binding. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos. O alinhamento foi feito através da introdução de gaps para maximizar a identidade.

O fragmento EM8 (453 pb) corresponde ao cDNA nº 18 da Figura 8. O fragmento teve CEs de 0,1 para MG, 0,84 para MC, 0,99 para MM e 2,1 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM8 com sequências disponíveis em bancos de dados apresentou 50% de identidade e 73% de similaridade com uma *putative leucine-rich-repeat protein* de *Arabidopsis thaliana* (acesso AB28611, submissão direta), Tabela 5. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM8 com a sequência de aminoácidos da *putative leucine-rich-repeat protein* de *Arabidopsis thaliana* (382 resíduos de aminoácidos) é mostrada na Figura 30.

```

EM8   : 4    PEDIGNLMNLEELNISSNFNAFVALPESIGGLCSLRELDLSYNQISALPDSFVGLLENLRH 183
          PED+ NL+NL+ LN+S NF      LP S+G L SL ELD+SYN I+ LPDS   L   ++
Sbjct: 212 PEDLENLVNLQVLNVSNFQHLTTLPYSVGLLISLVELDVSNGITVLPDSLGLRRIQK 271

EM8   : 184 LKVDGNPLVVPPLKVVEIGVEAVREFMAQRL 276
          L V+GNPL+ PP +VVE G+EA++++M++++
Sbjct: 272 LSVEGNPLISPPFEVVEQGLEALKQYMSEKM 32

```

Figura 31: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento EM8, e a sequência de aminoácidos da *putative leucine-rich-repeat protein* de *Arabidopsis thaliana* (acesso AB28611). O “subject” representa a sequência de aminoácidos da *putative leucine-rich-repeat protein*. As cruzes mostram similaridade entre os aminoácidos.

O fragmento EM5,2 (465 pb) corresponde ao cDNA nº 15 da Figura 8. Esse fragmento teve CEs de 0,3 para MG, 0,66 para MC, 1,19 para MM e 2,12 para EM. A comparação da sequência deduzida de aminoácido do fragmento EM5,2 com sequências disponíveis em bancos de dados não revelou similaridade com nenhuma sequência conhecida até o momento.

Tabela 5: Características dos clones de cDNAs identificados através de *display* diferencial de mRNA

Clones de cDNA	Primers ancoradores e arbitrários	Tamanho (bp)	Expressão (amostras)	Coefficiente de Expressão (CE)	Similaridade (número de acesso)	Porcentagem de similaridade	Score (bits) e-value
MG1	T ₁₂ VC-OPJ01	817	MG	1,87	Homeodominio zipper de leucina de <i>Glycine max</i> , (AF184278)	45%	38; 0,19
MG13	T ₁₂ VC-OPJ01	356	MG	1,2	Sem similaridade	-	-
MG1.2	T ₁₂ VC-OPJ10	597	MG	1,72	Transposon MuDR de <i>Zea mays</i> , (AC68624)	69%	40; 0,23
MG6	T ₁₂ VC-OPJ10	598	MG e MC	1,3 e 1,5	early B-cell factor de <i>Gallus gallus</i> , (AJ238322)	63%	31; 8,7
MG7	T ₁₂ VC-OPJ10	421	MG e MC	1,3 e 1,4	LP3 (Proteína induzida através de estresse hídrico) de <i>Pinus taeda</i> , (U67135)	56%	78,4; 4e ⁻¹⁴
MG8	T ₁₂ VC-OPJ10	449	MG e MC	1,4 e 1,3	Sem similaridade	-	-
MG9	T ₁₂ VC-OPJ10	412	MG e MC	1,3 e 1,4	Poliproteína de <i>Oryza sativa</i> , (AAK13122.1)	60%	72; 4e ⁻¹²
MG1.3	T ₁₂ VG-OPJ10	541	MG	1,5	Histona H2B de <i>Zea mays</i> , (X69960)	93%	368; 2e ⁻³⁴
MG2.2	T ₁₂ VG-OPJ10	420	MG	3,8	Sem similaridade	-	-
MG4	T ₁₂ VG-OPJ10	258	MG	3,3	Sem similaridade	-	-
MC14	T ₁₂ VG-OPJ01	442	MC	2,0	Sem similaridade	-	-
MC13	T ₁₂ VC-OPJ08	322	MC	1,8	Gluconoquinase de <i>Oryza sativa</i> , (P3928)	75%	164; 7e ⁻¹³
MC14.2	T ₁₂ VC-OPJ08	321	MC	1,6	Sem similaridade	-	-
MC15	T ₁₂ VC-OPJ08	39	MC	1,7	Sem similaridade	-	-
MC16	T ₁₂ VC-OPJ08	257	MC	1,7	CROC-1 de <i>Picea mariana</i> , (AF5129), Perry & Bousquet, 1998	86%	133; 7e ⁻⁸
MC6	T ₁₂ VG-OPJ08	490	MC e MM	1,1 e 1,2	Sem similaridade	-	-
MC7	T ₁₂ VC-OPJ10	650	MC	1,7	Glicosiltransferase de <i>Nicotiniana tabacum</i> , (U32644), Horvath & Chua, 1996	62%	318; 7e ⁻²⁹
MC14.3	T ₁₂ VC-OPJ10	428	MC	1,8	Oligopeptidase de <i>Arabidopsis thaliana</i> , (AB26639)	49%	34; 1.2
MC15.2	T ₁₂ VC-OPJ10	421	MC	1,9	Citoquinina oxidase de <i>Arabidopsis thaliana</i> , (AC02510)	77%	123; 3e ⁻⁶
MC16.2	T ₁₂ VC-OPJ10	351	MC	1,8	Sem similaridade	-	-
MM9	T ₁₂ VG-OPJ01	411	MC e MM	1,6 e 1,4	Fosfotransferase de <i>Arabidopsis thaliana</i> , (AC02387)	73%	254; 1e ⁻²¹
MM11	T ₁₂ VG-OPJ01	558	MM	1,4	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase de <i>Arabidopsis thaliana</i> , (AC02387)	95%	190; 6e ⁻¹⁴
MM17	T ₁₂ VG-OPJ01	496	MM e EM	1,8 e 1,7	Sem similaridade	-	-

MM8	T ₁₂ VC-OPJ08	472	MM	1,7	Álcool desidrogenase de classe III de <i>Arabidopsis thaliana</i> (U63931)	85%	76; 1e ⁻¹³
MM3	T ₁₂ VC-OPJ10	374	MC eMM	1,1 e 1,2	<i>Gypsy-type</i> retrotransposon de <i>Oryza sativa</i> , (AP02484)	54%	189; 4e ⁻¹⁴
MM11,1	T ₁₂ VC-OPJ10	250	MM	2,2	Proteína homeobox de <i>Danio rerio</i> , (AF71240)	43%	65; 63
MM1	T ₁₂ VG-OPJ10	376	MM	3,6	<i>Mannose-binding lectin</i> de <i>Convolvulus arvensis</i> , (AF233284)	62%	159; 1e ⁻¹⁰
EM3	T ₁₂ VG-OPJ01	460	EM	2,11	Sem similaridade	-	-
EM11	T ₁₂ VG-OPJ01	349	EM	1,9	<i>Thiamin biosynthetic enzyme</i> de <i>Glycine max</i> , (AB3491)	65%	191; 3e ⁻¹⁴
EM1	T ₁₂ VC-OPJ08	572	EM	2,2	Fator 2 que se liga ao promotor <i>DC3</i> de <i>Helianthus annuus</i> , (AF01454), Kim <i>et al.</i> , 1997	92%	284; 5e ⁻²⁵
EM5	T ₁₂ VC-OPJ08	416	EM	2,0	Sem similaridade	-	-
EM9	T ₁₂ VG-OPJ08	417	EM	2,2	Sem similaridade	-	-
EM10	T ₁₂ VG-OPJ08	448	EM	2,3	Sem similaridade	-	-
EM5.2	T ₁₂ VG-OPJ10	465	EM	2,1	Sem similaridade	-	-
EM6	T ₁₂ VG-OPJ10	53	EM	2,1	<i>RNA-binding</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , (AAG2644.1)	51%	74; 1,9
EM8	T ₁₂ VG-OPJ10	453	EM	2,1	<i>Leucine-rich-repeat</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AB28611)	73%	221; 1e ⁻¹⁷

A técnica de *display* diferencial de mRNA foi utilizada nesse trabalho para analisar a expressão diferencial de genes durante o desenvolvimento da semente de *A. angustifolia*. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada na literatura (Reidt *et al.*, 2000; Fujii *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999; Delseny *et al.*, 1993; Skriver & Mundy, 1990; Galau *et al.*, 1987; Dure, 1993; Liang *et al.*, 1992; Sager *et al.*, 1993; Watson & Mergulies, 1993; Zhang & Medina, 1993; Donohue *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1995; Hutchison *et al.*, 1999; Brosché & Strid, 1999; Kuno *et al.*, 2000). Através dessa técnica várias amostras de RNA foram comparadas simultaneamente e assim, vários cDNAs foram isolados dos diferentes estádios de desenvolvimento do megagametófito e embrião maduro. Setenta e nove por cento dos cDNAs isolados tiveram a expressão diferencial confirmada por *slot blot*.

É a primeira vez que uma grande quantidade de cDNAs expressos diferencialmente na semente de *Araucaria angustifolia* são isolados. Os cDNAs que apresentaram expressão diferencial mais acentuada foram clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas em bancos de dados. De um total de 36 seqüências obtidas 21 apresentaram similaridades com seqüências de bancos dados. Das 21 proteínas que apresentaram similaridades (Tabela 5), segundo descrição na literatura, 12 estão relacionadas com desenvolvimento da semente (HDZip, LP3, CROC-1, glicosiltransferase, citocinina oxidase, PHGPX, ADH, *Mannose-binding lectin*, HOX, *early B-cell factor* de *Gallus gallus*, *thiamin biosynthetic enzyme* e o fator 2 que se liga ao promotor DC3). Dessas proteínas 3 (HDZip, HOX e *early B-cell factor* de *Gallus gallus*) apresentaram *e-value* não significativo e baixa similaridade, podendo indicar que a similaridade observada pode ter sido ao acaso ou a região comparada é pouco conservada.

Um total de 15 seqüências dos cDNAs isolados não apresentaram similaridade com seqüências em bancos de dados. Essas seqüências são importantes para estudos futuros, pois podem representar transcritos, ainda não descritos, importantes para o desenvolvimento do megagametófito ou embrião. Assim, o isolamento da seqüência completa, por RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), e a caracterização desses genes é de fundamental importância.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailly, C.; Audigier, C.; Landonne, F.; Wangner, M.H.; Coste, F.; Corbineau, F.; Côme, D. (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J. of Experimental Botany* 52 (357), 701-708.
- Baima, S.; Possenti, M.; Matteucci, A.; Wisman, E.; Altamura, M.M.; Ruberti, I.; Morelli, G. (2001) The Arabidopsis ATHB-8 HD-ZIP protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.* 126, 643-655.
- Belanger, F.C.; Leustek, T.; Chu, B.; Kriz, A. (1995) Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. *Plant Mol. Biol.* 29, 809-821.
- Benková, E.; Witters, E.; Dongen, W.V.; Kolár, J.; Motyka, V.; Brzobohatý, B.; Onckelen, H.A.V.; Machácková, I. (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiol.* 121, 245-251.
- Bilyeu, K.D.; Cole, J.L.; Laskey, J.G.; Riekhof, R.W.; Esparza, T.J.; Krame, D.M.; Morris, R.O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* 125, 378-386.
- Brosché, M.; Strid, A. (1999) Cloning expression and molecular characterization of a small pea gene family regulated by low levels of ultraviolet B radiation and other stresses. *Plant Physiol.* 121, 479-487.
- Cavada, B.S.; Santos, C.F.; Grangeiro, T.B.; Nunues, E.P.; Sales, P.V.P.; Ramos, L.R.; Souza, F.A.M. de; Crisostomo, C.V.; Calvete, J.J. (1998) Purification and characterization of lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke. *Phytochem.* 49 (3), 675-680.

- Chang, S.; Puryear, J.D.; Dias, D.L.; Funkhouser, E.A.; Newton, R.J. Cairney, J. (1996) Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol. Plant* 97, 139-148.
- Chaubet, N.; Chaboute, M.E.; Philipps G.; Gigot, C. (1987) Histone genes in higher plants: Organization and expression. *Devel. Genet.* 8, 461-473.
- Chatthai, M.; Kaukinen, K.H.; Tranbarger, T.J.; Gupta, P.K.; Misra, S. (1997) The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: regulation by ABA, osmoticum and metal ion. *Plant Mol. Biol.* 34 (2), 243-254.
- Choi, H-in; Hong, J.-H.; Ha, J.-O.; Kang, J.-Y.; Kim, S.Y. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275 (3), 1723-1730.
- Delseny, M.P.; Gaubier, G.; Hull, G.; Saezunsquez, J.; Gallois, P.; Raynal, M.; Cooke, R.; Grellet, F. (1993) Nuclear genes expressed during seed desiccation: relationship with responses to stress. In: A. A. Barsa (ed). *Stress induced gene expression*. Harwood Academic Publishers.
- Dias, M.A.D.L. (1995) Analysis of water deficit responsive cDNA clones and characterization of the genomic clone of gene '*lp5*' of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Ph.D. Dissertation, 130pp. Texas A & M University. College station, TX.
- Dong, J.Z.; Dunstan, D.I. (1999) Clonig and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 39, 859-864.
- Donohue, P.J.; Alberts, G.F.; Hampton, B.S.; Winkles, J.A. (1994) A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J. Biol. Chem.* 269, 8606-8609.

- Dure, L. (1993) The lea proteins of higher plants. In: Verma D.P.S. (ed). **Controls of plant gene expression**. pp. 325. CRC press, Boca Raton, FL.
- Espindola, L.S.; Noin, M.; Corbineau, F.; Côme, D. (1994) Cellular and **metabolic** damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Science Res.* 4, 193-201.
- Estonius, M.; Danielsson, O.; Karlsson, C.; Persson, H.; Jornvall, H.; Hoog, J-O. (1993) Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 215, 497-503.
- Esworthy, R.S.; Doan, K. Doroshov, J.H.; Chu, F.F. (1994) Cloning and **sequencing** of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene* 144 (2), 317-318.
- Favre-Duchartre, M. (1958) Ginko, an oviparous plant. *Phytomorphology* 8, 377-390.
- Fliegmann, J.; Sandermann Jr., H. (1997) Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene of detoxification. *Plant Mol. Biol.* 34, 843-854.
- Flinn, B.S.; Roberts, D.R.; Webb, D.T.; Sutton, B.C.S. (1991) Storage **protein** changes during zygotic embryogenesis in interior spruce. *Tree Physiol.* 8, 71-81.
- Fujii, N.; Kamada, M.; Yamasaki, S.; Takahashi, H. (2000) Differential **accumulation** of Aux/IAA mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Mol. Biol.* 42 (5), 731-740.
- Galau, G.A.; Bijaisoradat, N.; Hughes, D.W. (1987) Accumulation **Kinetics** of cotton late embryogenesis abundant (LEA) mRNAs and storage protein mRNAs: Co-ordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. *Dev. Biol.* 124, 198-212.

- Gatehouse, A.M.R.; Powell, K.S.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.; Gatehouse, J.A. (1995) Lectins: biochemistry prespectives. A. Pusztai and S. Bardocz (eds). Taylor and Francis, London, pp. 35-57.
- Goldschmidt, E.E. (1980) Pigment changes associated with fruit maturation and their control. In: Thimann KV (ed) senescence in plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 207-217.
- Gill, R.T.; Valdes, J.J.; Bentley, W.E. (1999) Reverse transcription — PCR differential display analysis *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. Applied and environmental microbial. 65 (12), 5386-5393.
- Guerra, M.P.; Silveira, V.; Santos, A.L.W.; Astarita, L.V.; Nodari, R.O. (2000) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE. In S. Jain, P. Gupta e R. Newton (eds). Somatic embryogenesis in woody plants, V. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hakman, I. (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during development and somatic embryogenesis. Physiol. Plant 87, 148-159.
- Hakman, I.; Stabel, P.; Engstrom, P.; Eriksson, T. (1990) Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). Physiol. Plant. 80, 441-445.
- Hentschel C.C.; Birnstiel, M.L. (1981) The organization and expression of histone gene families. Cell 25, 301-313.
- Hjelmqvist, L.; Hackett, M.; Shafqat, J.; Danielsson, O.; Lida, J.; Hendrickson, R.C.; Michel, H.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Jörnvall, H. (1995) Multiplicity of N-terminal structures of medium-chain alcohol dehydrogenases. FEBS Lett. 367, 237-240.

