



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALINE DIAS BRANDÃO

“Isolamento de cDNAs parciais de quatro genes do metabolismo de carboidratos e análise de seus padrões de expressão durante a fase inicial do desenvolvimento de plântulas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.)”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) ALINE DIAS BRANDÃO e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

CO-Orientador: Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**B733i** Brandão, Aline Dias  
Isolamento de cDNAs parciais de quatro genes do metabolismo de carboidratos e análise de seus padrões de expressão durante a fase inicial do desenvolvimento em plântulas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) / Aline Dias Brandão. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Marcos Silveira Buckeridge, Michel Georges Albert Vincentz.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Hymenaea courbaril*. 2. Expressão gênica. 3. Xiloglucano. 4. Carboidratos. 5. Plântula. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Vincentz, Michel Georges Albert. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

**Título em inglês:** Isolation of four partial cDNA sequences of genes of the carbohydrate metabolism in jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) and their pattern of expression during early seedling growth.

**Palavras-chave em inglês:** *Hymenaea courbaril*; Gene expression; Xyloglucan; Carbohydrates; Seedling.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Marcos Silveira Buckeridge, Marília Gaspar Maïs, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Helaine Carrer, Eduardo Purgatto.

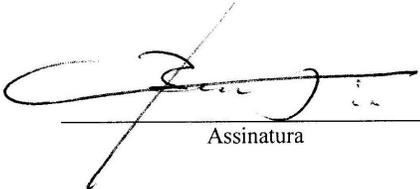
**Data da defesa:** 27/02/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

**Campinas, 27 de fevereiro de 2008.**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)

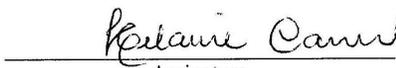


Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Assinatura

Profa. Dra. Helaine Carrer



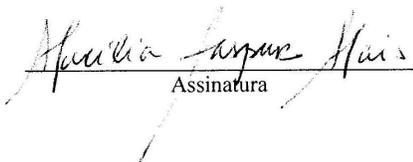
Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Purgatto



Assinatura

Profa. Dra. Marília Gaspar Maïs



Assinatura

Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Assinatura

*Aos meus pais, irmãos e a verdadeira amizade.*

*“O importante é se esforçar para transformar as pedras de nosso caminho, em degraus para se transpassar os obstáculos que nele surgem”.*

## *Agradecimentos*

*Ao Prof. Dr. Marcos Buckeridge, pela oportunidade e orientação.*

*Ao Prof. Dr. Michel Vincentz, pela oportunidade e orientação.*

*Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi por permitir o uso da casa de vegetação e por disponibilizar a BOD para os experimentos de luz.*

*À Dra. Maria Cristina C. G. Marcondes, por disponibilizar o laboratório, computadores e o software para a quantificação densitométrica de todos os experimentos de RT-PCR.*

*Ao prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pelas valiosas sugestões na elaboração final do abstract.*

*À técnica Sandra L.M. Silva pelo suporte técnico prestado para o desenvolvimento desse trabalho.*

*Aos membros da pré-banca, em especial ao Prof. Dr. Marcelo C. Dornelas e a Profa. Dra. Marília G. Mais, pelas valiosas sugestões.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade.*

*À Lilliam A. S. Panagio, secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, pela amizade, ajuda e valiosas assistências administrativas prestada para a finalização deste trabalho.*

*Às secretárias do CBMEG (Tania, Sandra e Andressa) pelas inúmeras assistências administrativas prestadas para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À UNICAMP, pelo espaço concedido para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao serviço de segurança da UNICAMP pelas valiosas e inúmeras escoltas noturnas para a execução desse trabalho.*

*À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel, pela amizade, pelo incentivo, aprendizado e grande apoio prestado para o desenvolvimento inicial e finalização deste trabalho que tanto contribuíram em mais uma etapa de minha formação acadêmica e profissional.*

*Aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram e apoiaram para a idealização deste trabalho, estando presentes sempre em minhas realizações.*

*Aos amigos e colegas de curso Estela Maria Gonçalves, Maristela Miyamoto, Tania Márcia de Queiroz, Leandro C.L. Verde, Luis Eduardo V. Del Bem, Diana S. Branco, Luana Cheven, Talita N. Terra, Jose Pedro Fonseca, Jurez P. Tomaz, pelo grande apoio, paciência, incentivo, solidariedade, auto-confiança, aprendizado e principalmente amizade, que sempre serão de grande valia para o meu crescimento humano e profissional.*

*Um agradecimento muito especial a amiga Estela pela grande ajuda, solidariedade, aprendizado e sábias palavras que tanto me incentivaram para a finalização deste trabalho. Muito grata por tudo e em especial por sua importante e valiosa amizade !*

*À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do projeto na forma de bolsa concedida a A.D.B e principalmente pela credibilidade e nova oportunidade.*

*Ao CNPq pelo financiamento.*

*A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.*

## SUMÁRIO

<b>1. Lista de Abreviaturas</b> .....	10
<b>2. Lista de Figuras</b> .....	11
<b>3. Resumo</b> .....	18
<b>4. Abstract</b> .....	20
<b>5. Introdução</b> .....	22
5.1. Estabelecimento da plântula.....	22
5.2. Jatobá.....	24
5.3. Parede celular.....	26
5.4. Xiloglucano.....	27
5.5. Mobilização e degradação do xiloglucano durante o desenvolvimento da plântula.....	31
5.6. Enzimas envolvidas na degradação e mobilização do xiloglucano .....	36
5.6.1. $\beta$ -galactosidase – BGAL.....	36
5.6.2. Xiloglucano endotransglicosilase - XET.....	36
5.6.3. Invertase neutra/alcalina – IN/IA.....	40
5.6.4. Sacarose sintase – SUS.....	41
5.7. Relação entre tecidos fonte e dreno.....	42
5.8. Auxina.....	44
<b>6. Justificativa</b> .....	47
<b>7. Objetivo</b> .....	49
<b>8. Material e métodos</b> .....	50
8.1. Material biológico.....	50
8.2. Extração, manipulação e análise dos RNAs.....	51
8.3. Síntese de cDNA e definição dos <i>primers</i> específicos.....	53
8.3.1. Síntese de cDNA.....	53
8.3.2. Obtenção, alinhamento e filogenia das seqüências e seleção de <i>primers</i> específicos para os genes que codificam para a XET, $\beta$ -galactosidase, invertase neutra, sacarose sintase e actina em leguminosas.....	53
8.4. Clonagem do cDNA.....	57
8.5. Seqüenciamento e análise das seqüências.....	59
8.6. RT-PCR semi-quantitativo.....	59
8.7. Densitometria.....	59

8.8. Construção das árvores filogenéticas.....	61
<b>9. Resultados</b> .....	64
9.1. Otimização da extração de RNA total e da síntese de cDNA.....	64
9.2. Desenho de <i>primers</i> para obtenção de cDNA parciais da XET, $\beta$ -Galactosidase, invertase neutra/alcalina, sacarose sintase e actina.....	64
9.3. Análise filogenética das seqüências parciais de cDNAs para a $\beta$ -galactosidase (HcBGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (HcXTH1), invertase alcalina (HcAlkIN1) e sacarose sintase (HcSUS1) do jatobá.....	66
9.4. Análise densitométrica e caracterização da expressão diferencial por RT-PCR semi-quantitativo dos genes da BGAL1, XTH1, AlkIN1 e SUS1 nos cotilédones, folhas, hipocótilos e raízes do jatobá .....	77
9.4.1. Cotilédones.....	77
9.4.2. Folhas.....	82
9.4.3. Hipocótilos.....	87
9.4.4. Raízes.....	92
<b>10. Discussão</b> .....	97
10.1. Caracterização dos cDNAs parciais do jatobá.....	97
10.1.1. $\beta$ -galactosidase (BGAL1).....	97
10.1.2. Xiloglucano endotransglicosilase (XTH1).....	99
10.1.3. Invertase alcalina (AlkIN1).....	100
10.1.4. Sacarose sintase (SUS1).....	103
10.2. Análise da expressão gênica no contexto do desenvolvimento das plântulas do jatobá...104	
10.2.1. Controle pela auxina.....	105
10.3. Influência da luz.....	111
<b>11. Considerações finais</b> .....	120
<b>11. Conclusões gerais</b> .....	123
<b>12. Referências Bibliográficas</b> .....	125
<b>13. Anexos</b> .....	148
<b>14. Declaração</b> .....	170

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

BMY3 –  $\beta$ -amylase

DH5 $\alpha$  – Linhagem de *Escherichia coli* utilizada para clonagem

EC – *The enzyme commission number*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

GBSSI – *Granule-bound starch synthase I*

Glc – Glucose

JTT – Tipo de algoritmo

kD – KiloDalton

MOPS – *Morpholinepropanesulfonic acid*

NJ – *Neighbor joining*

PIN – *Pin-formed (PIN) auxin efflux facilitator family*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Sh1 – Gene que codifica a sacarose sintase em milho

TAE – *Tris acetate EDTA buffer*

UDP – Uridina difosfato

Var. – Variedade vegetal

XG – Xiloglucano

*M-MuLV – Moloney Murine Leukemia Virus*

*AMV – Avian Myeloblastosis Virus Particles*

## 2. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** *Hymenaea courbaril* L. Distribuição geográfica, segundo Lee & Langenheim (1975) (A); espécime adulto (B); plântula com 100 dias (C); sementes (D); vagem (E). (pg 25).

**Figura 2.** Estrutura do xiloglucano de reserva. Cadeia principal do tipo celulósica (glucoses ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4), com ramificações com unidades de xilose (ligadas as glucoses através de ligações  $\alpha$ -1,6) e galactose (ligadas as xiloses através de ligações  $\beta$ -1,2) proposto por Kooiman (1960) (A). Modelo de bloco estrutural a partir da nomenclatura proposta por Fry et al. (1993). A cadeia principal é esta representada na forma de anel aromático em branco, constituída por glucoses. As xiloses estão representadas na forma de anel aromático preenchido e o trissacarídeo está representado em anel em branco com uma ligação entre uma glucose, uma xilose e uma galactose (B); bloco estrutural do xiloglucano do jatobá com a presença de 5 unidades de glucose além das xiloses e galactoses (C). (pg 29).

**Figura 3.** Modelos baseados na atividade de hidrolases durante a degradação e mobilização do xiloglucano de reserva. Esquema da mobilização do xiloglucano de reserva, a partir da atividade de duas enzimas que degradam o xiloglucano ( $\beta$ -galactosidase e XTH) e duas enzimas que mobilizam a sacarose (invertase e sacarose sintase) (A); modelo proposto por Tiné et al. (2000) para a degradação do xiloglucano de reserva em *H. courbaril* a partir da atividade de quatro hidrolases (B). (pg 32).

**Figura 4.** Esquema do mecanismo de transglicosilação. Moléculas de xiloglucano são representadas por linhas contínuas e os oligos, provenientes da hidrólise do xiloglucano pela ação da XET através do mecanismo de transglicosilação estão representados por linhas pontilhadas. (pg 39).

**Figura 5.** Alternância cíclica da localização da proteína PIN, dependente de auxina, entre a membrana plasmática e um compartimento endossomal. Os inibidores do transporte de auxina como TIBA e NPA, interferem na localização das proteínas PIN1 nas regiões basais da

membrana plasmática após a lavagem com BFA, sugerindo que esses inibidores de transporte interferem na localização da PIN1. Linha pontilhada = Filamento de actina (pg 46).

**Figura 6.** Plântulas de *H. courbaril* com 45 dias após a embebição, submetidas a diferentes tratamentos. Plântula controle (12 horas luz /12 horas escuro) (A); detalhe (B); plântulas crescidas em luz contínua por 20 dias (C); detalhe (D); plântulas crescidas no escuro contínuo por 20 dias (E); detalhe (F); plântulas sem a parte aérea (G); detalhe (H); plântula com 30 dias sendo preparada para aplicação do NPA (I); detalhe da aplicação do NPA (J); plântulas tratadas com NPA (K); detalhe (L). As imagens que mostram os detalhes são relativas às plântulas no dia da coleta para cada um dos tratamentos. (pg 52).

**Figura 7.** Esquema geral utilizado para obtenção de cDNA de interesse a partir de dois pares de *primers* parcialmente sobrepostos em domínios/motivos conservados. DCP = Domínio Protéico Conservado. Primeiro *primer* direto (1); segundo *primer* direto, que é parcialmente sobreposto ao primeiro (2); primeiro *primer* reverso (3) e segundo *primer* reverso, que é parcialmente sobreposto ao primeiro (4) reverso. (pg 56).

**Figura 8.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da actina do jatobá (Hc-Ac1) (Ver Anexo 2) com a espécie com a espécie *Glycine max* (leguminosa) que apresentou menor *E-value* (8e-119). (pg 60).

**Figura 9.** Relação evolutiva da  $\beta$ -galactosidase de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distâncias calculadas a partir do alinhamento da posição 181 a 332 em *A. thaliana* (At-BGAL4). As seqüências utilizadas foram a do jatobá (Hc-BGAL1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (At-GAL1 - AT3G13750; At-GAL2 - AT3G52840; At-GAL3 - AT4G36360; At-BGAL4 - AT5G56870; At-GAL5 - AT1G45130; At-BGAL6 - AT5G63800; At-GAL7 - AT5G20710; At-BGAL8 - AT2G28470; At-BGAL9 - AT2G32810; At-BGAL10 - AT5G63810; At-BGAL11 - AT4G35010; At-GAL12 - AT4G26140; At-BGAL13 - AT2G16730; At-BGAL14 - AT4G38590; At-GAL15 - AT1G31740, At-BGAL16 - AT1G77410; At-BGAL17 - AT1G72990; *Oryza sativa* (10 membros), leguminosas (CanBGAL-4 - CAA09457; CanBGAL-3 - CAA06309; *Chickpea* - AJ012687), tomate (AJ012796;

AF020390; AJ012798), maçã (L29451), morango (AJ278705; AJ278703). Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*. (pg 67).

**Figura 10.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da  $\beta$ -galactosidase parcial do jatobá (Hc-BGAL1) (Ver Anexo 2) com a espécie de leguminosa (*Cicer arietinum*) filogeneticamente mais próxima. (pg 69).

**Figura 11.** Relação evolutiva da xiloglucano endotransglicosilase de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distâncias calculadas a partir do alinhamento da posição 87 a 197 em *A. thaliana* (At-XTH5). As seqüências utilizadas foram a do jatobá (Hc-XTH1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (At-XTH1 - AT4G13080; At-XTH2 - AT4G13090; At-XTH3 - AT3G25050; At-XTH4 - AT2G06850; At-XTH5 - AT5G13870; At-XTH6 - AT5G65730; At-XTH7 - AT4G37800; At-XTH8 - AT1G11545; At-XTH9 - AT4G03210; At-XTH10 - AT2G14620; At-XTH11 - AT3G48580; At-XTH12 - AT5G57530; At-XTH13 - AT5G57540; At-XTH14 - AT4G25820; At-XTH15 - AT4G14130; At-XTH16 - AT3G23730; At-XTH17 - AT1G65310; At-XTH18 - AT4G30280; At-XTH19 - AT4G30290; At-XTH20 - AT5G48070; At-XTH21 - AT2G18800; At-XTH22 - AT5G57560; At-XTH23 - AT4G25810; At-XTH24 - AT4G30270; At-XTH25 - AT5G57550; At-XTH26 - AT4G28850; At-XTH27 - AT2G01850; At-XTH28 - AT1G14720; At-XTH29 - AT4G18990; At-XTH30 - AT1G32170; At-XTH31 - AT3G44990; At-XTH32 - AT2G36870), *Oryza sativa* (14 membros), leguminosas (Va-XTH2 - AB086396; VaXTH1 - AB086395) e *Tropaeolum majus*. Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*. (pg 70).

**Figura 12.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da xiloglucano endotransglicosilase parcial do jatobá (Hc-XTH1) (Ver Anexo 2) com a espécie de leguminosa (*Vigna angularis*) filogeneticamente mais próxima. (pg 72).

**Figura 13.** Relação evolutiva da invertase alcalina de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distâncias calculadas a partir do alinhamento da posição 278 a 556 em *A. thaliana* (AT4G34860). As seqüências utilizadas foram as do jatobá (Hc-AlkIN1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (9 membros), *Oryza sativa* (OsNIN1 - AY575558; OsNIN2 -

AY575559; OsNIN3 - AY575560; OsNIN4 - AY575561; OsNIN5 - AY575562; OsNIN6 - AY575563; OsNIN7 - AY575564; OsNIN8 - AY575565) e leguminosa (Lc-inv1 - AJ717412). Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*. (pg 73).

**Figura 14.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da invertase alcalina parcial do jatobá - Hc-AlkIN1 (Ver Anexo 2) com a espécie de leguminosa (*Cicer arietinum*) filogeneticamente mais próxima. (pg 74).

**Figura 15.** Relação evolutiva da sacarose sintase de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distâncias calculadas a partir do alinhamento da posição 429 a 810 em *A. thaliana* (SUS4). As seqüências utilizadas foram as do jatobá (Hc-SUS1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (At-SUS1 - AT5G20830; At-SUS2 - AT5G49190; At-SUS3 - AT4G02280; At-SUS4 - AT3G43190; At-SUS5 - AT5G37180; At-SUS6 - AT1G73370), *Oryza sativa* (6 membros) e leguminosa (SUSY VICFA - P31926; SUSY MEDSA - O65026; SUSY PHAAU - Q01390; SUS *isoform* 3 - CAC32462). Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*. Dicot = dicotiledôneas. (pg 75).

**Figura 16.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da sacarose sintase parcial do jatobá (Hc-SUS1) (Ver Anexo 2) com a espécie de leguminosa (*Medicago truncatula*) filogeneticamente mais próxima. (pg 76).

**Figura 17.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nos cotilédones pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 = Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz. (pg 79).

**Figura 18.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nos cotilédones para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D). (pg 80-81).

**Figura 19.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nas folhas pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 = Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz. (pg 84).

**Figura 20.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nas folhas para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D). (pg 85-86).

**Figura 21.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nos hipocótilos pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 =

Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz. (pg 89).

**Figura 22.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nos hipocótilos para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D). (pg 90-91).

**Figura 23.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nas raízes pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 = Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz. (pg 94).

**Figura 24.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nas raízes para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D). (pg 95-96).

**Figura 25.** Alinhamento realizado com a ferramenta *blast 2 sequences* no serviço do NCBI. Aminoácidos localizados nos domínios conservados. Em destaque, resíduos que caracterizam a invertase alcalina de acordo com Ji et al (2005). Alinhamento dos aminoácidos com a presença dos 10 resíduos da invertase alcalina com a espécie mais próxima filogeneticamente ao jatobá (A). Alinhamento da seqüência parcial de aminoácidos do jatobá com a espécie mais próxima filogeneticamente (Leguminosa) com a presença de 5 resíduos da invertase alcalina (B). Em destaque, os aminoácidos conservados. (pg 102).

**Figura 26.** Padrão de expressão dos genes da  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ GAL1) da xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) e possível consequência para a plântula de jatobá em função da degradação e mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones em resposta a auxina endógena, disponibilidade de carbono e alternância de luz. Cotilédones (A); folhas (B); hipocótilos (C) e raízes (D). Cinza escuro = genes induzidos; Cinza claro = genes reprimidos; Sem preenchimento = genes que possivelmente não sofreram alteração direta dos fatores analisados em relação ao controle. (pg 114).

**Figura 27.** Modelo para o controle da degradação e mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones em resposta a auxina endógena e a alternância de luz durante a fase inicial do desenvolvimento em plântulas de *H. courbaril*. Cotilédone e folha (A); hipocótilo e raiz (B). (pg 118-119).

### 3. RESUMO

Os jatobás (espécies pertencentes ao gênero *Hymenaea*, família Leguminosae) apresentam grande plasticidade fisiológica. Diferentes espécies e variedades de jatobás se adaptaram a praticamente todos os biomas tropicais brasileiros, incluindo a Floresta Amazônica, e o complexo de ecossistemas que é formado pela Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. Espécies do gênero possuem como principal reserva de carbono do embrião o xiloglucano, um polissacarídeo similar à celulose, mas solúvel em água devido a ramificações com xilose e galactose. Após a germinação, o xiloglucano dos cotilédones é completamente degradado, produzindo monossacarídeos livres que são rapidamente metabolizados à sacarose. A produção das enzimas de hidrólise do xiloglucano nos cotilédones é controlada pela auxina proveniente da parte aérea da planta, porém, não se sabe exatamente como esse mecanismo é controlado. O objetivo deste trabalho foi isolar cDNAs (DNA complementar) parciais dos genes da  $\beta$ -galactosidase - BGAL e xiloglucano endotransglicosilase ou endo- $\beta$ -1,4-glucanase – XET, relacionados com a degradação do xiloglucano e duas enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose, a invertase neutra/alcalina - IN/IA e a sacarose sintase – SUS, para tentar avaliar possíveis formas de controle da expressão gênica envolvidas nos mecanismos do catabolismo do xiloglucano em cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril*. Primeiramente, foram desenhados *primers* com base em seqüências de espécies da família Leguminosae existentes em banco de dados para os respectivos genes. A partir daí foi possível clonar seqüências parciais de todos os genes. Utilizando a técnica de RT-PCR semi-quantitativa (*semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*) foram realizadas análises da expressão nos cotilédones, folhas, hipocótilos e raízes no 45º dia após a embebição (quando ocorre a taxa máxima de mobilização do xiloglucano) a cada 6 horas em um período de 24 horas. As plântulas foram analisadas sob as seguintes condições: I) plântulas crescidas em condições naturais; II) excisão da parte aérea; III) aplicação do inibidor do transporte polar de auxina (NPA – ácido naftil ftalâmico); IV) crescimento em luz contínua e V) crescimento em escuro contínuo. Observou-se que existem, basicamente, três formas de controle em resposta a auxina. Nos cotilédones, os genes responsáveis pela degradação do xiloglucano BGAL1 e XTH1, possivelmente são regulados em resposta a auxina endógena e a variação de luz, enquanto que os genes responsáveis pelo metabolismo da sacarose, AlkIN1 e SUS1 possivelmente são regulados pela

disponibilidade de carbono. Nas folhas, hipocótilos e raízes o padrão de expressão variou de acordo com a disponibilidade de carbono proveniente da degradação do xiloglucano de reserva nos cotilédones. Os resultados apresentados relatam a primeira descrição do isolamento dos cDNAs, permitiram a caracterização do padrão de expressão de genes chave, envolvidos no estabelecimento de uma espécie arbórea nativa do Brasil e em conjunto com os dados de atividade enzimática possibilitaram observar que a mobilização de reserva no jatobá ocorre a nível transcricional. Através do seqüenciamento, também foi possível observar que a invertase neutra clonada da raiz do jatobá apresentou resíduos de aminoácidos que a caracterizam como invertase alcalina (AlkIN1). Diante do padrão de expressão observado para a  $\beta$ -galactosidase, XTH, invertase alcalina e sacarose sintase no presente trabalho, é possível sugerir um modelo para o controle da degradação e mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones sob influência da auxina endógena e da variação de luz, durante o desenvolvimento inicial nas plântulas de *Hymenaea courbaril*.

#### 4. ABSTRACT

The jatobas (species belonging to the genus *Hymenaea*, family Leguminosae) display large physiological plasticity and as a consequence they have great adaptive capacity to several habitats. Different species and varieties of jatobas have adapted practically to all Brazilian tropical biomes, including the Amazon Forest and the complex of ecosystems that is formed by the Atlantic Forest, the Savannah and the Caatinga. Species of this genus contain xyloglucan as the main storage of carbon in their seeds. Xyloglucan is a polysaccharide similar to cellulose, but water soluble due to the branching with xylose and galactose. After germination, xyloglucan is completely degraded, producing free monosaccharides that are quickly metabolized to sucrose. The production of xyloglucan hydrolytic enzymes in the cotyledons is known to be controlled by auxin that comes from the shoot. However, it is not known how the mechanism is controlled. The aim of the present work was isolate partial cDNAs of the genes  $\beta$ -galactosidase (BGAL) and xyloglucan endo-transglycosylase or endo- $\beta$ -1,4-glucanase (XET) xyloglucan degradation genes and two other genes related to sucrose metabolism (neutral/alkaline invertase - NI/AI and sucrose synthase - SUS) in order to try to evaluate possible forms of control of gene expression involved in the catabolism of xyloglucan in cotyledons of *Hymenaea courbaril*. Primers were designed on the basis of extant sequences obtained from databases for all genes. We guided the search by sequences obtained from species of the Leguminosae. We cloned partial sequences of genes coding BGAL, XTH, NI and SUS. Semi-quantitative RT-PCR (semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction) was used to analyze expression at the 45<sup>th</sup> day after imbibition (when the rate of mobilization is maximal) in cotyledons, leaves, hypocotyls and roots every 6 hours during 24 hours. The experimental treatments were 1) seedlings grown under natural conditions; II) seedlings with top shoot excised; III) seedlings treated with auxin transport inhibitor (NPA – naphthyl phthalamic acid); IV) seedlings grown in continuous light and V) seedlings grown in darkness. We observed that there are three mechanisms of response to auxin. In cotyledons the genes related to xyloglucan degradation, BGAL1 and XTH1, showed responses by auxin and light in the plant. The genes related to sucrose metabolism, AlkIN1 and SUS1, have shown responses to carbon flux. In leaves, hypocotyls and roots the gene pattern change according carbon source comes from product of storage xyloglucan degradation in cotyledons. Our results revealed the first description of cDNA isolation and allow characterize

pattern of genes involved native Brazilian tree species establishment. Our results and enzymatic data obtained by other researchers suggest a transcriptional control of storage mobilization in jatoba. From the sequencing data, it was also possible to observe that neutral invertase (NI) gene cloned from roots of jatoba contains aminoacid residues that characterise the NI as an alkaline invertase (AlkIN1) instead. Based in degradation and mobilization of xyloglucan storage in cotyledons we propose an expression control model for  $\beta$ -galactosidase, XTH, alkaline invertase and sucrose synthase in all analyzed tissues during early development in seedlings of *Hymenaea courbaril* by endogenous auxin influence and light alternance.

## 5. INTRODUÇÃO

### 5.1. Estabelecimento da plântula

Quando uma semente germina na floresta, é extremamente importante que a plântula que se desenvolve atinja a luz em intensidade suficiente para que ocorra o que é chamado de estabelecimento da plântula. Uma plântula estabelecida na floresta é um indivíduo que apresenta auto-suficiência em relação à captação de carbono, água e nutrientes. Se o estabelecimento ocorre com sucesso, a plântula pode crescer até o estágio de “planta jovem” e ficar por um longo tempo nesta condição, até que o aparecimento de uma clareira propicie a oportunidade para um novo passo que é passar do estágio juvenil para se tornar um adulto. Como árvore, o indivíduo adulto poderá florescer e produzir novas sementes, fechando o ciclo de vida característico de sua espécie (Buckeridge et al. 2000a). Segundo Stebbins (1974), o estabelecimento da plântula consiste no ponto mais frágil do ciclo de vida de uma planta devido à vulnerabilidade a estresses bióticos e abióticos.

Uma pequena plântula no chão da floresta terá que atingir a luz e para que obtenha sucesso nesse intento há um programa genético que a plântula mantém que é chamado de *skotomorphogenesis* (daqui em diante chamado de escotomorfogênese) (Alabbadí et al. 2004). Este é o programa genético que faz com que a plântula apresente estiolamento, alongando rapidamente seu hipocótilo ou epicótilo e mantendo o gancho plumular. Segundo estes autores, um processo de inibição da fotomorfogênese é mais derivado em termos evolutivos, uma vez que, plantas menos derivada não apresentam estiolamento. Assim, o programa de escotomorfogênese provavelmente apareceu durante a evolução como uma solução para o estabelecimento de plântulas em ambientes menos iluminados, como o chão das florestas (Alabbadí et al. 2004).

Os genes relacionados à fotossíntese são inibidos e as plântulas mantêm etioplastos ao invés de cloroplastos e quando estas atingem uma intensidade luminosa adequada, cujo sensor principal é o fitocromo, que avalia a razão entre vermelho e vermelho extremo no ambiente, os etioplastos se transformam em cloroplastos, inicia-se a síntese de pigmentos e proteínas dos fotossistemas e a fotossíntese se estabelece, completando a transição entre os programas de escotomorfogênese e a fotomorfogênese (Alabbadí et al. 2004). Durante o estiolamento, os

gastos energéticos da plântula são mínimos, uma vez que o alongamento do hipocótilo ou epicótilo ocorre com base na expansão celular e não na divisão celular. No entanto, ao atingir o nível de luz adequado, a necessidade de montagem do sistema fotossintético e a produção de folhas irão demandar maior quantidade de nutrientes e energia. Até que a planta atinja o nível considerado autotrófico, será importante o uso de reservas que muitas sementes trazem da planta mãe (Buckeridge et al. 2000b).

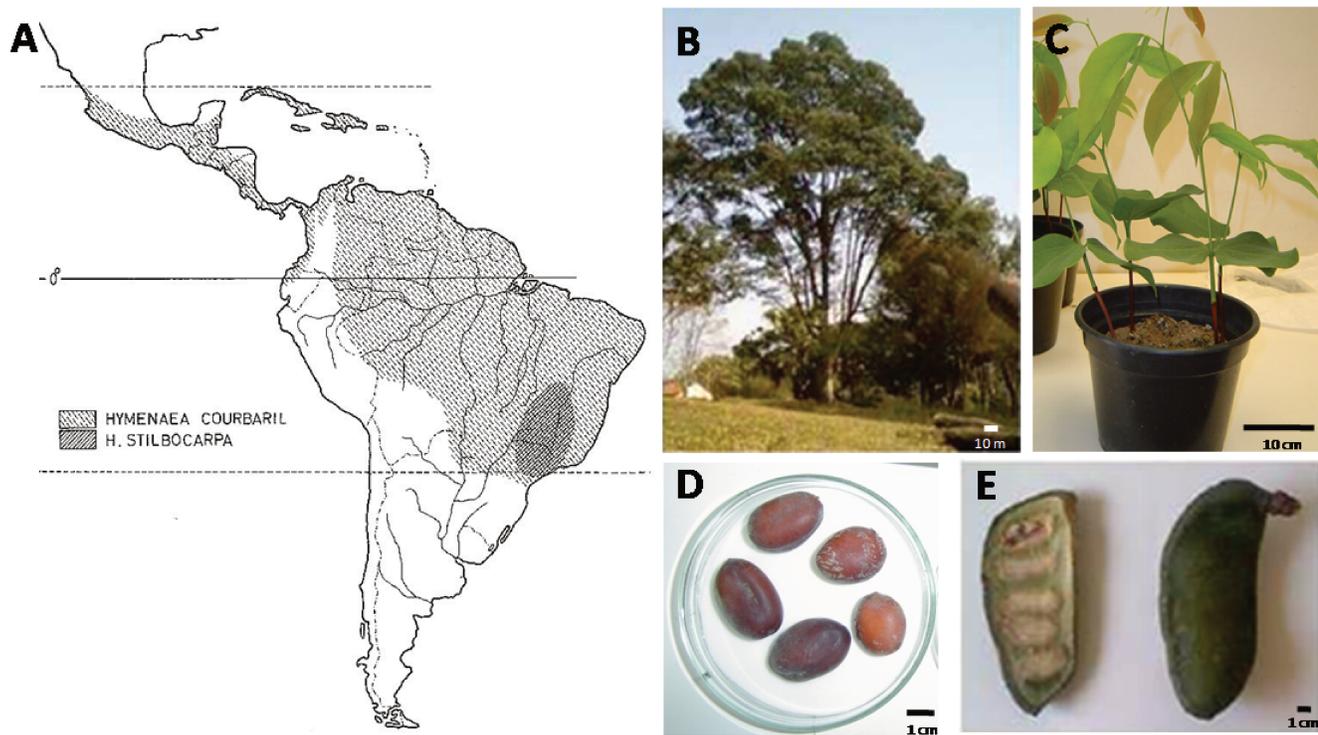
Buckeridge et al. (2000b) classificaram o estabelecimento das plântulas nas florestas tropicais em relação à forma como estas utilizam suas reservas para o estabelecimento da plântula. Algumas espécies podem apresentar grandes quantidades de reserva de carbono nas sementes e irá utilizá-la para completar o sistema fotossintético em uma plântula mais robusta. Estas são chamadas de maturoeutróficas, isto é, possuem embriões com grande quantidade de reserva. Em contraposição a esta estratégia, estão as espécies maturooligotróficas, que possuem poucas reservas nas sementes e ao desenvolverem rapidamente cotilédones fotossintéticos atingem o estágio autotrófico. Estas espécies são geralmente adaptadas a ambientes mais iluminados (ou menos escuros), característicos do processo de sucessão ecológica. Por outro lado, as maturoeutróficas são adaptadas a ambientes mais escuros da floresta, as quais já se encontram em um estágio mais avançado da sucessão ecológica.

As sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) são do tipo maturoeutróficas, contendo grandes quantidades de reservas (Figuras 1C, D). Elas produzem, em cerca de 60 dias, plântulas relativamente grandes de até 30 cm de altura. Nas florestas neotropicais, onde o jatobá ocorre, a semente, ao germinar, tem que manter o programa de escotomorfogênese funcional até ultrapassar a camada de folheto e atingir um nível de iluminação muito reduzido. Segundo Santos & Buckeridge (2004) as plântulas são encontradas na floresta crescendo em iluminação correspondente a  $22 \mu\text{moles de fótons m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Ao ultrapassar o nível do folheto, as plântulas expandem grandes folhas primárias (os eófilos) à custa da mobilização das reservas cotiledonares (Ver Figuras 1C, 5A, K e J).

## 5.2. Jatobá

*Hymenaea* (subfamília Caesalpinioideae, tribo Detarieae) é um gênero originário da África e amplamente distribuído, podendo ser encontrado desde a América Central até a América do Sul, principalmente na Bacia Amazônica (Lee & Langenheim 1975) (Figura 1A). Plantas do gênero apresentam características terapêuticas. A partir do caule é possível extrair uma resina utilizada pela medicina popular no tratamento de enfermidades como bronquite e doenças estomacais (Marsaioli et al. 1975; Corrêa 1984). Atividades analgésicas e anti-inflamatórias também já foram relatadas (Neves et al. 1993). “As frutas de Jatobá”, como são chamadas, possuem grande quantidade de farinha protéica com fibras solúveis e insolúveis além de grande quantidade de amido, que podem ser utilizadas na preparação de aperitivos com alto teor de fibras (Chang et al. 1998).

Espécies do gênero *Hymenaea* são conhecidas principalmente por possuírem diterpenos do tipo *enatio-labdanoic* extraído do caule e *ent-halimane* extraído da semente (Nakano & Djerassi 1961; Cunningham et al. 1973, 1974; Khoo et al. 1973; Marsaioli et al. 1975; Imamura et al. 1977). A espécie *H. courbaril* é considerada uma das espécies com maior sucesso adaptativo, devido a um caráter dominante tanto em florestas tropicais como em regiões sombreadas e com escassez de água (Gerhardt 1993; Souza & Válio 1999) (Figura 1B, C). Entretanto, pouco se sabe sobre as estratégias utilizadas pelas sementes da espécie para sobreviver (Santos et al. 2004) (Figura 1D). A espécie também vem despertando interesse de outros estudiosos a fim de investigar a composição da resina extraída da vagem (Nogueira et al. 2001) (Figura 1E). Outra particularidade da espécie é que as sementes armazenam grande quantidade de xiloglucano, que pode chegar até 45% do seu peso seco. O xiloglucano fica armazenado na parede celular, cuja função é dar o suporte inicial para o crescimento e desenvolvimento da plântula até sua fase autotrófica (Buckeridge & Dietrich 1990; Tiné et al. 2000).



**Figura 1.** *Hymenaea courbaril* L. Distribuição geográfica, segundo Lee & Langenheim (1975) (A); espécime adulto (B); plântula com 100 dias (C); sementes (D); vagem (E).

### 5.3. Parede Celular

A parede celular em plantas superiores exerce um forte suporte mecânico que ajuda a definir a forma das células e a morfologia da planta, além de protegê-la contra ataque de patógenos (Pilling & Hofte 2003). A deposição e a modificação das células da parede exercem um papel essencial durante o desenvolvimento e crescimento, além da resposta das plantas ao ambiente e a interação com simbiotias e patógenos (Carpita & Gibeaut 1993). A parede é constituída por agrupamentos macromoleculares heterogêneos que circundam as células. Entre os polímeros presentes estão os polissacarídeos que representam 80-90% da parede, proteínas e compostos fenólicos (Carpita & Gibeaut 1993; Chanliaud et al. 2002; Yong et al. 2005).

Nas plantas superiores podem ser distinguidos dois tipos de parede, a parede primária, que é depositada durante o crescimento celular e precisa ser mecanicamente estável e suficientemente extensível para permitir a expansão celular evitando a ruptura das células durante a pressão de turgor (Thompson 2005). A parede primária consiste principalmente em três domínios distintos compostos por celulose, celulose ligada a hemiceluloses e pectinas (Reiter 2002). A parede secundária é depositada após o término do crescimento celular permitindo uma estabilidade mecânica para os tipos celulares especializados como elementos do xilema e células do esclerênquima (Reiter 2002). Essa parede é representada por compostos de celulose e hemicelulose impregnados com lignina (Reiter 2002). De acordo com o tipo de polissacarídeo, a parede celular das plantas pode conter centenas de proteínas distintas. Muitas dessas proteínas são consideradas estruturais (Cassab 1998), enquanto que outras participam da remodelação e renovação da parede celular (Wong et al. 1990). Em outros modelos de parede, sugere-se que esses polímeros formam três domínios independentes: celulose-hemicelulose, pectinas e proteínas (McCann & Roberts 1991). Carpita & Gibeaut (1993) propuseram a separação da parede em dois grupos. Isto foi proposto baseado no fato de que polímeros estruturalmente diferentes poderiam desempenhar funções análogas na parede de diferentes grupos taxonômicos. A parede do tipo I é típica das dicotiledôneas, caracterizada pela grande quantidade de pectinas e por apresentar o xiloglucano como principal hemicelulose. A parede celular do tipo II está presente nas monocotiledôneas da família Poaceae, onde a hemicelulose predominante é o arabinoxilano ou o glucano de ligação mista (1,3), (1,4) - $\beta$ -glucano, e é caracterizada pela baixa proporção de pectinas.

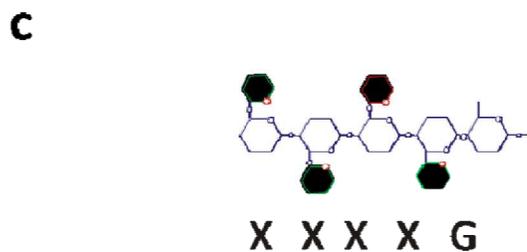
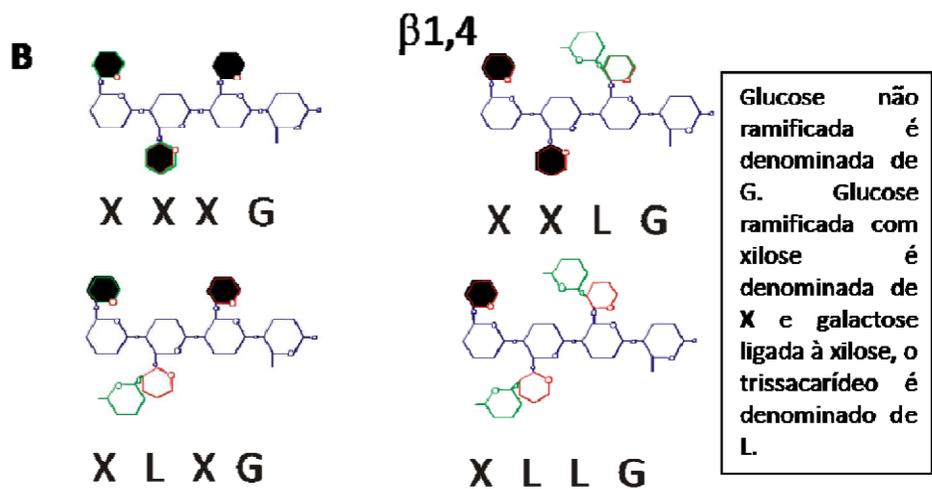
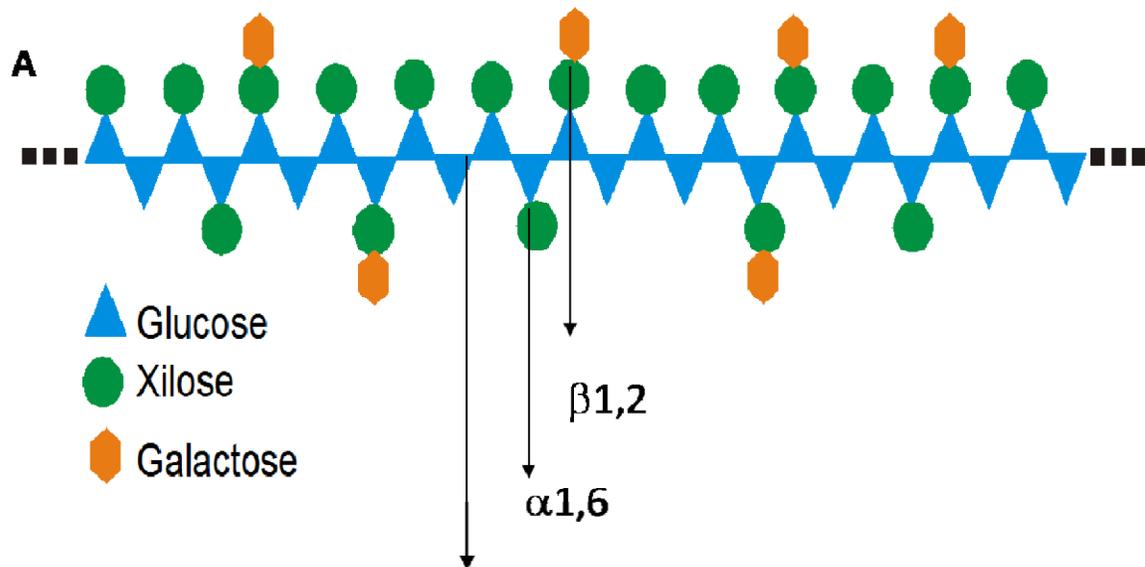
A interação, o arranjo e o metabolismo dos componentes da parede celular têm sido objeto de vários estudos, numa tentativa de esclarecer o envolvimento em processos biológicos como o crescimento, desenvolvimento, a expansão foliar, a adaptação ao ambiente e o acúmulo de substâncias de reserva na semente (Hayashi 1989). O material da parede celular é de grande importância na nutrição animal e humana além de ser uma fonte natural de fibras para a indústria têxtil e na fabricação de papel (Cosgrove 2005). De acordo com McCann et al. (2007) 10% dos estudos sobre genomas realizados em plantas são direcionados para a biogênese da parede celular. Os papéis de cada uma das famílias de polímeros na determinação das características da parede celular ainda são bem pouco esclarecidos, portanto, é de grande interesse e importância a análise da conservação estrutural e mecânica da parede, sobretudo da estrutura e função das hemiceluloses que constituem a parede celular (Wilder & Albersheim 1973; Chanliaud et al. 2002).

#### **5.4. Xiloglucano**

Os xiloglucanos são polissacarídeos armazenados na parede celular de sementes e têm sido alvo de muitos estudos por constituírem a principal hemicelulose das dicotiledôneas e estarem envolvidos em processos fisiológicos e mecânicos que ocorrem na parede celular durante o crescimento e desenvolvimento da planta (Fry et al. 1992; De Silva et al. 1993; Buckeridge et al. 2000a, b; Keegstra & Raikhel 2001; Steele et al. 2001; Suda & Giorgini 2003; Saura-Valls et al. 2006).

De acordo com Levy et al. (1997) moléculas de xiloglucano exercem um importante papel na definição das propriedades estruturais da parede celular das plantas e na regulação do crescimento e desenvolvimento das dicotiledôneas. O xiloglucano é composto por uma cadeia principal do tipo celulósica (glucoses ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4), com ramificações com unidades de xilose (ligadas as glucoses através de ligações  $\alpha$ -1,6) e galactose (ligadas as xiloses através de ligações  $\beta$ -1,2) (Buckeridge et al. 1992). Kooiman (1960) determinou que os xiloglucanos fossem formados por blocos estruturais de um heptassacarídeo (quatro glucoses e três xiloses) com variações nas ramificações e substituições com resíduos de galactose (Figura 2A). Fry et al. (1993) propuseram uma nomenclatura específica para os blocos estruturais de xiloglucano. A glucose não ramificada é denominada de G; a glucose ramificada

com xilose é denominada de **X** e se ocorre uma galactose ligada à xilose, o trissacarídeo é denominado de **L** (Figura 2B). Um estudo comparativo da estrutura fina dos xiloglucanos de reserva de sementes das espécies *Tamarindus indica*, *Tropaeolum majus* e *Copaifera langsdorffii* mostrou que eles apresentam um padrão estrutural similar de oligossacarídeos resultantes da degradação limite. Todos os compostos quase que exclusivamente apresentam quatro glucoses (Glc<sub>4</sub>) XXXG, XLXG, XXLG e XLLG (Buckeridge, et al. 1992). Porém, Buckeridge et al. (1997) observaram que o xiloglucano das sementes do jatobá apresenta um padrão de ramificação único, com a presença de 5 unidades de glucose (XXXXG) (Figura 2C). Este motivo estrutural foi analisado por Tiné et al. (2006), que demonstraram as diferentes posições das ramificações com galactose ao longo dos oligossacarídeos e propuseram menor solubilidade e maior interatividade do xiloglucano com a celulose.



**Figura 2.** Estrutura do xiloglucano de reserva. Cadeia principal do tipo celulósica (glucoses ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4), com ramificações com unidades de xilose (ligadas as glucoses através de ligações  $\alpha$ -1,6) e galactose (ligadas as xiloses através de ligações  $\beta$ -1,2) proposto por Kooiman (1960) (A). Modelo de bloco estrutural a partir da nomenclatura proposta por Fry et al. (1993). A cadeia principal é esta representada na forma de anel aromático em branco, constituída por glucoses. As xiloses estão representadas na forma de anel aromático preenchido e o trissacarídeo está representado em anel em branco com uma ligação entre uma glucose, uma xilose e uma galactose (B); bloco estrutural do xiloglucano do jatobá com a presença de 5 unidades de glucose além das xiloses e galactoses (C).

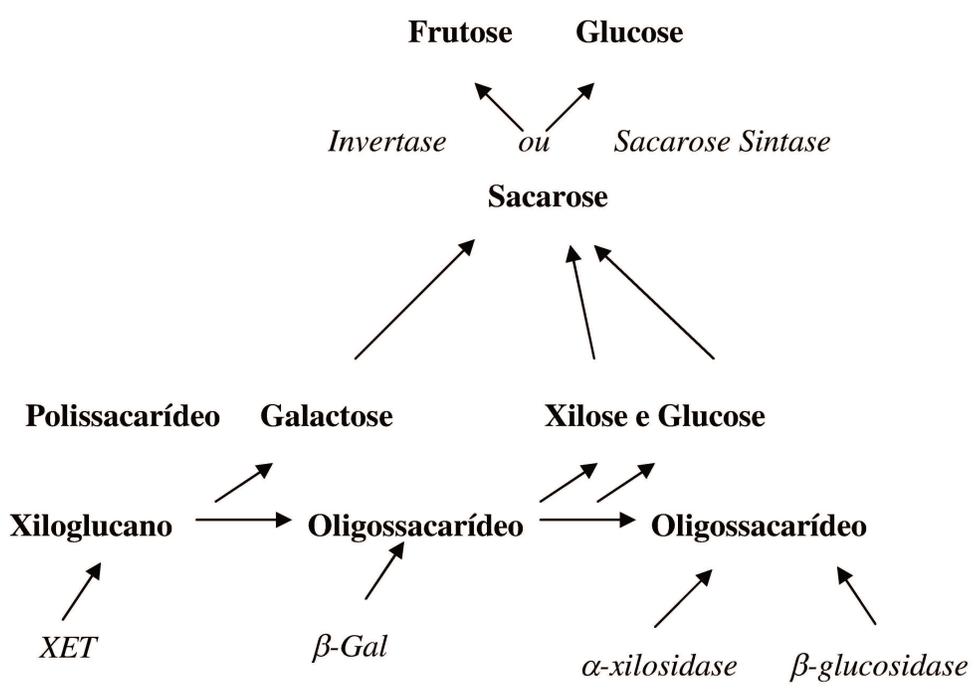
## 5.5. Mobilização e degradação do xiloglucano durante o desenvolvimento da plântula

É importante neste ponto definir os termos degradação e mobilização do xiloglucano. Neste texto, consideraremos degradação o processo em si de ataque das enzimas ao polímero de xiloglucano e sua completa desmontagem até a produção de galactose, xilose e glucose. O termo mobilização será empregado para definir um processo mais amplo, que consiste na degradação do xiloglucano seguida pela transformação de seus produtos em sacarose e o transporte desta e seu subsequente uso em um órgão dreno.

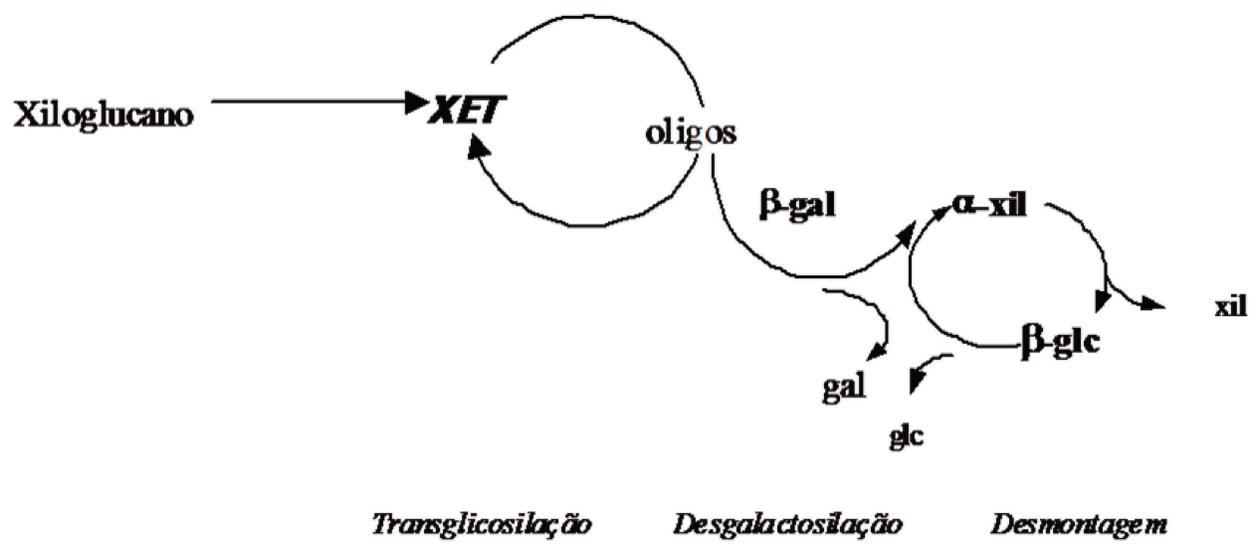
A mobilização de reservas cotiledonares após a germinação das sementes foi relatada pela primeira vez no século XIX em sementes de *Impatiens balsamina*, *Tropaeolum majus* e *Cyclamen europaeum* (Heinricher 1888; Reiss 1889). A função de reserva nos cotilédones foi proposta para sementes de *Tropaeolum majus* (Edwards et al. 1985), *Tamarindus indica* (Reis et al. 1987), *Copaifera langsdorffii* (Buckeridge et al. 1992) e *Hymenaea courbaril* (Tiné et al. 2000). Em todos os casos, os autores demonstraram que a mobilização do xiloglucano *in vivo* é seguida pelo aumento e queda das atividades de quatro hidrolases:  $\beta$ -galactosidase, endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucanase (ou XET),  $\alpha$ -xilosidase e  $\beta$ -glucosidase (Figura 3A). Estudos revelaram que o xiloglucano é mobilizado após a embebição e germinação, quando a parte aérea começa a se desenvolver, proporcionando o aumento da produção de frutose, glucose e sacarose e/ou amido transitório nos cotilédones (Buckeridge & Reid 1994; Tiné et al. 2000; Santos et al. 2004).

Baseados na ação de hidrolases XET,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -xilosidase e  $\beta$ -glucosidase, após a embebição e germinação das sementes Edwards et al. (1986, 1988), Fanutti et al. (1993), Crombie et al. (1998) e Tiné et al. (2000) propuseram um modelo para a degradação do xiloglucano (Figura 3B). Estudos em *H. courbaril* revelam que a XET age principalmente como uma transglicosilase, produzindo oligossacarídeos que são novamente transglicosilados para os polímeros e não se observa degradação do xiloglucano. No entanto, a presença de atividade de  $\beta$ -galactosidase, retirando as galactoses dos finais não redutores dos oligossacarídeos produzidos (ver Alcântara et al. 1999, 2006), rompe o ciclo de transglicosilação, iniciando o processo de desgalactosilação uma vez que os oligossacarídeos desgalactosilados expõem a xilose do terminal não redutor do oligossacarídeo, tornando a molécula um substrato para a  $\alpha$ -xilosidase.

A



B



**Figura 3.** Modelos baseados na atividade de hidrolases durante a degradação e mobilização do xiloglucano de reserva. Esquema da mobilização do xiloglucano de reserva, a partir da atividade de duas enzimas que degradam o xiloglucano ( $\beta$ -galactosidase e XTH) e duas enzimas que mobilizam a sacarose (invertase e sacarose sintase) (A); modelo proposto por Tiné et al. (2000) para a degradação do xiloglucano de reserva em *H. courbaril* a partir da atividade de quatro hidrolases (B).

A ação desta última enzima faz com que a glucose presente no terminal não redutor se torne um substrato para a  $\beta$ -glucosidase. A parte da degradação do xiloglucano que envolve a ação das enzimas  $\alpha$ -xilosidase e  $\beta$ -glucosidase que constitui o processo de desmontagem (Tiné et al. 2000) (Figura 3B). Segundo Alcântara et al. (2006) a  $\beta$ -galactosidase do cotilédone do jatobá é regulada metabolicamente, já que é inibida competitivamente por seu próprio produto (galactose). Isto levou os autores a propor que o processo de desgalactosilação, seja um passo importante no controle do metabolismo de degradação do xiloglucano. A seqüência de passos mostrada na figura 3A constitui um processo interativo que se repete até que galactose, xilose e glucose livres sejam produzidas e utilizadas pelas células cotiledonares para a produção de sacarose, que será transportada e utilizada para o crescimento da plântula. No entanto, não se sabe ainda quais as formas de controle dos genes que codificam as enzimas envolvidas na mobilização do xiloglucano. Existem relatos sobre a atividade da XET e  $\beta$ -galactosidase que foram observadas durante a mobilização do xiloglucano em *H. courbaril* na presença de auxina e em diferentes períodos ao longo do dia (Santos et al. 2004; Amaral 2005).

Em 2004, Santos et al. demonstraram que a atividade das enzimas envolvidas na degradação do xiloglucano dos cotilédones de *H. courbaril* é controlada pela produção de auxina na parte aérea associada ao seu transporte até os cotilédones. Os autores usaram o ácido naftil ftalâmico (NPA), um inibidor de transporte polar de auxina através de inibição de efluxo celular (Kleine-Vehn et al. 2006), para demonstrar que quando o transporte polar de auxina é bloqueado, a atividade das hidrolases é fortemente alterada. Isto levou os autores a propor que a taxa de crescimento da plântula estaria fortemente relacionada à taxa de mobilização do xiloglucano nos cotilédones (Ver Santos e Buckeridge 2004). Desta forma, existem algumas hipóteses sobre diferentes níveis de controle da degradação e da mobilização do xiloglucano em cotilédones de jatobá a parti de estudos bioquímicos e fisiológicos:

- 1) Em nível metabólico, através da conexão dos ciclos de transglicosilação e desmontagem pela  $\beta$ -galactosidase, a qual é inibida pelo próprio produto. De acordo com Amaral (2005) não foram observados oligos ou monossacarídeos livres, originários do xiloglucano (xilose e galactose) em cotilédones ao longo do dia durante o processo de mobilização, ou seja, não é observado grande aumento de galactose livre nos tecidos;

- 2) Relação fonte-dreno. A) De acordo com Santos et al. (2004) a auxina (hormônio associado ao desenvolvimento) sinaliza para os cotilédones que a parte aérea da plântula está crescendo e induz a produção de hidrolases; B) Alteração do nível endógeno de açúcar nos tecidos (Ver Koch, 2004). Ao produzir sacarose nos cotilédones e transportá-la para as folhas, as plântulas estabelecem uma relação em que os cotilédones são a fonte e as folhas são os drenos. Santos e Buckeridge (2004) demonstraram que durante o período de mobilização do xiloglucano (i.e. entre os 40 e os 60 dias após a embebição das sementes) as folhas se tornam fotossintetizantes. Isto faz com que, ao longo do dia, as folhas se tornem fontes, enviando sacarose para toda a planta, inclusive para os cotilédones;
- 3) Luz. A) Santos et al. (2004) observaram que quando os cotilédones foram cobertos com papel alumínio ocorreu uma queda drástica nas atividades das hidrolases. B) De acordo com Amaral (2005) as atividades enzimáticas aumentaram principalmente no período noturno. Usando um anticorpo anti -  $\beta$ -galactosidase, a autora observou um aumento transitório da enzima durante o período noturno, sugerindo um controle em nível de expressão gênica;
- 4) Temperatura. Minhoto (2002) isolou a XET de jatobá e demonstrou que a enzima desnatura acima de 35°C e que a conformação das moléculas de xiloglucano se altera em temperaturas entre 20 e 40°C e que a 35°C o sistema XET-xiloglucano atinge a máxima eficiência de ataque da enzima. Isto significa que o processo de *transglicosilação* é mais ativo no meio do dia, quando a temperatura é mais alta.

Dentre as diferentes hipóteses a serem testadas para aprofundar o conhecimento sobre o controle da degradação do xiloglucano de reserva em cotilédones de jatobá, uma das mais importantes é a do controle em nível genético. Até que ponto as atividades de hidrolases seriam controladas em nível de transcrição gênica?

## **5.6. Enzimas envolvidas na degradação e mobilização do xiloglucano**

### **5.6.1. $\beta$ -galactosidase – BGAL**

A  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) tem a função de hidrolisar resíduos terminais não reduzidos de  $\beta$ -D-galactosil a partir de polímeros de carboidratos ou de oligos do xiloglucano (Gross & Sams 1984; Ross et al. 1994; Carey et al. 2001; Li et al. 2001; Alcântara et al. 1999, 2006). Sua atividade e expressão estão associadas à degradação de componentes da parede celular durante o amadurecimento dos frutos (Brummel & Harpster 2001; Smith et al. 2002; Esteban et al. 2003; Wu & Burns 2004; Martin et al. 2005). Essas enzimas também já foram detectadas, durante a germinação de sementes, alongamento do hipocótilo e espigas em desenvolvimento (Edwards et al. 1988; Sekimata et al. 1989; Simos et al. 1989; Dopico et al. 1989; King & Davies 1995; Tiné et al. 2000; Li et al. 2001; Alcântara et al. 1999, 2006).

### **5.6.2. Xiloglucano endotransglicosilase – XET**

A enzima xiloglucano endotransglicosilase - XET (EC 2.4.1.207) também chamada de xiloglucano endotransferase – EXGT ou EXT, pertence à família gênica XTH (xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase) e catalisa a transferência de um segmento da molécula de xiloglucano (doador) para outra molécula de xiloglucano (receptor), mediando à reestruturação molecular entre os polissacarídeos durante a morfogênese da parede celular (Fry et al. 1992; Okazawa et al. 1993; Darley et al. 2001; Steele et al. 2001; Vissenberg et al. 2001; Suda & Giorgini 2003; Cosgrove 2005; Saura-Valls et al. 2006).

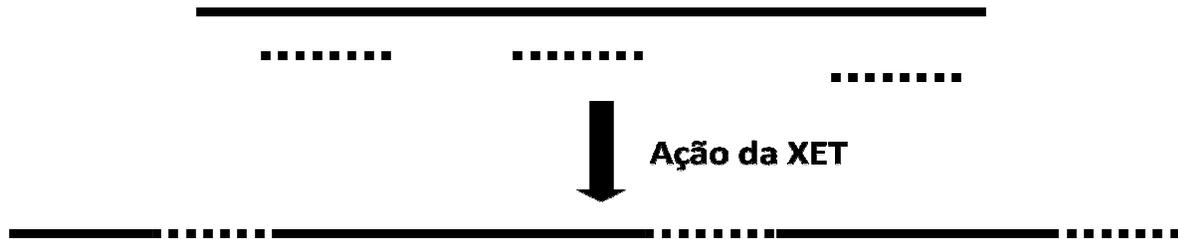
Os estudos associados à XET mostram a atividade e ou padrão de expressão sob diferentes condições fisiológicas em diversas espécies. Sua atividade é associada a múltiplos processos relacionados ao crescimento, rápida expansão celular, maturação de frutos além da mobilização de reservas durante a geminação (Pritchard et al. 1993; Zurek & Clouse 1994; Nishitani 1995; Smith et al. 1996; Antosiewicz et al. 1997; Oh et al. 1998; Akamatsu et al. 1999; Uozu et al. 2000; Busato et al. 2001; Ishimaru & Kobayashi 2002). Portanto, a XET pode ter um importante papel onde ocorre uma lise parcial da parede celular durante amadurecimento do fruto, zona de abscisão, durante a mobilização de reserva do xiloglucano e após a germinação, na

separação celular após a mitose e na formação de placas crivadas para a condução da seiva durante o desenvolvimento de células do xilema e floema, respectivamente (Fry et al. 1992).

Devido a sua função na reestruturação da parede celular, durante o desenvolvimento das plantas a XET tem sido alvo de muitos estudos. Relatos em diferentes espécies vegetais têm mostrado que a enzima participa do processo de transglicosilação do xiloglucano em diferentes fases do desenvolvimento (Talbot & Ray 1992). Nishitani & Tomiga (1992) purificaram uma XET (chamada por eles de EXT) de epicótilo de *Vigna angularis* e verificaram que a enzima transfere um grande segmento de uma molécula de xiloglucano para outra molécula deste polímero. Os autores propuseram que a reação de transglicosilação ocorre em duas etapas: i) endo-clivagem da ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glicosil e ii) ligação terminal do novo resíduo glicosil reduzido em um polímero ou oligo de xiloglucano não reduzido (Figura 4). Fry et al. (1992) observaram o mecanismo de transglicosilação em caule de *Pisum sativum* e sugeriram que a enzima promove a extensão celular nos segmentos do caule durante o desenvolvimento. Os autores também sugeriram que a XET contribui para o crescimento de duas formas: i) na ausência de oligossacarídeos, ocorre uma transglicosilação entre polissacarídeos, permitindo o afrouxamento de forma reversível da parede celular; ii) na presença de oligossacarídeos ocorre a transglicosilação entre estes e os polissacarídeos, permitindo a efetiva clivagem do polímero e resultando em um afrouxamento da parede mais permanente. Fanutti et al. (1992) revelaram em seus estudos que a XET apresenta duas formas de ação, uma apenas de hidrólise e outra de transglicosilação, baseada na disponibilidade de substrato. Os autores também demonstraram que a XET de *Tropaeolum majus* tem atividade predominante de hidrolase.