- Horvath, D.M.; Chua, N.H. (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* 31, 1061-1072.
- Hutchison, K.W.; Singer, P.B.; McInnis, S.; Sala, C.D.; Greenwood, M.S. (1999) Expansins are conserved in conifer and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin. *Plant Physiol.* 120, 827-831.
- Jarvis, S.B.; Taylor, M.A.; MacLeod, M.R.; Davies, H.V. (1996) Cloning and characterization of the cDNA clones of three genes that are differentially expressed during dormancy breakage in the seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *J. Plant Physiol.* 147, 559-566.
- Johnson, R.R.; Cranston, J.H.; Chaverra, E.M.; Dyer, W.E. (1995) Characterization of cDNA clones for differentially expressed genes in embryos of dormant and nondormant *Avena fatua* L. caryopses. *Plant Mol. Biol.* 28, 113-122.
- Kim, S.Y.; Chung, H.-J.; Thomas, T.L. (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* 11 (6), 1237-1251.
- Kuno, N.; Muramatsu, T.; Hamazato, F.; Furuya, M. (2000) Identification by large-scale of phytochrome-regulated genes in etiolated seedlings of *Arabidopsis* using a fluorescent differential display technique. *Plant Physiol.* 122, 15-24.
- Larsson, A.S.; Svenson, M.; Liao, H.; Engstrom, P. (1998) A homeobox gene with potential developmental control function in the meristem of the conifer *Picea abies*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 15118-15122.

- Leal, I.; Misra, S. (1993) Molecular cloning and characterization of a legumin-like storage protein cDNA of Douglas fir seeds. *Plant Mol. Biol.* 21, 709-715.
- Lewis, M.L.; Miki, K.; Ueda, T. (2000) FePer 1, a gene encoding an evolutionarily conserved 1-Cys peroxiredoxin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), is expressed in a seed-specific manner and induced during seed germination. *Gene* 4 (246), 81-90.
- Liang, P.; Averboukh, L.; Keyomarsi, K.; Sager, R.; Padree, A.B. (1992) Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 52, 6966-6968.
- Liang, P.; Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 14 (5072), 967-971.
- Lima, A.R.; Capobianco, J.P.R. (1997) Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação, Instituto Socioambiental, Brasília, pp. 118 (Documentos do ISA nº 004).
- Longhi, S.J. (1993) Floresta ombrófila mista. Trabalho acadêmico de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, setor de ciências agrárias, Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Curitiba, pp. 61.
- Mason, R.P.; Sanders, J.K.M.; Crawford, A.; Hunter, B.K. (1986) Formaldehyde metabolism by *Escherichia coli*. Detection by *in vivo* ¹³C NMR spectroscopy of S-(hydroxymethyl) glutathione as a transient intracellular intermediate. *Biochem.* 25, 4504-4507.
- McHale, N.A.; Hanson, K.R.; Zelitch, I. (1988) A nuclear mutant in *Nicotiana sylvestris* causing a thiamine-reversible defect in synthesis of chloroplast pigments. *Plant Physiol.* 88, 930-935.

- Minami, M.; Huh, G.H.; Yang, P.; Iwabuchi, M. (1993) Coordinate gene expression of five subclass histones and the putative transcription factors, *HBP-1a* and *HBP-1b*, of histone genes in wheat. *Plant Mol. Biol.* 23, 429-434.
- Misra, S.; Green, M.J. (1991) Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination II. Crystalloid protein synthesis in the developing embryo and megagametophyte of White spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss.). *Plant Science* 78, 61-71.
- Newton, C.H.; Flinn, B.S.; Sutton, B.C.S. (1992) Vicilin-like seed storage proteins in the gymnosperm interior spruce (*Picea glauca/engelmannii*). *Plant Mol. Biol.* 20, 315-322.
- Owens, J.N.; Merris, S.J.; Misra, S. (1993) The ultrastructural, histochemical and biochemical development of the post-fertilization megagametophyte and the zygotic embryo of *Pseudotsuga menziessi* [mirb.] Franco. *Can. J. Forest Res.* 23, 816-827.
- Padmanabhan, V.; Dias, M.A.L.; Newton, R.J. (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Mol. Biol.* 35, 801-807.
- Perry, D. J.; Bousquet, J. (1998) Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: development characterization and analysis of linkage in black spruce. *Genetics* 149, 1089-1098.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109 (2), 347-352.
- Precott, A.; Martin, C. (1987) Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. *Plant Mol. Biol. Report* 4, 219-222.

- Pushpa-Rekha, T.R.; Burdsall, A.L.; Oleksa, L.M.; Chisolm, G.M.; Driscoll, R. (1995) phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem.* 10 (45), 26993-26999.
- Ratcliffe, O.J.; Riechmann, J.L.; Zhang, J.Z. (2000) *INTERFASCICULAR FIBERLESS1* is the same gene as *REVOLUTA*. *Plant Cell* 12, 315-317.
- Reidt, W.; Wohlfart, T.; Ellerstrom, M.; Czihal, A.; Tewes, A.; Ezcurra, I.; Rask, L.; Baumlein, H. (2000) Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the *FUS3* gene product. *Plant* 2 (5), 401-408.
- Rothofsky, M. L.; Lin, S. L. (1997) CROC-1 encodes a protein which mediates transcriptional activation of the human *FOS* promoter. *Gene* 195 (2), 141-149.
- Rudenko, G.N.; Walbot, V. (2001) Expression and post-transcription regulation of maize transposable element MuDR and its derivatives. *Plant Cell* 13, 553-570.
- Sager, R.; Anisowicz, A.; Neveu, N.; Liang, P. (1993) Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J.* 7, 964-970.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, New York.
- Sancho, E.; Vila, M. R.; Sanchez-Pulido, L.; Lozano, J. J.; Paciucci, R.; Nadal, M.; Fox, M.; Harvey, C.; Bercovich, B.; Loukili, N.; Ciechanover, A.; Lin, S. L.; Sanz, F.; Estivill, X.; Valencia, A.; Thomson, T. M. (1998) Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, *in vitro* differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol. Cell Biol.* 18, 576-589.

- Schulze-Siebert D.; Schultz, G. (1987) β -carotene synthesis in isolated spinach chloroplasts: its tight linkage to photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiol.* 84, 1233-1237.
- Sherwood, R.C.; Nordgren, R.; Andrews, J.S. (1941) Thiamin in the products of wheat milling and in bread. *Cereal Chem.* 18, 811-819.
- Skriver, K.; Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic and osmotic stress. *Plant Cell* 2, 503-512.
- Sugimoto, M.; Furui, S.; Suzuki, Y. (1997) Molecular cloning and characterization of cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (8), 1379-1381.
- Takumi, S.; Kosugi, T.; Murai, K.; Mori, N.; Nakamura, C. (2000) Molecular cloning of three homoeologous cDNA encoding orthologs of the maize KNOTTED1 homeobox protein from young spikes of hexaploid wheat. *Gene* 249, 171-181.
- Tong, S.; Porco, A.; Isturiz, T.; Conway, T. (1996) Cloning and molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* *gntR*, *gntK*, and *gntU* genes of *GntI*, the main system for gluconate metabolism. *J. of Bacteriologists* 178 (11), 3260-3269.
- Tranbarger, T.J.; Misra, S. (1996) Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotsain) from Douglas fir. *Gene* 172, 221-226.
- Uotila, L.; Koivusalo, M. (1989) Glutathione-dependent oxidoreductases: formaldehyde dehydrogenase. In: Dolphin, D.; Poulson, R.; Avramovic O (eds) *Coenzymes and cofactors*. Vol. III. Glutathione. John Wiley, New York, pp. 517-551.

- Van Damme, E.J.M.; Astoul, C.H.; Barre, A.; Rouge, P.; Peumans, W.J. (2000) Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae). *Eur. J. Biochem.* 267, 5067-5077.
- Vicent, C.M.; Hull, G.; Guilleminot, J.; Devic, M; Delseny, M. (2000) Differential expression of the *Arabidopsis* genes coding for Em-like proteins. *J. Experimental Botany* 51 (348), 1211-1220.
- Wang, A.Y.; Kao, M.H.; Yang, W.H.; Sayion, Y.; Liu, L.F.; Lee, P.D.; Su, J.C. (1999) Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant Cell Physiol.* 40 (8), 800-807.
- Watson, J.B.; Mergulies, J.E. (1993) Differential cDNA screenig strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. *Devel. Neurosci.* 15, 77-86.
- Wilk, D.J.; Goldschmidt, E.E.; Riov, J.; Sadka, A.; Holland, D. (1997) Induction of a *Citrus* gene highly homologous to plant and yeast *thi* genes involved in thiamine biosynthesis during natural and ethylene-induced fruit maturation. *Plant Mol. Biol.* 35, 661-666.
- Xiao, W.; Lin, S.L.; Broomfield, S.; Chow, L.B.; Wei, Y-F. (1998) The products of the yeast MMS2 and two human homologs (hMMS2 and CROC - 1) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family. *Nucl. Acids Res.* 26 (17), 3908-3914.
- Xu, N.; Johns, B.; Pullman, G.; Cairney, J. (1997) Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue: mass cloning and characterization of differentially expressed genes from loblolly pine embryos. *Plant Mol. Biol. Reporter* 15, 377-382.

- Zhang, L.; Medina, D.(1993) Gene expression screening for specific genes associated with mouse mammary tumor development. *Mol. Carcinog.* 8, 123-126.
- Zhong, R.; Ye, Z.H. (1999) *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucin zipper protein. *Plant Cell* 11, 2139-2152.
- Yang, P.; Taoka, K.; Nakayama, T.; Iwabuchi, M. (1995) Strutural and functional characterization of two wheat histone H2B promoters. *Plant Mol. Biol.* 28, 155-172.

**SÍNTESE E FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO
MEGAGAMETÓFITO DE *Araucaria angustifolia* DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE**

1. INTRODUÇÃO

A conífera nativa, *Araucaria angustifolia* ocupava inicialmente 40%, 31% e 25% da superfície do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente (Guerra *et al.*, 2000). Manchas esparsas eram encontradas em São Paulo, inteirando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro. A intensa exploração da araucária fez com que as reservas naturais diminuíssem de maneira drástica. Atualmente, a araucária está na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção.

As árvores de araucária atingem 20-50 m de altura e 1-2 m de diâmetro (Reitz *et al.*, 1978) sendo, que a madeira pode ser utilizada em construções, fabricação de móveis, laminados e outros. A resina, exudada da casca serve para fabricação de vernizes, terebentina e acetona. A semente, com 3-8 cm de comprimento, 1-2 cm de largura e 6,5-8,5 g de peso fresco, é utilizada na alimentação humana e de animais (Reitz *et al.*, 1978). A semente possui uma casca densa que envolve o megagametófito que é uma fonte importante de nutrientes para o embrião em desenvolvimento e plântula. A maior parte dos compostos de reserva são acumulados no megagametófito sendo que a deposição coincide com o desenvolvimento do embrião (Owens *et al.*, 1993; Favre-Duchartre, 1958).

Durante o desenvolvimento da semente, ocorrem vários eventos, incluindo principalmente, a síntese e deposição de proteínas de reserva em grandes quantidades. Apesar da síntese e deposição de proteínas durante o desenvolvimento da semente ter sido investigada por diversos autores (Krasowski & Owens, 1993; Hakman, 1993; Misra, 1994; Newton *et al.*, 1992; Leal & Misra, 1993; Tranbarger & Misra, 1996 e Jarvis *et al.*, 1996), pouco se sabe sobre a fosforilação de proteínas na semente.

Vários processos celulares são regulados através da fosforilação e desfosforilação de proteínas. Alguns desses processos inclui a divisão e diferenciação celular e transdução de sinal. Várias proteínas e enzimas são fosforiladas em plantas. Como exemplo podemos citar: ATPase, RNA polimerase, malato sintase, histona H1, ativadores de transcrição e outras (Trewavas & Gilroy, 1991). Muitas proteínas são fosforiladas através de caseína quinase tipo I (CKI), caseína quinase tipo II (CKII) e quinase glicogênio sintase 3, que compreendem as maiores proteínas serina/treonina quinases ativas em extratos celulares. A CKI está presente no núcleo, citoplasma, membrana, ribossomos e mitocôndrias (Hathaway

et al., 1983). A CKI fosforila um grande número de substratos diferentes. A caseína quinase tipo II está envolvida no controle da replicação e transcrição, processamento de RNA, transdução de sinais e metabolismo celular (Litchfield & Luscher, 1993). A CKII é uma holoenzima composta por duas subunidades catalíticas (α e α') e duas subunidades β regulatórias (Battistutta *et al.*, 2000b) que estabilizam a subunidade catalítica e determinam a sua especificidade aos substratos (Espunya & Matínez, 1997). A estrutura primária e quaternária da CKII é altamente conservada nos organismos (Wirkner *et al.*, 1992). Ela é considerada uma das principais proteínas quinases multifuncionais da célula (Lee *et al.*, 1999) com mais de 200 substratos conhecidos (Battistutta *et al.*, 2000).

Mizoguchi *et al.* (1993) observaram alta expressão do gene da subunidade α da CKII em folhas de *Arabidopsis thaliana*. Em cloroplastos de espinafre foi observada a fosforilação de ATP sintetases e ribonucleases *in vivo* e *in vitro* (Kanekatsu *et al.*, 1995; Kanekatsu & Hiroshi, 1997). O fator de transcrição *GBF1* pode ser fosforilado através da atividade da CKII (Klimczak *et al.*, 1992). A atividade de CKII na fosforilação do *GBF1* foi identificada através da utilização de GTP como doador de fosfato, baixa concentração de heparina, fosforilação de substratos ácidos (caseína e fosvitina) e ausência de fosforilação de substratos básicos (histonas). Em milho, foi observada a fosforilação do fator de transcrição *opaco 2* na semente em desenvolvimento (Ciceri *et al.*, 1997). O gene *RAB-17* que codifica uma proteína básica de milho rica em glicina foi encontrado altamente fosforilado *in vivo* e *in vitro* (Plana *et al.*, 1991).

Neste capítulo, fez-se a análise da fosforilação de proteínas no megagametófito de *A. angustifolia* durante o desenvolvimento da semente. Para isso, foi realizada extração de proteína total do megagametófito nos estádios MG, MC e MM. As proteínas foram fosforiladas *in vitro* e analisadas através de SDS-PAGE. Uma vez que CKII está presente numa vasta gama de eucariotos superiores, incluindo as plantas, foram feitos ensaios com o objetivo de se verificar a presença desta enzima em sementes de *A. angustifolia*. Para tanto, foram realizados ensaios com um inibidor de CKII (heparina) em concentrações que inibem especificamente esta quinase. Foram também realizados ensaios usando-se ATP e GTP como doadores de fosfato, para se distinguir caseína quinase tipo I e tipo II. Ensaios de quinase em gel foram feitos de forma a se retificar a massa molecular da CKII presente no megagametófito. Com o objetivo de analisar a expressão temporal de CKII durante o

desenvolvimento da semente, RNA total isolado de MG, MC, MM, EG, EC e EM foi transferido para membranas de nylon e hibridizados com as sondas de CKII SCEQAM1039G02.g e SCEQSD1077B01.g, isoladas de cana-de-açúcar.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Cones femininos de *Araucaria angustifolia* foram coletados em 2000 na localidade de Bom Retiro, Santa Catarina, Brasil. Os cones foram esterilizados com álcool e as sementes (pinhão) foram removidas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. As sementes foram coletadas nos 3 estádios de desenvolvimento do embrião: globular, cotiledonar e maduro.

2.2. Preparação de extrato

Os experimentos foram realizados com megagametófitos isolados de sementes contendo embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento: MG (megagametófito de semente contendo embrião globular), MC (megagametófito de semente contendo embrião cotiledonar) e MM (megagametófito de semente contendo embrião maduro). Para isto, as sementes foram dissecadas, os embriões descartados e os megagametófitos foram homogeneizados separadamente em almofariz contendo tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; NP-40 0,1%; DTT 1 mM), sendo 2 volumes de tampão por grama de tecido de megagametófito. Todo o procedimento foi realizado a 4°C. Após a homogeneização, as amostras foram colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas por 10 min, 4°C, 9.000 rpm em uma microcentrífuga refrigerada (Beckman). O sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf limpo e submetido à nova centrifugação nas condições especificadas acima. Após a centrifugação, as proteínas das diferentes amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976).

2.3. Análise das proteínas através de SDS-PAGE

Para análise das proteínas do megagametófito de *A. angustifolia*, os extratos das diferentes amostras (MG, MC e MM) foram precipitados com acetona gelada na proporção 1:10. As amostras foram incubadas no gelo por 2 h, e centrifugadas por 10 min, 4°C, 9000

rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em tampão de extração. A seguir, foi adicionado tampão da amostra 3 X concentrado (0,6 ml de tampão do gel de empacotamento - Tris-HCl 1M, pH 6,8; 0,9 ml de glicerol; 0,4 ml de SDS 10%; 0,1 ml de 2-mercaptoetanol; 30 µl de azul de bromofenol 1%), e as amostras foram aquecidas durante 5 min a 96°C. As proteínas foram analisadas através de eletroforese em gel de 10% de acrilamida contendo SDS (Laemmli, 1970). Como marcador de tamanho, foi utilizado o *Protein Ladder* (Gibco BRL). Após a eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie brilliant Blue R 250* (*Coomassie brilliant Blue R 250* 0,27%; metanol 54%; ácido acético 13,5%; água destilada q.s.p. 1 L) e descorado com uma solução contendo: 10% de etanol e 5% de ácido acético. As amostras dos diferentes estádios analisados foram comparadas para identificação de proteínas específicas de cada um dos estádios.