Autores como Farkas et al. (1992), Nishitani (1997), Suda & Giorgini (2003), Saura-Valls et al. (2006) também observaram, em seus estudos, o processo de transglicosilação da XET, mediada pela transferência de unidades oligoméricas do xiloglucano para outro oligossacarídeo de xiloglucano em diferentes espécies. Tiné et al. (2000) demonstraram que a atividade de XET de *H. courbaril* é predominantemente de transglicosilação, sendo inclusive capaz de “enxertar” fragmentos em meio a moléculas poliméricas de xiloglucano. Alcântara (2002) purificou a XET de jatobá e a caracterizou bioquimicamente, mostrando que seu pH ótimo é 7 e que a enzima é capaz de transglicosilar oligossacarídeos para moléculas de xiloglucano de alto peso molecular.

De acordo com Brummell & Harpster (2001) as características das enzimas XET variam consideravelmente, sendo divididas em dois grupos com base nas propriedades bioquímicas. Um dos grupos possui enzimas associadas ao processo de germinação de sementes que estocam o xiloglucano como fonte de reserva (*Tropaeolum majus*). Neste caso, existe um tipo de XET que hidrolisa o xiloglucano a uma subunidade simples de oligossacarídeo em baixa concentração de substrato, porém quando a concentração de substrato é alta prevalece o processo de transglicosilação. De acordo com os autores a XET pode despolimerizar o xiloglucano por hidrólise na ausência de oligos de xiloglucano e por hidrólise e transglicosilação na presença de oligos de xiloglucano. O segundo grupo possui enzimas que foram observadas durante o crescimento de tecidos vegetais com atividade apenas em xiloglucanos com peso molecular acima de 10 kDa como doadores de substrato.



**Figura 4.** Esquema do mecanismo de transglicosilação. Moléculas de xiloglucano são representadas por linhas contínuas e os oligos, provenientes da hidrólise do xiloglucano pela ação da XET através do mecanismo de transglicosilação estão representados por linhas pontilhadas.

### 5.6.3. Invertase neutra/alcalina – IN/IA

As invertases (EC 3.2.1.26) compreendem uma família multigênica que inclui duas subfamílias; a das invertases ácidas e das invertases neutras/alcalinas (Tymowska-Lalanne & Kreis 1998; Vargas et al. 2003). As enzimas estão envolvidas em processos catabólicos da sacarose e a hidrólise ocorre de forma irreversível liberando hexoses (frutose e glucose) (Weber et al. 1995; Kingston-Smith et al. 1999).

As invertases podem ser distinguidas de acordo com suas propriedades bioquímicas, localização subcelular, ponto isoelétrico e pH ótimo (Gallagher et al. 2004). As ácidas possuem um pH ótimo ácido e podem ser divididas em duas classes: insolúvel ligada à parede celular e solúvel localizada no lúmen do vacúolo. Ambas são normalmente encontradas nos órgãos imaturos das plantas (Lee & Sturm 1996; Gallagher et al. 2004). As invertases neutra/alcalinas têm um pH ótimo neutro ou alcalino, estão localizadas no citoplasma e normalmente são encontradas nos tecidos maduros das plantas (Copeland 1990; Lee & Sturm 1996). Também existem estudos que revelam que essas invertases já foram observadas nas mitocôndrias (Ji et al. 2005). Apesar de serem rapidamente degradadas, dificultando sua purificação para estudos de caracterização, existem alguns relatos sobre as propriedades fisiológicas e bioquímicas das invertases neutras e alcalinas (Lee & Sturm 1996; Sturm 1999). Com exceção da invertase alcalina de cenoura (Lee & Sturm 1996), as invertases são enzimas homotetraméricas compostas por subunidades protéicas com massas moleculares de 54 a 65 kDa (Sturm 1999). De acordo com estudos realizados por Lee & Sturm (1996) em cenoura, as invertases neutra e alcalina diferem quanto à massa (57kDa e 126kDa, respectivamente), quanto ao pH ótimo (8,0 a 9,0 e 5,4 a 6,8, respectivamente) e na especificidade do substrato. A invertase neutra atua na clivagem de rafinose e estaquiose, enquanto que a invertase alcalina é específica para a clivagem da sacarose. A atividade da invertase alcalina pôde ser detectada na presença de ATP, enquanto a invertase neutra foi inibida, nas mesmas condições. Da mesma forma, a invertase neutra foi determinada na presença de  $MnCl_2$  e a invertase alcalina foi inibida. Os autores sugeriram, portanto, tratar-se de diferentes genes, embora ambas tenham apresentado um padrão imunológico semelhante, não descartando a hipótese de ser apenas um gene, que pode ser gerado por uma diferenciação no *splicing* ou na clivagem proteolítica da invertase alcalina.

De acordo com estudos em diferentes espécies a atividade das invertases de uma forma geral pode ser controlada por fatores como a presença de hormônios, fluxo de carbono e presença de luz e suas funções podem ser atribuídos a diversos processos de expansão celular e desenvolvimento em várias plantas analisadas, conforme discutido por vários autores (Sonnewald et al. 1997; Sturm & Tang 1999; Koch & Zeng 2002; Bate et al. 2004; Schweinichen & Buttner, 2005). Sturm (1999) relata que as invertases regulam a entrada de sacarose em diferentes vias de utilização. Os açúcares nas plantas também regulam a expressão gênica e talvez as invertases estejam indiretamente envolvidas no controle da diferenciação celular durante o desenvolvimento da plântula (Koch 1996; Sturm 1999). Apesar de autores como Lee & Sturm (1996) e Ross et al. (1996), terem isolado invertases neutras em diferentes espécies, existem poucos relatos sobre as funções específicas das diferentes isoformas e os genes que as codificam.

#### **5.6.4. Sacarose sintase – SUS**

A sacarose sintase (E.C. 2.4.1.13) compreende uma família multigênica. A enzima cliva a sacarose em presença de UDP para UDP-glucose e frutose (Baud et al. 2004). Sua atividade é atribuída a múltiplos processos fisiológicos como a fixação de nitrogênio, síntese de polissacarídeos, síntese e regulação do transporte da sacarose pelo floema, armazenamento de carbono, além de ser associados ao desenvolvimento, amadurecimento de frutos e responder a diferentes tipos de estresse (Huber & Akazawa 1986; Doehlert 1990; Geigenberger et al. 1993; Martin et al. 1993; Nolte & Koch 1993; Wang et al. 1993; Sung et al. 1994; Amor et al. 1995; Zrenner et al. 1995; Chourey et al. 1998; Ricard et al. 1998; Buckeridge et al. 1999; Gordon et al. 1999; Haigler et al. 2001; Albrecht & Mustroph 2003; Yang et al. 2004). Contudo, é difícil estabelecer uma relação funcional da enzima, por ela ser encontrada em diversos órgãos, tecidos e regiões subcelulares na planta (Wang et al. 1999). Acredita-se na existência de isoformas, uma livre no citosol e outra associada ao complexo de síntese de polissacarídeos na membrana plasmática (Buckeridge et al. 1999, Barrat et al. 2001). A forma citosólica estaria relacionada com o suprimento de produtos do metabolismo da sacarose para o metabolismo geral, enquanto a forma de membrana estaria relacionada com o suprimento de UDP-Glc diretamente para a síntese de polissacarídeos como celulose e os  $\beta$ -glucanos (Amor et al. 1995; Carlson & Chourey

1996; Buckeridge et al. 1999). De qualquer forma, o mecanismo de partição de sacarose entre o citosol e a membrana plasmática é desconhecido (Barrat et al. 2001).

Estudos revelam que sua atividade pode ser controlada por invertase e ou sacarose sintase em processos transitórios durante o desenvolvimento de plantas adultas e jovens determinando o papel bioquímico da fonte e do dreno em algumas espécies (Sun et al. 1992; Heim et al. 1993; Kingston-Smith et al. 1999; Wobus & Weber 1999; Borisjuk et al. 2002, 2003; Gardiner et al. 2003; Ruan et al. 2003; Salnikov et al. 2003; Weschke et al. 2003; Schaffer et al. 2004; Yang et al. 2004).

### **5.7. Relação entre tecidos fonte e dreno**

As fontes de carbono incluem qualquer órgão exportador capaz de produzir fotossintatos (produtos da fotossíntese) em excesso para suas necessidades (Rook et al. 2006). Outro tipo de fonte é um órgão de reserva que exporta carbono durante uma determinada fase do seu desenvolvimento (Taiz & Zeiger 2004). Os drenos incluem os órgãos não-fotossintéticos dos vegetais e órgãos que não produzem produtos fotossintéticos em quantidade suficiente para suas próprias necessidades de crescimento ou reserva (Chen et al. 2005). As raízes, os frutos e as folhas imaturas que devem importar carboidratos para seu desenvolvimento normal são exemplos de tecidos-dreno (Lara et al. 2004).

A relação entre fonte e dreno é regulada por vários estímulos entre eles a regulação metabólica por açúcares (Roitsch 1999). O carbono fixado em uma célula-fonte pode ser utilizado tanto para o armazenamento na forma de amido, como para o metabolismo em diversas vias metabólicas do próprio tecido-fonte para satisfazer necessidades energéticas da célula ou fornecer esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos necessários à célula, além de poder ser incorporado em transportadores de monossacarídeos e serem enviados para diferentes tecidos-dreno (Martin et al. 1993; Emes et al. 2003; Lara et al. 2004).

A alocação também é um fator importante nos tecidos-dreno. Quando os açúcares são descarregados nas células-dreno eles podem permanecer como tal ou serem transformados em vários outros compostos (Taiz & Zeiger 2004). Nos drenos de reserva, o carbono fixado pode ser acumulado como sacarose, hexose ou como amido nos amiloplastos (Emes et al. 2003; Lara et al. 2004). Nos drenos em crescimento, os açúcares podem ser utilizados para a respiração e para a

síntese de outras moléculas necessárias para o desenvolvimento (Rook et al. 2006). Quanto maior a capacidade de um dreno de estocar ou metabolizar os açúcares importados, maior sua capacidade de competir pelos produtos fotossintéticos exportados pelos tecidos fonte (Taiz & Zeiger 2004). Tal competição determina a distribuição de açúcares de transporte entre os vários tecidos-dreno da planta (partição dos fotossintatos) (Taiz & Zeiger 2004). Obviamente, os eventos nas fontes e nos drenos são sincronizados (Wardlaw 1990). O processo de partição determina os padrões de crescimento e tal crescimento deve ser equilibrado entre a parte aérea (fotossíntese) e a raiz (absorção de água e minerais) (Iacono et al. 1995).

O aumento na taxa de fotossíntese nas folhas-fonte resulta em um aumento na taxa de translocação a partir da fonte (Quereix et al. 2001). Pontos de controle para a alocação dos produtos fotossintetizados incluem várias vias entre elas a de síntese de amido como armazenamento temporário (Emes et al. 2003; Li et al. 2003). Tiné et al. (2000) observaram que durante a degradação do xiloglucano em plântulas de *H. courbaril* o nível de amido aumentou no próprio órgão de reserva (cotilédone). O mesmo foi observado por Santos et al. (2004). Neste caso, quando a parte aérea foi excisada, houve acúmulo de sacarose e síntese de amido nos cotilédones. Estes autores observaram que quando as gemas axilares das plantas que tiveram suas partes aéreas excisadas iniciam o desenvolvimento, o amido armazenado transitoriamente foi mobilizado, restabelecendo a relação fonte-dreno entre o órgão de reserva (cotilédone) e a parte aérea em desenvolvimento (dreno). Santos e Buckeridge (2004) mostraram que o controle da relação fonte dreno em jatobá é exercido, em parte pela luz e em parte pela temperatura. Os autores colocaram plântulas em três condições de iluminação e verificaram que as maiores intensidades luminosas aceleram o processo de mobilização das reservas cotiledonares. Esta aceleração resulta em maior taxa de crescimento das plântulas através de um transporte mais intenso de sacarose para a parte aérea, que recebe 70% do carbono distribuído durante o estágio em que há a mobilização de xiloglucano. Quereix et al. (2001) e Rook & Bevan (2003) sugerem existência de um sinal interno que é ligado em nível de carboidrato na planta e a demanda do dreno gera um mecanismo de *feedback* para manter o balanço entre as atividades dos tecidos fonte-dreno. Borisjuk et al. (2003) analisaram os cotilédones de *Vicia faba* (leguminosa) durante o desenvolvimento e verificaram que ocorre síntese de amido no cotilédone.

Os hormônios são responsáveis por sinais químicos emitidos entre fonte e dreno, tendo grande importância na regulação das relações entre esses tecidos, uma vez que afetam a partição

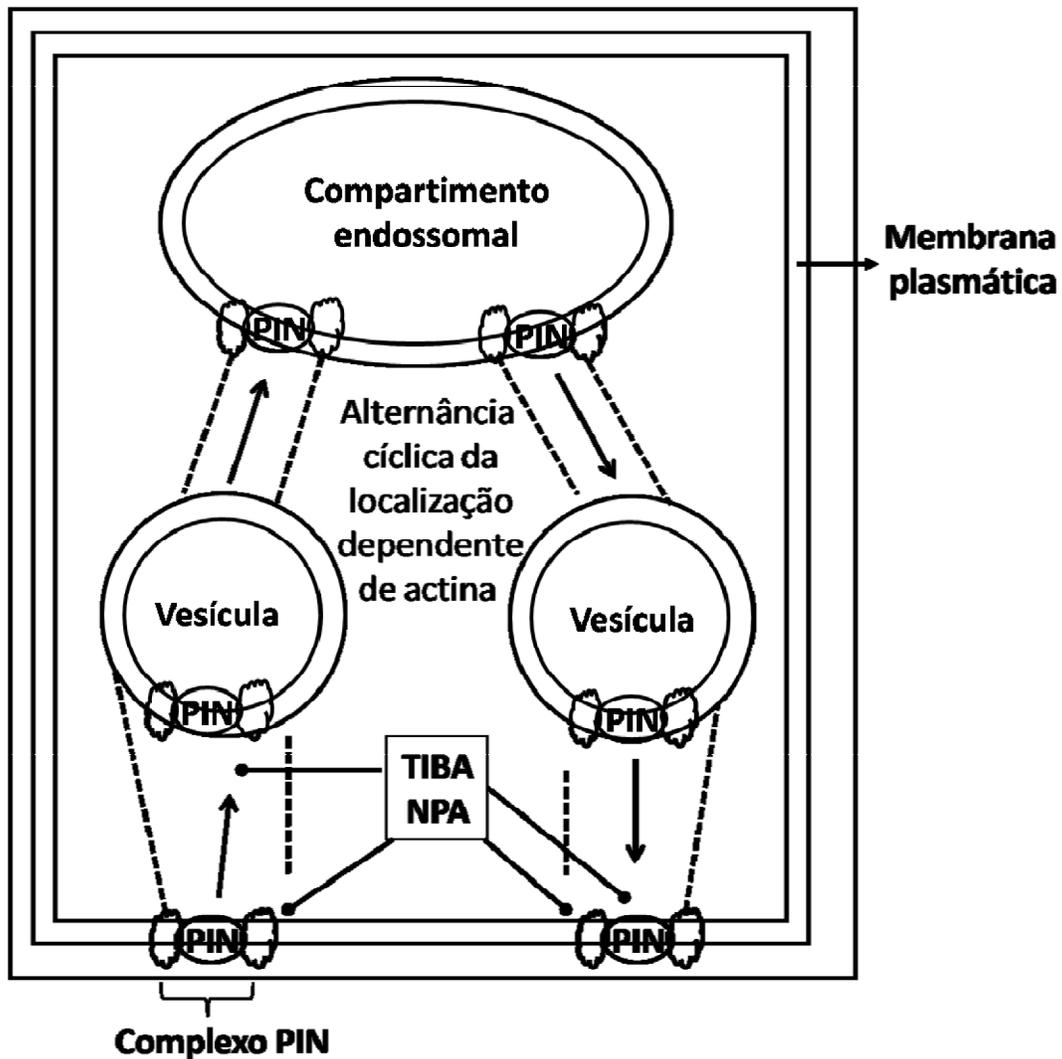
dos fotossintatos por controlarem o crescimento do dreno, a senescência foliar e outros processos do desenvolvimento (Rook & Bevan 2003; Lara et al. 2004). A atividade e a força do dreno também estão relacionadas à presença e atividade de enzimas de clivagem da sacarose como a sacarose sintase e invertases, pois elas catalisam a primeira etapa da utilização da sacarose (Tang & Sturm 1999; Carlson et al. 2002; Emes et al. 2003). Tang et al. (1999) revelaram que invertases são críticas durante a partição de sacarose entre as folhas fonte e a raiz em cenoura. Tang & Sturm (1999) revelaram que em plantas transgênicas de cenoura a sacarose sintase exerce um papel crucial na determinação da partição da sacarose entre os órgãos fonte-dreno. Druart et al. (2001) analisaram a assimilação da sacarose durante estágios do desenvolvimento em *Cichorium* e sugeriram que a atividade da invertase ácida está relacionada com a determinação da força-dreno nas raízes da planta. Zhou et al. (2006) analisaram a regulação da expressão gênica da sacarose sintase em árvores de maçã e verificaram que a enzima exerce um importante papel na determinação da força dreno na macieira. Molle (2007) sugeriu que a invertase ácida e a sacarose sintase exercem um papel importante no processo de mobilização das reservas de xiloglucano dos cotilédones para os órgãos dreno em desenvolvimento durante a mobilização de reserva em jatobá.

## **5.8. Auxina**

A auxina foi o primeiro hormônio descoberto em plantas e classificado como a chave central na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (Leyser & Berleth 1999). A auxina natural de maior ocorrência nas plantas é o ácido indol-3-acético (AIA) embora existam o ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) e o ácido indol-3-butírico (AIB) (LeClere et al. 2002; Kerr & Bennett 2007). As auxinas podem exercer efeitos na estrutura da planta durante seu desenvolvimento, desde estágios precoces da embriogênese e na diferenciação do tecido vascular, como na floração e desenvolvimento do fruto, no desenvolvimento da raiz, no fototropismo, gravitropismo, senescência e respostas a estresse mecânico (Perrot-Rechenmann & Napier 2005). A regulação do crescimento nos vegetais pode depender em parte da auxina livre presente nas células, tecidos e órgãos. No entanto, a maior parte dessa auxina é encontrada nos meristemas apicais da parte aérea e nas folhas jovens (Taiz & Zeiger 2004). Porém, grande parte da auxina encontra-se na forma conjugada com açúcares ou aminoácidos de alto peso molecular

(Perrot-Rechenmann & Napier 2005). Sua distribuição na célula parece ser regulada pelo pH e o acúmulo ocorre em compartimentos mais alcalinos (citosol e cloroplastos) (Taiz & Zeiger 2004). O gradiente longitudinal da auxina da parte aérea até a raiz afeta vários processos do desenvolvimento, incluindo o alongamento do caule (Kerr & Bennett 2007). Visto que o ápice caulinar age como principal fonte de auxina para toda a planta, o transporte polar tem sido apontado como a causa principal do gradiente de auxina formado do ápice caulinar ao radicular. Com isso, a utilização de inibidores do transporte polar tem sido empregada em vários estudos com auxina.

Vários compostos sintéticos podem agir como inibidores do transporte de auxina, incluindo o ácido 1-*N*-naftil ftalâmico (NPA). Tais inibidores bloqueiam o transporte polar por impedir o efluxo (saída) da auxina. O NPA não é transportado de modo polar e parece interferir no transporte da auxina por se ligar a proteínas a ela associadas, formando um complexo com o transportador do efluxo (Taiz & Zeiger 2004). As proteínas ligantes de NPA são encontradas nas extremidades basais das células condutoras, onde se localizam as proteínas PIN (Jacobs & Gilbert 1983). O NPA interfere no movimento das vesículas em relação à membrana plasmática e tem a capacidade de inibir a atividade de transporte dos complexos PIN na membrana plasmática por se ligar a uma ou mais proteínas reguladoras (Figura 5) (Geldner et al 2001).



**Figura 5.** Alternância cíclica da localização da proteína PIN, dependente de auxina, entre a membrana plasmática e um compartimento endossomal. Os inibidores do transporte de auxina como TIBA e NPA, interferem na localização das proteínas PIN1 nas regiões basais da membrana plasmática após a lavagem com BFA, sugerindo que esses inibidores de transporte interferem na localização da PIN1. Linha pontilhada = Filamento de actina.

## 6. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas foram feitos com a principal variedade da Mata Atlântica [*Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee & Lang (jatobá)] e com a espécie do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. jatobá-do-cerrado) e verificou-se que as sementes de ambas as espécies possuem como principal reserva de carbono o xiloglucano. Os xiloglucanos de sementes do jatobá vêm ganhando grande importância nas aplicações biotecnológicas, como por exemplo, em papel (Lima et al. 2003). O jatobá também se apresenta como uma importante espécie brasileira para regeneração de florestas e constitui uma das árvores que oferece taxas significativas de seqüestro de carbono, sendo de grande importância ambiental (Aidar et al. 2002; Buckeridge et al. 2007). O grupo do Prof. Dr. Buckeridge vem aumentando o conhecimento sobre aspectos bioquímicos e ecofisiológicos do desenvolvimento inicial de plântulas de jatobá, uma vez que a espécie pode ser utilizada em regeneração de florestas e em programas de seqüestro de carbono com árvores, já que propiciam a base para se obter mudas vigorosas. Do ponto de vista biotecnológico, conhecer melhor os mecanismos de controle da degradação do xiloglucano em cotilédones de jatobá oferece uma oportunidade de desvendar um dos sistemas mais eficientes de degradação e mobilização de reservas de parede celular, já descritos. Do ponto de vista fisiológico, as plântulas de jatobá oferecem um bom modelo para compreender a integração dos mecanismos de controle ambientais e endógenos das relações fonte-dreno em plantas. As plântulas de jatobá se desenvolvem lentamente em relação a modelos, como *Arabidopsis*, tomate, feijão entre outros. Apesar de parecer uma desvantagem em relação à obtenção dos resultados, algumas características, tais como o tamanho da plântula e o maior período do desenvolvimento, oferecem vantagens como uma maior disponibilidade de material para as análises e melhor definição temporal entre os eventos fisiológicos que ocorrem na planta. Contudo, existem ainda muitas lacunas importantes a serem pesquisadas. Uma delas se relaciona com os possíveis pontos de controle existentes em nível da expressão gênica relacionados ao processo de mobilização do xiloglucano durante o desenvolvimento da plântula. Porém o genoma do jatobá é praticamente desconhecido, dificultando este tipo de abordagem. Com isto, uma estratégia possível seria selecionar alguns genes, sequenciá-los e iniciar testes sobre o controle de expressão levando em conta os pontos de controle da mobilização previamente conhecidos. Nesse sentido, foram

escolhidos quatro genes, dois relacionados à degradação do xiloglucano (xiloglucano endotransglicosilase e  $\beta$ -galactosidase) e dois genes relacionados ao metabolismo de sacarose (sacarose sintase e invertase alcalina). A estratégia adotada no presente trabalho foi clonar os cDNAs destes genes e obter seqüências específicas que permitissem os estudos de expressão gênica. Para isso foi necessário desenhar *primers* degenerados com base nos genes descritos na literatura para outras espécies da família Leguminosae. A partir daí, foi possível obter os cDNAs, sintetizar *primers* específicos e utilizar fragmentos com até 450pb como sonda para avaliar o padrão de expressão sob algumas hipóteses mencionadas. Portanto, o presente trabalho inicia os primeiros estudos para cobrir a lacuna em nível molecular sobre o controle da mobilização do xiloglucano nas plântulas de jatobá, caracterizando o padrão de expressão de alguns genes importantes no processo em diversas partes da plântula de jatobá. Escolhemos estudar a expressão destes genes ao longo do 45º dia de vida da plântula, pois este é o período em que ela está em pleno processo de degradação do xiloglucano e da transferência de seus produtos para a parte aérea em desenvolvimento. Os estudos de expressão foram feitos ao longo do dia e da noite. É importante salientar que como a degradação do xiloglucano ocorre ao longo de aproximadamente 20 dias, as observações no 45º dia tentam ilustrar o padrão de comportamento dos genes ao longo de um dia típico. Muitos outros estudos mais aprofundados terão que ser realizados para que possamos compreender como os padrões de expressão se relacionam com o desenvolvimento da plântula de jatobá, mas esperamos que os resultados a serem apresentados a seguir possam abrir caminho para isto.

## **7. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo isolar cDNAs e analisar a expressão dos genes da  $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase, invertase neutra e sacarose sintase durante a fase inicial do desenvolvimento do jatobá nos cotilédones, folhas, hipocótilos e raízes a fim de confirmar um possível controle transcricional por auxina e luz.

## 8. MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1. Material biológico

As sementes de *Hymenaea courbaril* L. foram procedentes do Instituto Florestal do Estado de São Paulo, Brasil. Em seguida foram escarificadas manualmente e colocadas para germinar em placas de Petri com papel de germinação umedecido com água até a emissão da radícula (aproximadamente 15 dias). Após a germinação, as sementes foram transferidas para vasos contendo ½ L de vermiculita, em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 horas durante 10 dias. Em seguida as plântulas foram separadas de acordo com cada tratamento. Foram realizados 05 tipos de tratamento: 1 - plântulas crescidas em condições naturais – controle (12 horas luz/12 horas escuro); 2 - plântulas excisadas na parte aérea; 3 - plântulas tratadas com NPA 200 mM; 4 - plântulas crescidas durante 20 dias em luz contínua; 5 - plântulas crescidas durante 20 dias em escuro contínuo (Figura 6). Estes tratamentos foram baseados no desenho experimental utilizado por Santos et al. (2004). Após aplicação do NPA e excisão da parte aérea as plântulas foram mantidas em casa de vegetação nas mesmas condições do controle. Em todos os tratamentos as plântulas foram regadas com água em intervalos de dois dias. Os experimentos de alternância de luz foram realizados em estufa incubadora BOD (Demanda bioquímica do oxigênio) (Modelo – *Forma Scientific*) em temperatura constante de 28°C e intensidade de luz de 50  $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$  para as plântulas crescidas em luz contínua.

As plântulas de *H. courbaril* foram coletadas 45 dias após a embebição. Essa idade foi selecionada por ser este o período em que, nestas condições, se detecta a taxa máxima de degradação do xiloglucano (Santos & Buckeridge 2004). De acordo com Amaral (2005) a atividade de enzimas envolvidas no processo de degradação do xiloglucano em plântulas de *H. courbaril* apresentou variações ao longo do dia com a presença de picos de atividade entre 22h e 2h da madrugada. Por esta razão, nossas coletas para análise da expressão gênica foram realizadas a cada 6 horas (0h, 6h, 12h, 18h e 24h).

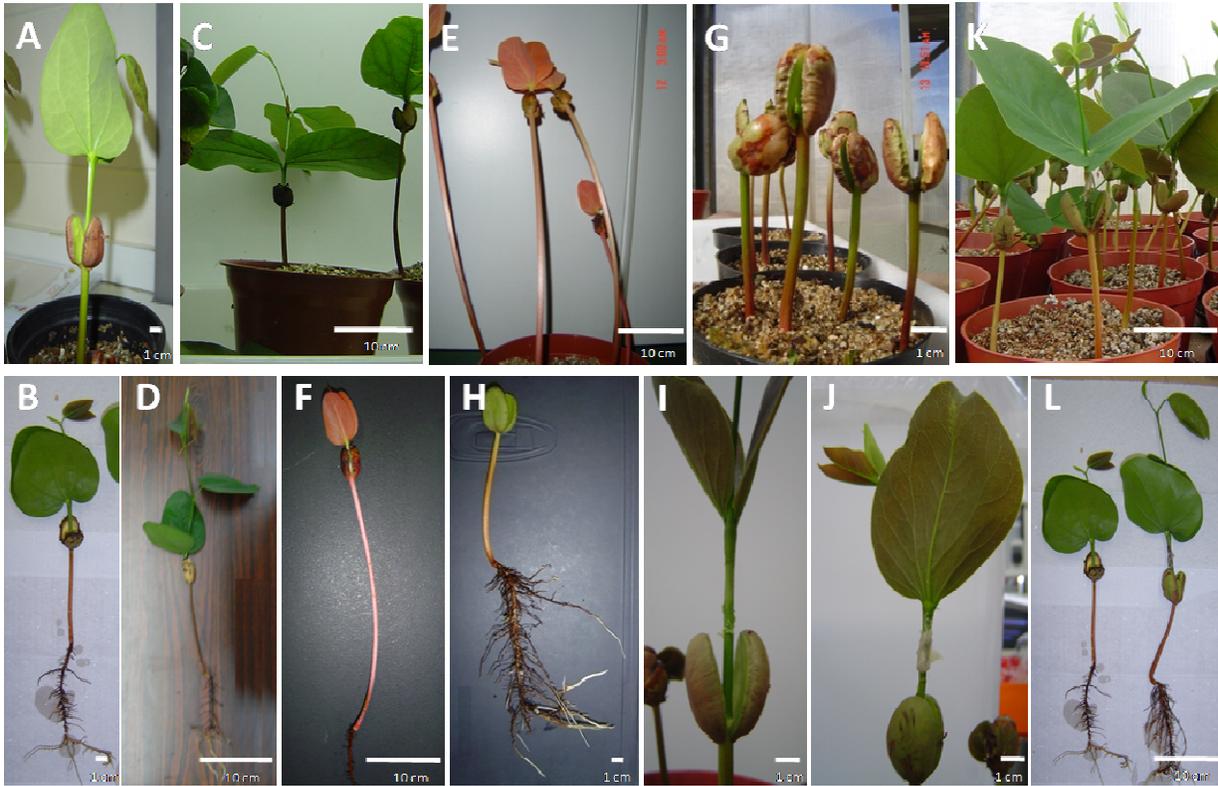
A determinação de experimentos durante 20 dias em luz e escuro contínuo foi em função da preservação de características em plântulas de *H. courbaril* da fotomorfogênese e escotomorfogênese, além ser o período que ocorre a degradação do xiloglucano. Durante as

coletas, as plântulas foram dissecadas em eófilo, cotilédone, hipocótilo e raiz e imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido.

Os tecidos foram armazenados, por até três meses, para a extração do RNA total, a -80°C. Para cada tipo de tratamento foram feitas três repetições biológicas em diferentes épocas do ano e foram sintetizados três cDNAs para cada amostra biológica, totalizando nove repetições.

## **8.2. Extração, manipulação e análise dos RNAs**

A extração do RNA das folhas e das raízes foi realizada segundo Gesteira et al. (2003). Nos hipocótilos a extração foi realizada com o reagente *Concert* – Invitrogen (de acordo com especificações do fabricante). Para os cotilédones, utilizou-se a metodologia descrita por Daohong et al. (2004) com várias modificações. O material foi macerado em N<sub>2</sub> líquido e homogeneizado em tampão de extração (Tris-HCl 0,5 M, pH 8; LiCl 0,25 M; EDTA 0,01 M pH 8; SDS 2,5% e β-mercaptoetanol 0,1%) (0,1g de tecido/mL de tampão) durante 10 min no gelo. Em seguida o extrato foi aliquoteado em microtubos de 2 mL e agitado em vórtex durante 2 min. Foram adicionados 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (PCI) (25:24:1) e o extrato foi agitado nas mesmas condições. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 4°C durante 15 min a 13000g. Para precipitar o RNA, 0,5 volume de LiCl 12 M foram adicionados e a mistura foi armazenada por 30 min a -80°C. Após centrifugação a 4°C por 30 min a 13000g o *pellet* foi lavado com 1mL de LiCl 6 M, e centrifugado durante 15 min nas mesmas condições. O precipitado foi diluído em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e o RNA foi reprecipitado em 0,2 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 1 volume de etanol absoluto durante 2 horas a -80°C ou permanecendo *overnight*. Após 30 min de centrifugação a 4°C a 13000g, o *pellet* foi lavado com etanol 70% e o RNA foi ressuspendido em 30 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. A quantificação foi feita através de absorvância em espectrofotômetro segundo Sambrook & Russel (2001). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 6% de formaldeído, em tampão MOPS 1X (MOPS 20 M, acetato de sódio 0,6 M, EDTA 0,01 M, pH 8).