2.4. Fosforilação e eletroforese de proteínas endógenas

Para análise da fosforilação *in vitro* foram utilizados extratos diluídos das diferentes amostras. A diluição do extrato foi feita em tampão contendo: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM e DTT 1 mM, nas seguintes proporções: 1:10, 1:20, e 1:50. Como controle foram utilizados extratos não diluídos. Os extratos foram incubados com MgCl₂ 10 mM e [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol) por 30 min a 30°C. As amostras foram desnaturadas a 100°C por 3 min e submetidas à eletroforese em gel de 10% de poliacrilamida contendo SDS (Laemmli, 1970). A seguir, os géis foram colocados sobre uma folha de papel Whatman 3 MM e seco a vácuo. A fosforilação foi detectada através de exposição a filme de raio-X (Hyperfilm, Amersham Pharmacia).

2.5. Fosforilação e eletroforese de proteínas endógenas usando inibidores de fosfatase

Adicionou-se, aos extratos diluídos das amostras de MG, MC e MM os seguintes inibidores de fosfatase: ortovanadato 1 mM e ácido ocadaico 2 µM. Através do ensaio com 1 mM de ortovanadato foi observado que alguns polipeptídeos de MC e MM incorporavam

menos fosfato, ao contrário do esperado. Assim sendo, testaram-se diferentes concentrações de ortovanadato para MC e MM: 100 nM, 1 mM e 2 mM. Através deste ensaio notou-se que a inibição da fosforilação dos polipeptídeos era maior em MM. Então, fez-se uma curva com diferentes concentrações de ortovanadato para MM: 50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM e 5 mM. Para todos os testes foram utilizados como controle extratos sem adição de inibidores. As amostras foram submetidas a fosforilação *in vitro* nas mesmas condições especificadas acima. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de 10% de poliacrilamida contendo SDS (Laemmli, 1970) e visualizadas através de autoradiografia.

2.6. Fosforilação e eletroforese de proteínas endógenas usando inibidor para CK (caseína quinase)

Aos extratos protéicos diluídos foi adicionado um inibidor de caseína quinase (heparina). A heparina em baixas concentrações (10 nM) inibe a fosforilação de proteínas por CKII e apenas em concentrações acima de 50 X inibem a fosforilação de proteínas por CKI. Assim, foram utilizadas as concentrações de heparina a seguir: 10 nM, 100 nM, 10 µM e 100 µM. Como o ácido ocadaico inibe a ação de fosfatases, foram realizados também ensaios com heparina nas concentrações acima e ácido ocadaico (2 µM), que é um inibidor de fosfatase. Como controle foram utilizados: (1) extratos sem adição de heparina e (2) extratos com ácido ocadaico e sem heparina, respectivamente. As amostras foram submetidas a fosforilação *in vitro* e analisadas através de eletroforese em gel de 10% de acrilamida contendo SDS. Os resultados foram visualizados através de exposição a filmes de raio-X.

2.7. Fosforilação de caseína exógena

Para esses ensaios adicionou-se aos extratos diluídos de MG, MC e MM: (1) ácido ocadaico 2 µM e caseína desfosforilada 3 µg (sigma) e (2) ácido ocadaico 2 µM, caseína desfosforilada 3 µg e heparina 10 nM. As amostras foram submetidas a fosforilação *in vitro*. Na reação de fosforilação foram utilizados $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ou GTP como doadores de

fosfato. As amostras foram analisadas através de SDS-PAGE e visualizadas por autoradiografia.

2.8. Ensaio de quinase em gel para CKII

Extratos de MG, MC e MM não diluídos foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-PAGE. Para este ensaio foi incorporada 1mg/ml de caseína no gel teste. Como controle usou-se o gel sem incorporação de caseína. As amostras submetidas à eletroforese foram previamente tratadas em tampão da amostra 3 X, porém sem aquecimento. Em seguida, os géis foram lavados, duas vezes por 40 min cada, em solução contendo: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; DTT 1 mM e isopropanol 20%. Os géis foram novamente lavados por 1 h em solução contendo: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e DTT 1 mM para eliminação do isopropanol. Após serem lavados, os géis foram desnaturados com guanidina-HCl 6 M durante 1 h e renaturados em solução contendo: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; DTT 1 mM e Tween 20 0,4%, com 5 trocas de solução. O processo de renaturação foi realizado a 4°C sob agitação constante por aproximadamente 16 h. Após a renaturação, os géis foram submetidos a fosforilação *in vitro* por 90 min à temperatura ambiente em 12 ml de solução contendo: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM e 5 µl de [γ -³²P] ATP ou GTP. A CKII possui a habilidade de usar tanto ATP quanto GTP como doadores de fosfato, enquanto que a CKI usa apenas ATP. O excesso de fosfato não incorporado foi removido através de 5 lavagens de 15 min cada, em solução contendo TCA (ácido tricloroacético) 5% e Napirofosfato 1%. A seguir, os géis foram colocados sobre uma folha de papel Whatman 3 MM e seco a vácuo. As amostras foram visualizadas através de autoradiografia. O peso molecular relativo das proteínas foi calculado através de comparação em gel com proteínas com peso molecular conhecido (*Protein Molecular Weight Standards*, Gibco BRL).

2.9. Slot blot de RNA

2.9.1. Isolamento de RNA total

O método de *slot blot* de RNA foi utilizado para verificação da quantidade de transcritos de CKII nos diferentes estádios de desenvolvimento do megagametófito (MG, MC e MM) e embrião (EG – embrião globular, EC – embrião cotiledonar, EM – embrião maduro). Para tanto, RNA total foi isolado de megagametófitos MG, MC e MM e embriões EG, EC e EM segundo metodologia descrita por Prescott & Martin (1987), com algumas modificações (descritas no item 2.2 do capítulo 1).

2.9.2. Transferência para membrana de nylon

Cinco µg das amostras de RNA foram diluídas em TE 1 X para obter um volume final de 12,5 µl. Em seguida, foram acrescentados 37,5 µl de solução contendo 500 µl de formamida deionizada, 162 µl de formaldeído 37%, 100 µl de tampão MOPS 10 X (Sambrook *et al.*, 1989). A mistura foi aquecida a 65°C por 5 min e 50 µl de SSC 20 X foram adicionados. As amostras foram então transferidas para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia) com o auxílio de um *slot blot*. Após a transferência, o RNA foi fixado a membrana através da incubação a 80°C por 2 h.

2.9.3. Hibridização

Para obtenção das sondas foram utilizados os clones de cDNA de CKII. Os clones de cDNA de CKII isolados de meristemas (SCEQAM1039G02.g) e sementes (SCEQSD1077BO1.g) do Projeto SUCEST/FAPESP foram cedidos pelo Prof. Dr. Paulo Aruda. Os clones de cDNA de CKII foram digeridos com as enzimas *EcoR* I e *BamH* I (Amersham Pharmacia). Os fragmentos foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,4% e os insertos foram purificados utilizando-se o kit *concert rapid gel extraction system* (Gibco, BRL), seguindo as especificações do fabricante.

Os fragmentos purificados foram marcados com [α - 32 P]dCTP utilizando-se o kit *Megaprime* (Amersham Pharmacia), de acordo com as especificações do fabricante. As membranas foram hibridizadas como descrito no item 2.4.2 do capítulo 1.

As membranas foram expostas a filmes de raio-X para visualização dos resultados. Os sinais de hibridização obtidos foram digitalizados e a intensidade do sinal de cada amostra foi quantificada utilizando-se o programa *Image Analysis software* (Kodak). A quantidade de RNA imobilizada nas membranas foi normalizada através de hibridização como o gene de rDNA 26S de milho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise das proteínas de MG, MC e MM através de SDS-PAGE

Proteínas isoladas do megagametófito (MG, MC e MM) foram separadas através de eletroforese em gel de 10% de acrilamida contendo SDS. O peso molecular relativo (M_r) das proteínas no gel variou de 243 a 26,2 kDa. Polipeptídeos específicos foram observados para cada um dos diferentes estádios de desenvolvimento. Assim sendo, polipeptídeos de 161, 138, 32 e 31 kDa foram observados em MG, 28 e 27 kDa em MC e 40, 39, 28,2, e 27,3 kDa em MM. Alguns desses polipeptídeos são mostrados na Figura 1A por setas.

3.2. Análise da fosforilação de proteínas de MG, MC e MM

Para análise da fosforilação foram utilizados extratos diluídos e não diluídos de proteína total de MG, MC e MM. Geralmente, inibidores de quinases presentes naturalmente nos extratos podem inibir a fosforilação. Segundo Hathaway *et al.* (1993), a atividade de caseína quinase pode ser inibida em até 80% em extratos celulares. Esta inibição pode ser diminuída através da diluição dos extratos protéicos, e a atividade total da quinase pode então ser quantificada. Assim, foi feito ensaio de fosforilação com 3 diluições do extrato para cada amostra (1:10, 1:20 e 1:50) a fim de diminuir a concentração desses inibidores nos extratos. As fosfatases podem sofrer mudanças na atividade dependendo das diluições usadas. Como controle (para comparação) foi utilizado extrato não diluído. É importante salientar que no estágio intermediário (cotiledonar) e final (maduro) de desenvolvimento da semente ocorre grande acúmulo de proteínas de reserva, o que dificulta a quantificação de outras proteínas. Através da autoradiografia foi observado que as amostras diluídas apresentaram maior fosforilação quando comparadas ao controle (extrato não diluído) (Figura 1B). As diluições que apresentaram maior fosforilação foram: MG (1:20), MC e MM (1:50). Através das autoradiografias dos ensaios de fosforilação foi observado que um total de 19 polipeptídeos foram fosforilados. Os M_r s desses polipeptídeos variavam entre 324 a 27,9 kDa. Para MG foram observados 6 polipeptídeos

fosforilados, enquanto que para MC e MM foram observados um total de 14 e 17 polipeptídeos fosforilados, respectivamente (Figura 1B).

3.3. Análise da fosforilação de proteínas endógenas usando inibidores de fosfatase

Foram utilizados dois inibidores de fosfatases para se obter uma maior fosforilação. Os inibidores utilizados nos ensaios foram o ortovanadato e o ácido ocadaico (OA). Inicialmente, foram utilizados 1 mM de ortovanadato (Figura 2A) e 2 μ M de ácido ocadaico (Figura 3). Como pode ser observado na Figura 3, nos extratos de MG, MC e MM em que foi adicionado OA houve um aumento da fosforilação para todas as proteínas. Nos extratos que tiveram a adição de 1 mM de ortovanadato não houve aumento da fosforilação (Figura 2A). No entanto, foi observado através da autoradiografia que a fosforilação de algumas proteínas de MC e MM estava diminuída. Essas proteínas apresentavam Mr de: 114,7, 98,9, 39 e 37 kDa. Essas proteínas são mostradas através de setas na Figura 2A – B. Assim sendo, foi realizado um ensaio com 4 concentrações de ortovanadato para MC e MM. Este ensaio não foi realizado com MG, pois não foi detectada nenhuma alteração para essa amostra. As concentrações utilizadas foram: 100 nM, 1 mM e 2 mM de ortovanadato. Através desse ensaio foi observado que a concentração de 100 nM não promoveu alteração na fosforilação das proteínas, enquanto que as concentrações de 1 e 2 mM resultaram mais uma vez na diminuição da fosforilação das mesmas proteínas detectadas no ensaio anterior (Figura 2B). Assim sendo, foi feita uma curva de concentração de ortovanadato com o extrato de MM. As concentrações utilizadas foram: 50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM e 5 mM. Este ensaio mostrou que a diminuição da fosforilação dessas proteínas ocorria a partir da concentração de 500 nM de ortovanadato (Figura 2C). Assim, o ortovanadato, ao contrário do esperado, pode estar inibindo a atividade de quinases em vez de fosfatases, ou então pode estar ativando a atividade de fosfatases.

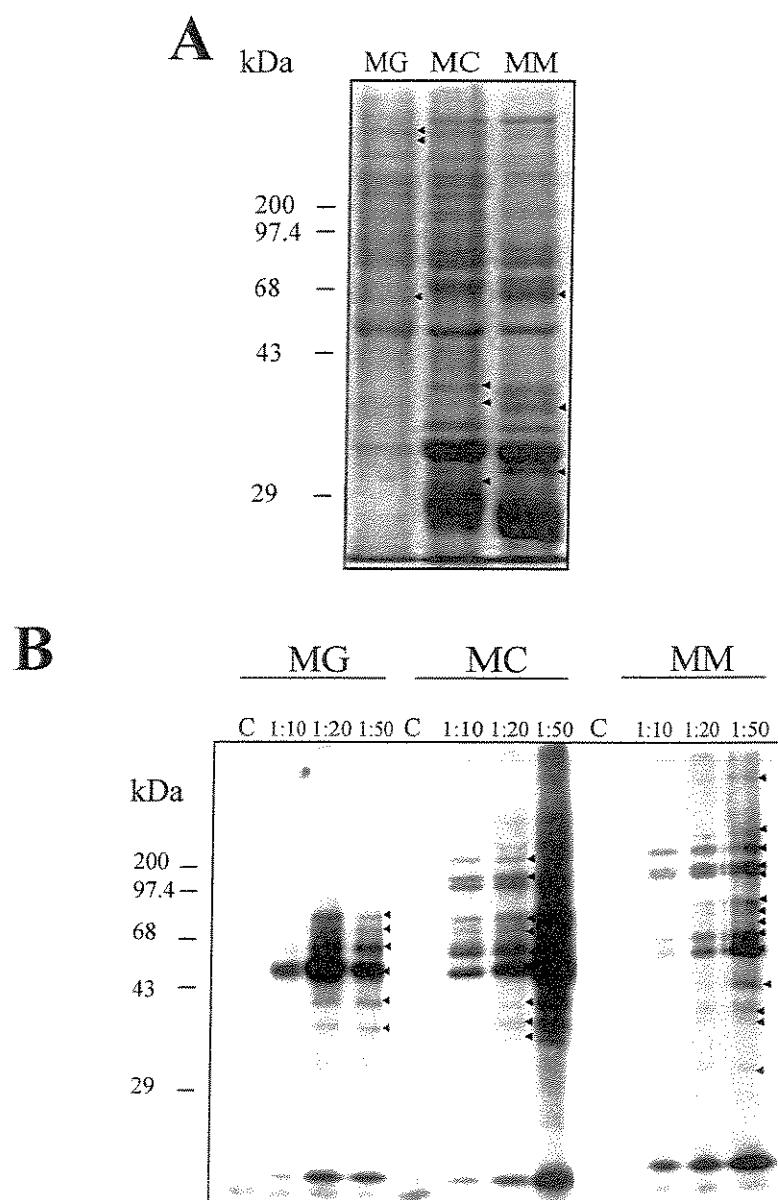


Figura 1. Gel de SDS-PAGE e ensaio de fosforilação *in vitro* usando extratos de proteína total de MG, MC e MM. Em (A) separação dos extratos protéicos de proteínas em gel de SDS-PAGE 10%. As setas indicam as proteínas que apresentaram perfil diferencial em MG, MC ou MM. Em (B) ensaio de fosforilação *in vitro*. O ensaio de fosforilação foi feito com extratos não diluídos (amostras controle mostradas pela letra C) e extratos diluídos nas proporções 1:10, 1:20 e 1:50. O peso molecular de proteínas (kDa) padrões são indicados do lado esquerdo dos géis (GibcoBRL).

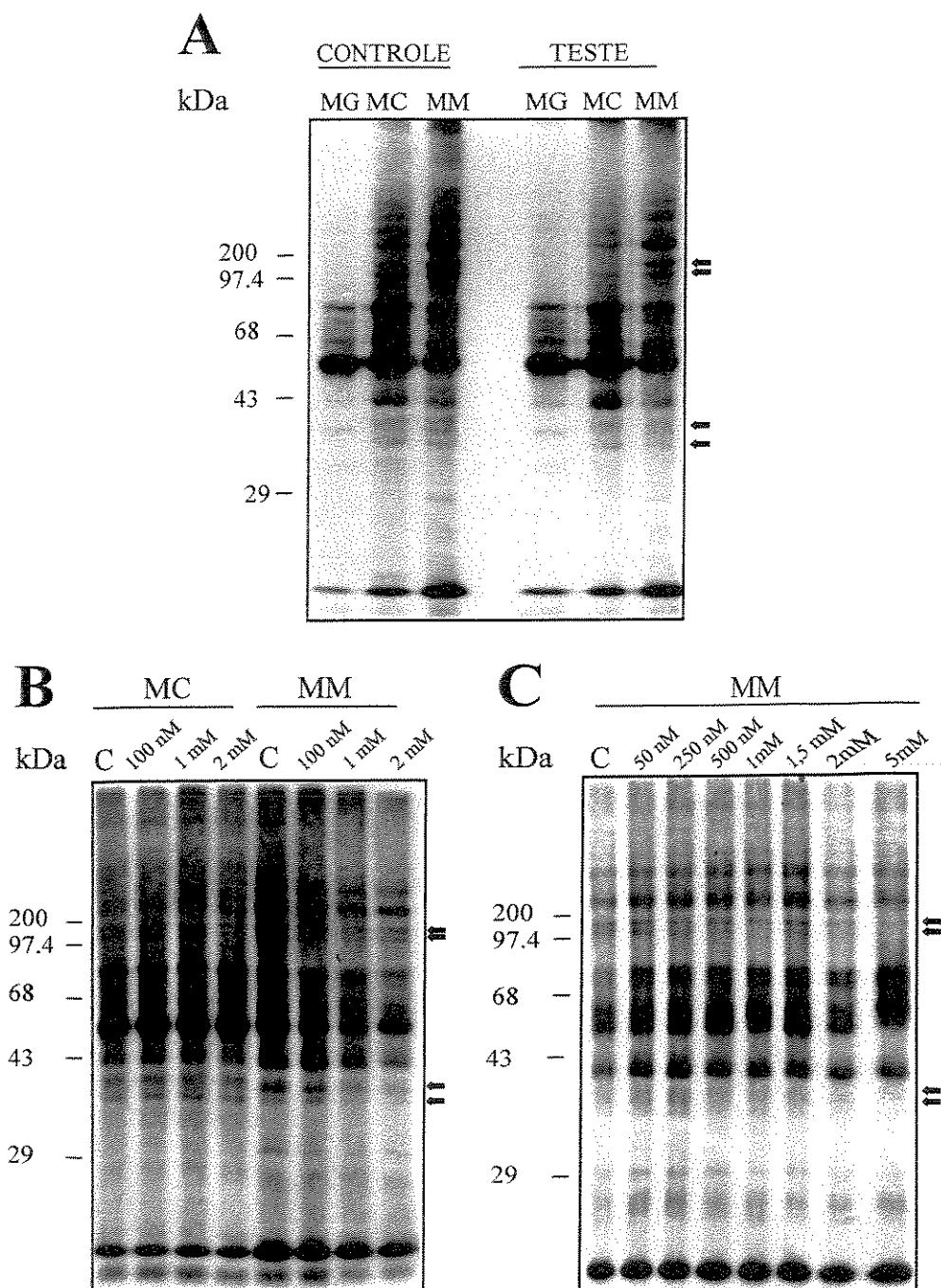


Figura 2. Ensaio de fosforilação *in vitro* na presença de ortovanadato. Em (A) teste com 1 mM de ortovanadato. As amostras controle são extratos sem ortovanadato. Em (B) teste com diferentes concentrações de ortovanadato nos extratos. As concentrações utilizadas foram: 100 nM, 1 mM e 2 mM. Como controle foram utilizados extratos sem ortovanadato. Em (C) teste com diferentes concentrações de ortovanadato no extrato de MM. As concentrações utilizadas foram: 50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM e 5 mM. Como controle foi utilizado extrato sem ortovanadato. As amostras controle são mostradas pela letra C e as setas indicam as proteínas que tiveram a fosforilação inibida por ortovanadato. O peso molecular (kDa) de proteínas padrões é indicado do lado esquerdo dos géis (Gibco BRL).

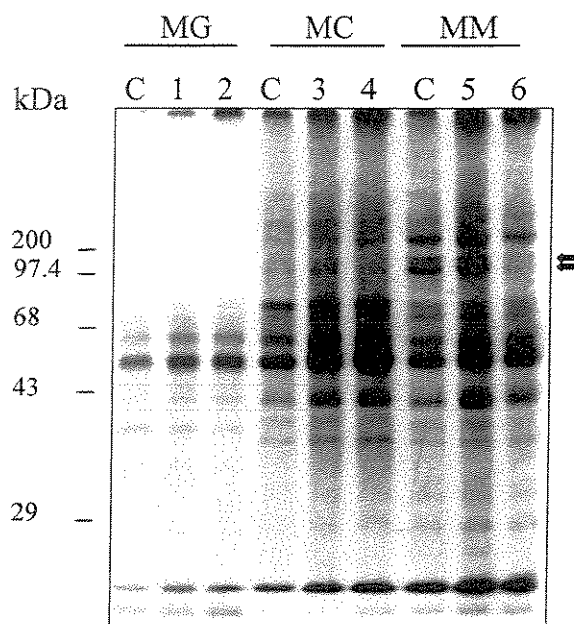


Figura 3. Ensaio de foforilação *in vitro* na presença de ácido ocadaico (OA). Em 1, 3 e 5 amostras de MG, MC e MM, respectivamente, contendo 2 μ M de OA, e em 2, 4 e 6 amostras de MG, MC e MM, respectivamente, contendo 2 μ M de OA e 1 mM de ortovanadato. As setas indicam as proteínas inibidas por ortovanadato. As amostras controles (extratos sem inibidores de fosfatase) são mostradas na letra C. O peso molecular (kDa) de proteínas padrões é indicado do lado esquerdo dos géis (Gibco BRL).

3.4. Análise da atividade de CKII nos extratos de MG, MC e MM

Foram realizados ensaios para identificação da atividade de CKII nos extratos de MG, MC e MM. Um dos critérios utilizados para identificar a atividade de CKII nos extratos foi a adição de heparina. As caseínas quinases I e II apresentam sensibilidade a polianions como a heparina (Lee *et al.*, 1999; Pinna, 1990). Segundo Crute & Buskirk (1992), baixas concentrações de heparina (10 nM) inibem a fosforilação de proteínas por CKII em contraste com a CKI que é inibida apenas por concentrações 50 X maiores. Assim, foi utilizado heparina nas concentrações que se seguem: 10 nM, 100 nM, 10 µM e 100 µM. Também foi feito o mesmo ensaio utilizando OA (2 µM) e heparina nas mesmas concentrações acima. Através desses ensaios foi observada a inibição da fosforilação das proteínas nas concentrações de 10 e 100 nM de heparina, o que ficou mais visível nos ensaios onde foi adicionado OA (inibidor da atividade de fosfatases) (Figura 4A – C). Ainda, foi observado que a fosforilação de duas proteínas, 114,7 e 98,9 kDa (Figura 4B – C), inibidas por ortovanadato, foi completamente inibida por heparina. Outros ensaios foram realizados utilizando caseína exógena (Sigma) nos extratos. Esses ensaios continham extrato de MG, MC e MM nas seguintes condições: (1) extratos com caseína (3 µg) e (2) extratos com caseína (3 µg) e heparina (10 nM). Como controle foi utilizado extrato sem caseína e heparina. Em todos os extratos, inclusive no controle, foi utilizado OA 2 µM. Estes extratos foram submetidos a fosforilação *in vitro* na presença de ATP ou GTP. Segundo Pinna (1990) as CKII fosforilam substratos contendo domínios ácidos como a caseína e fosvitina e possuem habilidade de usar tanto ATP quanto GTP como doadores de fosfato. As CKI também fosforilam substratos contendo domínios ácidos como a caseína e fosvitina, no entanto, possuem a habilidade de usar o ATP como doador de fosfato, mas não o GTP. Através desses ensaios foi observado que a caseína adicionada ao extrato foi fosforilada tanto na presença de ATP quanto de GTP (Figura 5A – B). As proteínas endógenas também foram fosforiladas na presença de ATP e GTP (Figuras 5A – B). Foi observado também que na presença de heparina ocorreu diminuição da fosforilação tanto da caseína, quanto das proteínas endógenas (Figura 5A – B). Assim, os resultados mostram que há atividade de CKII nos extratos das amostras analisadas.

3.5. Identificação de CKII através de ensaio de quinase em gel

No ensaio de quinase em gel, a fosforilação é testada quando as proteínas do extrato já se encontram separadas por eletroforese. Assim, a incorporação de fosfato é testada no próprio gel, resultando na identificação das possíveis enzimas catalisadoras da ligação covalente de fosfato (quinasas). Esse ensaio tem por objetivo identificar as possíveis quinases presentes em uma dada amostra. O substrato, no caso a caseína, foi distribuído uniformemente no gel de acrilamida antes da polimerização e a reação da quinase seria localizada na região do gel onde houvesse incorporação de marcador proveniente de [γ - 32 P] ATP ou GTP.

Para este ensaio foi incorporado ao gel teste de acrilamida, antes de ser polimerizado, 1 mg/ml de caseína. Como controle foi utilizado gel sem incorporação de caseína. Como doadores de fosfato foram utilizados ATP ou GTP. Os extratos utilizados neste ensaio não foram diluídos, pois a reação de fosforilação *in vitro* é realizada após eletroforese, não tendo assim interferência de fosfatases. Como foi discutido anteriormente, as proteínas de reservas que começam a ser depositadas a partir do estágio intermediário de desenvolvimento (cotiledonar) até o estágio final (maduro) dificultam a quantificação das outras proteínas. Assim, torna-se difícil dizer através desse ensaio, em que estágio de desenvolvimento do megagametófito há maior quantidade de CKII. A Figura 6A – B mostra o ensaio de quinase em gel para CKII utilizando ATP como doador de fosfato na reação de fosforilação *in vitro*. Neste ensaio foi observada maior fosforilação, no gel teste, de duas proteínas de 50 e 35 kDa. No gel controle também foi observada a fosforilação dessas duas proteínas, só que a intensidade foi menor. A presença de fosforilação no gel controle desses polipeptídeos, assim como de outros polipeptídeos (69 e 15 kDa) tanto no gel controle quanto no gel teste, na mesma intensidade, representam autofosforilação da CKII e de outras quinases, já que no gel controle não há presença de substratos. Os polipeptídeos de 68 e 61 que apresentaram autofosforilação foram detectados apenas em MC e MM e não foram detectados em MG. Os dois polipeptídeos de 50 e 35 kDa que apresentaram maior fosforilação no gel teste apresentaram maior fosforilação em MC e MM. No entanto, não podemos dizer que estes polipeptídeos estão presentes em menor quantidade em MG, pois este resultado pode estar refletindo uma menor quantidade de

proteínas de MG no ensaio. A Figura 6C – D mostra o ensaio de quinase em gel para CKII utilizando GTP como doador de fosfato na reação de fosforilação *in vitro*. Através desse ensaio foi observado que das proteínas que incorporaram ATP apenas a de 35 e a de 15 kDa incorporaram também GTP. O polipeptídeo de 35 kDa apresentou maior intensidade de sinal no gel teste com relação ao gel controle. A fosforilação desse polipeptídeo foi maior para MC e MM, e também apresentou autofosforilação no gel controle. O polipeptídeo de 15 kDa incorporou tanto ATP quanto GTP, no entanto, não apresentou diferença significativa de sinal entre o gel controle e o gel teste. A CKII é uma enzima oligomérica com massa molecular de 130 – 150 kDa (Pinna, 1990) composta de 2 subunidades alfa catalíticas ($\alpha = 38$ kDa, $\alpha' = 36$ kDa) e 2 subunidades beta regulatórias ($\beta = 25$ kDa) (Crute & Buskirk, 1992) que estabilizam a subunidade catalítica, determinam a especificidade de CKII aos substratos (Espunya & Matinez, 1997) e contém o sítio para autofosforilação (Hathaway & Traugh, 1983). Assim, possivelmente o polipeptídeo de 35 kDa representa a subunidade catalítica (subunidade α') da CKII, pois fosforilou caseína (incorporada no gel) e utilizou tanto ATP quanto GTP como doadores de fosfato. E o polipeptídeo de 15 kDa, que não apresentou diferença significativa na incorporação de fosfato quando comparado o gel teste (com substrato) com o gel controle (sem substrato), possivelmente representa a subunidade regulatória (subunidade β), pois esta subunidade possui sítio para autofosforilação e não fosforila substrato. A proteína de 50 kDa que apresentou maior fosforilação no gel teste usando ATP como doador de fosfato, não foi detectada no ensaio em que foi usado GTP (Figura 6A-B). Assim, talvez esta proteína venha a ser uma CKI, pois a CKI assim como a CKII fosforila caseína, no entanto, não tem a propriedade de utilizar o GTP como doador de fosfato como a CKII.

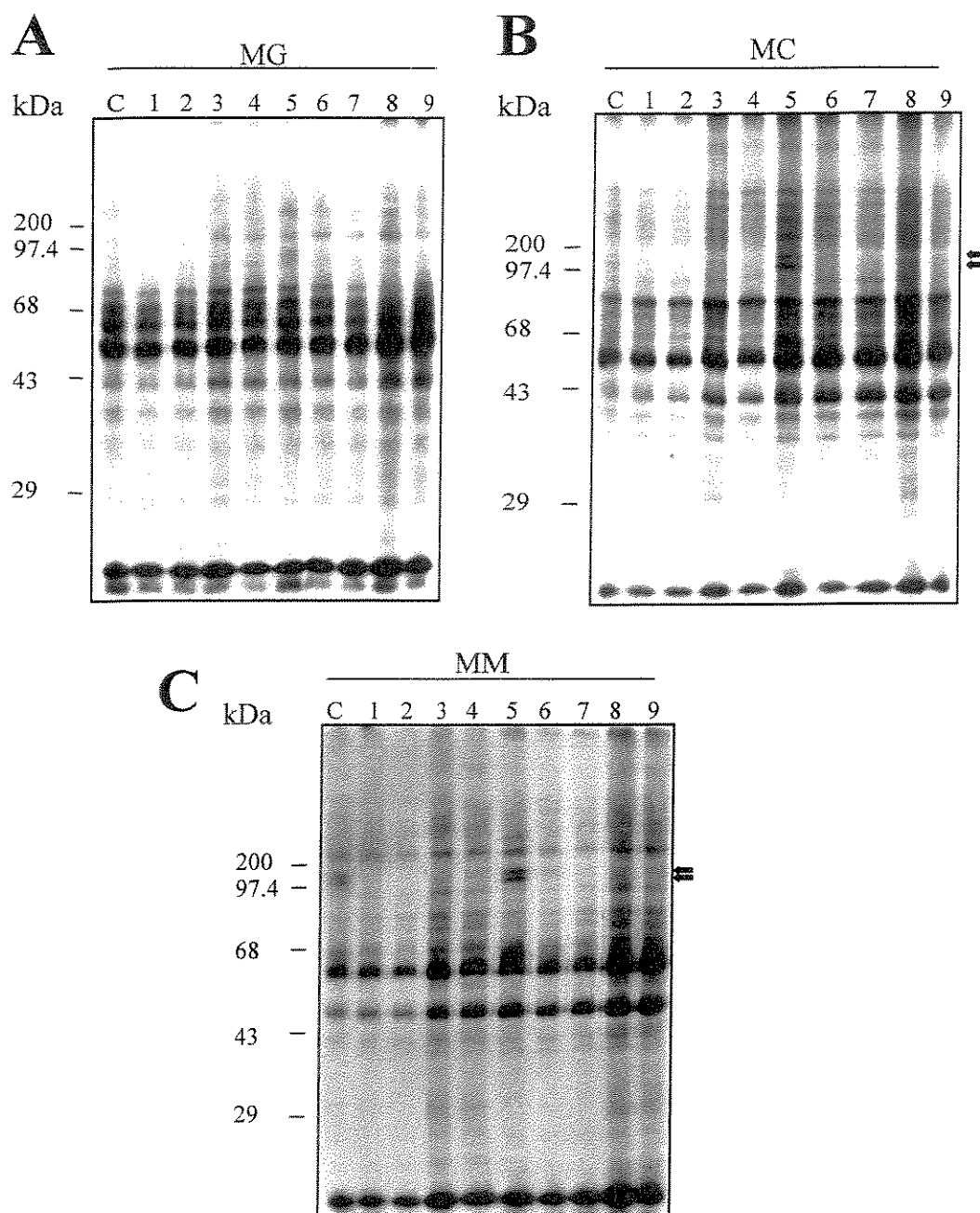


Figura 4. Ensaio de fosforilação *in vitro* na presença de heparina. Em (A) 1 a 4, extratos de MG com heparina nas concentrações de 10 nM, 100 nM, 10 μ M e 100 μ M, respectivamente; 5 MG com 2 μ M de OA (ácido ocaídoico) e sem heparina; 6 a 9, extratos de MG contendo heparina (10 nM, 100 nM, 10 μ M e 100 μ M, respectivamente) e 2 μ M de OA. Em (B) 1 a 4, extratos de MC contendo heparina (10 nM, 100 nM, 10 μ M e 100 μ M, respectivamente); 5, MC com 2 μ M de OA e sem heparina; 6 a 9, extratos de MC contendo heparina (10 nM, 100 nM, 10 μ M e 100 μ M, respectivamente) e 2 μ M de OA. Em (C) 1 a 4, extrato de MM contendo heparina (10 nM, 100 nM, 10 μ M e 100 μ M, respectivamente); 5, MM com 2 μ M de OA e sem heparina; 6 a 9, extratos de MC contendo heparina (10 nM, 100 nM, 10 μ M e 100 μ M, respectivamente) e 2 μ M de OA. As amostras controle (sem heparina e OA) são mostradas na letra C. A fosforilação das proteínas foi inibida com 10 e 100 nM de heparina em MG, MC e MM. As proteínas que tiveram maior inibição da fosforilação em MC e MM são indicadas através de setas. O peso molecular (kDa) de proteínas padrões é indicado do lado esquerdo dos géis (Gibco BRL).