**Figura 6.** Plântulas de *H. courbaril* com 45 dias após a embebição, submetidas a diferentes tratamentos. Plântula controle (12 horas luz /12 horas escuro) (A); detalhe (B); plântulas crescidas em luz contínua por 20 dias (C); detalhe (D); plântulas crescidas no escuro contínuo por 20 dias (E); detalhe (F); plântulas sem a parte aérea (G); detalhe (H); plântula com 30 dias sendo preparada para aplicação do NPA (I); detalhe da aplicação do NPA (J); plântulas tratadas com NPA (K); detalhe (L). As imagens que mostram os detalhes são relativas às plântulas no dia da coleta para cada um dos tratamentos.

### 8.3. Síntese de cDNA e definição dos *primers* específicos

#### 8.3.1. Síntese de cDNA

Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *ready-to-go RT-PCR beads* (Amersham Biosciences) de acordo com especificações do fabricante. Foram utilizados 3,5 µg de RNA e 5 µL de OligoDT 10 µM. O volume final da reação foi de 50 µL. O cDNA foi armazenado a -20°C até a utilização.

#### 8.3.2. Obtenção, alinhamento e filogenia das seqüências e seleção de *primers* específicos para os genes que codificam para a XET, β-galactosidase, invertase neutra, sacarose sintase e actina em leguminosas

As seqüências que codificam a xiloglucano endotransglicosilase, β-galactosidase, invertase neutra, sacarose sintase e actina foram obtidas a partir de seqüências de diversas espécies vegetais disponíveis no GenBank (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Para o alinhamento das seqüências de nucleotídeos, foi utilizado o software *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). As análises filogenéticas dos alinhamentos das seqüências codificantes para as famílias gênicas foram obtidas com auxílio dos softwares *prodist* para calcular as distâncias entre as seqüências e *neighbor joining* (NJ) para estabelecer as relações evolutivas a partir das distâncias (Saitou & Nei 1987).

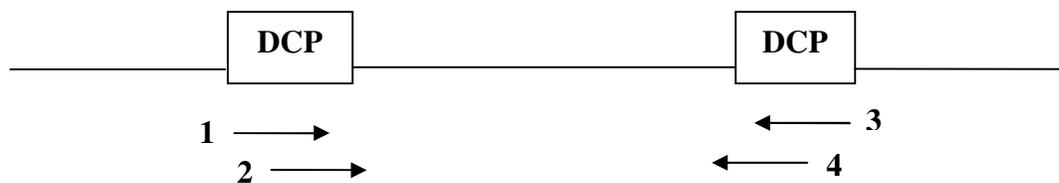
Dois pares de *primers* parcialmente sobrepostos e específicos para amplificação de cada cDNA de interesse foram desenhados a partir das seqüências nucleotídicas correspondentes a domínios/motivos protéicos conservados, identificados nas proteínas provenientes de organismos evolutivamente próximos ao jatobá (família Leguminosae). No desenho dos *primers*, procuramos evitar seqüências palindrômicas, manter uma quantidade de AT equivalente à quantidade de GC e minimizar o grau de degenerescência. Os *primers* sintetizados tinham entre 17 e 24 nucleotídeos (Ver Tabela 1, Figura 7). Para as reações com os *primers* degenerados foram realizados 36 ciclos de amplificação: (95°C por 1 min, 50°C por 1 min e 30 seg e 72°C por 2 min) e com desnaturação inicial a 95°C por 5 min e uma fase de alongamento final de 5 min a 72°C e para as reações com os *primers* específicos dos genes (BGAL, XTH, IN, SUS e AC) foi

alterada apenas a temperatura de anelamento (58°C) para todos os genes. Os produtos de amplificação com tamanho esperado foram purificados após separação em gel de agarose usando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as especificações do fabricante.

**Tabela 1.** Sequências de *primers* utilizados para obtenção dos cDNAs parciais para os experimentos de RT-PCR semi-quantitativo.

<b>Gene</b>	<b>Primer direto</b>	<b>Primer reverso</b>
<b>BGAL1</b>	*1. GTA(C/T)ATGTA(C/T)CATGG(A/T)G *2.(C/T)CATGG(A/T)GGAAC(A/T)AA(C/T) *1. GTTGGAAATAACAAGATTTTC *2. CAAGATTTCTTTACTTAGTGTTG A. GCGTCATAGTCATAGCTTG	*3.T(G/T)A(C/T)CCA(A/T)A(C/T)(C/T)T(G/C)A *4. (A/T)A(C/T)(C/T)T(G/C)ACC(C/T)TTTCCC *3. GA(A/G)CCTTCTGGAATTTTC(A/T)TTG *4. GAATGGGGAGG(A/T)GA(G/T)CCTTCTGG B. CCATACTCGTTCTCAATCTG
<b>BGAL 2</b>	*1.TACATGTA(C/T)CATGGAGGAA *2.CATGGAGGAACTAA(C/T)TTTG *1. CCAAT(A/T)ATT(C/T)T(A/T)TC(A/T)CAGATTG *2. C(A/T)CAGATTGA(A/G)AA(C/T)GA(A/G)TATGG A. CAGATTGAGAACGAGTATGG	*3. A(C/T)CCA(A/T)A(C/T)CTGACC(C/T)T *4.(C/T)CTGACC(C/T)TTTCCCAT(A/T)C *3. CTATGA(A/G)GC(C/T)CC(A/T)(G/T)TTGA(A/G)G *4.C(A/T)AGCATTGACTATGA(A/G)GC B. CTTCATTGCCACAAGCTATG
<b>XTH</b>	*1.CAACC(A/C)ATGAA(A/G)(A/G)T(A/T)T *2. AA(A/G)(A/G)T(A/T)TACAA(C/T)AGTT *1. GGTTCCTGGTGATTC(A/T)GCTGG *2. GCCCA(G/A)TCATC(A/T)GCATTCC A. CTGCTGGAACAGTTACTGC	*3.(A/G)C(A/G)GTGCA(A/G)TA(A/G)TTG *4.CA(A/G)TA(A/G)TTGTA(A/G)ATGGTG *3.GGAATGC(A/T)GATGA(A/G)TGGGC *4. CAA(A/G)AGTTT(C/T)TGGAATGC(A/T)G B. CAACAGTTTATGGAATGCAG
<b>IN</b>	*1. CTTTGTGCTGA(C/T)GG(T/A)TG(T/C)TC *2. GGTTTCAT(G/C)(A/T)G(C/T)TTGTCTTCTTC A. GAACGGTTGCTCTATGGTTG	*3.GAAGAAGACAA(C/T)C(A/T)(G/C)ATGAAACC *4. GAT(A/G)TC(A/G)CTTGAAGAAGAC B. CACCAGAGCAATCAATGGC
<b>SUS</b>	*1. TGGCACATAA(T/C)T(A/G)GGTG *2. CAATTTGCGGTACTTGAGAG A. GATCTGCGACACCAAGGGAG	*3. A(T/C)T(A/G)GGTGTCCTCAGTG *4. TACTTGACAGCATAGAACATC B. GATGTTCTATGCTGTCAAGTA
<b>AC</b>	*1. CATTGT(A/T)GGTCGTCC(A/T)CGTCACAC A. GTCGTCCACGTCACACTG	*2. CCAGAATCCA(A/G)(A/C)ACAATACC B. CCAGAATCCAGCACAATACC

BGAL1 =  $\beta$ -galactosidase grupo 1; BGAL2 =  $\beta$ -galactosidase grupo 2 XTH = xiloglucano endotransglicosilase; IN = invertase neutra; SUS = sacarose sintase; AC = actina; A e B = *primer* específico para o jatobá; Números identificados com \* = *primers* degenerados para leguminosas.



**Figura 7.** Esquema geral utilizado para obtenção de cDNA de interesse a partir de dois pares de *primers* parcialmente sobrepostos em domínios/motivos conservados. DCP = Domínio Protéico Conservado. Primeiro *primer* direto (1); segundo *primer* direto, que é parcialmente sobreposto ao primeiro (2); primeiro *primer* reverso (3) e segundo *primer* reverso, que é parcialmente sobreposto ao primeiro (4) reverso.

#### 8.4. Clonagem do cDNA

Após purificação os fragmentos foram ligados no vetor *pGEM-T* do *Kit pGEM-T Easy* (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Esse vetor permite a clonagem de produtos de amplificação sintetizados com *Taq* polimerase. A concentração de DNA utilizado na ligação variou de acordo com o tamanho do inserto segundo especificações do fabricante.

As células competentes utilizadas para transformação de vetores recombinantes foram selecionadas a partir de uma colônia isolada da cepa DH5 $\alpha$  riscada em placa com meio LB sólido sem antibiótico (Sambrook & Russel 2001). Após inóculo da colônia previamente selecionada 100  $\mu$ L do meio contendo a bactéria foi diluído em 10 mL de meio Tym (Ext. levedura 0,5%; NaCl<sub>2</sub> 0,58%; peptona 2%, MgSO<sub>4</sub> 0,25%) e em seguida foi incubado a 37°C em *shaker* (250 rpm) até a cultura atingir uma densidade óptica de 0,9 – 1,2 a OD<sub>600</sub>. Em seguida, a cultura foi transferida para um erlenmeyer contendo 40 mL de meio Tym, nas mesmas condições até atingir a OD<sub>600</sub> de 0,5 a 0,9. Após este período a cultura foi transferida para um erlenmeyer contendo 200 mL de meio Tym, nas mesmas condições até atingir a OD<sub>600</sub> de 0,6. A partir daí o erlenmeyer foi transferido rapidamente para o gelo e a cultura foi transferida para tubos *falcon* previamente resfriados. A solução contendo as bactérias foi centrifugada por 30 minutos a 4°C, 3000g. As células foram ressuspensas em solução TBF1 (acetato de potássio 0,03 M; MnCl<sub>2</sub> 0,05 M; KCl 0,1 M; CaCl<sub>2</sub> 0,01 M e Glicerol 15%) previamente resfriado. As células foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 4°C, 3000g e ressuspensas gentilmente em 10mL de solução TBF2 (MOPS pH 7 0,01 M; KCl 0,1 M; CaCl<sub>2</sub> 0,01 M e Glicerol 15%) previamente gelada. Foram feitas alíquotas em microtubos (100  $\mu$ L/tubo) e em seguida congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a – 80°C por até seis meses para utilização.

A transformação bacteriana foi realizada adicionando-se 90  $\mu$ L de tampão de transformação – TT (KCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,3 M e MgCl<sub>2</sub> 5,5 M; 1,5 mL polietileno glicol - PEG 10% 7,5 mL água Mill-Q) junto à reação de ligação que permaneceu no gelo durante 20 min. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de células competentes. O microtubo contendo a mistura (reação de ligação, TT e células competentes) foi mantido no gelo durante 30 min e depois mantido em temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente foram adicionados 700  $\mu$ L de meio LB (Sambrook & Russel 2001) e a reação foi incubada a 37°C durante 1 hora para permitir a expressão fenotípica da resistência a ampicilina. As amostras foram plaqueadas em meio LB

sólido contendo X-Gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside), (0,8 mg/placa) e ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Para cada reação de ligação de DNA foram utilizadas duas placas, cada uma com 400  $\mu$ L da transformação. As placas foram mantidas a 37°C *overnight* e transferidas para a geladeira durante no mínimo 3 horas.

Dez clones de cada inserto foram selecionados e inoculados em 4 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Os inóculos foram mantidos a 37°C em *shaker* (250 rpm) *overnight*. Para realizar a extração do DNA plasmidial (mini-preparação) a fim de confirmar a clonagem, as culturas foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 13000g durante 2 minutos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 350  $\mu$ L de solução P1 (Tris-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 10 mM, pH 8,0 e RNase 100  $\mu$ g/mL) em seguida adicionou-se 350  $\mu$ L de solução P2 (NaOH 0,2 M e SDS 1%). As amostras foram levemente agitadas por inversão e 350  $\mu$ L de solução P3 (acetato de potássio 3 M pH 5,5) foram adicionados para precipitar o DNA genômico. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo e 750  $\mu$ L de isopropanol gelado foi adicionado. Após 10 min em temperatura ambiente o material foi centrifugado nas mesmas condições por 15 min. O DNA plasmidial foi lavado com etanol 70% e depois foi seco a temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensado em 30  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 0,1 mM pH 8,0).

A confirmação da clonagem foi verificada através da digestão com enzima de restrição *EcoRI*. Para a reação foram utilizados 7,2  $\mu$ L de água destilada autoclavada, 0,3  $\mu$ L da enzima *EcoRI* (Invitrogen – 10 U/ $\mu$ L), 1,5  $\mu$ L de Tampão 10 X (Invitrogen) e 10 ng de DNA plasmidial. A reação permaneceu durante 2 horas a 37°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE uma vez concentrado. Os fragmentos utilizados na clonagem foram submetidos à eletroforese com os respectivos clones, para confirmação do tamanho dos insertos.

Três clones de cada fragmento foram selecionados para seqüenciamento. O DNA plasmidial destes clones foi isolado com o kit Promega *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* de acordo com instruções do fabricante.

## 8.5. Seqüenciamento e análise das seqüências

Após confirmação da clonagem, foi realizada uma reação de amplificação com 40 ciclos (96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min) com a utilização do *kit DNA Sequencing Big Dye™* (Applied Biosystems) com 400 ng de DNA, 1 µL de *primer* (direto e reverso), 2 µL de *mix Big Dye*. Após a amplificação, o DNA foi precipitado e em seguida, os cDNAs foram ressuspensos em 4 µL de tampão de corrida e seqüenciados em seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer).

As seqüências obtidas de todos os clones para os genes da SUS, IN, XET, BGAL e actina foram comparadas com seqüências disponíveis em banco de dados através do programa *blastn* no serviço do NCBI (*National Center of Biotechnology*, [www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/BLAST/)) para confirmar suas respectivas identidades (Ver actina na Figura 8).

## 8.6. RT-PCR semi-quantitativo

A quantidade de RNA para a síntese do cDNA, e o volume de cDNA para as amplificações foram utilizados conforme previamente mencionado. Para cada gene foram utilizados os *primers* específicos para jatobá conforme tabela 1. Os resultados de RT-PCR semi-quantitativo foram apresentados na forma de nível alto, baixo e não detecção de transcritos de RNAm.

## 8.7. Densitometria

As análises densitométricas foram realizadas com a utilização do *software Gel-Pro Analyzer* (versão Gel-Pro 3.1 - Media Cybernetics, Inc.). Os resultados foram plotados em gráficos a partir dos valores obtidos em densidade óptica integrada (IOD) das bandas detectadas nos géis.

Score = 253 bits (646), Expect = 2e-65 Identities = 122/123 (99%), Positives = 123/123 (100%), Gaps = 0/123 (0%)

```

Gm/GMU60500      AGFAGDDAPRAVFPSIIIGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGIVSN 60
HcAc1            -----IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGIVSN 45
                  *.:*****

Gm/GMU60500      WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQ 120
HcAc1            WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQ 105
                  *****

Gm/GMU60500      VLSLYASGRRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTEYLVKILTERGY 180
HcAc1            VLSLYASGRRTTGIVLDG----- 123
                  *****

```

**Figura 8.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da actina do jatobá (Hc-Ac1) (Ver Anexo 2) com a espécie com a espécie *Glycine max* (leguminosa) que apresentou menor *E-value* (8e-119).

## 8.8. Construção das árvores filogenéticas

A seleção dos organismos utilizados para estabelecer a filogenia foi baseada na disponibilidade do genoma completo de uma espécie de dicotiledônea (*Arabidopsis thaliana*) e uma monocotiledônea (*Oryza sativa*), a fim de confirmar possíveis ortólogos, além de espécies de leguminosas que apresentam maior similaridade no *tblastn* no serviço do NCBI (*National Center of Biotechnology*). Também foram utilizadas espécies de dicotiledôneas de acordo com cada gene, cuja funcionalidade da proteína foi previamente descrita.

O levantamento foi feito através da função para cada uma das proteínas codificantes no banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) a fim de identificar todos os genes que codificam para a  $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase, invertase alcalina e sacarose sintase no genoma de *Arabidopsis*. Em seguida, possíveis ortólogos de arroz (*O. sativum*) que foram identificados usando o programa *tblastn* no serviço do NCBI (*National Center of Biotechnology*). Para o alinhamento das seqüências dos aminoácidos, foi utilizado o software *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

As análises filogenéticas das seqüências buscaram estabelecer as correlações evolutivas a partir das distâncias. As distâncias foram calculadas usando o método baseado na matriz JTT, que se baseia no número de substituições de aminoácidos por sítio (Jones et al. 1992) e as relações foram estabelecidas pelo método de *neighbor joining* (Saitou & Nei 1987). Foram conduzidos 1000 *bootstraps* para obter uma árvore consenso para representar a história evolutiva das seqüências (Felsenstein 1985). A porcentagem de réplicas nas quais as seqüências associadas foram postas juntas no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) está mostrada próxima aos nós (Felsenstein 1985). Todas as posições contendo *gaps* no alinhamento ou *missing data* (*indels*) foram eliminadas por *pairwise deletion*. Para a  $\beta$ -galactosidase foi utilizada uma amostra com 145 posições, para a xiloglucano endotransglicosilase 111 posições, para a invertase alcalina 273 posições e para a sacarose sintase foram utilizadas 382 posições. As análises foram feitas através do software MEGA4 (Tamura et al. 2007).

Para classificar o gene obtido a partir do cotilédone do jatobá para a  $\beta$ -galactosidase Hc-BGAL1 (Ver Anexo 2), foi gerada uma árvore com representantes de leguminosas (CanBGAL-4 - CAA09457; CanBGAL-3 - CAA06309; *chickpea* - AJ012687), *A. thaliana* (At-GAL1 - AT3G13750; At-GAL2 - AT3G52840; At-GAL3 - AT4G36360; At-BGAL4 - AT5G56870; At-

GAL5 - AT1G45130; At-BGAL6 - AT5G63800; At-GAL7 - AT5G20710; At-BGAL8 - AT2G28470; At-BGAL9 - AT2G32810; At-BGAL10 - AT5G63810; At-BGAL11 - AT4G35010; At-GAL12 - AT4G26140; At-BGAL13 - AT2G16730; At-BGAL14 - AT4G38590; At-GAL15 - AT1G31740; At-BGAL16 - AT1G77410; At-BGAL17 - AT1G72990), *Oryza sativa* (Os01g0580200; Os01g0875500; Os03g0165400; Os03g0255100; Os05g0539400; Os06g0573600; Os08g0549200; Os12g0429200; NP920740; XP475258), *Solanum lycopersicum* (AF020390; AJ012796; AJ012798), *Fragaria* (AJ278703; AJ278705) e *Malus dosmetica* (L29451).

Para classificar o gene obtido da raiz do jatobá para a XET, Hc-XTH1 (Ver Anexo 2), foi gerada uma árvore filogenética com representantes de leguminosas (Va-XTH2 - AB086396; VaXTH1 - AB086395), *A. thaliana* (At-XTH1 - AT4G13080; At-XTH2 - AT4G13090; At-XTH3 - AT3G25050; At-XTH4 - AT2G06850; At-XTH5 - AT5G13870; At-XTH6 - AT5G65730; At-XTH7 - AT4G37800; At-XTH8 - AT1G11545; At-XTH9 - AT4G03210; At-XTH10 - AT2G14620; At-XTH11 - AT3G48580; At-XTH12 - AT5G57530; At-XTH13 - AT5G57540; At-XTH14 - AT4G25820; At-XTH15 - AT4G14130; At-XTH16 - AT3G23730; At-XTH17 - AT1G65310; At-XTH18 - AT4G30280; At-XTH19 - AT4G30290; At-XTH20 - AT5G48070; At-XTH21 - AT2G18800; At-XTH22 - AT5G57560; At-XTH23 - AT4G25810; At-XTH24 - AT4G30270; At-XTH25 - AT5G57550; At-XTH26 - AT4G28850; At-XTH27 - AT2G01850; At-XTH28 - AT1G14720; At-XTH29 - AT4G18990; At-XTH30 - AT1G32170; At-XTH31 - AT3G44990; At-XTH32 - AT2G36870), *Oryza sativa* (Os02g0127800; Os03g0108300; Os03g0117300; Os03g0239000; Os03g0854600; Os04g0604200; Os06g0696400; Os06g0696600; Os06g0697000; Os07g0480800; Os08g0237000; Os08g0237800; Os08g0240500; Os11g0539200) e *Tropaeolum majus* (AA39950).

Para classificar o gene obtido da raiz do jatobá para a invertase alcalina, Hc-AlkIN1 (Ver Anexo 2), foi gerada uma árvore filogenética com representantes de leguminosas (Lc-inv1 - AJ717412), *A. thaliana* (AT1G35580; AT1G22650; AT1G72000; AT1G56560; AT3G05820; AT3G06500; AT4G09510; AT4G34860; AT5G22510) e *Oryza sativa* (OsNIN1 - AY575558; OsNIN2 - AY575559; OsNIN3 - AY575560; OsNIN4 - AY575561; OsNIN5 - AY575562; OsNIN6 - AY575563; OsNIN7 - AY575564; OsNIN8 - AY575565).

Para classificar o gene obtido a partir do cotilédone do jatobá para a sacarose sintase, Hc-SUS1 (Ver Anexo 2), foi gerada uma árvore filogenética com representantes de leguminosas

(SUSY VICFA - P31926; SUSY MEDSA - O65026; SUSY PHAAU - Q01390; SUS *isoform 3* - CAC32462), *A. thaliana* (At-SUS1 - AT5G20830; At-SUS2 - AT5G49190; At-SUS3 - AT4G02280; At-SUS4 - AT3G43190; At-SUS5 - AT5G37180; At-SUS6 - AT1G73370) e *Oryza sativa* (Os02g0831500; Os03g0340500; Os03g0401300; Os04g0309600; Os06g0194900; Os07g0616800).

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Otimização da extração de RNA total e da síntese de cDNA

Devido à alta concentração de carboidratos e compostos fenólicos foi encontrada grande dificuldade na obtenção de RNA de qualidade para a síntese dos cDNAs com os protocolos mais corriqueiros (i.e., *Trizol* e *Concert* da Invitrogen e *Tri* da Sigma). Cada protocolo foi testado no mínimo duas vezes em cada um dos tecidos do jatobá. Para a extração do RNA total dos cotilédones foram testados protocolos como os descritos por Chang et al. (1993); Wang et al. (1996); Salzman et al. (1999); Sharma et al. (2002); Gesteira et al. (2003); Kolosova et al. (2004); Daohong et al. (2004), além do *Kit RNeasy Plant Mini* e dos reagentes *Trizol* e *Concert* da Invitrogen e *Tri* da Sigma. Para as folhas, raízes e hipocótilos foram testados os mesmos reagentes e os mesmos protocolos.

Os protocolos que apresentaram resultados satisfatórios tanto na integridade, quantidade de RNA para a síntese de cDNA foram os descritos por Gesteira et al. (2003) para folha e raiz, o descrito por Daohong et al. (2004) e o reagente *Concert* (Invitrogen) para o hipocótilo, com várias modificações para obtenção de resultados satisfatórios para os cotilédones.

Para a obtenção dos cDNAs parciais dos genes da actina, sacarose sintase, invertase neutra, XET e  $\beta$ -galactosidase do jatobá foram testados diversos protocolos baseados na atividade de enzimas como a *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* da Promega com o auxílio do *Kit ImProm-II<sup>TM</sup>, Reverse Transcription System SuperScript® III* e *AMV RT* da Invitrogen com os *Kits First-Strand cDNA Synthesis* e *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit III* e *M-MuLV Reverse Transcriptase* da Amersham com o *Kit Ready-to-go RT-PCR Beads*, associados a testes de concentração do RNA total. A síntese de cDNA foi padronizada utilizando 3,5  $\mu$ g de RNA total e 10% de cDNA foram utilizados para as reações de RT-PCR semi-quantitativo.

### 9.2. Desenho de *primers* para obtenção de cDNA parciais da XET, $\beta$ -galactosidase, invertase neutra/alcalina, sacarose sintase e actina

As seqüências conservadas utilizadas para o desenho dos *primers*, foram inicialmente obtidas utilizando palavra-chave no banco de dados do GenBank. Análises filogenéticas

correspondentes a cada família gênica em diversas espécies vegetais foram realizadas, tornando possível a seleção de grupos que apresentaram a maior quantidade de seqüências de espécies da família Leguminosae/Fabaceae à qual o jatobá pertence (Anexo 1). Para a  $\beta$ -galactosidase foram selecionados dois grupos na árvore que apresentaram espécies de leguminosas. Não foi necessário fazer a filogenia para as seqüências codificantes da sacarose sintase e actina, por se mostrarem muito conservadas. A partir do alinhamento com espécies de *Arabidopsis* e leguminosas obtido com ajuda do *software Clustal W*, foi possível obter um consenso para desenhar os *primers* em regiões conservadas para obtenção dos cDNAs parciais. Para a  $\beta$ -galactosidase foram desenhados *primers* para os dois grupos selecionados. Para otimizar a especificidade da amplificação foram utilizados dois pares de *primers* parcialmente sobrepostos, um mais externo para obter uma primeira amplificação e um mais interno, com uma sobreposição de aproximadamente 10pb (Ver Figura 7).

Para a segunda amplificação foram utilizados 5  $\mu$ L da primeira reação e a concentração dos *primers* em ambos os casos foi 5 $\mu$ M. Para a BGAL foi obtido um fragmento parcial com 435pb que corresponde (20%) do tamanho total da seqüência de aminoácidos da espécie *Cicer arietinum* (leguminosa) que apresenta a maior similaridade com a seqüência de aminoácido do jatobá. Para a XTH foi obtido um fragmento parcial com 333pb que corresponde (20%) do tamanho total da seqüência de aminoácidos da espécie *Vigna angularis* que apresenta maior similaridade com a seqüência de aminoácido do jatobá. Para a invertase alcalina foi obtido um fragmento parcial com 819pb que corresponde (44%) do tamanho total da seqüência de aminoácidos da espécie *Lotus corniculatus* que apresenta maior similaridade com a seqüência de aminoácido do jatobá. Para a sacarose sintase foi obtido um fragmento parcial com 1146pb que corresponde (48%) do tamanho total da seqüência de aminoácidos da espécie *Medicago truncatula* que apresenta maior similaridade com a seqüência de aminoácido do jatobá. Para a actina foi obtido um fragmento parcial com 371pb que corresponde (25%) do tamanho total da seqüência de aminoácidos da espécie *Glycine max* que apresenta maior similaridade com a seqüência de aminoácido do jatobá.

Para os experimentos de RT-PCR semi-quantitativo foram sintetizados *primers* específicos para o jatobá, cujo, os produtos foram utilizados como sonda. Para a BGAL foi utilizado um fragmento com aproximadamente 400pb, para a XET 330pb, para a invertase alcalina 440pb, para sacarose sintase 410pb e para a actina, 360pb.

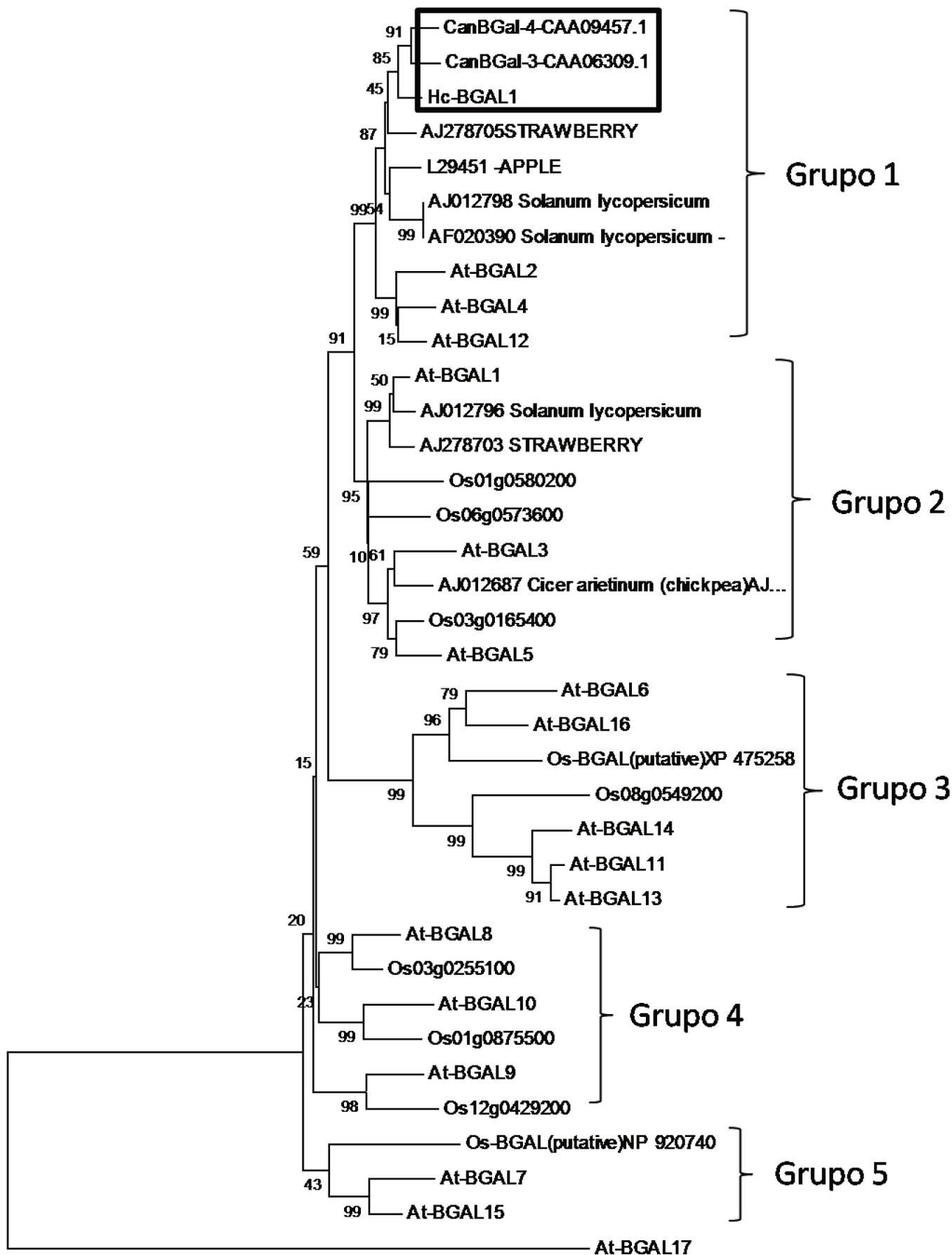
### **9.3. Análise filogenética das seqüências parciais de cDNAs para a $\beta$ -galactosidase (Hc-BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (Hc-XTH1), invertase alcalina (Hc-AlkIN1) e sacarose sintase (Hc-SUS1) do jatobá**

O gene Hc-BGAL1 (Ver Anexo 2) do jatobá foi associado ao grupo 1 das  $\beta$ -galactosidases e apresentou alta similaridade com a espécie *Cicer arietinum* (leguminosa), especificamente ao gene CanBGal-4 (Figura 9). Na figura 10 é mostrado o alinhamento entre as seqüências de aminoácidos do gene do jatobá e da leguminosa que apresentou maior similaridade.