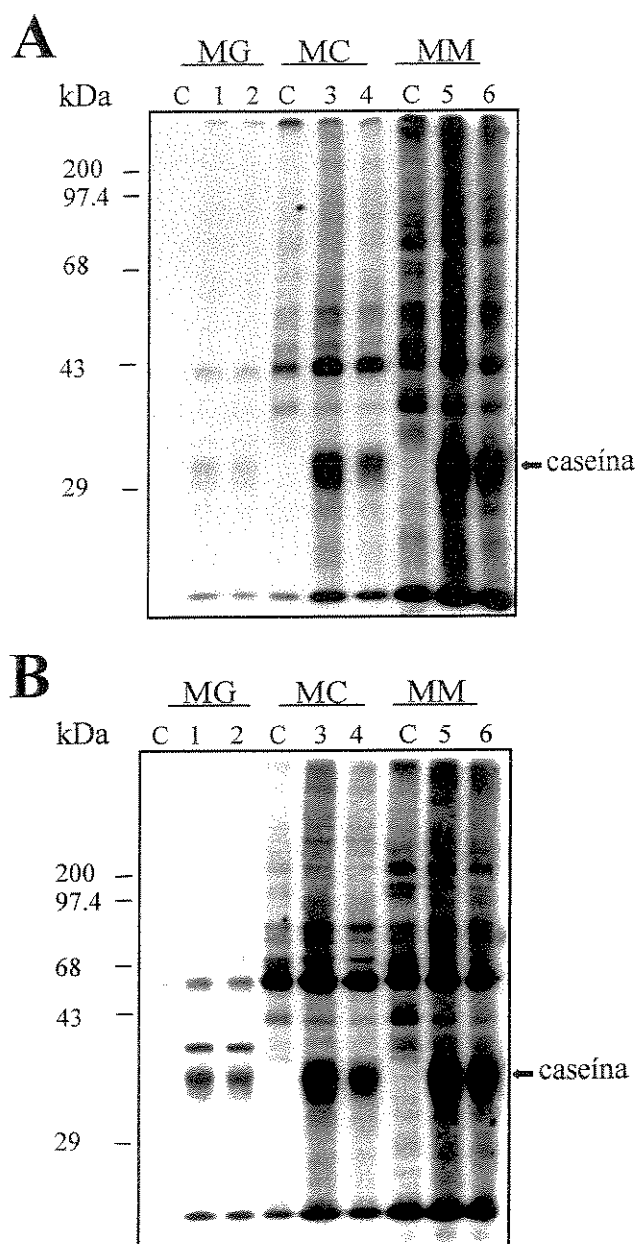


Figura 5. Ensaio de fosforilação *in vitro* na presença de caseína exógena (3 µg) utilizando ATP ou GTP como doador de fosfato. Em (A) foi utilizado ATP como doador de fosfato. 1, 3 e 5 mostram extratos de MG, MC e MM na presença de caseína exógena, respectivamente. 2, 4 e 6 mostram extratos de MG, MC e MM na presença de caseína exógena e heparina (10 nM). Em (B) foi utilizado GTP como doador de fosfato. Utilizou-se extratos nas mesmas condições especificadas acima. As setas indicam a caseína fosforilada nos diferentes extratos. O peso molecular (kDa) de proteínas padrões é indicado do lado esquerdo dos géis (Gibco BRL).

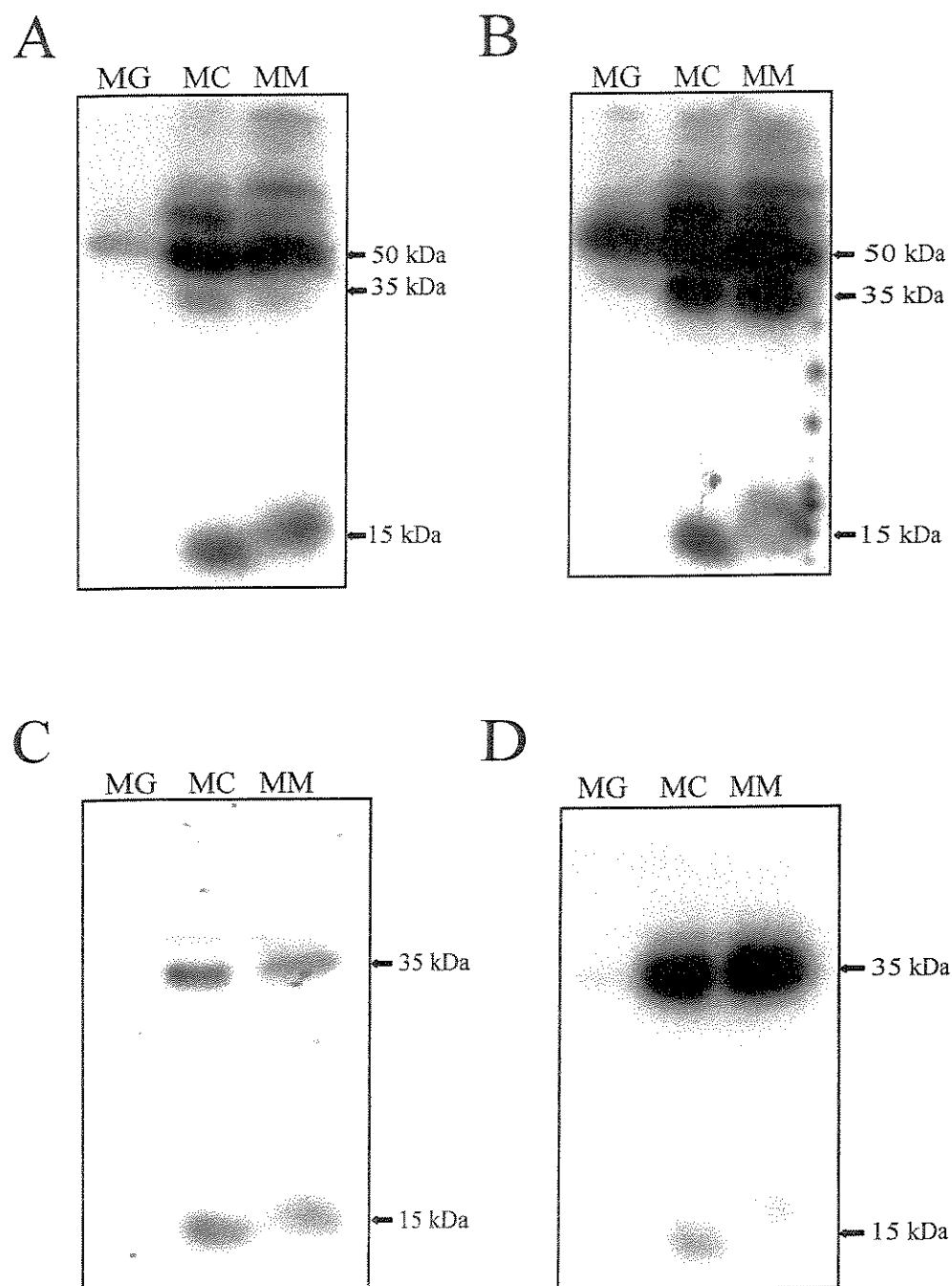


Figura 6. Ensaio de quinase em gel para CKII. Em (A e B) foi utilizado o ATP como doador de fosfato, sendo que em (A) é mostrado o gel controle e em (B) o gel teste (gel com incorporação de caseína). Em (C e D) foi utilizado o GTP como doador de fosfato, sendo que em (C) é mostrado o gel controle e em (D) o gel teste. A CKI (50 kDa) e a CKII (35 kDa, subunidade α' e 15 kDa, subunidade β) são mostradas através de setas.

3.6. Análise através de *slot blot* de RNA dos transcritos de CKII durante o desenvolvimento da semente

Através dos ensaios descritos acima, não foi possível estimar onde ocorre maior atividade de CKII no megagametófito durante o desenvolvimento da semente, pois a deposição de proteínas de reservas nos estádios cotiledonar e maduro dificulta a quantificação exata das proteínas totais presentes nos extratos. Assim, foi feito *slot blot* de RNA para verificação da quantidade de transcritos no megagametófito (MG, MC e MM) e embrião (EG, EC e EM) durante o desenvolvimento da semente. Para tanto, 5 µg de RNA total isolado de MG, MC, MM, EG, EC e EM foram transferidos para membranas de nylon através de *slot blot* e as membranas foram hibridizadas com sonda de cDNA de CKII isolados de meristema e semente de cana-de-açúcar. A normalização da quantidade de RNA foi feita através de hibridização com um gene rDNA 26S de milho nas membranas.

Através de *slot blot* de RNA (Figura 7) foi observada uma maior quantidade de transcritos de CKII em MG quando comparada com MC, MM, EG, EC e EM tanto para a sonda de cDNA de CKII isolada de semente (Figura 7A) quanto de raiz (Figura 7B). Foi observado também que ocorre uma maior expressão de CKII no estágio inicial de desenvolvimento (globular), com diminuição significativa da expressão no estágio intermediário (cotiledonar) e estágio final (maduro). Assim, podemos concluir que no estágio inicial de desenvolvimento ocorre maior transcrição de CKII tanto no megagametófito quanto no embrião (expressão temporal).

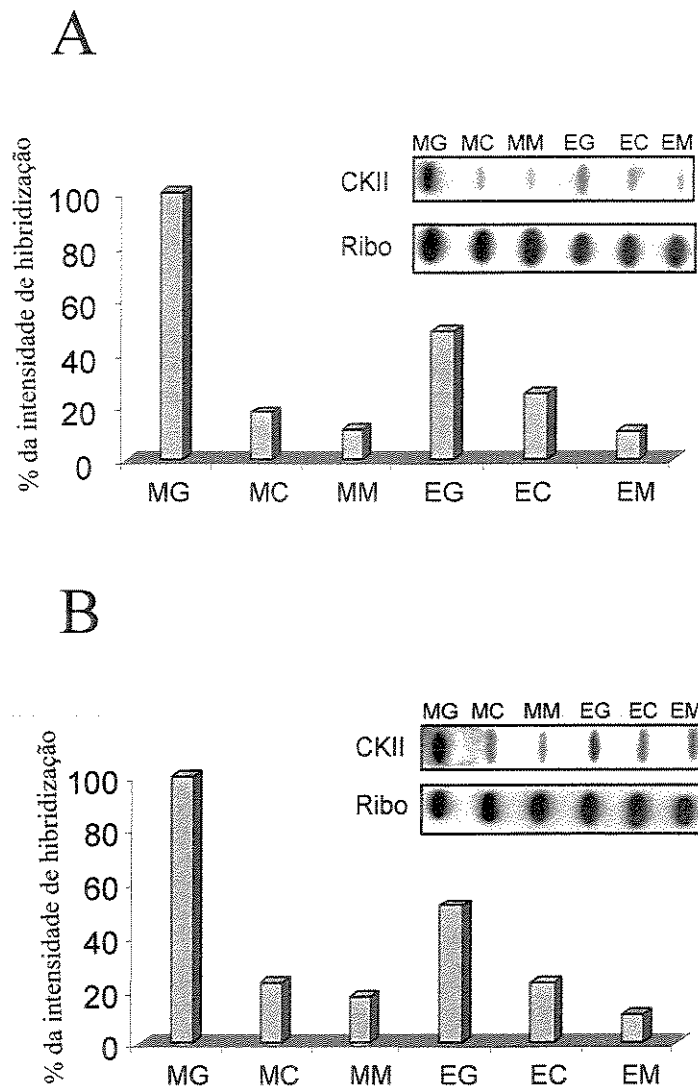


Figura 7. Acumulação de transcritos de *CKII* em MG, MC, MM, EG, EC e EM. Em (A) *slot blot* de RNA isolado de MG, MC, MM, EG, EC e EM hibridizado com o clone de *CKII* (SCEQAM1039G02.g) isolado de meristema de cana-de-açúcar. Em (B) *slot blot* de RNA isolado de MG, MC, MM, EG, EC e EM hibridizado com o clone de *CKII* (SCEQSD1077B01.g) isolado de semente de cana-de-açúcar. Para normalização das quantidades de RNA, as membranas foram hibridizadas com o gene de rDNA 26S de milho (Ribo). Os histogramas mostram os valores normalizados em porcentagem da intensidade do sinal de hibridização com a sonda de *CKII*.

Através dos ensaios foi possível detectar fosforilação de proteínas nos extratos, presença da atividade de CKII, identificação desta quinase nas amostras analisadas e a quantidade de transcritos de CKII. Os ensaios de fosforilação *in vitro* mostraram maior atividade e quantidade de CKII em MC e MM. No entanto, através de *slot blot* de RNA, foi detectada uma maior quantidade de transcritos de CKII em MG. Assim sendo, não foi possível dizer com precisão em que estágio de desenvolvimento do megagametófito ocorre maior atividade dessa quinase. A CKII pode estar envolvida na fosforilação de fatores de transcrição importantes para a formação e desenvolvimento do megagametófito. Tem-se conhecimento que a caseína quinase II fosforila mais de 200 substratos. Assim, além de fatores de transcrição a CKII pode estar envolvida na modulação de várias proteínas importantes para o desenvolvimento da semente de araucária.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Battistutta, R.; Sarno, S.; Moliner, O.; Marin, O.; Issinger, O-G.; Zanotti, G.; Pinna, L.A. (2000a) The crystal structure of the complex of *Zea mays* α subunit with a fragment of human β subunit provides the clue to the architecture of protein kinase CK2 holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 267, 5184-5190.
- Battistutta, R.; Sarno, S.; Moliner, O.; Papinutto, E.; Zanotti, G.; Pinna, L.A. (2000b) The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2*. *J. of Biol. Chem.* 275 (38), 29618-29622.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Ciceri, P.; Gianazza, E.; Lazzari, B.; Lippoli, G.; Genga, A.; Hoscheck, G.; Schmidt, R.J.; Viotti, A. (1997) Phosphorylation of Opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *The Plant Cell* 9 (1), 97-108
- Crute, B.E.; Buskirk (1992) A casein kinase – like kinase phosphorylates β - tubulin and may be a microtubule – associated protein. *J. of Neurochem.* 59 (6), 2017-2023.
- Espunya, M.C.; Martínez, M.C. (1997) Identification of two different molecular forms of *Arabidopsis thaliana* casein kinase II. *Plant Science* 124, 131-142.
- Favre-Duchartre, M. (1958) Ginkgo, an oviparous plant. *Phytomorphology* 8, 377-390.
- Guerra, M.P.; Silveira, V.; Santos, A.L.W.; Astarita, L.V.; Nodari, R.O. (2000) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE. In S. Jain, P. Gupta e R.

- Newton (eds). Somatic embryogenesis in woody plants, V. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hakman, I. (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during development and somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 87, 148-159.
- Hathaway, G.M.; Tuazon, P.T.; Traugh, J.A. (1983) Casein Kinase I. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. Vol. 99, pp 308
- Hathaway, G.M.; Traugh, J.A. (1983) Casein Kinase II. In *Methods in enzymology*. Academic Press, Inc. Vol. 99, pp 317
- Jarvis, S.B.; Taylor, M.A.; MacLeod, M.R.; Davies, H.V. (1996) Cloning and characterization of the cDNA clones of three genes that are differentially expressed during dormancy breakage in the seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *J. Plant Physiol.* 147, 559-566.
- Kanekatsu, M.; Ezumi, A.; Nakamura, T.; Ohtsuki, k. (1995) Chloroplast ribonucleoproteins (RNPs) as phosphateacceptors for casein kinase II: Purification by ssDNA-celulose column chromatography. *Plant Cell Physiol.* 36, 1649-1656.
- Kanekatsu, M.; Hiroshi, S. (1997) Phosphorylation of chloroplast ATP synthase by casein kinase II (CKII). *Plant Physiol.* 114, 148-153.
- Klimczak, L.J.; Schindler, U.; Cashmore, A.R. (1992) DNA binding activity of the Arabidopsis G-box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *Plant Cell* 4, 87-98.

- Krasowski, M.J.; Owens, J.N. (1993) The ultrastructural and histochemical post-fertilization megagametophyte and zygotic embryo development of interior spruce. *Can. J. Bot.* 71, 98-112.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leal, I.; Misra, S. (1993) Molecular cloning and characterization of a legumin-like storage protein cDNA of Douglas fir seeds. *Plant Mol. Biol.* 21, 709-715.
- Lee, Y.; Lloyd, A.M.; Roux, S.J. (1999) Antisense Expression of the CK2 α subunit gene in *Arabidopsis*. Effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiol.* 119, 989-1000.
- Litchfield, D.N.; Lüscher, B. (1993) Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol. Cell Biochem.* 127, 187-199.
- Misra, S. (1994) Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis and seed germination: Biochemical and molecular advances. *Seed Science Res.* 4, 357-384.
- Mizoguchi, T.; Yamaguchi-Shinizaki, K.; Hayashida, N.; Kamada, H.; Shinozaki, K. (1993) Cloning and characterization of two cDNAs encoding casein kinase II catalytic subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 21, 279-289.
- Newton, C.H.; Flinn, B.S.; Sutton, B.C.S. (1992) Vicilin-like seed storage proteins in the gymnosperm interior spruce (*Picea glauca/engelmannii*). *Plant Mol. Biol.* 20, 315-322.
- Owens, J.N.; Merris, S.J.; Misra, S. (1993) The ultrastructural, histochemical and biochemical development of the post-fertilization megagametophyte and the zygotic embryo of *Pseudotsuga menziesii* [mirb.] Franco. *Can. J. Forest Res.* 23, 816-827.

- Pinna, L.A. (1990) Casein Kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochem. Biophys. Acta* 1054, 267-284.
- Plana, M.; Itarte, E.; Erija, R.; Goday, A.; Pagès, M.; Martinez, M.C. (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.* 266 (33), 22510-22514.
- Precott, A.; Martin, C. (1987) Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. *Plant Mol. Biol. Report* 4, 219-222.
- Reitz, R.; Klein, R.M.; Reis, A. (1978) Projeto Madeira de Santa Catarina. Separata 28 de sellowia-Herbário Barbosa Rodrigues, Itajai.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, New York.
- Tranbarger, T.J.; Misra, S. (1996) Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir. *Gene* 172, 221-226.
- Trewavas, A.; Gilroy, S. (1991) Signal transduction in plant cells. *TIG* 7, 356-361.
- Wirkner, U.; Voss, H.; Lichter, P.; Weitz, S.; Ansorge, W.; Pyerin, W. (1992) Human casein kinase II subunit alpha: sequence of a processed (pseudo) gene and its localization on chromosome 11. *Biochem. Biophys. Acta.* 1131, 220-222.

CONCLUSÕES

1. Um total de 163 cDNAs foram analisados através de *slot blot* de DNA, sendo que 129 tiveram a expressão diferencial confirmada : 15 cDNAs de MG, 48 de MC, 31 de MM e 35 de EM.
2. De um total de 36 seqüências obtidas 21 apresentam similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados, sendo 6 de MG (homeodomínio *zipper* de leucina, transposon *MuDR*, *early B-cell factor*, LP3-Proteína induzida através de estresse hídrico, poliproteína e histona H2B), 5 de MC (gluconoquinase, CROC-1, glicosiltransferase, oligopeptidase e citocinina oxidase), 6 de MM (fosfotransferase, *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*, álcool desidrogenase classe III, *gypsy-type* retrotransposon, *mannose-binding lectin* e proteína *homeobox*) e 4 de EM (*thiamin biosynthetic enzyme*, fator 2 que se liga ao promotor *DC3*, *RNA-binding* e *leucine-rich-repeat*).
3. Existe um total de 19 proteínas fosforiladas com tamanhos relativos entre 324 a 27,9 kDa, sendo 6 de MG, 14 de MC e 17 de MM.
4. A atividade de CKII (caseína quinase II) foi detectada em MG, MC e MM.
5. Foi possível identificar a CKII no gel para MG, MC e MM. Esta proteína apresentou massa molecular relativa de 35 kDa (subunidade α' catalítica) e 15 kDa (subunidade β regulatória).
6. Uma maior quantidade de transcritos de CKII foi identificada no estágio globular do megagametófito e embrião (expressão temporal). Esta quantidade de transcritos é maior no megagametófito.

APÊNDICE

Sequências dos clones de cDNA de MG, MC, MM e EM isolados através de *display* diferencial de mRNA

>MG1

```

1 CCCGGCATAA CCATCCATCA ACATCCTTGC CACTGAACTT AGGGAAGTCT AATTTATGTA
61 TTTTGAAGGT CAGATCACGA TCATAGGGAT TTTCTCTTCT GTGAGGACGT TCAGAGTTTT
121 CAGCTTGGTT TCCAGATGTG AAATTTCCCT GCAGTTTAGT TTCCACCTCT GTAAAGTTCTT
181 CTATGTGGTT TCGAGTAGTT ACTTGCTCCA TACGAAGTTG GTTAATATCC TGTTCATTT
241 TGAGGCTAGT TTGAGTCAAG GATTCCATAG AACTTTGGAG GTGTGCCAAC ATCGAGACCA
301 AGTCTTGTG ATCCTTACTA CGAGTGCCCA TTGCCATTAG GGACCTTCTG TTTTCTTAGT
361 TACTAAAAAT AGATGTGGGA TTTTAGGAGT TACTATTTTT AGTAAGGTGT CCCAAAAGT
421 GCTTGGGTGT GGTATATCAA AATGATTAGC TCGGAAAAAC AGTCGCAATG AGCTATGCCC
481 CTCAACACCA GTTTCGAGCA CTTGGATTAC TATTTTtagT AAGTGTCTGA AAAAATGCTT
541 GGGTGTGGTA TATCAAAATG ATCAGCTTGA AAAGACAGTC GTAATGGGCT ATGTCCACA
601 ACAGTGATTT TGGACACAAC ACTTTTTTTA TTTTATTTTT TATTTTttAC TGCTATGTTG
661 TCTAACGGTG TTGTCGGTTT CTGTTGGCAA TTTTGCCACA CTGAGATGAT GAAGGGGCAG
721 TTTTGGCAAT ATGATGTCTG TTTTtagTTT TGCAGCTTAT TTGAAAACCT CGCAGACCAG
781 CTTGCAGATT TTTGGCGAAC TTACGATTTA TGCCGGG

```

>MG13

```

1 CCCGGCATAA AGAAATGGAA ATGGAAGTTG CAGAAGTTGT GGGTATGCTG GATGAGAAGA
61 ACGGTGGAAA TCTATTCCCA TATGTTACCA ACACATAATC AAGGAACCAT GTTTTCAATT
121 TTGCTTACAA GAACATGCTC TACCATGACA GGCCTTGATG TTGTTTTTTA GTTCTGTTCT
181 TGCTTTATAA GGTCAATTTT CAATGCCGTC TATAGAAAAC AAGAAAATAA CTGAAACTCC
241 TACTGTGTAT TTTCTTTCCC GTTATCACTA TGTTGGATAT TAAAGACATA GATCCTTTGG
301 ATTTTGGGTT CAGTTCATGT GTTTTGAAAT CACTATTTTA GCAAAAAAAA AAAAAA

```

>MG1,2

```

1 AAGCCCGAGG GAGGCATACT ATGATTAGAG AGTGTTGGA TATGATTTGG TTCTTACGGG
61 TATTCCAAAT TGACCCAATC CAAAATGACC AAGCATATTT TATGGATTTG ATCGAGATAT
121 GGGACCCACA TACCAACACC TTCCATCTCC CAATAGGAGA GATTACAGTC ACATTGGAGG
181 ATGTTTATCG GATCTATAGG ATCCTAATTT TTGGACATCG GATAGTTGTC ACTCTAGTAG
241 AGTAGCAAAG CGAGGTATTT TGATGGGTGT TTGGTGCTTA CCCTGATTAG GTTTAGGAGG
301 ATAGTGGAGG TGGTGTACAT CTGATATTAA TGTCCCTTAT ATCTAAGATT GTGCTACCAG
361 ACTCCTCGAG ATACAAATTC CTATGGAACA TGCTGGATAT TATTGAGGAT CTTATGGCTT
421 GCCCATAGGG TGTGCCTATG GTTTGTGATT GGGTTAGTGC TCTCCTAGCA TAGTTGTATG
481 AGGAGCTCTA TGAGTTACAT TGtagGGGGC ATAAGGGTAC TAGTTGTAGT ATGCTCCTAC
541 AACTTTGGGG ATGGGAGCAC TTCCATGTGG ATAGATCGCT GGGGTTGCCT CGGGCTT

```

>MG6

```

1 AAGCCCGAGG TAGCAGAATT CAAGGTAGAT CAAGCATAGA TCTCGAGATA GATTGTGCAC
61 AGGCTCAAGC ACAGATCTCG AGGTGGCACA TGGTAGCTGC ACACAGATCG AGGTGGATGA
121 CGTGGCATAG CTAAGGTGGT AGTTGACGTG ATAGCACACG GATCGAGGTG GTTGATGTGG
181 CAGCTGTGCT GGTAGAGGAG CTGGTGTGGA CACGTGTCGA GCTTGCGTGG TGAGGGTGGC
241 AGCTGTGCTG GTAGAGGAGC TGGTGTGACA CGGTGTGCGAG CTTGCGTGGT GAGGTGGAAG
301 CAGATGTGGC AGCGTGTGAT TTGCTAAAAAT TTTGCCATGT GGCATGGTTT GATTGGTTAT
361 ATTTACGGCT AAAACGGCGC TCATCCAATF GCCCGAAGGC AATCGAAGTG AATTACACGA
421 TTATGGGTTT AAAAACCCCTC GCGCGGTCGT AACCCACTGA ATGTGGGACA AAGCATTGCA
481 ATTTTAAAAA AACTAGCACC GTTAATTGCT AAAGAGGTAG GTGTGCCTCT TACATCCCAT
541 CCAAGGGACA TGGTCTAGTG GATAAGACGT CCACTAGCAG GGTGGAGGCC TCGGGCTT

```

>MG7

```

1 AAGCCCGAGG GGGAGCTCGG AGCCATGGCT GCCGGCGCCT TTGCACTGTA TGAGAAGCAT
61 GAAGCGAAGA AAGACCCGGA GAATGCTCGG AGGCACAAGA TAGAGGAGGA GGTGCTGCA
121 GCTGCTGCGG TGGGCAGTGG CGGATTTGCA TTCCATGAAC ACCACGAGAA GAAGGAAGAC
181 AAGAGAGAAG AGGAGGAAGC CAGCGGCAAG AAGCATCACC ACCTCTCTG AATGCAAATC
241 TTAACGAGCG TGTCTAAGAA ATCTACTATA ATCGTGTGGG GGGGTGTTTT TAATGTTTTT
301 AGGGTATAAA TCTTGCTGTC TAAGCCTGCG TGCTTCTTGT GTTCAATATA ATATTGGGGG
361 GGGGGGGTTA GATTAAAGGG GGATAAAATT TTGGCTTGTT ATAAACCCTG GGGTGCTTTT
421 T

```

>MG8

```

1 AAGCCCGAGG TTGTGTAGAA GTTGATCTGC AAAGAAAGTT ATCGCAATGT TTGAAAATCA
61 TCACACAGGA AGGGGTAATC TCATAGGAGG TTCGTATTTT AAATTTACCT AATACCTTTT
121 TTTTGTCTC AGGATCACTT AATCTGTGAC TGTCTTTTGA GAAAACCTCA AAAGGCAAAT
181 AATGAGAAGG GTGTGATGGA AACTGACTCT TCTATAACCA GTGGGAAGGT TTAGCCCAAC
241 AAGGATACTA ATGAGGACAC TCAAGAAATG GAGATGGATG CAGGGAGTCA GGAAATGAGC
301 AACAAAGAAG ACATTGGTTG GAAGTTGGTT CAAAAGAGGC AAGAAGTAAA GGATTCATCA
361 AATAGGCCCT CTAAATTTAA GAAGGGTTCC TCTTCCTCTA GGGGGAGTTC TAGAGGTTAA
421 TGTTGGCTCC AAGGATACTC CTCGGGCTT

```

>MG9

```

1 AAGCCCGAGG AGACACACTA GGCTTGATAT GGCCTTTTTT TAGCAATTCT TGTAGCTAGG
61 CCTCAAGTTC CTATAATTCG ATGGGGATCA TTCTGTATGG GGTCTAGCA ATGGGTGTTT
121 CCCCTGGAAA AAGGTCAAGG GAAAAGTCAA ATTCTCTTTT GGGATGAAGT CCTGGCAAAT
181 CTTTAGGGAA CATGTCTCTA AAATTGTTCA AAATTGGGTA TTGTTGAAGG AGTCTAGAGC
241 TAAATTCCAC TTCCTCTTTT TAATTCATTT TGAATACATA AAGTTGGCAT CCTTTCCTTA
301 AGGCTTGTTT GGGTTTGCAT AGCAACAAT AGGTGCAGTT CCAAAACCTT ACGATCACAA
361 TAAAATCAAA CTCATTGTTT GGTATCATCT GTATACTCTA GCCTCGGGCT TA

```

>MG1,3

```

1 AAGCCCGAGG AAAAGGCCAC TCCCAAGGCC GGTAAGAAGG TCGCCAAAGA GGGCGGTGGA
61 AAGAAGAAGA AGAGGGCGAA GAAGGGAGTG GAGACCTACA AAATTTATAT CTTCAGGTT
121 CTTAAGCAAG TCCACCCTGA CATCGGCATC TCCAGTAAGG CTATGAGCAT CATGAATCT
181 TTCATGAGTG ACATTTTGA GAAGCTGGCC GCCGAGTCGT CGAAGCTGGT GCGTTACACC
241 AAGAGGAATA CTCCTCTTTC GCGGGAAGTG CAGTCGGCCG TGAAATTGTC TCTTCCGGT
301 GAACTTGCGA AGCATGCTGT ATCGGAGGGC ACCAAGGCCG TCACCAAATT TACCTCTGGT
361 TAATAACATT TGCTTCTCTC TTTGGGCCCT TCTATATTTT ATGGTGTTTT TTTGACACCG
421 CCTCTTTTTC GGATTTTTTT GGTTCCTCTC GATGTCCAGA AGGGTAGGGG TAATCCCAT
481 TTTATATGTT GCTTGTGATG AACCATAATT CTCTGGTGTT TTCTGCCAAA AAAAAAAAAA
541 A

```

>MG2,2

```

1 AAGCCCGAGG ACTAAGAGGA ATGTCTGTTT CAGATGATCT GAAGTTTCAC CTGAAAGGAT
61 TAAACATGCC AAAGCAAGCC TGGGATAAGT TCGCATCTTT GTATGGGAAA CAGAATGTTA
121 TTCCGGCATG TCAACTTGAA TACGAACTCA TCAGCTTGGA TCCAAGTGAA TTTTTCATGCA
181 TTGAAGATTT CATTTCAAGT TTTGAGAAAT TGAGGCTTCA ACTTAGTTAT TGTGATGTAA
241 TCAAAGAGGA TAATTAGATT ATCTATGTCA TTCTTTCAAG ATTTAAAGGT CCATATTCCA
301 TGTTTGTTC TACCTTCTAC ACATTTAAAG ATGCCCTTGG TGCTCTTTAC AAAACACATT
361 CTTTTGATGA ATTTTGTGAG TACTTACCTC GGGAGCCAAG AT

```

>MG4

```

1 AAGCCCGAGG AGATTACTGC CCATCATTAA ATGCATGAAA AGGTCTATGA TACATGTGTT
61 TTGACAAATA TAATTTCACT TGTACTGAA ACTCTATTTG GGTAAATAA AAGTGCTGCT
121 AGGCGATGCA AATTAGAATC CCCATAGTTG GCATTAGCCT TTGTACTCAT GTATTGGAAT
181 AGCAATGTCA CTTATGTATA ATAGTATGGA CTTATGCTTG TTTAAATCTT TCTTTGCATT
241 CCCAAAAAAA AAAAAAAA

```

>MC14

```

1 CCCGGCATAA CATAGAGGGA AGCAAATGGT TCCACAGGGA TGCGTCCTCC CACCTGAGGG
61 ATGCGTTCTT GCATCCCCCA GCACGGGGGG ACGACATGGG GGATGTTTGC CCCACCCCC
121 CTTTTTGGGG ACGGCAGGGA GCCGTTTGCA GGGATGGCTA AGGCCTACGA CTTCCCGTCC
181 CCCGGGACAT CCCCTTTTGT GCATCCTCGG GGACGGTTGG GCATCATGGG GGACGCTCAA
241 GCTGACCCTA GGGACGACTA GGCATCCCCC ATGACGCCCC GCTATCCCC ACGGTTGGGT
301 GTCATGGGCA AACTTAAGAA CATAAAAAA AAATTCTGTT CTCCTTTGTT GCTAAACATT
361 ACTATCTCTG CTAATGCTAC TGAAAAACATA AATAAGTATT TAGTATTTAC TATCTCTGCT
421 ATTGGTGACC ATTTATGCCG GG

```

>MC13

```

1 CATACCGTGG CTAGAGGCAG TTCGTGATAC TATCGTAGAC CNTATGATTG AAGGCCTNNG
61 CAGAAGTTAT TGCATCACGG CTAGAAACCC GGGCAAAAGA AGGTGAACAC TTTATGTCTC
121 CATCCCTTCT GCAATCCCAG ATAGATTTAC TACAGACTGA TGATACAGAA GGCATATTTT
181 TCATAGATGC AACATTGAGC TCTGACCTTA CTGTGAAGAA TATCCAAAGG AAACCTTCAG
241 ACTCTCAATT GATATCTTGA ATGGTATAGT TGTGTTTCAT GGAAATAATA TATGGTTATG
301 CTTCTTGCCA AAAAAAAAAA AA

```

>MC14,2

```

1 CATACCGTGG AGAAACACA TTTGGCAATG AGGATTTGTT TCCTCAATGC TAGATATGCT
61 GAAGAAACAG ATTTGSTAGA AAATGAAATT GCAGTGAGAA GATTGATTGT GAGACAAATT
121 GAACTATTTT GAACAGAGTA TTTCTTTTCT GATTTAAACT GTTGAATTC GCTTTAATCA
181 TTTACAAAAG TTATTTAGAC AACAAAGTTG TATAGGAGTC ATTTGTAAAT AACCCTCTG
241 TTCAAAGACA AGATGATACT ATTTGTGCTT TGAATGTAA ATTCTATATA ATTATCAAGC
301 ATTTGTGCAA AAAAAAAAAA A

```

>MC15

```

1 CATACCGTGG ACAACAACCTT GCAGTGCAAT GACGTTTCT GATAGTTCAA TTTTAGCGGA
61 TCTCCGAAGG ACATGAAGAA AATATTCCGC CAAATGACA TGTAACAGGC CGTGGACAGT
121 GGACAACCTG CTGTGAAAGG ACGTTTGTG AAGGTTAAAT TTTAGCAGAC CTCTGAAGGA
181 TATGATGTGA AAGAAAAATT AACAGATATC TGAAGGACGT TTTGTGGAAG AAAATTTGCC
241 GATCGGGTGT ATAATCTTGA AATAGGAGCA CAATAAATCA TGTGGATTTA CTACTGCAA
301 AAAAAAAAAA