O gene Hc-XTH1 (Ver Anexo 2) do jatobá foi associado ao grupo 1 das XTHs e apresentou alta similaridade com a espécie *Vigna angularis* (leguminosa), especificamente ao gene Va-XTH2 (Figura 11). Na figura 12 é mostrado o alinhamento entre as seqüências de aminoácidos do gene do jatobá e da leguminosa que apresentou maior similaridade.

O gene Hc-AlkIN1 (Ver Anexo 2) do jatobá foi associado ao grupo  $\beta$  das invertases e apresentou alta similaridade com a espécie *Lotus corniculatus* (leguminosa), especificamente ao gene Lc-IN AJ717412 (Figura 13). Na figura 14 é mostrado o alinhamento entre as seqüências de aminoácidos dos genes do jatobá e da leguminosa que apresentou maior similaridade.

O gene Hc-SUS1 (Ver Anexo 2) do jatobá foi associado ao grupo SUS1 das sacarose sintase e apresentou alta similaridade com a espécie *Medicago truncatula* especificamente ao gene SUS isoform 3 - CAC32462 (Figura 15). Na figura 16 é mostrado o alinhamento entre as seqüências de aminoácidos dos genes do jatobá e da leguminosa que apresentou maior similaridade.



**Figura 9.** Relação evolutiva da  $\beta$ -galactosidase de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distâncias calculadas a partir do alinhamento da posição 181 a 332 em *A. thaliana* (At-BGAL4). As seqüências utilizadas foram a do jatobá (Hc-BGAL1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (At-GAL1 - AT3G13750; At-GAL2 - AT3G52840; At-GAL3 - AT4G36360; At-BGAL4 - AT5G56870; At-GAL5 - AT1G45130; At-BGAL6 - AT5G63800; At-GAL7 - AT5G20710; At-BGAL8 - AT2G28470; At-BGAL9 - AT2G32810; At-BGAL10 - AT5G63810; At-BGAL11 - AT4G35010; At-GAL12 - AT4G26140; At-BGAL13 - AT2G16730; At-BGAL14 - AT4G38590; At-GAL15 - AT1G31740, At-BGAL16 - AT1G77410; At-BGAL17 - AT1G72990; *Oryza sativa* (10 membros), leguminosas (CanBGAL-4 - CAA09457; CanBGAL-3 - CAA06309; *Chickpea* - AJ012687), tomate (AJ012796; AF020390; AJ012798), maçã (L29451), morango (AJ278705; AJ278703). Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*.

Score = 253 bits (646), Expect = 6e-65 Identities = 121/145 (83%), Positives = 128/145 (88%), Gaps = 8/145 (5%)

```

CanBGAL-4/CAA09457.1      WNFGGFPVWLKYVPGISFRDNEPFKAAMQKFTTKIVSMMKAENLFQNQGGPIIMSQIEN 180
Hc-BGAL1                  -----QIEN 4
                               ****

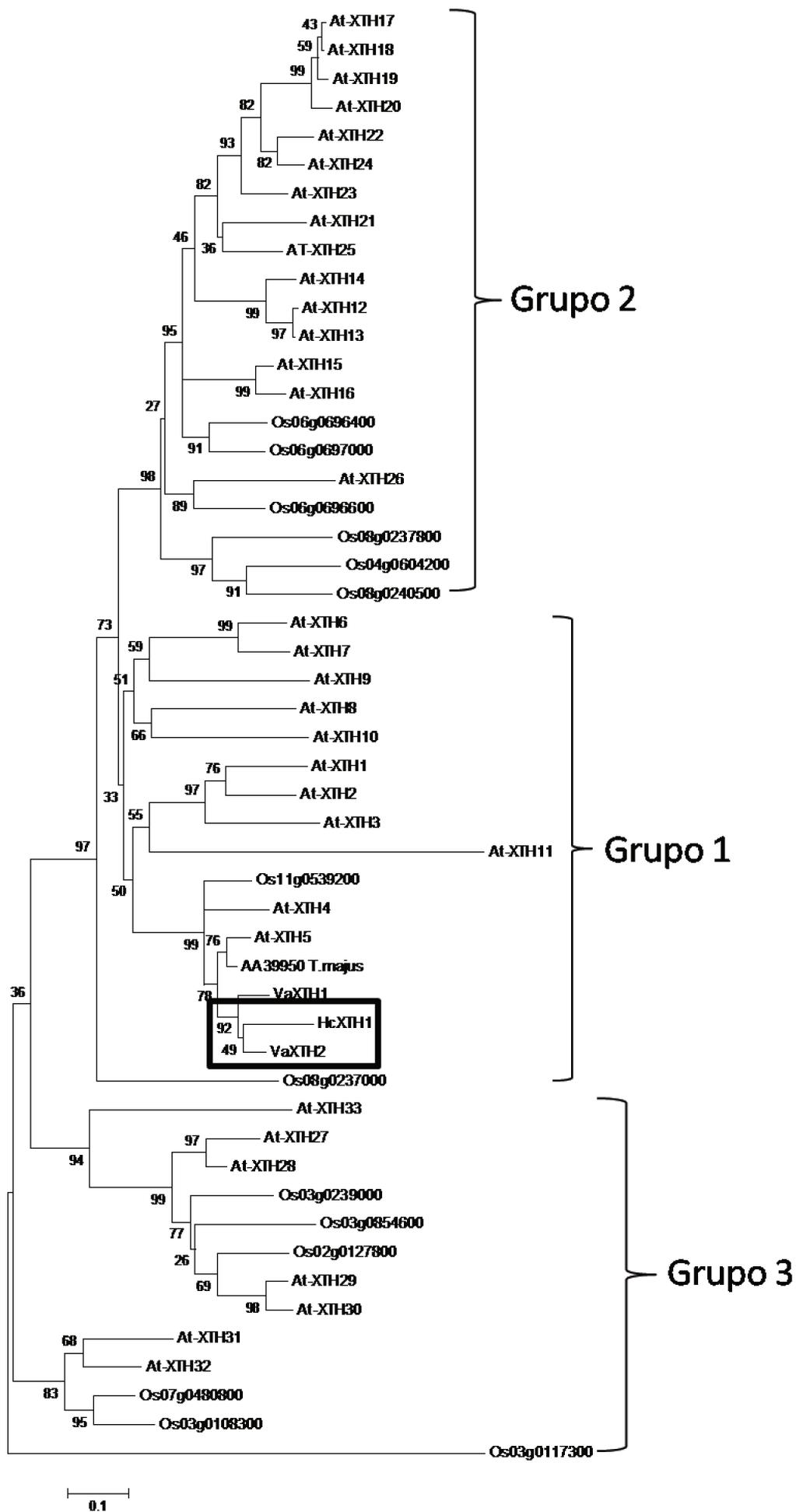
CanBGAL-4/CAA09457.1      EYGPVEWNIGAPGKAYTNWAAQM--AVGLDTGVPWDM--CKQEDAPDPVIDTCNGYYCEN 236
Hc-BGAL1                  EYGPVEWEIRAPGKAYTAWAAKMETAVGLNTGVPWVMECTCKQDDAPDPVIDTCNGYYCEN 64
                               *****:* ***** *:* *:*:* ***** * *:*:*****

CanBGAL-4/CAA09457.1      FTPNKNYKPKM--WTENWSGWYDFGNAICYRPVEDLAYSVARFIQNRGSEFVNYYM--YH 292
Hc-BGAL1                  FTPNKNYKPKMETWTENWSGWYTEYGGAVPKRPVEDIAYSVARFIQNGGSEFVNYYMETYH 124
                               ***** *****:*.*: *****:***** ***** **

CanBGAL-4/CAA09457.1      GGTNFGRTSSGLFIATSVDYDAPIDEYGLTNEPKWHLRDLHKAIKQCEPALVSDPTIT 352
Hc-BGAL1                  GGTNFGRTXSGLFIATSVDYD----- 145
                               ***** *****

```

**Figura 10.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da  $\beta$ -galactosidase parcial do jatobá (Hc-BGAL1) (Ver Anexo 2) com a espécie de leguminosa (*Cicer arietinum*) filogeneticamente mais próxima.



**Figura 11.** Relação evolutiva da xiloglucano endotransglicosilase de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distancias calculadas a partir do alinhamento da posição 87 a 197 em *A. thaliana* (At-XTH5). As seqüências utilizadas foram a do jatobá (Hc-XTH1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (At-XTH1 - AT4G13080; At-XTH2 - AT4G13090; At-XTH3 - AT3G25050; At-XTH4 - AT2G06850; At-XTH5 - AT5G13870; At-XTH6 - AT5G65730; At-XTH7 - AT4G37800; At-XTH8 - AT1G11545; At-XTH9 - AT4G03210; At-XTH10 - AT2G14620; At-XTH11 - AT3G48580; At-XTH12 - AT5G57530; At-XTH13 - AT5G57540; At-XTH14 - AT4G25820; At-XTH15 - AT4G14130; At-XTH16 - AT3G23730; At-XTH17 - AT1G65310; At-XTH18 - AT4G30280; At-XTH19 - AT4G30290; At-XTH20 - AT5G48070; At-XTH21 - AT2G18800; At-XTH22 - AT5G57560; At-XTH23 - AT4G25810; At-XTH24 - AT4G30270; At-XTH25 - AT5G57550; At-XTH26 - AT4G28850; At-XTH27 - AT2G01850; At-XTH28 - AT1G14720; At-XTH29 - AT4G18990; At-XTH30 - AT1G32170; At-XTH31 - AT3G44990; At-XTH32 - AT2G36870), *Oryza sativa* (14 membros), leguminosas (Va-XTH2 - AB086396; VaXTH1 - AB086395) e *Tropaeolum majus*. Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*.

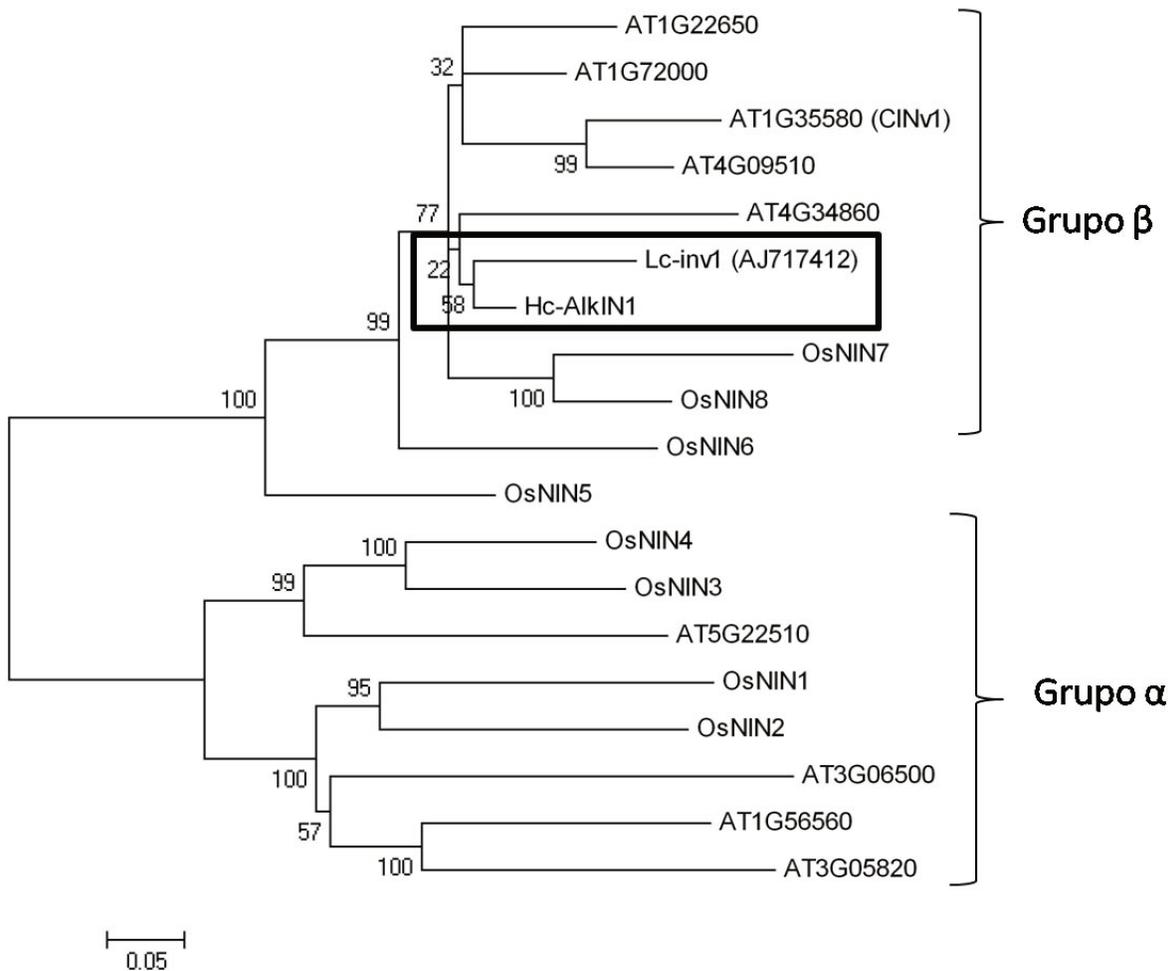
Score = 198 bits (503), Expect = 6e-49 Identities = 94/111 (84%), Positives = 100/111 (90%), Gaps = 0/111 (0%)

```

Va-XTH2/AB086396      YTGTFQTKGSYLFGHFSMNIKMVPGDSAGTVTAFCLSSQNAEHDEIDFEFLGNRTGQPY 120
Hc-XTH1                -----DSAGTVTAFYLSSQNSEHDEIDFEFLGNRTGQPY 34
                        ***** *****:*****
Va-XTH2/AB086396      ILQTNVFTGGKGDREQRIYLWFDPTKAYHRYSVLWNMYQIVFLVDNIPIRVFNKLNKELGV 180
Hc-XTH1                ILQTNVFTGGKGDREQRIYLWFDPTKEYHRYSVLWNMDQIVFLVDDIPIRVFNCKDLGS 94
                        ***** ***** *****:***** *:**
Va-XTH2/AB086396      KFPPNQPMKVYNSLWNADDWATRGGLEKTDWSKAPFVAEYKGFHVDGCEASVNSRFCATQ 240
Hc-XTH1                EIPFQPTHEFNLSLWNA----- 111
                        ::**: . : :*****

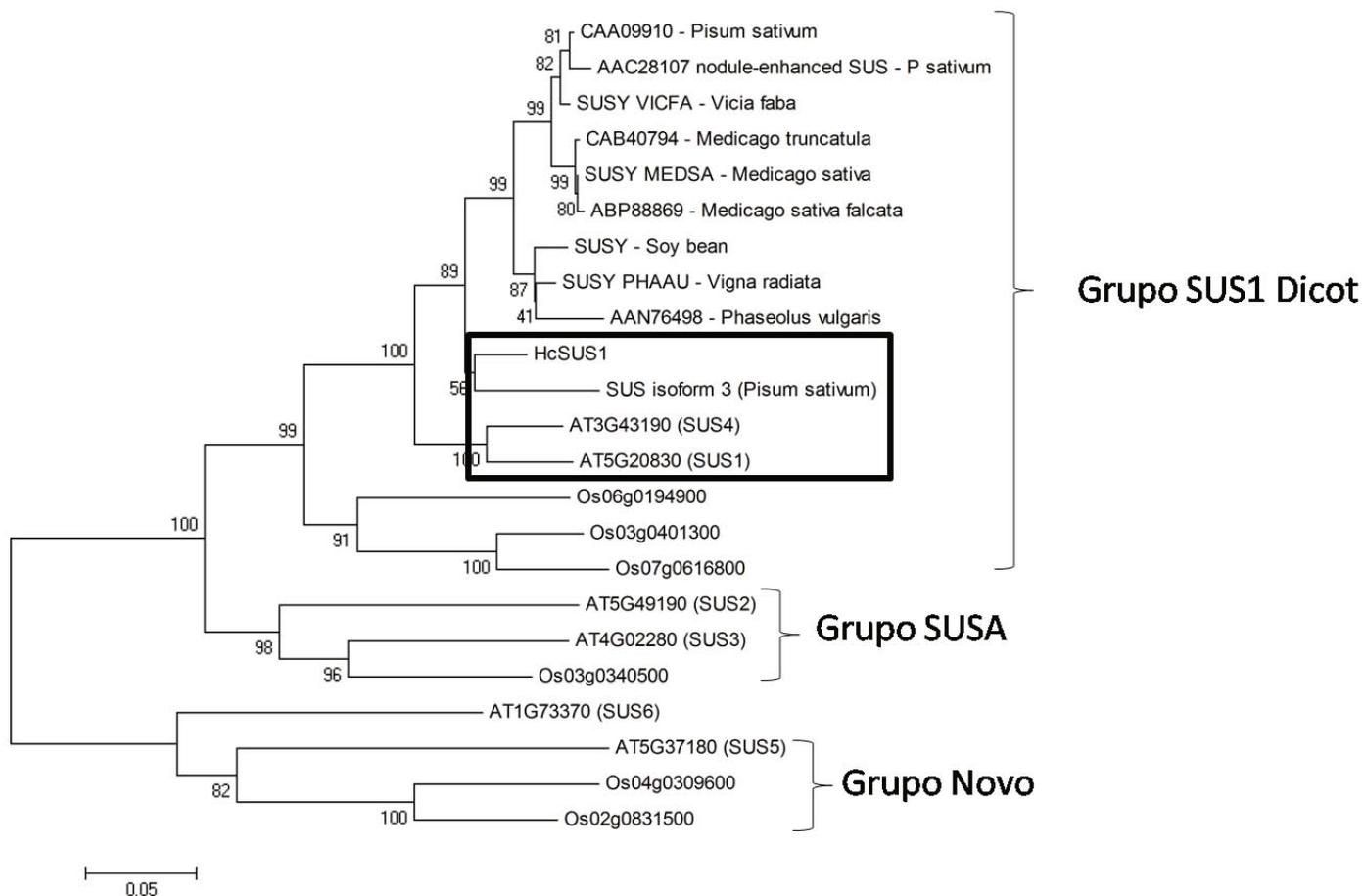
```

**Figura 12.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da xiloglucano endotransglicosilase parcial do jatobá (Hc-XTH1) (Ver Anexo 2) com a espécie de leguminosa (*Vigna angularis*) filogeneticamente mais próxima.



**Figura 13.** Relação evolutiva da invertase alcalina de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distâncias calculadas a partir do alinhamento da posição 278 a 556 em *A. thaliana* (AT4G34860). As seqüências utilizadas foram as do jatobá (Hc-AIKIN1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (9 membros), *Oryza sativa* (OsNIN1 - AY575558; OsNIN2 - AY575559; OsNIN3 - AY575560; OsNIN4 - AY575561; OsNIN5 - AY575562; OsNIN6 - AY575563; OsNIN7 - AY575564; OsNIN8 - AY575565) e leguminosa (Lc-inv1 - AJ717412). Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*.





**Figura 15.** Relação evolutiva da sacarose sintase de Angiospermas. A árvore filogenética foi inferida por uma análise NJ das distâncias calculadas a partir do alinhamento da posição 429 a 810 em *A. thaliana* (SUS4). As seqüências utilizadas foram as do jatobá (Hc-SUS1) (Ver Anexo 2), *A. thaliana* (At-SUS1 - AT5G20830; At-SUS2 - AT5G49190; At-SUS3 - AT4G02280; At-SUS4 - AT3G43190; At-SUS5 - AT5G37180; At-SUS6 - AT1G73370), *Oryza sativa* (6 membros) e leguminosa (SUSY VICFA - P31926; SUSY MEDSA - O65026; SUSY PHAAU - Q01390; SUS isoform 3 - CAC32462). Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*. Dicot = dicotiledôneas.

Score = 691 bits (1784), Expect = 0.0 Identities = 339/382 (88%), Positives = 351/382 (91%), Gaps = 16/382 (4%)

```

Mt/AJ131943      SLLAHKLGVTQCTIAHALEKTKYPESDIYWKKFEEKYHFSCQFTADLFAMNHTDFIITST 480
HcSUS1          -----LGV TQCTIAHALEKTKYPDSDIYWKKFEDKYHFSCQFTADLFAMNHTDFIITST 54
                *****;*****;*****

Mt/AJ131943      FQEIAGSKDKVGQYESHTAFTLPGLYRVVHGIDVFDPKFNIVSPGADQTIYFPYTETSRR 540
HcSUS1          FQEIAGSKDITVGQYESHTAFTLPGLYRVVHGIDVFDPKFNIVSPGADMSIYFPYTETQKR 114
                *****;*****;*****

Mt/AJ131943      LTSFYPEIEELLYSSVENEHICVLK----- 566
HcSUS1          LTSFHPEIEELLYSSVENEHICVLKDRTPKIIFTMARLDRVKNITGLVEWYGKNARLRE 174
                ****;*****

Mt/AJ131943      -----KKMYGLIETYKLNQFRWISSQMNRVRNGELYRVC 602
HcSUS1          LVNLVVVAGDRRKESQDLEEKAEEMKKMYGLIETYKLNQFRWISSQMNRVRNGELYRVC 234
                *****

Mt/AJ131943      DTK-----GAFVQPAVYEAFGLTVVEAMATGLPTFATLNGGPAEIIIVHG 646
HcSUS1          DTKGAFEAFAEAFQHRVICDTKGAFVQPAVYEAFGLTVVEAMTCGLPTFATCNGGPAEIIIVHG 294
                *** *****;*****

Mt/AJ131943      KSGFHIDPYHGDRAADLLVEFFEKVKVDPSHWDKISQGGLQRIEEKYTWTIYSQRLTLT 706
HcSUS1          KSGFHIDPYHGDRAAETLVGFFEKCKADPTHWDKISQGGLKRIHEKYTWQIYSERLLTLT 354
                *****; ** **** *.**;*****;**.***** **;*****

Mt/AJ131943      GVGFWKHVSNLDRLESRRYLEMFYALKYRKLAEVPLAVE 747
HcSUS1          GVGFWKHVSNLDRRESRRYLEMFYAVK----- 382
                ***** *****;*

```

**Figura 16.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos da sacarose sintase parcial do jatobá (Hc-SUS1) (Ver Anexo 2) com a espécie de leguminosa (*Medicago truncatula*) filogeneticamente mais próxima.

#### **9.4. Análise densitométrica e caracterização da expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes da BGAL1, XTH1, AlkIN1 e SUS1 nos cotilédones, folhas hipocótilos e raízes do jatobá.**

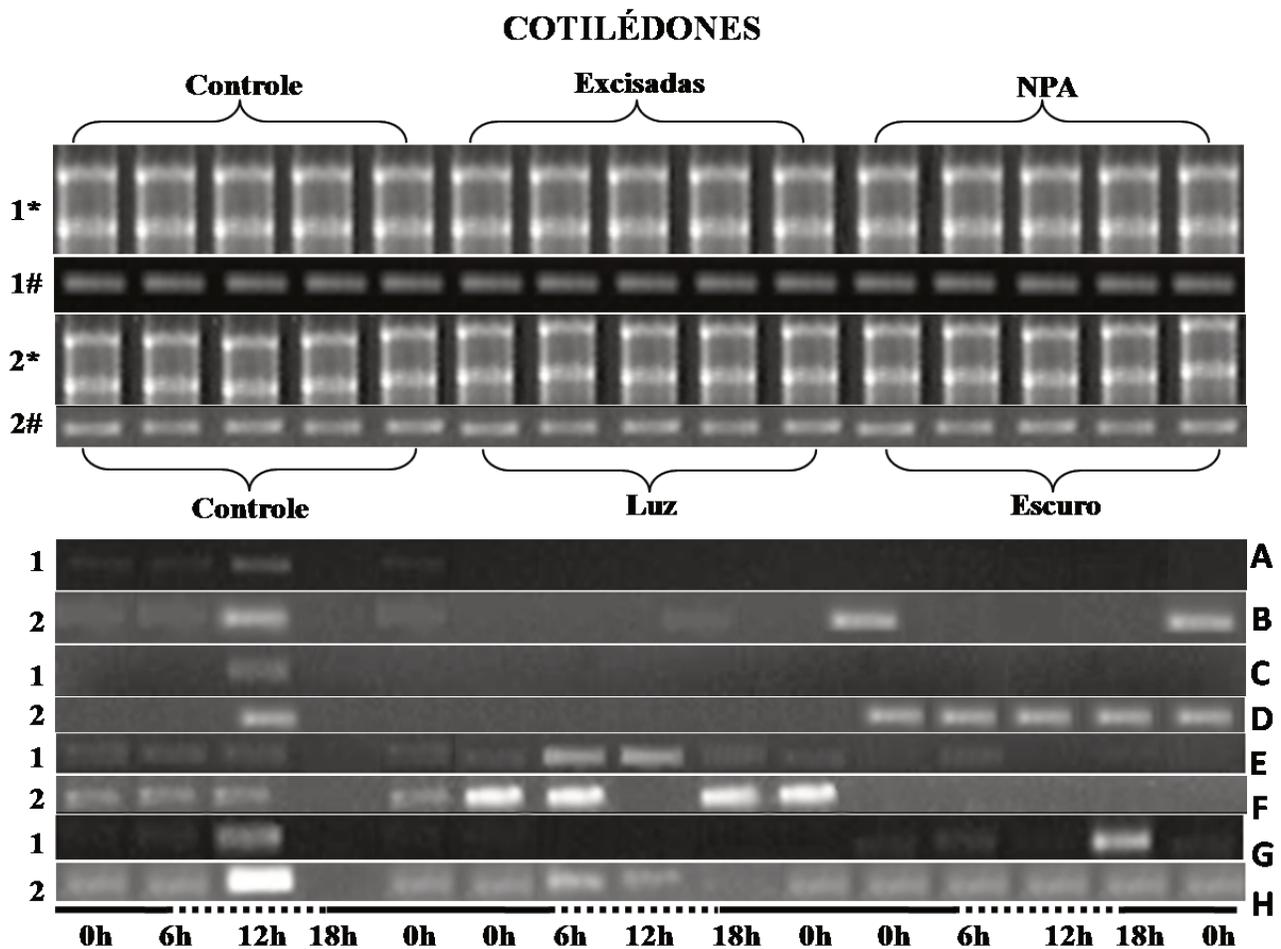
##### **9.4.1. Cotilédones**

O gene HcBGAL1 apresentou alto nível de transcritos nas plântulas controle, às 12h (meio dia), quando comparado com as 0h e 6h (médio), às 18h não foi observado transcrito, nas plântulas excisadas e tratadas com NPA não foi observado transcrito (Figura 17A). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso de forma similar ao controle, com alto nível de transcritos às 18h, no escuro contínuo o gene foi expresso apenas às 0h (Figura 17B). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi reprimido nas plântulas excisadas, tratadas com NPA e nas plântulas crescidas em escuro contínuo (Figura 18A; Anexo3).

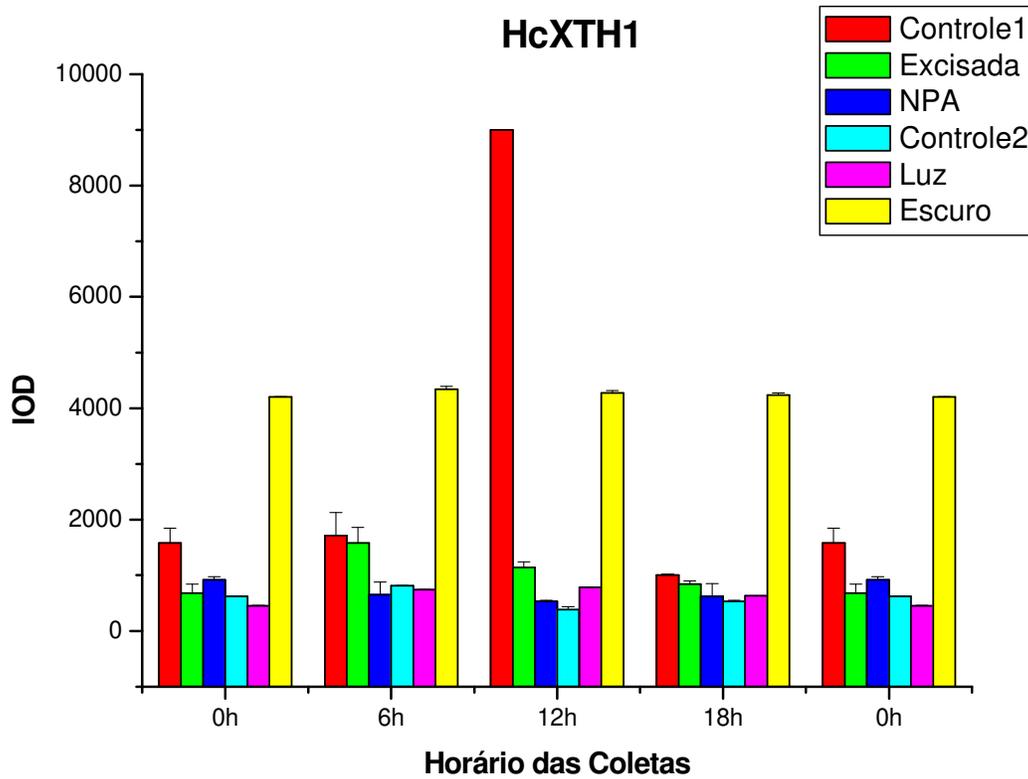
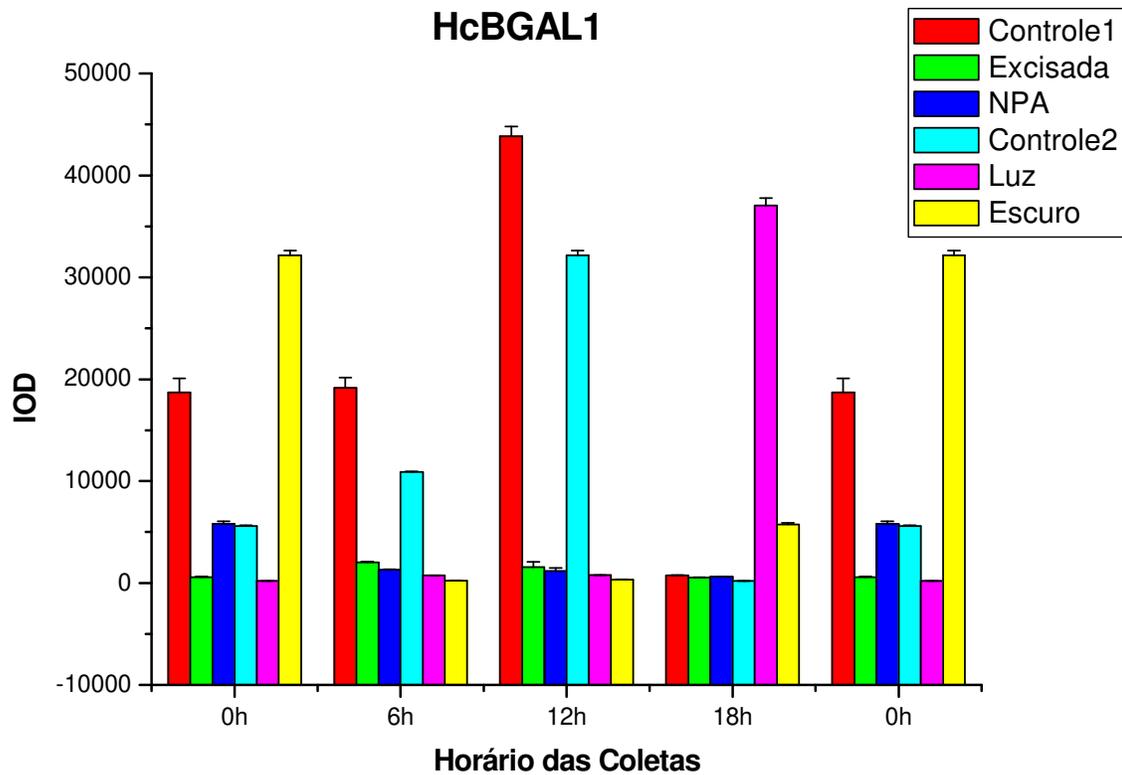
O gene HcXTH1 foi expresso apenas às 12h nas plântulas controle, nas plântulas excisadas e tratadas com NPA não foi observado transcrito (Figura 17C). Nas plântulas crescidas em luz contínua não foi observado transcrito e no escuro contínuo o gene foi induzido (Figura 17D). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi reprimido nas plântulas excisadas, tratadas com NPA e crescidas em luz contínua e induzido nas plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 18B; Anexo 3).