```

>MC16

```

1 ATGTAAGTATA TAAATTAGTA CATCTGAAAC TCATCAAAGC CTGGAAGTAT ACATGAAAGC
61 TGTACTTCCA ACTACTTGTG TGCCACTCAT AATGTGATAC ATATTCCATT TATTGTATCC
121 AATCAGAGTG ATGTACAAAG AAAGCAAAAG GCAAATTCTT TCAGAAGAAA GTGCCTTCTG
181 GAGGCTGCGC CAACTTCCTG TTATGAGAAG TTGACATCTC TCTTTTCAAC TGTGTGAGAA
241 TATCTTCCAC GGTATGA

```

>MC6

```

1 CATACCGTGG AAAGGATCAA GAAAGCTCTC AACTGTGAAA ATACTTGAAT GAACCTTTTT
61 CTGTTTGGG ACTGAAACGT TTCATTCCAT CTTTTCATGC CGACTAAAAT AGATAGCGAG
121 TATATAGTTG TTAATCTCAT TAGATGGAGC CTCAACTTAA CTTGTTTCTT CTATTAGATG
181 GAGTCTCTCA ACTCAACTTG TTCAACTGTT AAGAGAATTG AGAGTCAAGA GCGCACCACA
241 CGCTCTCCTT GTGTGGTGGT GAGGTGAAGT GAAGAGAGTG AAGAATGTTG TCTGAATTTG
301 TGCTTTCACT TCACCCCTAT GCAAGGAAAG TGGTTCGGGT ATTGACTTTC CAACGACATG
361 AGGAATATAT TTCCCCTTTT CGTTAGCGGC AAGGGCAAAA CGCATTGTAT TCTGTAATTT
421 GACAGAGAGA TACTCAAAAC CTCTTCTTG TTGCCAAAAT TAAATTTGAA TTCTAAAAAA
481 AAAAAAAAAA

```

>MC7

```

1 AAGCCCGAGG GTTTTAAAGA GAGAACGAAG GAGAGGGGTT TGGTCATCTG GGGCTGGGCA
61 CCGCAGCTTC TAATTCTTTC CCACCCTTCC GTGGGTGCCT TCATGAGTCA CTGCGGATGG
121 AACTCTACCC TTGAGAGTGT CACTCTTGGA GTCCCTATAA TTGCATGGCC TCTGCATGCA
181 GAGCAGCACT TCAATTCCAA ATTAGTAGCT GAGTTGGGTG TGGGAGTTCA GATTGCGCAA
241 CATAGAGATG GCATTCCAGA CGAGGGAAAA GTGGAGGAGG TCCTAGAGCT AGTGTTAAAC
301 AACAAGAGAG GCGAAGAGAT GAGAAGAAGC GCAGAGAAGG TGAAGGAGCT AGCAAGAAAT
361 ACTTTCCAAG ATGGGGGATC CGTCGAAAAC TGATATGGAA GCTTTTGTGTA AGCGAGATGC
421 GTAAGCTGCA GGTGCGGGGA AAAACGACAT AGAGAGCCTA ATCAATGGAA GCTGTGATCC
481 CAAACACCAA ATTATTTCTT TTGATTGTTT TTTATATATA GAAGAATTAA TTACATTTAT
541 GAAGATTTAA AATTTGTAACT TAAGTTATGT TTAATCCTGT ACCGAAAAGA AACACTTGTC
561 CCCTTGAGAA TAATATTACC ACAATTTCTA CTGGCAAAAA AAAAAAAAAA

```

>MC14,3

```

1 AAGCCCGAGG CCAGAAGGAA GGGTTGGTGT TGATCTACGA CACAAAGCTG CAGGAATGGT
61 CCAGAGGACC CGATTTGCCT TTTGTTAGGA ATGGCGCCAC CTGCGCTGTG GTGGAATGTT
121 AATAAATCAT CCTTATGTAA TGGTAAAGAT TTTAAATCA TTGCAGGCAG GCAGGCCAG
181 TCATTATTTT CTCTTCAGCT CACCCCGAAT CTGAAGCCTT GATCAGCAGA TATTGCAAGA
241 TGTGTTTAC AGTGCCCATG AGGTAGAGCT TCTATGTGAC ATTGAACGAT TTACATCGAT
301 GGTATGTAT GTTGGTCTGT CCCTTGTGT GCTCTTCAGA TCTGATTTCC CTTAAATAT
361 TTAAGGGCCT AAAATGTAGG AGTTCCAAGG CCTAGAGATT TGATTTATTG GGCACAAAAA
421 AAAAAAA

```

>MC15,2

```

1 AAGCCCGAGG TAAAGAAATC TCGAAGAATC GAAGAGCGGA TCTTAGTGCC CTACTATGAC
61 CGCCTGGGAA AAATGCAAGA TTTCGTCATC ACGAGCAGTG ATCTAGAAAA GGTGCGTCGA
121 GAAATCGACT CCGTCCTATC AAAGGTCTCT CCTGAGAACC CGTGGACTGT GATTACTAT
181 TCTTACTTGT ACTGGTATTT GTGTACCCCA GTACACCCTT GTCCAGAATT GGTGGCCGTT
241 GTAGCCAAAC ATTATGACCC CTTAACCCGG AATGTCCGAA ATGCTAAAGG TGATGTGTTG
301 TTTAATATTT CGTCGGAGAC TGTTGAGAG GCTTTCACTT GCCGGCGAAC TCCCCTGCA
361 GGAGATATCC AAAAAAAAT TTCCACGCGA GAACAGGATG AAAGATATAC CTCTCGGGC
421 TTA

```

>MC16,2

```

1 AAGCCCCGAGG ATTAAGCGGA TCCACTTGCA ATTAGGGTAA ATTTTAGAGT TTTTGTTCCTCA
61 TTTCCTTTTT AACGTTGTTG GGTATCTGTT TTAGTTTCGG GTAGACTGTT GGGTTACGAA
121 CAGAGGGATT GGGGAGGCCT TAGGGTTTCC GTGATTTTGA CTTCAGGCCT CGACATGGCT
181 CTGGTCAGAC GATTTCTGTA GATTTTGTGAT AATTATTATT ATGACAAAAT GCTTATATGT
241 ATACATTAAT TGATCCGGTG GAGAAATAGG AAGAAAAATG TGAGAAGCGA TGCACGTGTT
301 GGTGTGAATG GTTTATTTTT ATTCACGCGT TGGATGGCAA AAAAAAAAAA A

```

>MM9

```

1 CCCGGCATAA TGGCAATAAA GGCAGAAGAG TTGTTGAAAC CCATCTCCTC AAGGGAAGAA
61 GTGCCAGTCT GTGTACATGG AACTTATCTG AAGCATTGTA AGTCAATTAA AAAGGAGGGC
121 CTCAAAAGCA TGGGAAGGCT TCATATCCAC TTTGCAACGG GTCTAGCCAA GGAGGGCGGT
181 GTAATCAGTG GAATGCGGAG CAGCTGTGAA GTTGTCATAC ATTTGGATGT GCAGAAGTAT
241 TTAGAAGATG GACTAAAGCT CTACCAGTCT GAAAATGGGG GTGATTTTAG CTGAAGGTAG
301 CAATGGGTGT AATACTACCC AAATATTTTG CAAAAGTTAC AGGAGATTCT GAAGAAAAAG
361 TTACAAAAT TATGTGAATA GGGGTGCACC CACTTTTAA GTAGGAAGCA A

```

>MM11

```

1 CCCGGCATAA AATGGAAGT CACCAAGTTT TTGGTGGACA AAGATGGAAA TGTGATTGAG
61 AGATATGCGC CTACTACGTC TCCATTGAAG ATTGAGAAAG ATATAAAGAA GCTATTGGGA
121 GTTGCCCTAAT ACTTTGAGGA GCAAAGTATT GTAGCTTTTC TATTTGAAA TAGTATTGGA
181 GGAGAGAGCA GAAACAATTT ATGTTGACAT GATTCTAGTT ACTAGTAAA GAGATTGTGC
241 ACTGCTTTTA GCAGTCTTGT TGTTAGTCAT TGAGAATGAA TATTACTATT GCTTAGATGT
301 TTTATTATAT GTGATATAGT TTATTCTACA TCTTAATAAG GGGGATTATT ATGCTTTTGT
361 TACTTTTTGG TACAGTGCAA CCTGGATGGT TTCTCAAGGG AGGATGAATG TTAATTTTGT
421 TATGGGTGGA TGGATATCTT CCTTCTCTT GAATCCACTC TGGGATTCTT ATTTTAGAAA
481 AACTGTATGG GGGTTGCTCT GCATATATCT GGAAAGATT TTTAAATTCA CAAAATGGT
541 CCTGTGAGAT ATTTGCCA

```

>MM17

```

1 CCCGGCNGAA TAGATTGTAA CGTCTGAAC CTGATCAGGA ACTGCTTATT CCGTGTGTAA
61 ATCTCCATCA GTCACAAGTC AAGAATATTA CAGAACTCAC AACATTCAAT CGTGATTGGA
121 TGTGAACTT GAATAGAGCA TGGGAACAA GGAAGATTTT GAGGTTTGT CAGTCTTTT
181 TGTACAGGAA GGAATTGTT ACAGTCAAGT ATTTATATTT TTCAGGGAGA TTTGTAAACT
241 GCTGTGCTTT GCACACAATT TTCGCTCATC CTCTAAATGA CTGTTGGAGG CAACAAAACC
301 ATGTTAGGAG TCAAATGGAT TGAGCCTTTT GTCTCTGCC TATGGTCTTA GTTTCTGTAA
361 GGCAGGTACC TCTTTTTATG TACATATGGG CTCTACTCAA GGGCAACAAA CTTTTTGCC
421 TTGGGCTTTT TTAGCCTTCT GAGATGTTTA TTCGATCTGA TACCAAGGTT TATTTCTTGA
481 CCAAAAAAAAA AAAAAA

```

>MM8

```

1 CATACCGTGG CTTGTTGAAA AGTACATGAA AAAGGAGATC AAGGTGGATG AGTACATTAC
61 ACACAATTTG AACTCGACC AAATCAATGA AGCATTCCAT CTGATGCATG GTGGGAAGT
121 CTTGCGGGTT GTACTGAAGA TGAATGCCAC TTCAGGAAAT CTTTAACTCC ATTGAATTTT
181 GAAAGTTGAG GCCCATAGAT GCTAGACTAT GTTTTCTCG GGGCGAGGGA AATATGACTC
241 TAGGGCATA GATGCGACTA TGTTTTCTT CAATGACGGA AATATGACTC CAGGGAGGTA
301 AAAGATTTGT GGGATTTTGT TTTTTACGA ACCTTGATA AAATGAAAAT CAAGGTTGGC
361 AAATGTTAAT AACTTAGTGG AGTGCATGAC AAATGATGCT TTAGAGCTCT GTTATATATT
421 ATTATCATTT GTGTGCAGCA TATAATACTC ATAATTGGCA AAAAAAAAAA AA

```

>MM3

```

1 AAGCCCGAGG ACCCAGAACC TGTTTCCAAT GATTTTTTGA AGCTCTTCTT TGATGGTGCC
61 CATTGTAAGA ATGGTGTCCG GGCTGGGGTA GTACTTGTTG CGCCTTCTGG AGAACAGAAG
121 GTGTATTCTT ACCGACTAAC ATGGAGCTAC ATGAACAATG CAGCCGAGTA TGAAGCCCTA
181 TGTTTAAGGC TTAAGAAGGC AGAAAAGCTC GGTATTAAAC AGTTGCAGAT ATTCAGCGAT
241 TTTGAGCTAA TTTGCCGCCA AATAACCAAC AAGTGTTGTG CAAAGCAACA CTATTTGAAA
301 GCTTACCGGA ATAAGGTTG GGAATTGTC GAATCCTTCA CAGCCTTAAG CGTGCAGACC
361 ATCCCTCGGG CTTA

```

>MM1

```

1 AAGCCCGAGG GGAATACGT GACAAAAATA AAGGGAACGG TGGACCTAT GCTGGTAACC
61 AGGTGGTCAC AGCTTTAACA ATCATCACCA ATGTTAAGCA ATATGGTCCC TACGGTATTG
121 GAGGCGGAAC TGCTTTTGAA TCCAAGGGTG ATGGAGAGGT TGTGGTTTC CATGGACGAA
181 ATGGAGATAA CTTGGATCAA ATTGGAGTTT TCACATTCCA CGTTTAGAAA CATATCCTAG
241 CTTTGTAGTA TAGCTATGGC CATGCGTGTC TGGGTGGTGG TATCTTTTCC TATGTCTGTG
301 TCAACCATAT CTAGTAAATA AATAAAACAA GAATGGCTAT GGCCATGTGT GTCTGTGTTG
361 CAAAAAATAA AAAAAA

```

>MM11,1

```

1 AAGCCCGAGG GGAAGATGGC ATTTTGCCTT TGGAAGCCTG TATCCTGACT CCGTATACGT
61 CGGATTCCTT TCGGGGTTCC TACCGCCGGC GCGAACGGCT TGGCTTGTTA GCGTGC GGCG
121 GTGGCCCGAG GGAAGATGG TTGGTGCCTT CTATTCGGTT GTGTGCTTGC TTCCATTTGG
181 TTTTCTGCGA ACAGCGGCTG GCTTATACGA GTTGTCTGTT GGGTCGGACT GAACCTTGGC
241 CTCGGGCTTA

```

>EM3

```

1 CCCGGCATAA ATGGCAGAAG CAAGATGGTG GTTTCCTGTT TTATTAATTT TAAATTCAAG
61 TTTGTTGAGT TTTATTGGTG GTTCCCTCT TTTGTTCTAT TAATTTTAAA TTCAAGTTTG
121 TTGAGTTATA TAGGTGATTT TGTCTTATGA TTTGTTGTAG GTAGGCTTAA AGTTTGTTAA
181 GTTTTATAGG TGATTTTGTG TTATGATTTG TTGTAAGTAG GCTTAATTTT CTTAAATTAA
241 GTAGGATTTT AAGTACGATT TGGTGTAGGT AGGCATAATT TCCATAAATT AATTTCTGAA
301 TTATGAATGA GTTTTTTTCAT TATGTAGTAG GAATAACAAA TCATGGGGAG AAGTTGGGCT
361 GGTTAAGTCT ATCTATCTAG TTTATGAAGG GGAACATTTT TCTGAATTAT GAATGAGTTT
421 TTTCAATATG TAGTAGGAAT AACAAAATCA TGGGGGAGAA

```

>EM11

```

1 CCCGGCATAA TAGTCACCGG CATGGAAGTC GCCGAAATTG ATGGCGCTCC TCGAATGGGC
61 CCTACGTTTG GAGCAATGTT GGTGTCTGGG CAGAAGGCAG CACATTTGGC ACTGAAAGCT
121 CTCGGCCTGC CAAATGCCCT GGATGGGTCT TTGAATGTGC AGCAACTAAC TTTGGCTTCT
181 GCTGAGGATG AGAACACTGC ATCTGCTTAA TTTCTATCCT TGTGATGGCG GCGTACAATT
241 TGTTTATTTA TCTATAAATA GAGTTTGCTT TTACTATGTA GGTATTGCTG GACCTTCGAT
301 TCCATGTAAT AAACAGGCAT AGTTTTTAAT ATAATGATTG GACCTTCGAT TCCATGTAAT
361 AAACACGCAT AGGTTTTAAT ATAATGATTG GGA

```

>EM1

```

1 CATACCGTGG AAAGGAGACA GAAGAGAATG ATCAAGAACC GCGAGTCGGC TGCTCGATCA
61 AGAGCAAGAA AGCAGGCGTA CACAAACGAG CTGGAGAATG AGGTGATGCA GCTGAAAGAG
121 GAGAATGAGA GGCTTAAAAA GCAGCAGTTC CTGGAGAAAC TGCTGCCTTC TATACCACCA
181 CCTCAACCAA AGCATACTCT TCGGAGGACC AACTCTGCTT CTTTTTGAGA TGGGTTTTGTA
241 AACGAGCATA ATTCCTATAA TTTTCCAAAG GGCTTCGTGG CACAGTTCCA CTAGTGTACC
301 TGTAATCTTT TTGTATCTCT ATTCAAATG ATAAGCTATG TAGTCCTAGA GTATTTGGAG
361 ATGAGGTTTA TGACCTTAGG ACGGATCTGA AGATTATTCC GGAGCATTTA CGAATAATGT
421 AGGATAGCAG AACCAGAAGA AGCTATACAC GTTTTGAAGT TTTGGCATGT AAGAAGAGCC
481 TGACTTTGAT GCCATGCCAG AATATGCCTA CAAGTCTCTG CATGCTACAC TGTAATTCAT
541 CATTGCATCT CTTGTGGTCC AGGATGACCT AA