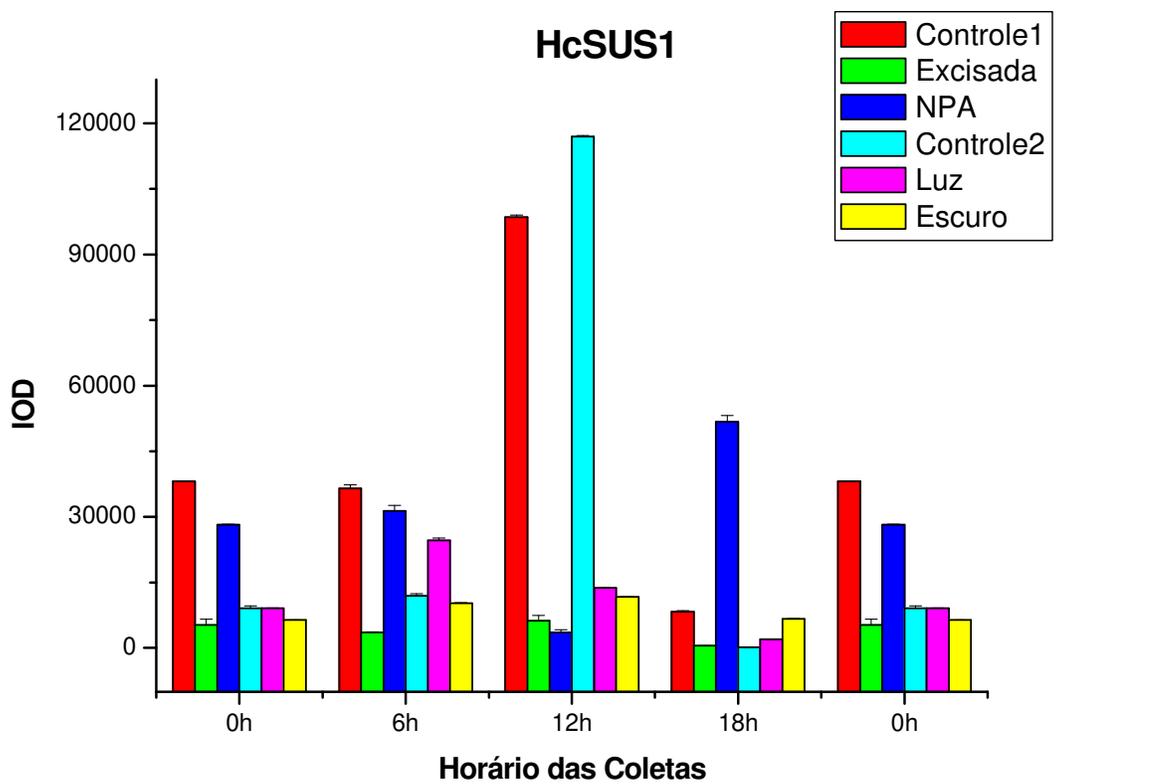
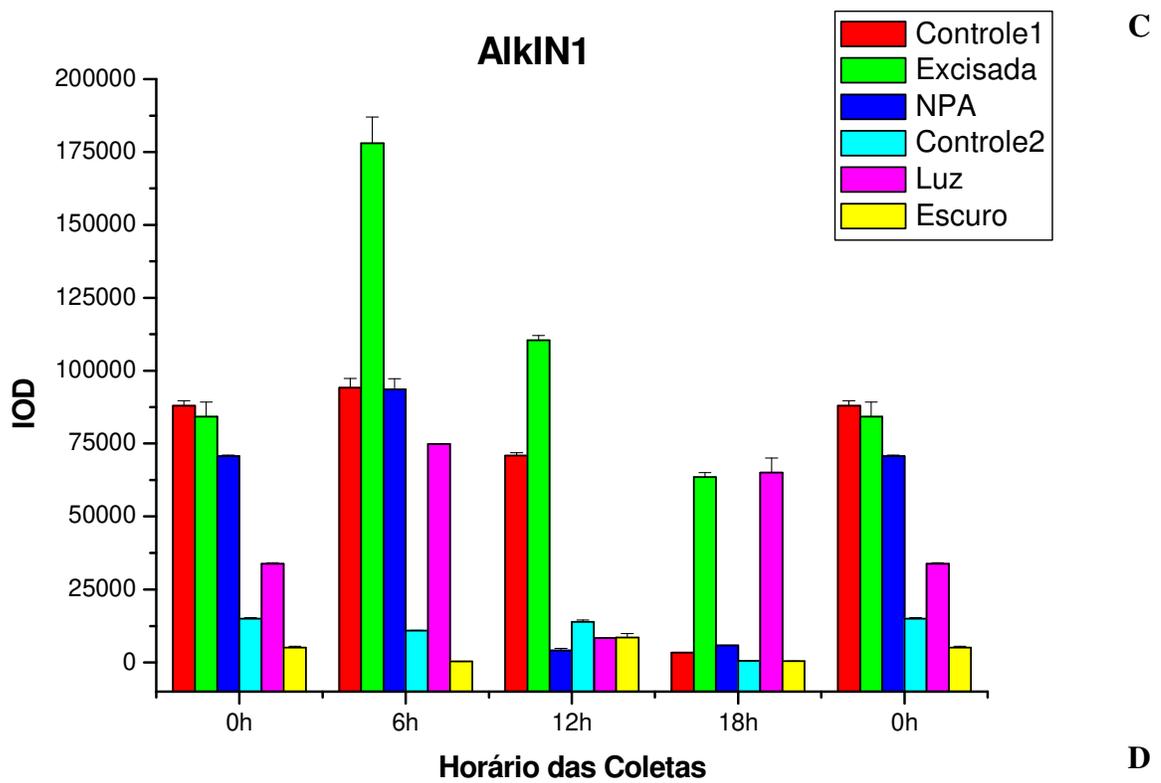
O gene HcAlkIN1 foi expresso ao longo do dia de forma constitutiva nas plântulas controle, às 0h, 6h e 12h, às 18h não foi observado transcrito, nas plântulas excisadas o gene foi expresso em todos os horários analisados e nas plântulas tratadas com NPA o gene foi expresso apenas às 6h (Figura 17E). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi induzido e no escuro contínuo não foi observado transcrito (Figura 17F). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi reprimido nas plântulas tratadas com NPA e nas plântulas crescidas no escuro contínuo e induzido nas plântulas excisadas e crescidas em luz contínua (Figura 18C; Anexo3).

O gene HcSUS1 foi expresso apenas no período de luz nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 12h quando comparado com as 6h (médio), nas plântulas excisadas não foi observado transcrito e nas plântulas tratadas com NPA o gene foi expresso de forma similar ao controle com alto nível de transcritos às 18h (Figura 17G). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi induzido e nas plântulas crescidas no escuro o gene foi expresso de forma constitutiva (Figura 17H). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas em luz contínua (Figura 18D; anexo3)



**Figura 17.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nos cotilédones pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 = Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz.





**Figura 18.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nos cotilédones para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D).

#### 9.4.2. Folhas

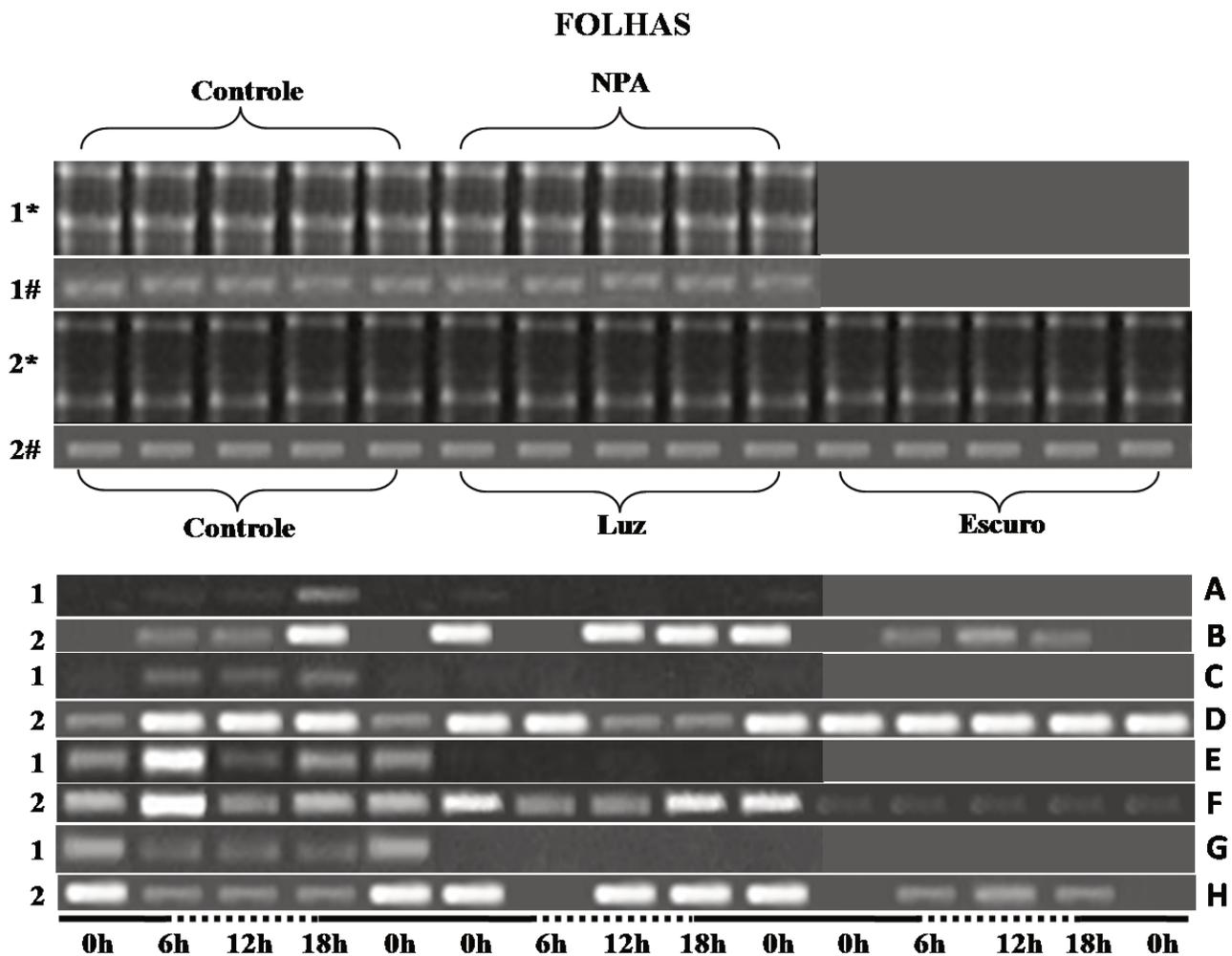
O gene HcBGAL1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 18h, quando comparado com as 6h e 12h (médio), às 0h não foi observado transcrito, nas plântulas tratadas com NPA o gene foi reprimido (Figura 19A). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi induzido e apresentou picos de expressão a cada 12 horas e no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 19B). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas em luz contínua e reprimido em plântulas tratadas com NPA e crescidas no escuro contínuo (Figura 20A; Anexo 3).

O gene XTH1 foi expresso ao longo do dia de forma constitutiva nas plântulas controle, às 6h, 12h e 18h, nas plântulas tratadas com NPA o gene foi reprimido (Figura 19C). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso de forma similar ao controle e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi induzido (Figura 19D). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas no escuro contínuo e reprimido em plântulas tratadas com NPA (Figura 20B; Anexo 3).

O gene HcAlkIN1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 6 horas, quando comparado com as 0h e 18h (médio), às 12h (baixo), nas plântulas tratadas com NPA o gene foi reprimido (Figura 19E). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi induzido e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi expresso de forma constitutiva em todos os horários analisados (Figura 19F). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas em luz contínua e reprimido nas plântulas tratadas com NPA e em plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 20C; Anexo 3).

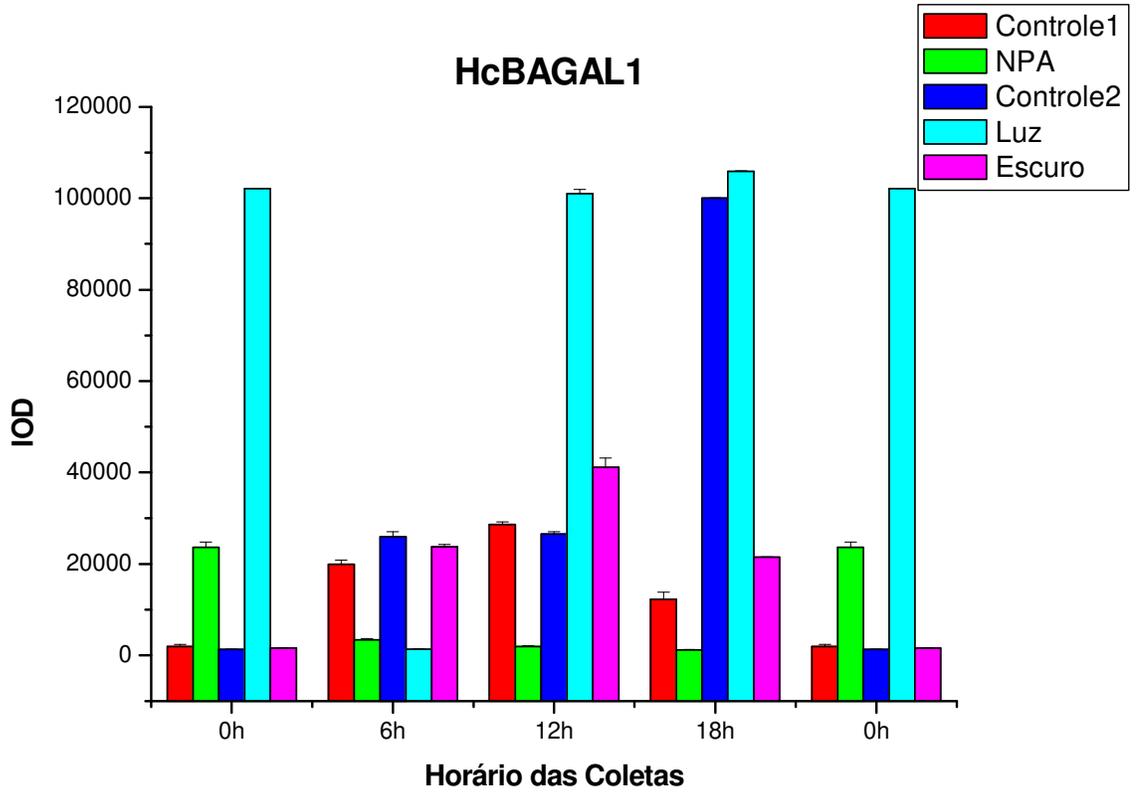
O gene HcSUS1 foi expresso ao longo do dia, nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 0h, quando comparado às 6h, 12h e 18 horas que foi expresso de forma constitutiva, nas plântulas tratadas com NPA não foi observado transcrito (Figura 19G). Nas

plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso de forma constitutiva e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 19H). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas em luz contínua e reprimido nas plântulas tratadas com NPA e em plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 20D; Anexo 3).

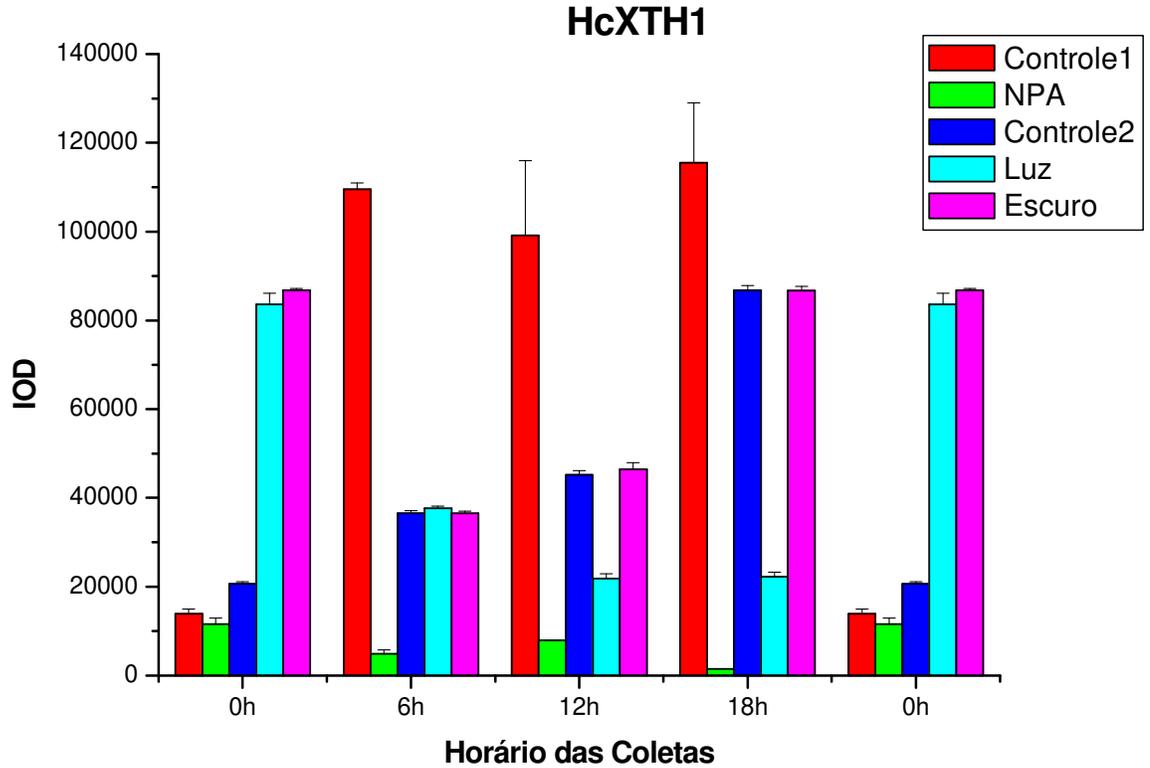


**Figura 19.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nas folhas pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 = Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz.

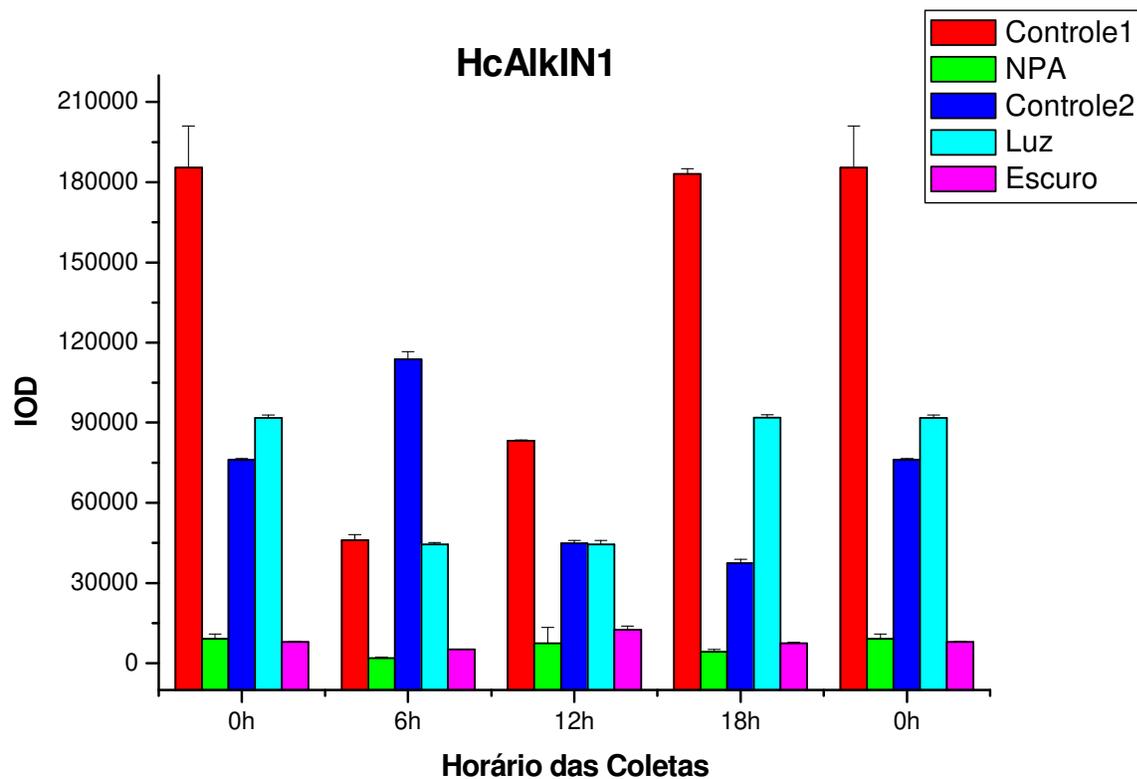
A



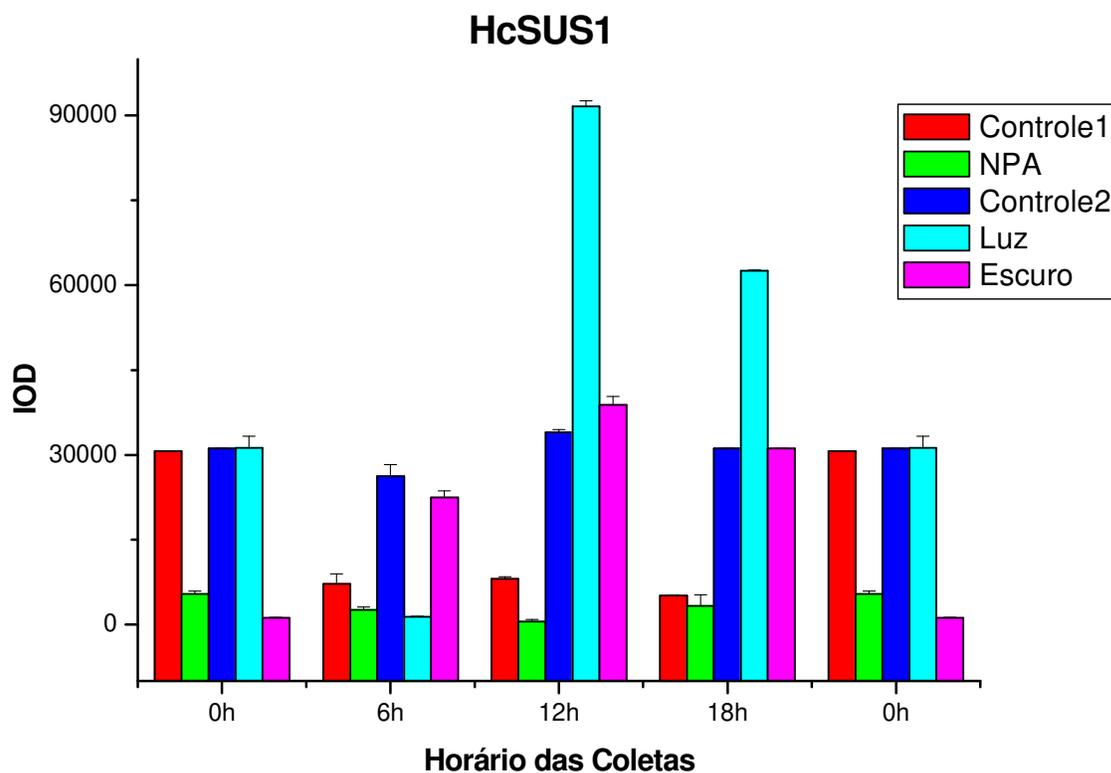
B



C



D



**Figura 20.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nas folhas para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D).

### 9.4.3. Hipocótilos

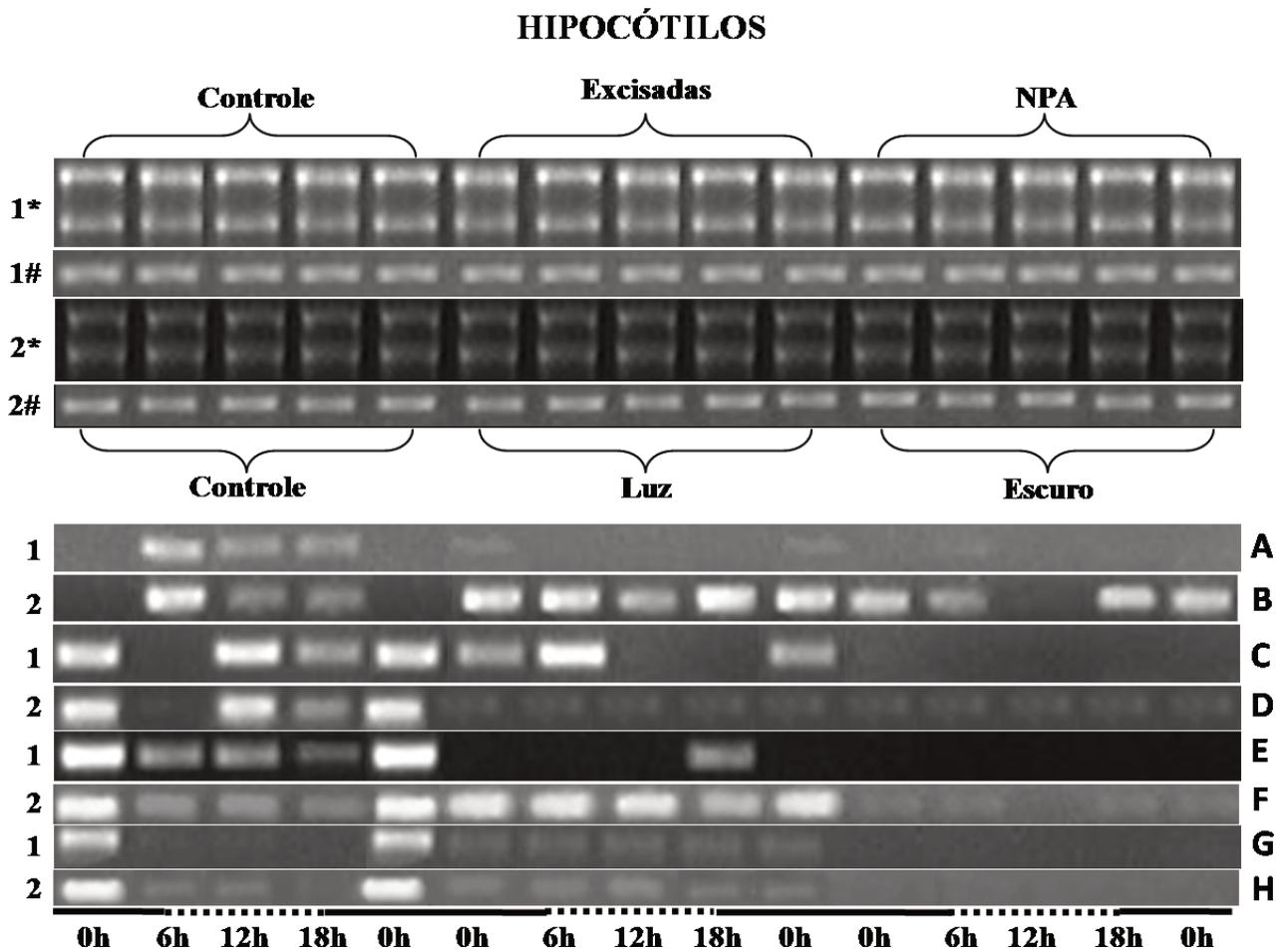
O gene HcBGAL1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 6h, quando comparado com 12h e 18h e às 0h não foi observado transcrito, nas plântulas excisadas e tratadas com NPA o gene foi reprimido (Figura 21A). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso em todos os horários analisados e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi expresso de forma similar ao controle, no entanto, com picos de expressão a cada 12 horas (Figura 21B). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas em luz contínua e reprimido nas plântulas excisadas e tratadas com NPA (Figura 22A; Anexo 3).

O gene HcXTH1 foi expresso ao longo do dia, com picos de expressão a cada 12 horas nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 0h e 12h, quando comparado com 18h (médio), às 6h não foi observado transcrito, nas plântulas excisadas e tratadas com NPA o gene foi reprimido (Figura 21C). Nas plântulas crescidas em luz e escuro contínuo o gene foi expresso de forma constitutiva (Figura 21D). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi reprimido nas plântulas excisadas e tratadas com NPA (Figura 22B; Anexo 3).

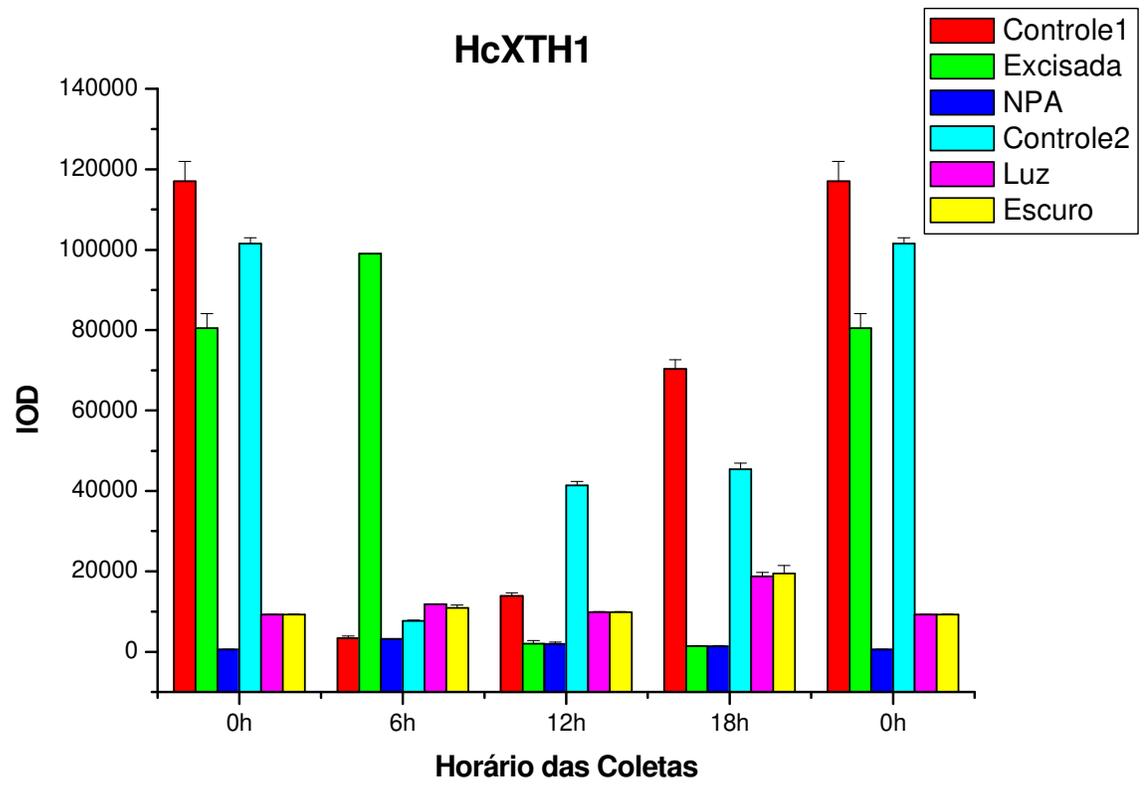
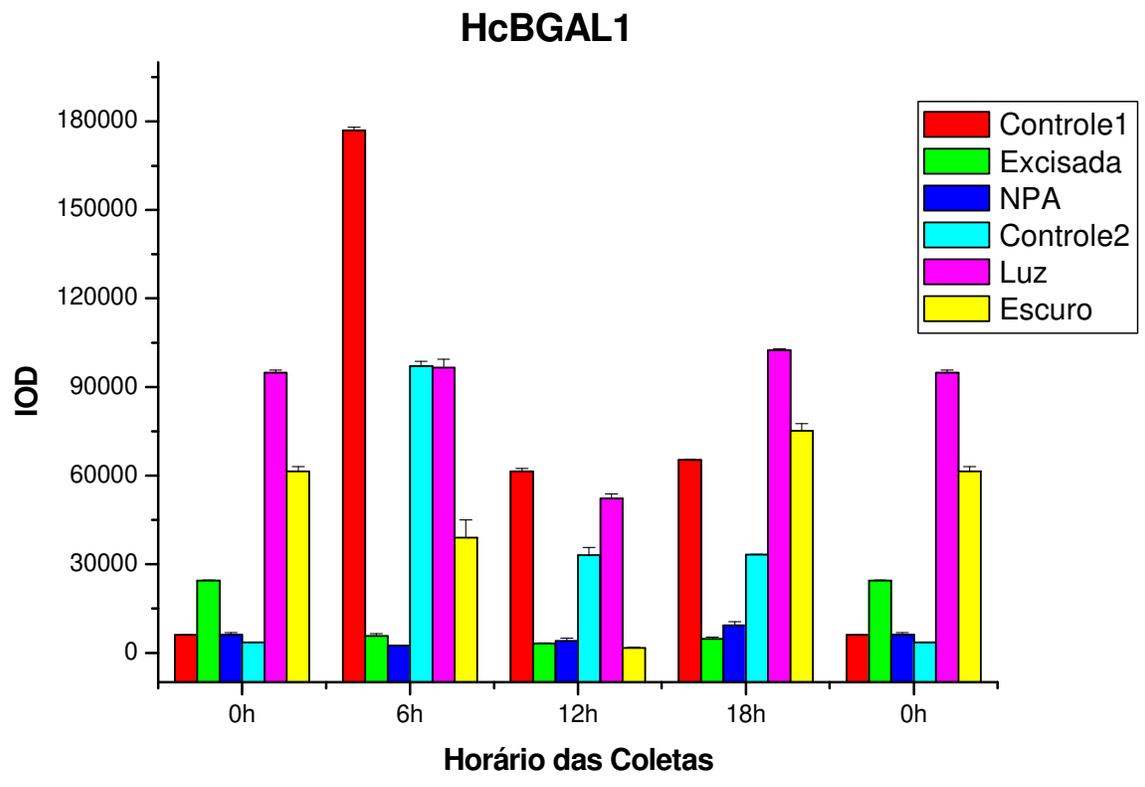
O gene HcAlkIn1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 0h, quando comparado com as 6h e 12h (médio) e às 18h (baixo), nas plântulas excisadas e tratadas com NPA o gene foi reprimido (Figura 21E). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi induzido e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 21F). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas na luz contínua e reprimido nas plântulas excisadas, tratadas com NPA e nas plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 22C; Anexo3).

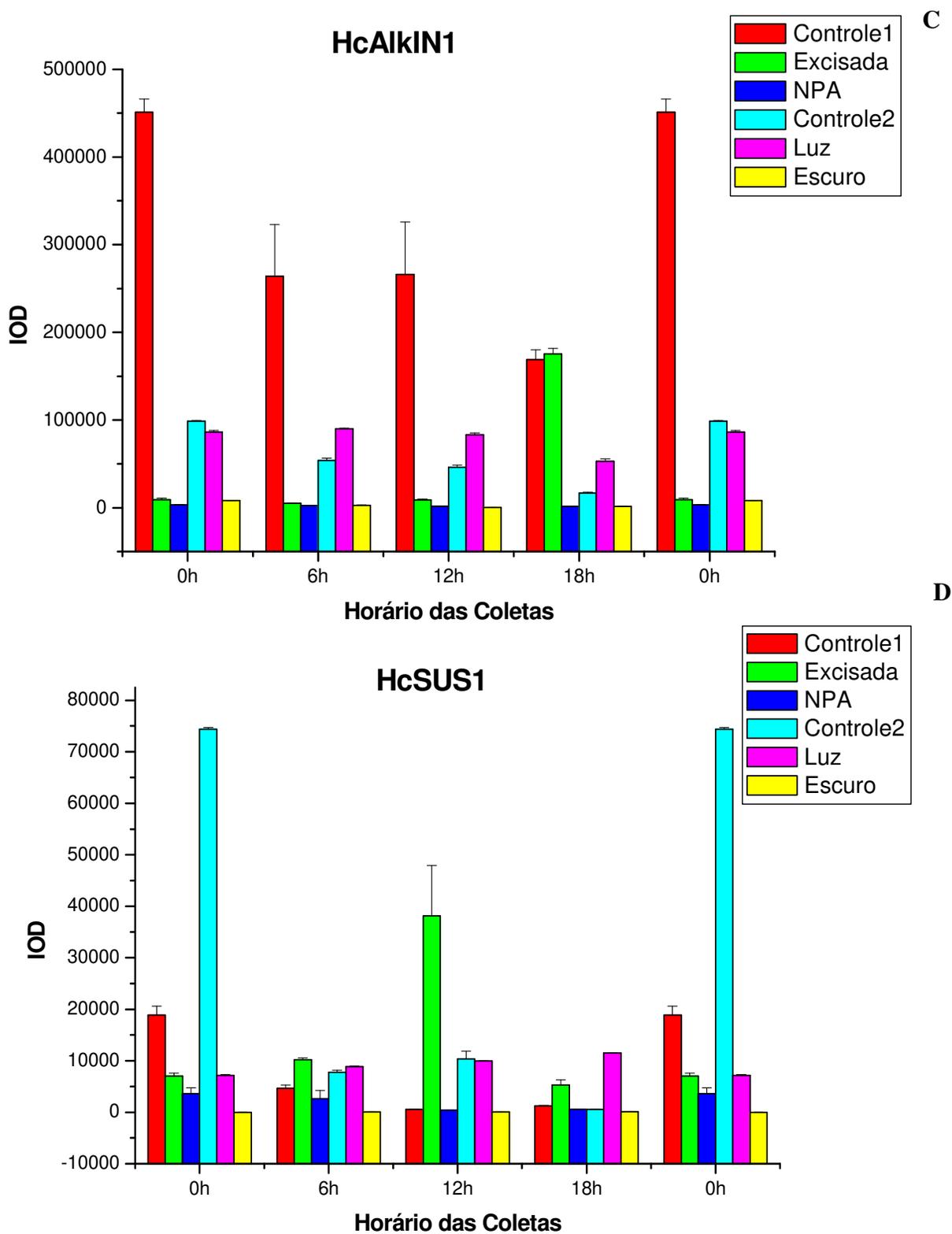
O gene HcSUS1 foi expresso nas plântulas controle, apenas à noite (0h), nas plântulas excisadas o gene foi expresso de forma constitutiva e nas plântulas tratadas com NPA não foi observado transcrito (Figura 21G). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso

de forma constitutiva e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 21H). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi reprimido nas plântulas tratadas com NPA e nas plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 22D; Anexo 3).



**Figura 21.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nos hipocótilos pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 = Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz.





**Figura 22.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nos hipocótilos para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D).

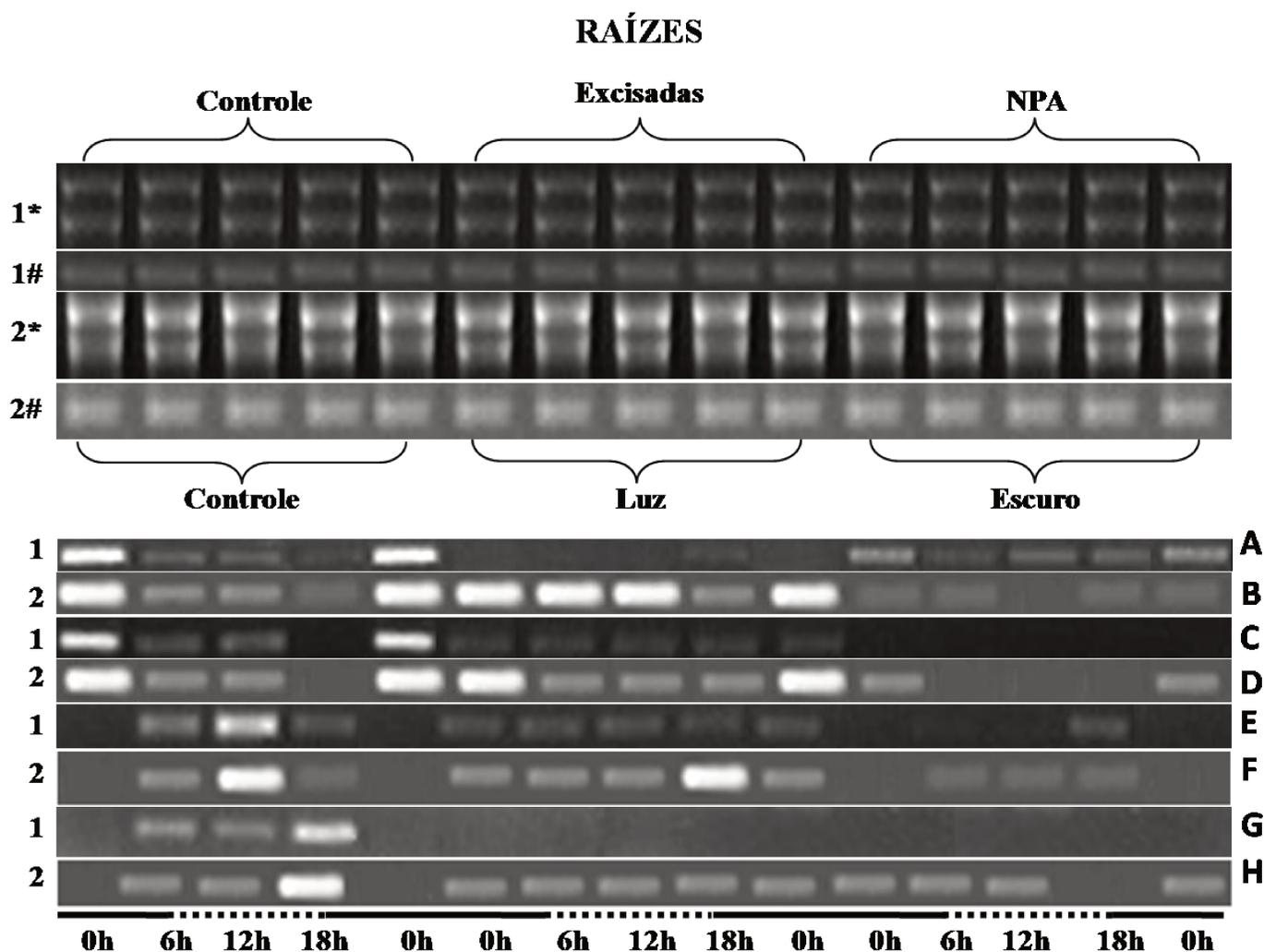
#### 9.4.4. Raízes

O gene HcBGAL1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 0h, quando comparado com as 6h e 12h (médio) e 18h (baixo), nas plântulas excisadas o gene foi reprimido e nas plântulas tratadas com NPA o gene foi expresso de forma similar o controle com alto nível de transcritos às 0h, quando comparado com às 12h e 18h (médio) e às 6h (baixo) (Figura 23A). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi induzido e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 23B). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas na luz contínua e reprimido nas plântulas excisadas e nas plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 24A; Anexo 3).

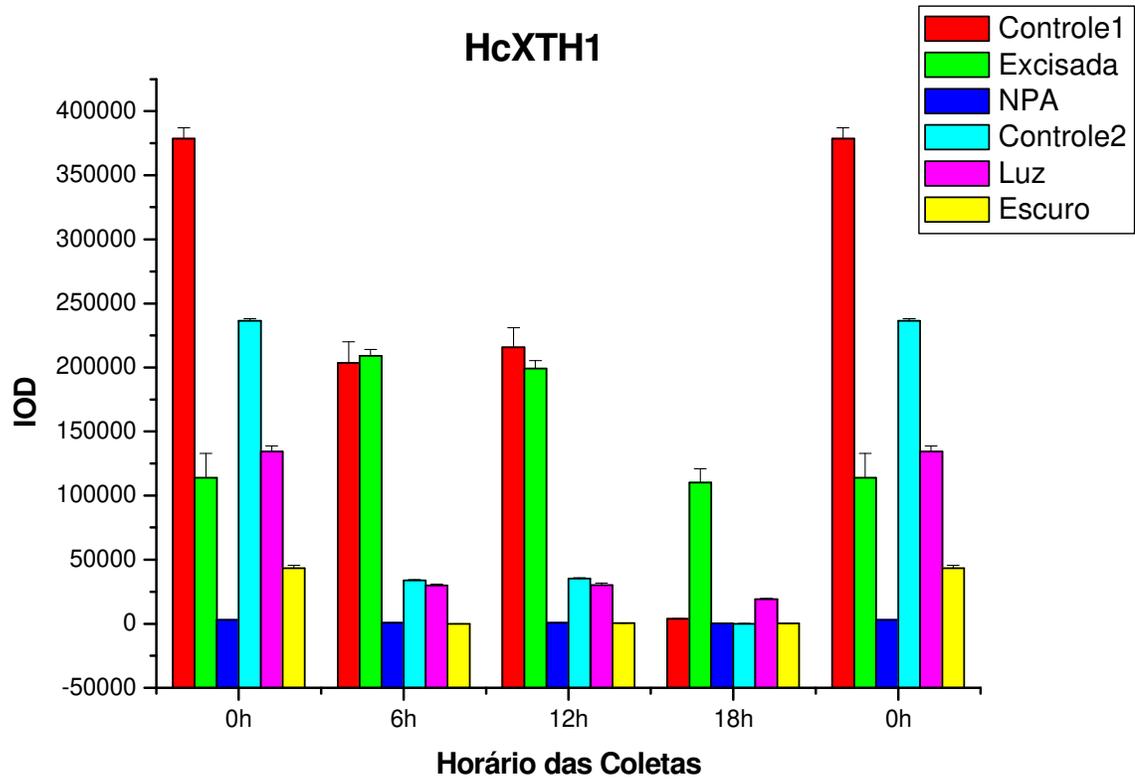
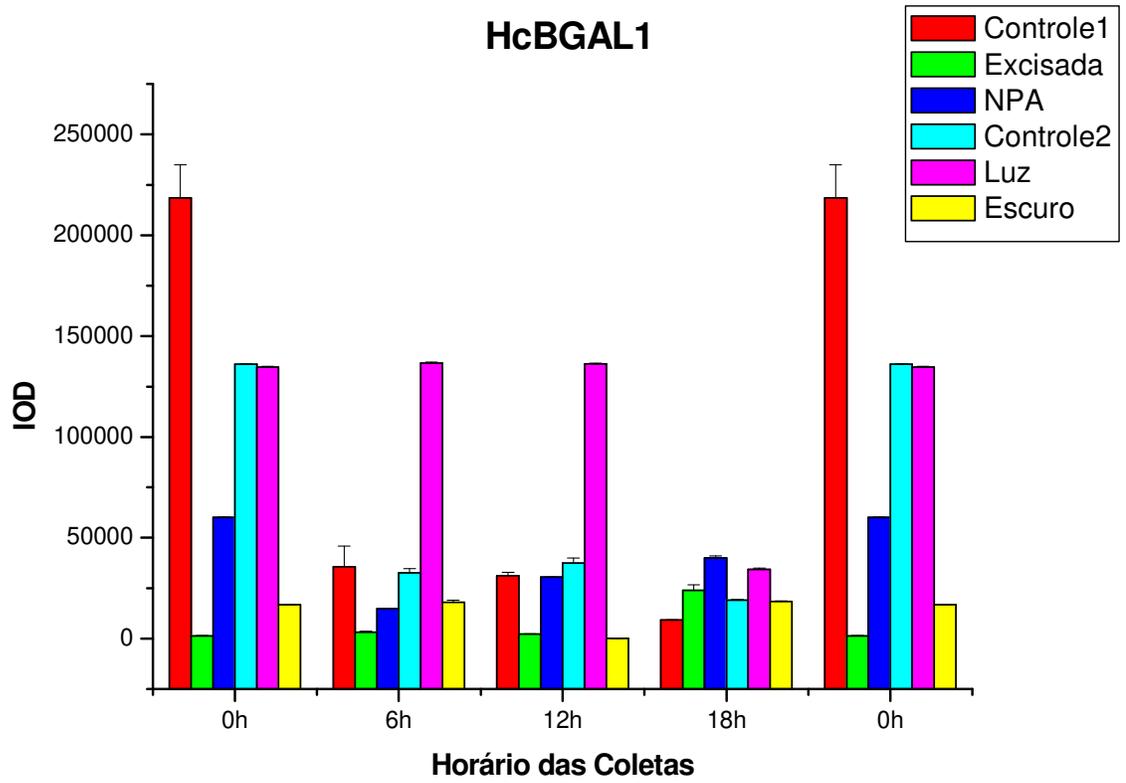
O gene HcXTH1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 0h, quando comparado com às 6h e 12h (médio), às 18h não foi observado transcrito, nas plântulas excisadas o gene foi reprimido, e não foi observado transcrito nas plântulas tratadas com NPA (Figura 23C). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso em todos os horários analisados e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 23D). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi reprimido nas plântulas excisadas, tratadas com NPA e nas plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 24B; Anexo 3).

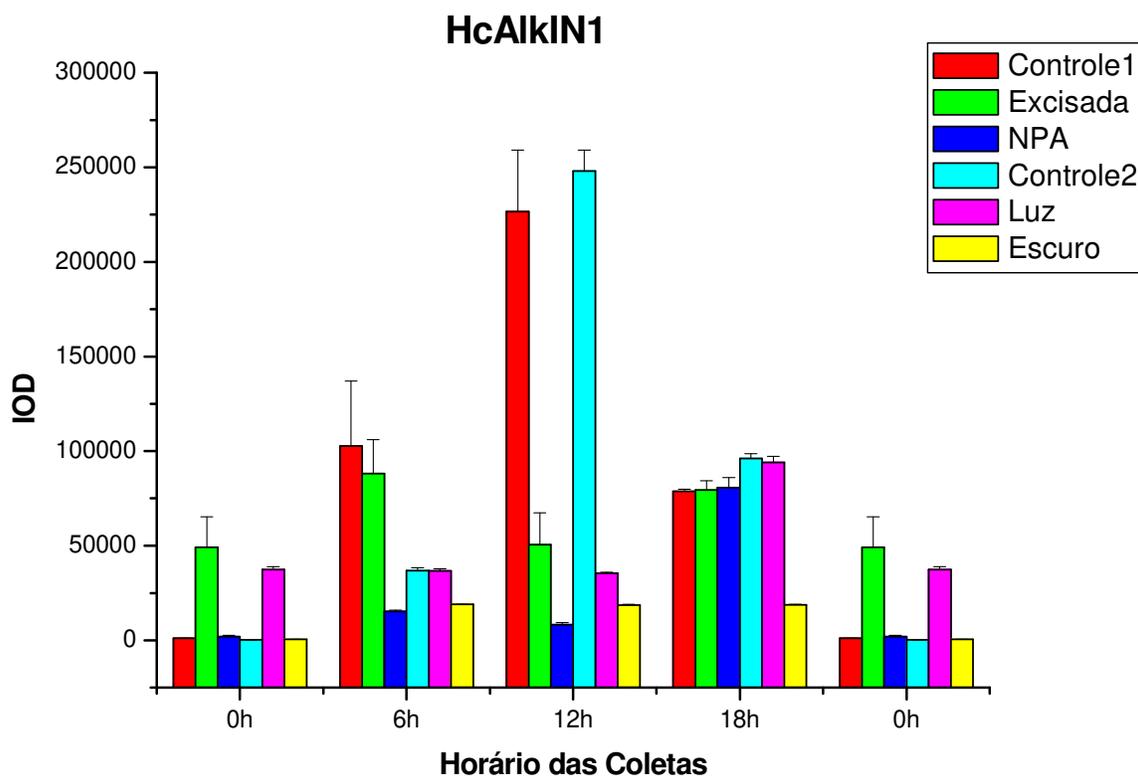
O gene HcAlkIN1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 12 horas, quando comparado com às 6h e 18h (médio), às 0h hora não foi observado transcrito, nas plântulas excisadas o gene foi expresso de forma constitutiva e nas plântulas tratadas com NPA o gene foi reprimido (Figura 23E). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso em todos os horários analisados e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 23F). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi reprimido nas plântulas tratadas com NPA e nas plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 24C; Anexo 3).

O gene HcSUS1 foi expresso ao longo do dia nas plântulas controle, com alto nível de transcritos às 18 horas, quando comparado com às 6h e 12h (médio), às 0h não foi observado transcrito, nas plântulas excisadas e tratadas com NPA não foram observados transcritos (Figura 23G). Nas plântulas crescidas em luz contínua o gene foi expresso de forma constitutiva e nas plântulas crescidas no escuro contínuo o gene foi reprimido (Figura 23H). As análises densitométricas confirmaram os resultados observados nos experimentos de RT-PCR, considerando tanto o período de 24 horas como cada horário individualmente. O gene foi induzido nas plântulas crescidas na luz contínua e reprimido nas plântulas excisadas, tratadas com NPA e nas plântulas crescidas no escuro contínuo (Figura 24D; Anexo 3).

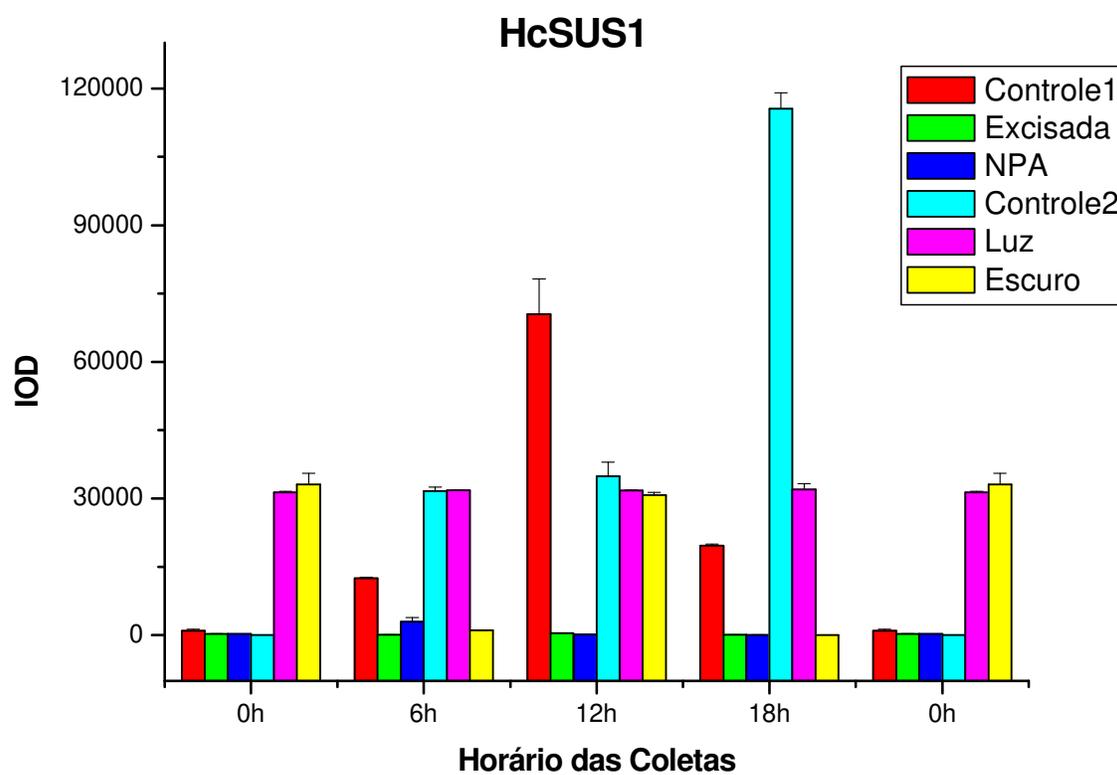


**Figura 23.** Padrão de expressão e densitometria dos genes da  $\beta$ -galactosidase (BGAL1), xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. A análise foi feita nas raízes pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa a cada seis horas. Foram analisados os tratamentos com auxina - TAUX (plântulas com fotoperíodo com 12h, excisadas e tratadas com NPA) e alternância de luz - TAL (plântulas com fotoperíodo com 12h, crescidas em luz contínua e em escuro contínuo por 20 dias). BGAL1 TAUX (A); BGAL1 TAL (B); XTH1 TAUX (C); XTH1 TAL (D); AlkIN1 TAUX (E); AlkIN1 TAL (F); SUS1 TAUX (G); SUS1 TAL (H). 1 = Tratamento com auxina; 2 = Tratamento com alternância de luz; \* = RNA total; # = Actina. Linha contínua = 12h de escuro e linha tracejada = 12h de luz.





D



**Figura 24.** Densitometria dos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo em plântulas de *H. courbaril* coletadas aos 45 dias após embebição. Representação gráfica da análise da IOD (densidade óptica integrada) para os tratamentos de auxina endógena e alternância de luz nas raízes para os genes da BGAL1(A); XTH1 (B); AlkIN1 (C); SUS1 (D).

## 10. DISCUSSÃO

### 10.1. Caracterização dos cDNAs parciais do jatobá

O primeiro passo do trabalho foi à seleção de dois genes relacionados ao processo de degradação do xiloglucano ( $\beta$ -galactosidase e xiloglucano endotransglicosilase) e outros dois (invertase alcalina e sacarose sintase) relacionados ao mecanismo de mobilização dos produtos de degradação do xiloglucano. Estes genes foram selecionados devido o conhecimento prévio da atividade destas enzimas durante os mecanismos de desenvolvimento da plântula do jatobá.

A estratégia adotada foi buscar seqüências em bancos de dados que permitisse a obtenção de *primers* degenerados que amplificasse os respectivos genes a fim de tornar possível a clonagem e obtenção dos genes parciais do jatobá. As seqüências de cDNAs parciais foram obtidas preferencialmente a partir do produto amplificado dos cotilédones, no entanto, a XET e a invertase alcalina foram obtidas a partir dos cDNAs da raiz. Baseado nas seqüências obtidas foi gerada uma árvore filogenética para os genes da  $\beta$ -galactosidase, XTH, invertase alcalina e sacarose sintase, a fim de tentar caracterizá-los, de acordo com a disponibilidade de informações na literatura. Os genes podem ser organizados em vários grupos evolutivamente relacionados, mas funcionalmente divergentes.

#### 10.1.1. $\beta$ -galactosidase

A atividade da  $\beta$ -galactosidase é caracterizada pela habilidade de hidrolisar resíduos terminais não reduzidos de  $\beta$ -D-galactosil a partir de polímeros de carboidratos, glicoproteínas e galactolipídeos (Ross et al. 1994; Smith et al. 1998, 2002). Pouco se conhece sobre as características estruturais e funcionais desses genes. Wu & Burns (2004) mostraram uma análise com a presença de três grupos filogeneticamente distintos onde o gene de *Citrus* foi agrupado com proteínas codificadas por genes expressos durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto. Iglesias et al. (2006) revelaram que 12 entre os 18 genes relatados em *A. thaliana* mostram um peptídeo sinal que classificam as enzimas como  $\beta$ -galactosidases apoplásticas e os autores mostram através da análise da expressão que os genes apresentam um padrão de expressão extremamente variado, de acordo com o tecido analisado (folhas jovens e maduras, região apical

e basal do caule e raiz). Os mesmos autores concluíram que devido à existência de diferentes substratos na parede, existem diversos processos fisiológicos que resultam em uma grande variação nos padrões de expressão dos genes que codificam as  $\beta$ -galactosidases de parede celular.

A fim de tentar caracterizar um possível grupo funcional para a  $\beta$ -galactosidase do jatobá (Hc-BGAL1) foram utilizados 17 genes de *A. thaliana*, 10 ortólogos de *O. sativa*, 3 genes que codificam em espécies de leguminosas, 3 genes que codificam em tomate, 2 genes que codificam em morango e um gene que codifica em maçã. De acordo com a filogenia o gene do jatobá foi associado ao grupo 1 conforme observado (Figura 9), sugerindo uma estrutura e atividade enzimática característica desse grupo. De acordo com Wu & Burns (2004) as  $\beta$ -galactosidases são classificadas em 3 grupos de acordo com a similaridade entre as seqüências de aminoácidos. No entanto, foi possível observar 5 grupos além de um grupo basal a partir das seqüências utilizadas no presente trabalho. Wu & Burns (2004) caracterizam funcionalmente o grupo 1, que apresenta genes expressos durante o desenvolvimento e amadurecimento de frutos. De acordo com Iglesias et al. (2006) membros do grupo 3 são caracterizados por apresentar genes com diferentes padrões de expressão.

Como mencionado as  $\beta$ -galactosidases são associadas à degradação da parede celular em frutos (Lazan et al. 2004) e segundo Tiné et al. (2000) e Santos et al. (2004) ocorrem mecanismos similares na parede celular em frutos durante o amadurecimento e nos cotilédones durante a mobilização de reserva. Buckeridge et al. (2005) demonstraram que a função biológica da  $\beta$ -galactosidase de *L. angustifolius*, que os autores chamaram de exo- $\beta$ -galactanase, possui alta similaridade com o que ocorre durante o amadurecimento de frutos. Portanto, a alta similaridade do gene HcBGAL1 com genes expressos durante o desenvolvimento do fruto corrobora com os dados da literatura, onde a expressão do gene esta associada a mecanismos que ocorrem durante a morfogênese da parede celular.

### 10.1.2. Xiloglucano endotransglicosilase

As XETs fazem parte da família multigênica XTH, na qual são atribuídas funções relacionadas à construção, modificação e manutenção da arquitetura da parede celular durante o desenvolvimento da planta (Rose et al. 2002).

O padrão da expressão desses genes tem sido analisado em diversas espécies vegetais a fim de tentar caracterizar funcionalmente os grupos e em *A. thaliana* foi observado que determinados genes respondem de forma diferenciada a estímulos como a luz e temperatura (Rose et al. 2002). Em *A. thaliana* a família gênica XTH consiste em 33 membros que são classificados em três grupos baseado na estrutura gênica (Xu et al. 1996; Nishitani et al. 1997; Rose et al. 2002). Os genes pertencentes ao grupo 1 são caracterizados por serem expressos em tecidos jovens em desenvolvimento e apresentam alta identidade (70 a 90%) entre diferentes espécies (Romo et al. 2005). O grupo 2 possui genes que são expressos em diferentes espécies mostrando padrões de expressão em resposta a hormônios ou estímulos mecânicos. O grupo 3 representa um grupo divergente das XTHs, que tem xiloglucano hidrolase e xiloglucano endotransglicosilase como membros (Romo et al. 2005).