```

>EM5

```

1 CATACCGTGG CCATAGTCCT GTTTATGACA GGTATCGCAG GCGATCGCCA ACAAGACGCT
61 TGAGGAGCTA GGGAGCTGCA ATTGAACTTT TGAAGTATCA TGCTGTTGAA GGGCCATTTC
121 AATATGAGAT ATACATTATA ATTGTTATTA TGCCTTTTAG TGTTAGGATG AAAATTCTGT
181 TTTGAATGGA CAACATGCAG ATTTTCATATG ATGGTAATGA CATTGACTAG GGAAAAATTA
241 ATACATTTTT TGGTCATCTA TGATGCTCTT TGAATCTTTG AGTTTTTCAA AATCACTTGT
301 GTAAATTCTT TGCTGTGTAT ACAATTCCTC CCTAAATTCG CACTATGAGC AATACAATGT
361 TCATCTTATC ACCAGTATTA TGGAAATGGAA TTTTGTGTG GGCACAAAAA AAAAAA

```

>EM9

```

1 CATACCGTGG CCATAGTCCT GTTTATGACA GGTATCGCAG CCGATCGCCA ACAAGACGCT
61 TGAGGAGCTA GGGAGCTGCA ATTGAACTTT TGAAGTATCA TGCTGTTGAA GGGCCATTTC
121 AATATGAGAT ATACATTATA ATTGTTATTA TGCCTTTTAG TGTTAGGATG AAAATTCTGT
181 TTTGAATGGA CAACATGCAG ATTTTCATATG ATGGTAATGA CATTGACTAG GGAAAAATTA
241 ATACATTTTT TGGTCATCTA TGATGCTCTT TGAATCTTTG AGTTTTTCAA AATCACTTGT
301 GTAAATTCTT TGCTGTGTAT ACAATTCCTC CCTAAATTCG CACTATGAGC AATACAATAT
361 TCATCTTGTC ACCAGTATTA TAGAATGGAA TTTTGTGTG GGCACAAAAA AAAAAA

```

>EM10

```

1 CATACCGTGG CGTGCTACAA GGGATTTAGG GATCGAAGTC GTATTCAGAG CCCTGGGAAT
61 CGAGGTCATA TAAAGAAGAA CTGTGATGGT GTCGACTAGA CGGGTGAGTA TGTAATTTCC
121 TACGTACGTA ACGGAGGACG AGAGATTTTT AATCCATTTT TCCTTGCTTT TGGTTTTTCGC
181 GTTTGTTTTT TTAATAGAGG TGGAGTCGTA CGTTGGAAC TGAAGGGCT CTGGGCACGT
241 TACGCGTGCC CTGCACCGCA GGGATTGTAA GTGGCTTATT ATTATGTTAT ATATAAATAT
301 ATATAGGTAG GGTGTGTTCT AACTAGTGGA GCCGTGACCG GGGCTCTGGA TGAATATGGA
361 ATTATATATG ATAAATATTT GAATGTAATG CCTATATATA AAAAAACAG TT'TAATCTGT
421 AGAGTAATTG TGGCCAAAAA AAAAAA

```

>EM5.2

```

1 AAGCCCGAGG CCACCAAAGT AGCGAAGCCC CTCAAAGCTC CTGTCAAAAA GCCCGCTTCT
61 GCCAAACCTA AGGCGAAGCC AAAGTCTGCC GCTAAGAAGA CAGTGTCTAA GCCCAAGGCT
121 GCCGCTATAC CTCCCACCAA GGCGGCTAAG GTCTCTAAAG CTTCCAAAGA TGTGCCCGCA
181 GTAGCTAAGA AGGTAGAGAA GGCACCAGCT AAAAAAGGTGG CCGCCCTAA AAAGGCGGTT
241 CCTGCAACGA AGCCCGTCAA GAAGCCGGCA AAGAAGGCGG CTGTCCCAA GCCGAAGTCT
301 GTTAAAAAGA CCCCCAAAAA GGTCAAGAAG TGACAGAATG GCGGCTCTAT CTTTTCACGTG
361 TAAATTATCT TCACAGCTGA CATATCATGT GCATTCGCTA TGTGTTTTAG TTAAGATTCA
421 GACATGTAAT TGAGCATTTT ATACCTTTGC CAAAAA AAAAA

```

>EM6

```

1 AAGCCCGAGG ATTATAAAAA TAAGAAAGGA AAGCAAGGGG GAGATCAAGG TCAGCAACCT
61 GGAAAGAGTA CTACTAAAAC AGATAGTTAT AAAAAAGGAA AATTCGGTAA AAGCATGCAT
121 TCTACCAAAC GAAATAATAA GGGAGTCTCT AGTAAGCGAT CTGGTGGAAG TATTGCAGAT
181 AAAATCCTGT CTCAAAAGAG AAAGGGTTCT GCAGGGGCCA CACGTGCAA TAAAAAGAGA
241 AAAGGAAGTA ACTAGTGTCT GTTAGGATT CATGTCATTT GAGTTTGTG ATATATATTT
301 CGAAGTATTG GAGATATGAA CTCAACACAG AATGTGAGAA AAGACCGTTT AATGCACTGG
361 TGACTATATT CTCAAGTCAG AATTTGCATT TATAGCCATG ACGTCTGCTT GGTAAATGCA
421 GAGCATTTTC TGGCTCCTTT TTGGTACATA CTCTGTTATG ACAGTTAAAG AGAATAATTT
481 TTTATTGCCA AAAAAAAAAA AAA

```

>EM8

```

-1 AAGCCCGAGG ACATTGGAAC CCTCATGAAT CTGGAAGAGC TCAATATCAG CAGCAATTTT
61 AATGCTTTTCG TGGCTCTCCC GGAATCGATA GCGGTCTGT GCAGTCTCAG AGAGCTGGAT
121 CTGAGTTACA ATCAGATAAG TGCCCTGCCG GATTCCTTCG TGGGTCTGGA AAATCTTCGA
181 CATCTCAAGG TGGACGGCAA CCCTCTGGTG GTACCTCCGC TAAAGTGGT AGAAATCGGC
241 GTCGAAGCCG TGAGGGAGTT CATGGCCAG AGGTTGCACA TAAAGTACG GACCCGTGGA
301 GGCCATAAAA GTTTGTTGAC GAAGTTAGCG AGGGGAATCA AATGGGGTAA AACGTAACCG
361 TAAGAAAAAT GTGGAATATG GAATTGAAGA GTATTGGGTA CCGTTCGTTG GAGGAAGAAA
421 ACGTGGGTTT TCGTTCAGCT CCTCCTCGGG CTT

```

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À INTRODUÇÃO GERAL

- Allende, J.E.; Allende, C.C. (1995) Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* 9, 313-323.
- Anil, S.V.; Harmon, A.C.; Rao, S.K. (2000) Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinase during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. *Plant Physiol.* 122, 1035-1043.
- Battistutta, R.; Sarno, S.; Moliner, O.; Marin, O.; Issinger, O-G.; Zanotti, G.; Pinna, L.A. (2000a) The crystal structure of the complex of *Zea mays* α subunit with a fragment of human β subunit provides the clue to the architecture of protein kinase CK2 holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 267, 5184-5190.
- Battistutta, R.; Sarno, S.; Moliner, O.; Papinutto, E.; Zanotti, G.; Pinna, L.A. (2000b) The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2*. *J. of Biol. Chem.* 275 (38), 29618-29622.
- Carvalho, P.E.R. (1994) Espécies florestais brasileiras recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira. Embrapa-CWPF. Colombo PR. pp. 70.
- Chatthai, M.; Misra, S. (1998) Sequence and expression of embryogenesis-specific cDNAs encoding 2S seed storage proteins in *Pseudotsuga menziessi* [Mirb] Franco. *Planta* 206, 138-145.
- Chatthai, M.; Kaukinen, K.H.; Tranbarger, T.J.; Gupta, P.K.; Misra, S. (1997) The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: regulation by ABA, osmoticum and metal ion. *Plant Mol. Biol.* 34 (2), 243-254.

- Ching, T.M. (1963) Fat utilization in germinating Douglas fir seed. *Plant Physiol.* 38, 722-728.
- Ching, T.M. (1972) Metabolism of germinating seed. In Kozlowski, T.T. (ed). *Seed Biology*. Academic Press, New York, pp. 103-218.
- Ciceri, P.; Gianazza, E.; Lazzari, B.; Lippoli, G.; Genga, A.; Hoscheck, G.; Schmidt, R.J.; Viotti, A. (1997) Phosphorylation of *Opaque2* changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell* 9 (1), 97-108
- Dogra, P.D. (1978) Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. *Phytomorphology* 28, 307-322.
- Dong, J.Z.; Dunstan, D.I. (1999) Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 39, 859-864.
- Dure, L. (1993) The lea proteins of higher plants. In: Verma D.P.S. (ed). *Controls of plant gene expression*. pp. 325. CRC press, Boca Raton, FL.
- Espindola, L.S.; Noin, M.; Corbineau, F.; Côme, D. (1994) Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Science Res.* 4, 193-201.
- Espunya, M.C.; Martínez, M.C. (1997) Identification of two different molecular forms of *Arabidopsis thaliana* casein kinase II. *Plant Science* 124, 131-142.
- Favre-Duchartre, M. (1958) Ginkgo, an oviparous plant. *Phytomorphology* 8, 377-390.

- Frattoni, M.; Morello, L.; Breviario, D. (1999) Rice calcium-dependent protein kinase isoforms OsCDPK2 and OsCDPK11 show different responses to light and different expression patterns during seed development. *Plant Mol. Biol.* 41, 753-764.
- Gallie, D.R.; Le, H.; Caldwell, C.; Tanguay, R.L.; Hoang, N.X.; Browning, K.S. (1997) The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat. *J. Biol. Chem.* 272, 1046-1053.
- Gaubier, P.; Raynal, M.; Hull, G.; Huestis G.M.; Grellet, F.; Arenas, C.; Pages, M.; Delseny, M. (1993) Two different *EM-like* genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol. Gen Genet.* 238 (3), 409-418.
- Gifford, E.M.; Foster, A.S. (1989) Comparative morphology of vascular plants. 3rd Edition. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Goldberg, R.B.; Barker, S.J.; Perez-Grau, L. (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56, 149-160.
- Guerra, M.P.; Silveira, V.; Santos, A.L.W.; Astarita, L.V.; Nodari, R.O. (2000) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE. In S. Jain, P. Gupta e R. Newton (eds). Somatic embryogenesis in woody plants, V. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hakman, I. (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during development and somatic embryogenesis. *Physiol. Plant* 87, 148-159.
- Handro, W. (1986) *Araucaria* (*Araucaria spp.*) In Y.P.S. Bajai (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Tree I, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 310 — 315.

- Hernández, G.M.; Murphy, A.; Taiz, L. (1998) Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression pattern in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 387-397.
- Jarvis, S.B.; Taylor, M.A.; MacLeod, M.R.; Davies, H.V. (1996) Cloning and characterization of the cDNA clones of three genes that are differentially expressed during dormancy breakage in the seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *J. Plant Physiol.* 147, 559-566.
- Joly, A.B.; Hermógenes, F.L.F. (1979) As principais Culturas Brasileiras. Botânica Econômica. Editora da USP, SP.
- Klimczak, L.J.; Schindler, U.; Cashmore, A. (1992) DNA binding activity of the *Arabidopsis* G-Box binding factor *GBF1* is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *The Plant Cell* 4, 87-98.
- Krasowski, M.J.; Owens, J.N. (1993) The ultrastructural and histochemical post-fertilization megagametophyte and zygotic embryo development of interior spruce. *Can. J. Bot.* 71, 98-112.
- Kvarnheden, A.; Tandre, K.; Engstrom, P. (1995) A *cdc2* homologue and closely related processed retropseudogenes from Norway spruce. *Plant Mol. Biol.* 27, 391-403.
- Larsson, A.S.; Svenson, M.; Liao, H.; Engstrom, P. (1998) A *homeobox* gene with potential developmental control function in the meristem of the conifer *Picea abies*. *Plant Biol.* 95, 15118-15122.
- Le, H.; Browing, K.S.; Gallie, D.R. (1998) The phosphorylation state of the wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A, and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination. *J. Biol. Chem.* 273, 20084-20089.

- Leal, I.; Misra, S. (1993) Molecular cloning and characterization of a legumin-like storage protein cDNA of Douglas fir seeds. *Plant Mol. Biol.* 21, 709-715.
- Lee, Y.; Lloyd, A.M.; Roux, S.J. (1999) Antisense expression of the CK2 α subunit gene in *Arabidopsis*. Effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiol.* 119, 989-1000.
- Lima, A.R.; Capobianco, J.P.R. (1997) Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação, Instituto Socioambiental, Brasília, pp. 118 (Documentos do ISA nº 004).
- Lindsay, K.; Topping, J.F. (1993) Embryogenesis: a question of pattern. *J. Exp. Bot.* 44, 359-374.
- Litchfield, D.N.; Luscher, B. (1993) Casein kinase II in signal transduction in cell cycle regulation. *Mol. Cell Biochem.* 127, 187-199.
- Longhi, S.J. (1993) Floresta ombrófila mista. Trabalho acadêmico de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, setor de ciências agrárias, Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Curitiba, pp. 61.
- Mattos, J.R. (1994) O pinheiro brasileiro. Vol. 1 (segunda ed). Artes Gráficas Princesa Ltda. Lages, SC.
- Misra, S. (1994) Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis and seed germination: Biochem. and molecular advances. *Seed Science Res.* 4, 357-384.
- Mukhopadhyay, K.; Singh, M. (1997) Endogenous protein phosphorylation and protein kinase activity in Winged bean. *Phytochem.* 46, 455-459.

- Mullen, R.T.; Gifford, D.J. (1997) Regulation of two lobolly pine (*Pinus taeda* L.) isocitrate lyase genes in megagametophytes of mature and stratified seeds and during postgerminative growth. *Plant Mol. Biol.* 33, 593-604.
- Müssig, C. Kauschmann, A.; Close, S.D.; Altmann, T. (2000) The Arabidopsis PHD-finger protein SHL is required for proper development and fertility. *Mol. Gen. Genet.* 264, 363-370.
- Newton, C.H.; Flinn, B.S.; Sutton, B.C.S. (1992) Vicilin-like seed storage proteins in the gymnosperm interior spruce (*Picea glauca/engelmannii*). *Plant Mol. Biol.* 20, 315-322.
- Nuccio, M.L.; Thomas, T.L. (1999) *ATSI* and *ATS3*: Two novel embryo-specific genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 39, 1153-1163.
- Owens, J.N.; Merris, S.J.; Misra, S. (1993) The ultrastructural, histochemical and biochemical development of the post-fertilization megagametophyte and the zygotic embryo of *Pseudotsuga menziessi* [mirb.] Franco. *Can. J. Forest Res.* 23, 816-827.
- Owens, J.N.; Moulder, M. (1984) The reproductive cycle of interior Spruce. Information Services Branch, B.C. Ministry of Forests, Victoria B.C.
- Parcy, F.; Valon, C.; Kohara, A.; Misera, S.; Giraudat, J. (1997) The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *Plant Cell* 9 (8), 1265-1277.
- Plana, M.; Itarte, E.; Erija, R.; Goday, A.; Pagès, M.; Martinez, M.C. (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.* 266 (33), 22510-22514.
- Pinna, L.A. (1990) Casein Kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochem. Biophys. Acta* 1054, 267-284.

- Prywes, R.; Dutta, A.; Cromlish, J.A.; Roeder, R.G. (1988) Phosphorylation of serum response factor, a factor that binds to the serum response element of the c-FOS enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7206-7210.
- Reitz, R.; Klein, R.M.; Reis, A. (1978) Projeto Madeira de Santa Catarina. Separata 28 de sellowia-Herbário Barbosa Rodrigues, Itajai.
- Rizzini, C.T. (1976) Árvores e madeiras úteis do Brasil. EDUSP. São Paulo, pp. 294.
- Sabala, I.; Elfstrand, M.; Farbos, I.; Clapham, D.; Arnold, S.V. (2000) Tissue-specific expression of *Pal8*, a putative lipid transfer protein gene, during embryo development in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol. Biol.* 42, 461-478.
- Shimizu, J. Y.; Oliveira, Y.M.M. (1981) Distribuição e usos dos recursos genéticos da araucária no sul do Brasil. EMBRAPA-URPFSC. Documento 4. Curitiba, PR.
- Singh, H. (1978) Embryology of gymnosperms. *Encyclopedia of Plant Anatomy*, Vol.10. Germany Gebruder Borntraeger pp 302.
- Thomas, T.L. (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell* 5, 1401-1410.
- Tranbarger, T.J.; Misra, S. (1996) Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir. *Gene* 172, 221-226.
- Trewavas, A.; Gilroy, S. (1991) Signal transduction in plant cells. *TIG* 7, 356-361.
- Wirkner, U.; Voss, H.; Lichter, P.; Weitz, S.; Ansorge, W.; Pyerin, W. (1992) Human casein kinase II subunit alpha: sequence of a processed (pseudo) gene and its localization on chromosome 11. *Biochem. Biophys. Acta.* 1131, 220-222.

Wobus, U.; Weber, H. (1999) Seed maturation: Genetic programmes and control signals
Curr. Opin. in Plant Biology 2, 33-38.

Yamamoto, K.K.; Gonzalez, G.A.; Biggs III, W.H.; Montminy, M.R. (1998)
Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of a nuclear factor CREB.
Nature 334, 494-498.