A fim de tentar caracterizar um possível grupo funcional para a xiloglucano endotransglicosilase do jatobá (HC-XTH1) foram utilizados os 32 genes de *A. thaliana*, 14 ortólogos de *O. sativa*, além de 2 genes que codificam em espécies de leguminosas e uma Tropaeolaceae (*Tropaeolum majus*). De acordo com a filogenia estabelecida foi possível observar que o gene que codifica a xiloglucano endotransglicosilase do jatobá apresentou alta similaridade com membros do grupo 1 (84% de identidade) Va-XTH2 (leguminosa) sugerindo, uma estrutura e atividade enzimática característica desse grupo (Figuras 11 e 12). De acordo com Nakamura et al. (2003) os resultados observados para os genes Va-XTH1 e Va-XTH2 (leguminosa) foram diferentemente induzidos na presença de auxina. A funcionalidade da enzima em Va-XTH2 foi associada à remodelação nas moléculas do xiloglucano, através do mecanismo de transglicosilação, sem atividade hidrolítica no xiloglucano, fazendo parte da construção direta das modificações da parede celular, preferencialmente no desmonte da arquitetura da parede celular (Nakamura et al. 2003). Apesar da seqüência do jatobá ser parcial os resultados obtidos pela filogenia corroboram com estudos realizados por Tiné et al. (2000), Alcântara (2002) e Minhoto (2002) que analisaram a atividade da XET em cotilédones de *H.*

*courbaril* e observaram a ação da enzima predominantemente no processo de transglicosilação do xiloglucano durante a mobilização de reserva.

De acordo com Nakamura et al. (2003) o gene Va-XTH2 foi induzido na presença de auxina em diferentes partes do caule. Romo et al (2005) também analisaram genes pertencentes ao grupo 1 em leguminosa (*Cicer arietinum*), e verificaram que a presença de auxina controla o acúmulo de mRNA.

### 10.1.3. Invertase alcalina

As invertases pertencem a uma família multigênica que atua em processos associados ao catabolismo da sacarose de forma irreversível liberando frutose e glucose (Weber et al. 1995; Kingston-Smith et al. 1999). Pouco se sabe sobre as características estruturais dos genes que codificam invertases neutra e alcalina. Ji et al. (2005), revelaram que a família das invertases neutra e alcalina diferem consistentemente em 10 resíduos de aminoácidos dentro de um motivo conservado, sendo diferenciadas em dois grupos ( $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente). No entanto, funcionalmente não se sabe as diferenças entre os grupos e tão pouco sobre os padrões de expressão. Na sequência parcial clonada a partir do RNA da raiz do jatobá é possível observar cinco de 10 resíduos de aminoácidos localizados em três dos quatro domínios conservados que diferenciam a invertase neutra da alcalina.

A fim de tentar caracterizar um possível grupo funcional para a invertase da alcalina do jatobá (Hc-AlkIN1) foram utilizados 09 genes de *A. thaliana*, 08 ortólogos de *O. sativa*, além de 1 gene que codificam em uma espécie de leguminosa. De acordo com a filogenia estabelecida à sequência de aminoácido do jatobá apresentou alta similaridade com uma sequência de leguminosa que pertence ao grupo  $\beta$  que apresenta todos os resíduos de aminoácidos que a caracteriza como invertase alcalina (Figuras 13 e 25). A partir do alinhamento das seqüências também é possível observar a alta similaridade entre as duas espécies (Figura 14).

No momento não existe um padrão de expressão ou funções que possam caracterizar membros pertencentes ao grupo filogenético próximo ao jatobá. Portanto, o padrão de expressão observado nos cotilédones, folhas, hipocótilos e raízes sob variação de auxina endógena e luz durante a fase inicial do desenvolvimento nas plântulas de jatobá, passa a ser a primeira descrição para uma espécie arbórea. Possivelmente o papel da invertase alcalina nos cotilédones

esteja associado à quebra da sacarose e particionamento de carbono para a manutenção do próprio tecido fonte e para o desenvolvimento e crescimento dos tecidos-dreno, já o papel nos tecidos com as folhas, hipocótilos e raízes possivelmente esteja associado à quebra da sacarose para o desenvolvimento e crescimento do próprio tecido.

**Sequence 1: Alkaline invertase motifs Sequence 2: Lc-inv1 (AJ717412)**

**A**

Score = 83.2 bits (204), Expect = 4e-15 Identities = 36/39 (92%), Positives = 38/39 (97%), Gaps = 0/39 (0%)

```
Query 1 LCLSEGFDTFPTLLCADGCCMIDRRMGVYGYFLEIQALF 39
        LCLSEGFDTFPTLLCADGC MIDRRMG+YGYF+EIQALF
Sbjct 246 LCLSEGFDTFPTLLCADGCCMIDRRMGVYGYFLEIQALF 284
```

Score = 79.7 bits (195), Expect = 5e-14 Identities = 55/146 (37%), Positives = 56/146 (38%), Gaps = 90/146 (61%)

```
Query 40 GFFIGNVSPARMDFRWFALGN 61 Query 49 DPKNTRWSYHNGGSWFVLLW 69 Query 81 GRYVGKQAR 91
        G+FIGNVSPARMDFRWFALGN DPKNTRWSYHNGGSWFVLLW GRYVGKQAR
Sbjct 370 GYFIGNVSPARMDFRWFALGN 389 Sbjct 418 DPKNTRWSYHNGGSWFVLLW 438 Sbjct 490 GRYVGKQAR 515
```

**B**

**Sequence 1: Hc-AlkIN1 Sequence 2: Lc-inv1 (AJ717412)**

Score = 63.2 bits (152), Expect = 5e-09 Identities = 49/142 (34%), Positives = 52/142 (36%), Gaps = 86/142 (60%)

```
Query 40 GFFIGNVSPARMDFRWFALGN 61 Query 68 SYHNGGSWVILLW 73 Query 81 GRYVGKQAR 90
        G+FIGNVSPARMDFRWFALGN SYHNGGSWVILLW GRY+GKQAR
Sbjct 108 GYFIGNVSPARMDFRWFALGN 129 Sbjct 168 SYHNGGSWVILLW 181 Sbjct 228 GRYIGKQAR 237
```

**Figura 25.** Alinhamento realizado com a ferramenta *blast 2 sequences* no serviço do NCBI. Aminoácidos localizados nos domínios conservados. Em destaque, resíduos que caracterizam a invertase alcalina de acordo com Ji et al (2005). Alinhamento dos aminoácidos com a presença dos 10 resíduos da invertase alcalina com a espécie mais próxima filogeneticamente ao jatobá (A). Alinhamento da seqüência parcial de aminoácidos do jatobá com a espécie mais próxima filogeneticamente (Leguminosa) com a presença de 5 resíduos da invertase alcalina (B). Em destaque, os aminoácidos conservados.

#### 10.1.4. Sacarose sintase

A sacarose sintase compreende uma família multigênica. A enzima cliva a sacarose em presença de UDP para UDP-glucose e frutose (Baud et al. 2004).

Investigações sobre os genes SUS revelaram que existem pelo menos seis genes em *A. thaliana* e que eles podem ser classificados em 3 grupos (Barratt et al. 2001). No entanto, Komatsu et al. (2002) sustentam a idéia de que os genes SUS podem ser classificados em 4 grupos. A comparação das seqüências de aminoácidos, assim como a estrutura do gene (íntron/éxon) corrobora com essa classificação. Os genes AtSUS1 e AtSUS4 são classificados no grupo SUS1 das dicotiledôneas, caracterizados pela ausência de íntrons nos dois éxons específicos (6 e 12). Os genes AtSUS2 e AtSUS3 pertencem ao grupo SUSA, que junto com o grupo SUS1 das monocotiledôneas são caracterizados pela presença de um íntron nos éxons 6 e 12. Os genes AtSUS5 e AtSUS6 constitui um grupo separado dos outros (Komatsu et al. 2002).

A fim de tentar caracterizar um possível grupo funcional para a sacarose sintase clonada a partir do RNA do cotilédone do jatobá (Hc-SUS1) foram utilizados 06 genes de *A. thaliana*, 06 ortólogos de *O. sativa*, além de 10 genes que codificam em espécies de leguminosas. De acordo com a filogenia a sacarose sintase do jatobá foi associada ao grupo SUS1 das dicotiledôneas (Figura 15). O gene do jatobá foi expresso em todos os tecidos respondendo a disponibilidade de carboidrato e a auxina endógena na planta. De acordo com estudos realizados para caracterizar as formas de controle da expressão de membros do grupo SUS1, foi demonstrado que os genes são expressos em diferentes tecidos, incluindo raiz e parte aérea de plântulas, além do endosperma e embrião de várias espécies vegetais em resposta a disponibilidade de carboidratos (Chourey et al. 1998). Koch et al. (1992) estudando os genes do grupo SUS1 em raiz de milho verificaram que a expressão varia em resposta ao *status* de carboidratos. Martin et al. (1993) analisaram a expressão do gene AtSUS1 no floema, folhas e raízes e observaram que o gene foi expresso em todos os tecidos das plântulas. Baud et al. (2004) analisaram membros pertencentes a este grupo e verificaram que os genes são caracterizados por serem expressos em todos os tecidos vegetais, desde a fase inicial do desenvolvimento (germinação das sementes), folhas, caule e raiz. De acordo com os autores os genes foram expressos em várias condições (desidratação, deficiência de O<sub>2</sub>, tratamento de baixa temperatura e suprimento de açúcar).

A maioria das plantas possui no mínimo dois genes, talvez três que codificam as isoformas da sacarose sintase (Winter & Huber 2000). Cada isoforma assume um papel específico em condições fisiológicas específicas e conseqüentemente a enzima está associada a diferentes vias metabólicas (Subbaiah & Sachs 2001; Schrader & Sauter 2002; Albrecht & Mustroph 2003). Porém, estudos em diferentes espécies mostraram que a sacarose sintase assume o principal papel no metabolismo energético, controlando a mobilização da sacarose em várias vias importantes para o metabolismo e funções de armazenamento na célula da planta (Sturm & Tang 1999).

A sintase de sacarose certamente ocorre nos cotilédones de *H. courbaril*, como produto da degradação do xiloglucano que é rapidamente transformado em sacarose (Santos and Buckeridge, 2004). Entretanto o acúmulo de sacarose em determinados tecidos também pode levar à sacarose sintase a produção de polissacarídeos de parede (Amor et al. 1995, Buckeridge et al. 1999). No presente trabalho é possível que a expressão do gene esteja relacionada com síntese de polissacarídeos de parede em tecidos como folhas, hipocótilos e raízes, considerando que nos cotilédones a enzima provavelmente esteja relacionada com síntese de sacarose e amido transitório

## **10.2. Análise da expressão gênica no contexto do desenvolvimento das plântulas de jatobá**

No presente trabalho, foi possível caracterizar padrões de expressão dos genes da  $\beta$ -galactosidase, XET, invertase alcalina e sacarose sintase pela primeira vez em uma espécie arbórea nativa do Brasil (*H. courbaril*) durante a fase inicial do desenvolvimento, momento no qual ocorre a mobilização de reserva do xiloglucano em resposta a inibição do transporte polar de auxina, alternância de luz e disponibilidade de carbono. A primeira estratégia foi testada através do uso de um inibidor de transporte polar de auxina endógena (NPA), a segunda foi feita mantendo as plântulas em luz ou escuro contínuo durante o período de degradação do xiloglucano evitando ou não a passagem do programa genético da plântula de escotomorfogênese para fotomorfogênese e a terceira através excisão da parte aérea, bloqueando tanto o “transporte” da auxina, quanto o de açúcares entre os órgãos fonte e dreno da plântula.

Em cada abordagem as conseqüências para a plântula são diferentes. No primeiro caso, somente a ação da auxina é avaliada, no segundo, toda a plântula sofre conseqüências e no

terceiro adiciona-se o fator “relação fonte-dreno”. A inexistência de análises moleculares neste contexto com os genes selecionados, os resultados tornam-se de difícil interpretação, mas ao mesmo tempo permite visualizar o funcionamento do sistema integrado da plântula de forma a poder discutir o papel das reservas no desenvolvimento inicial da plântula de jatobá de uma forma mais ampla. Deve-se destacar que dentro das limitações impostas para a realização do trabalho, as melhores estratégias possíveis foram adotadas para tentar fortalecer ao máximo as conclusões e com isto tentar avançar o conhecimento em nível molecular sobre a mobilização do xiloglucano em plântulas de jatobá de uma forma geral.

A seguir são discutidos os possíveis papéis da auxina e da luz no controle da mobilização do xiloglucano nos cotilédones do jatobá. A discussão será feita no contexto do presente trabalho que revela padrões de expressão sobre os genes ainda não descritos para uma espécie arbórea.

### **10.2.1. Controle pela auxina**

Baseado no experimento realizado por Santos et al. (2004) que verificaram que a auxina altera a atividade da  $\beta$ -galactosidase e XET no cotilédones de plântulas de *H. courbaril* durante a mobilização de reserva, nosso trabalho propõe uma análise dos padrões de expressão dos dois principais genes envolvidos na degradação do xiloglucano ( $\beta$ -galactosidase e xiloglucano endotransglicosilase) e das duas principais enzimas do metabolismo da sacarose (invertase alcalina e sacarose sintase) sob influência da auxina endógena a partir da utilização do NPA, um inibidor de transporte polar de auxina por inibição do efluxo. Os resultados observados mostraram que a inibição do transporte polar da auxina dá suporte à hipótese de que este hormônio exerce algum controle sobre a expressão dos 4 genes analisados, contudo também foi possível observar que outros fatores como a luz e possivelmente a disponibilidade de carbono também interferem na expressão desses genes na fase inicial do desenvolvimento das plântulas de *H. courbaril*.

A regulação da expressão de genes pela auxina tem sido estudada de forma extensiva por décadas (Theologis & Ray 1982). Várias famílias de genes têm sido identificadas e caracterizadas por apresentarem respostas à auxina em curto período de tempo (genes precoces). Este fato ocorre quando fatores de transcrição preexistentes são ativados, entram no núcleo e promovem a expressão de genes específicos (Abel et al. 1996; Reed 2001). Membros de famílias

SAUR (*small auxin-up-regulated genes*), Aux/IAA e GH3 estão associados a respostas a auxina durante o desenvolvimento (Catalá et al. 2000; Nakazawa et al. 2001; Reed 2001; Liscum & Reed 2002). A família SAUR está associada especificamente ao tropismo, a família Aux/AIA codifica fatores de transcrição que agem como repressores ou ativadores da expressão de genes tardios induzidos pela auxina e a família GH3 esta relacionada especificamente ao nanismo e a respostas a auxina reguladas pela luz (Hsieh et al. 2000; Nakazawa et al. 2001). Ainda existem relatos de que os genes que codificam a glutathione S-transferases e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase – ACC estão relacionados em resposta ao estresse (Taiz & Zeiger 2004). Alguns desses genes são expressos em regiões diferentes de um mesmo tecido e em condições distintas, enfatizando a diversidade de respostas da auxina em diferentes tecidos e órgãos da planta (Abel et al. 1996).

As vias de sinalização da auxina vêm sendo extensivamente descritas como a principal forma de regulação do metabolismo do xiloglucano durante o afrouxamento da parede celular no desenvolvimento de várias espécies vegetais através de genes que codificam a xiloglucano endotransglicosilase/hidrolases (XTHs) (Labavitch & Ray 1974; Terry et al. 1981; Nishitani & Masuda 1982, 1983; Hayashi et al. 1984; Carpita 1984; Kutschera & Briggs 1987a, b; Lorences & Zarra 1987; McDougall & Fry 1989; Wakabayashi et al. 1991; Talbott & Ray 1992; Cosgrove 1993; Schindler et al. 1995; Nishitani 1995, 1997; Davies et al. 1997; Akamatsu et al. 1999; Catalá et al. 1997, 2001). Porém, muito pouco se sabe sobre o controle da mobilização do xiloglucano de reserva nas sementes (Walker & Estelle 1998). Apenas dois estudos, Hensel et al. (1991) demonstraram que o ácido 2,4-diclorofenoxy acético (2,4-D, auxina sintética) foi capaz de induzir a mobilização de xiloglucano em cotilédones destacados de *Tropaeolum majus*, e outro feito com jatobá (Santos et al. 2004) foram realizados até o momento. Santos et al (2004) aplicaram NPA em lanolina ao epicótilo de plântulas de jatobá em desenvolvimento e observaram que todas as enzimas de degradação do xiloglucano foram afetadas, diminuindo sua atividade. Os autores também aplicaram 2,4-D a cotilédones isolados e observaram que esta auxina sintética induz a atividade das mesmas enzimas. Além disso, os níveis de auxina endógenos foram medidos e ao excisar a parte aérea da plântula (acima dos cotilédones), tanto a degradação do xiloglucano como a atividade das enzimas foram inibidas. Os níveis endógenos de auxina nos cotilédones também foram alterados pela excisão e com base nestas observações os autores concluíram que auxina é transportada da parte aérea (possivelmente folhas em

desenvolvimento) para os cotilédones, estabelecendo um sistema de comunicação hormonal entre as duas partes da plântula.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a  $\beta$ -galactosidase, XET, invertase alcalina e sacarose sintase foram expressas em resposta a alternância da luz, a inibição do transporte da auxina endógena e disponibilidade de carbono. Porém o padrão da expressão variou de acordo com cada tecido analisado. Nas folhas os quatro genes foram drasticamente reprimidos com a inibição do transporte de auxina endógena (Figura 19A; C; E; G). Nos hipocótilos a  $\beta$ -galactosidase e a invertase alcalina, também foram reprimidos de forma drástica (Figura 21A; E). Nas raízes apenas a sacarose sintase foi reprimida de forma drástica em resposta a inibição do transporte de auxina (Figura 23G). Nas folhas ainda foi possível observar picos de expressão a cada 12 horas para a invertase alcalina em resposta a auxina (Figura 19E).

Os diferentes padrões de expressão observados no jatobá corroboram com dados na literatura onde os trabalhos relatam a diversidade de respostas à auxina durante a análise da expressão gênica em diferentes genes e espécies vegetais, inclusive membros da família XTH, conforme observado nas folhas e hipocótilos do jatobá. Nishitani et al. (1995) e Xu et al. (1996) analisaram genes que codificam a XET e concluíram que em *A. thaliana* e *Vigna*, que os genes eram regulados por auxina. Xu et al. (1995); Campbell & Braam (1998) revelaram que TCH4 que codifica a XET é induzida por auxina em vários tecidos como o hipocótilo, região vascular, raiz primordial lateral e folhas jovens em desenvolvimento. Catalá et al. (1997) e Kotake et al. (2000) analisaram dois membros da parede celular (endo e exo-glucanase) em hipocótilo de tomate e em coleótilo de cevada, respectivamente, e verificaram que os genes eram induzidos na presença de auxina. Em ambos os trabalhos as respostas dos genes a auxina foi diferente. Catalá et al. (2001) analisaram membros da família XTH em hipocótilo de tomate e verificaram o gene da XET (chamado de LeEXT2) é reprimido drasticamente em presença da auxina. Nakamura et al. (2003) analisaram dois membros da família XTH em diferentes partes da plântula de feijão azuki (parte aérea, diferentes regiões do entrenó) e concluíram que os genes foram induzidos em resposta a auxina, de forma diferenciada. Cui et al. (2005) observaram que auxina induz a expressão da XET em folha de arroz. Osato et al. (2006) analisaram alguns membros da família XTH em raiz de *A. thaliana* e concluíram que o gene AtXTH19 foi induzido pela auxina.

De acordo com Becnel et al. (2006) o gene AtXTH5 (*A. thaliana*) ortólogo ao gene XTH1 do jatobá, foi expresso em tecidos como folhas, cotilédones, hipocótilos e raízes, com maior quantidade de transcritos nos cotilédones e sementes, durante a fase inicial do desenvolvimento das plântulas analisadas e o gene VaXTH2, que apresentou maior similaridade com a seqüência de aminoácido do jatobá, apresentou resposta à auxina. Portanto, os resultados observados para o gene XTH nas folhas e hipocótilos do jatobá, corrobora com a literatura, tanto em relação à resposta a auxina como nos tecidos onde foram observados os transcritos. Porém, esta é a primeira análise da expressão durante a mobilização do xiloglucano de reserva em uma espécie arbórea.

Embora uma  $\beta$ -galactosidase de *H. courbaril* tenha sido isolada a partir dos cotilédones e sua atividade e propriedades fisiológicas terem sido caracterizadas durante a mobilização do xiloglucano por Alcântara et al.(2006), até o momento são limitados os estudos sobre os tipos de controle da expressão gênica. Os poucos trabalhos apenas caracterizaram ou descrevem a expressão do gene durante o desenvolvimento, alongamento celular e amadurecimento de frutos sob influência do etileno (Ross et al. 1994; O'Donoghue et al. 1998; Kotake et al. 2000; Carey et al. 2001; Tateishi et al. 2001; Moctezuma et al. 2003; Wu & Burns 2004). Carey et al. (1995) identificaram 7 genes durante o desenvolvimento do fruto de tomate e cinco apresentam resposta da expressão ao etileno. No entanto, segundo Young et al. (2007) o gene BGAL4 (*A. thaliana*) ortólogo ao gene da  $\beta$ -galactosidase do jatobá, foi observado transcrito nas folhas, cotilédones, hipocótilos e raízes, sendo induzido sob baixas concentrações de auxina. Os dados apresentados neste trabalho, para o gene codifica a  $\beta$ -galactosidase constitui o primeiro relato sobre um controle da expressão em resposta a auxina endógena em folhas e hipocótilos de uma espécie arbórea.

Os dados observados para os padrões de expressão da invertase alcalina e sacarose sintase em resposta a auxina endógena tanto nas folhas hipocótilos e raiz também não foram descritos para outras espécies. Normalmente o controle da expressão desses genes, está associado ao metabolismo de sacarose e disponibilidade de carboidratos, conforme observado nos cotilédones do jatobá para a sacarose sintase (Figuras 17G).

O padrão de expressão observado nas folhas de jatobá, onde todos os genes foram drasticamente reprimidos em resposta ao acúmulo de auxina endógena na parte aérea (tratamento com NPA) (Figuras 19A; C; E; G) pode ser justificado através de um possível mecanismo de

*feedback* negativo, conforme já relatado por Reed (2001), onde para tentar estabelecer uma relação entre o nível de auxina e a expressão de genes alvos em diferentes células, assim como uma resposta gradativa, levaria a auxina a atuar na morfogênese em vários tecidos.

Em nossas análises é possível especular que além da resposta a deficiência da auxina também pode existir uma resposta em relação à disponibilidade de carbono, proveniente da parte aérea, já que o balanço fonte/dreno foi alterado devido à excisão da parte aérea das plântulas. Nas plantas os açúcares não funcionam apenas como substrato para o crescimento, já que sistemas de sinalização são afetados proporcionando alterações na expressão de vários genes (Sheen et al. 1999; Rook et al. 2006). Tanto a abundância quanto a privação de carboidratos podem inibir ou induzir a expressão dos genes (Koch 1996). De acordo com Blasing et al. (2005) 34% dos genes analisados em *A. thaliana*, são modulados por açúcar, porém esses genes são específicos, tendo um papel direto ou indireto no metabolismo do açúcar. Nossas análises mostraram um possível controle da expressão em resposta à disponibilidade de carbono na presença de auxina endógena para a invertase alcalina, nos cotilédones e raízes e XET também nas raízes (Figuras 17E; 23E; C).

São limitados os trabalhos que analisam o controle da expressão de genes em resposta a hormônios e açúcar no mesmo contexto. Alguns estudos revelam uma forte relação entre a disponibilidade de carboidratos e respostas ao controle hormonal pelo ácido abscísico (ABA) e etileno durante processos do desenvolvimento (Léon & Sheen 2003; Rook & Bevan 2003). Também existem relatos sobre a interação de giberelinas e citocininas e sinalização por açúcar (Baur-Hoch et al. 1990; Cheng et al. 1992; Thomas et al. 1994; Xu 1995). Os açúcares são capazes de reprimir processos mediados por auxina incluindo geotropismo, assim como reguladores do crescimento (p.ex. auxina) podem ter efeito em genes modulados por carboidratos, porém, esses mecanismos são pouco esclarecidos (Willemoes et al. 1988). Sabe-se que genes responsáveis por modificações da parede celular são controlados pela auxina e que há uma série de processos bioquímicos que são coordenados por vários tipos de enzimas ligadas a carboidratos (Nishitani 1997).

Os genes que codificam as invertases são expressos em tecidos em desenvolvimento e são modulados por açúcar (Roitsch et al. 1995; Sturm et al. 1995; Xu et al. 1996; Tymowska-Lalanne & Kreis 1998). Fatores como à disponibilidade de açúcar, auxina, ácido giberélico e luz influenciam na atividade das invertases (Morris & Arthur 1984). Como a sacarose e hexoses, não

são apenas substrato e produtos das invertases, mas também servem como moléculas sinalizadoras a enzima também está envolvida em respostas ao estímulo ambiental (Kim et al. 2000; Heyer et al. 2004; Roitsch & Gonzalez 2004).

Os padrões de expressão observados para a invertase alcalina e XET nas raízes do jatobá são os primeiros relatos sobre um possível controle em resposta a auxina endógena associado à disponibilidade de carboidrato em uma espécie arbórea. Quanto ao possível controle pela disponibilidade de açúcar para o gene da sacarose sintase observado nos cotilédones e hipocótilos de *H. courbaril* corroboram com dados na literatura.

A maioria dos trabalhos sobre expressão gênica da sacarose sintase, mostram que a expressão do gene é específica para cada tipo de tecido, sendo regulada durante o desenvolvimento pelo *status* de carboidrato (Koch et al. 1992; Ruan et al. 1997). Estudos também relatam que a expressão do gene está associada com uma relação força dreno ou acúmulo de carbono para síntese de amido além da biossíntese de polissacarídeos da parede celular (Wang et al 1993; Dejardin et al. 1997; Hajirezaei et al. 2000; Baroja-Fernandez et al. 2001; Ugglá et al. 2001; Li & Zhang 2003). A sacarose sintase tem um papel importante com o balanço entre a remobilização do endosperma e demandas do crescimento das plântulas (Thomas et al. 1995). Heim et al. (1993) mostraram que a clivagem da sacarose para a síntese de amido é mediada pela sacarose sintase.

Como a sacarose sintase pertence a uma família multigênica é possível especular que sejam observadas diferentes respostas de acordo com cada tecido analisado no jatobá. Nos cotilédones a presença de carbono induz a expressão e nos hipocótilos a presença de carbono reprime a expressão da sacarose sintase (Figuras 17G e 21G, respectivamente e Figura 26). Normalmente, a redução de carboidratos induz a expressão de genes da fotossíntese, mobilização de reservas e dos processos de exportação, enquanto que, recursos abundantes de carbono induzem a expressão de genes de armazenamento e catabolismo (Koch 1996). A descoberta de distintas isoformas da sacarose sintase em espécies vegetais, codificadas por diferentes genes, também mostra uma resposta diferenciada de acordo com o suprimento de carboidrato, indicando que o controle geral é bem complexo. Koch et al. (1992) estudando a expressão em raiz de milho, verificaram que a expressão da sacarose sintase (Sh1) é induzida quando os açúcares são abundantes, enquanto que outro gene (Sus1) que codifica a sacarose sintase é mais abundante na epiderme e tecidos externos e mais expressos em condições de escassez de açúcar.

O padrão de expressão da  $\beta$ -galactosidase observado na raiz do jatobá em resposta à disponibilidade de carbono também corrobora com dados previamente observados na literatura, porém esta é a primeira descrição para uma espécie arbórea, durante a mobilização do xiloglucano de reserva. De acordo com Lee et al. (2007) genes que codificam glicosil hidrolases são regulados por açúcar, esses genes agrupam mais de 100 famílias que são diferenciadas de acordo com a similaridade dos aminoácidos. Entre estas famílias estão os genes que codificam a  $\beta$ -galactosidase. De acordo com esses autores, esses genes podem hidrolisar a parede celular para remobilizar açúcares em resposta a escassez de açúcar, podendo ser, portanto, controlados pela disponibilidade de açúcar.

Os resultados observados para a  $\beta$ -galactosidase e XET nos cotilédones revelaram o terceiro padrão de expressão em resposta à inibição de auxina endógena nos cotilédones em plântulas de *H. courbaril*, onde o gene parece responder de forma associada à disponibilidade de luz (Figura 17A; B; C; D). Esses dados corroboram com a literatura tanto para dados relativos a atividades como para a expressão gênica. Reed (2001) sugere que a luz pode regular proteínas da família Aux/IAA em *A. thaliana*. Vandenbussche et al. (2003) revelaram que a auxina induz a expressão de genes em plantas sob baixas intensidades de luz. Tanaka et al. (2002) revelaram que a síntese de auxina é alterada de acordo com a disponibilidade de luz. Xu et al. (1995) também observaram que o gene TCH4 que codifica a XET é induzido durante a noite na presença de auxina.

### **10.3. Influência da luz**

A luz está também envolvida no controle da mobilização do xiloglucano em plântulas de *H. courbaril* através da modulação das atividades enzimáticas, esta hipótese foi observada por Santos & Buckeridge (2004), Santos et al. (2004) e Amaral (2005) conforme previamente mencionado. Considerando os resultados sobre as atividades das enzimas envolvidas na degradação do xiloglucano durante o desenvolvimento inicial foi realizado um experimento em que plântulas de jatobá foram mantidas na luz e no escuro contínuo durante 20 dias, período de mobilização das reservas, a fim de avaliar se a transição do programa de escotomorfogênese para

o de fotomorfogênese influencia na expressão dos genes que codificam a BGAL, XET, AlkIN e SUS, nos cotilédones, folhas, hipocótilos e raízes.

Na figura 6 é possível observar que as plântulas crescidas no escuro contínuo, se mantiveram no programa de escotomorfogênese, isto é, alongaram o hipocótilo, não produziram pigmentos fotossintéticos e não degradaram as reservas. Por outro lado, as plantas em luz contínua ou o controle em fotoperíodo de 12 horas apresentaram morfologia condizente com plantas jovens que ativaram o programa de fotomorfogênese. Como o jatobá necessita de um tempo maior para executar a transição de um estado heterotrófico (escotomorfogênese) para o autotrófico (resultante do programa de fotomorfogênese) (Santos & Buckeridge 2004) foi necessário manter as plântulas na luz ou escuro contínuo por um longo tempo (20 dias) quando comparado com modelos experimentais como *Arabidopsis* e ervilha. Através das análises da expressão foi possível observar que tanto a presença como a ausência de luz altera a expressão dos quatro genes estudados.

Através da expressão gênica foi possível observar que os genes associados à degradação de reserva nos cotilédones são dependentes de luz e da manutenção do ciclo dia/noite. Quando as plântulas foram crescidas no escuro contínuo apenas o gene XTH foi induzido, o que pode está associado ao processo exclusivo de transglicosilação nos cotilédones (Figura 26A). Como a  $\beta$ -galactosidase foi reprimida nas mesmas condições não ocorre à degradação do xiloglucano (Figura 26A). Esta hipótese pode ser reforçada quando analisamos os genes associados ao metabolismo de sacarose nos cotilédones e verificamos que os genes são reprimidos no escuro, ou seja, ocorre uma expressão basal a partir da disponibilidade mínima de substrato, até o desligamento total dos genes, caso as condições ideais não sejam restabelecidas (Figura 26A). Nas folhas, hipocótilos e raízes a expressão da  $\beta$ -galactosidase e da XTH, está associada à transglicosilação, mecanismo que ocorre durante a reestruturação da parede celular, na fase de crescimento e desenvolvimento dos três tecidos. Na luz contínua foi possível observar nas folhas, hipocótilos e raízes que a  $\beta$ -galactosidase foi induzida e reprimida no escuro (Figura 26B; C; D, respectivamente). Nos hipocótilos a  $\beta$ -galactosidase também foi induzido no escuro (Figura 26C). O gene da XTH nas folhas foi induzido no escuro contínuo (Figura 26B). Nos hipocótilos e raízes o gene foi reprimido tanto na luz contínua como no escuro contínuo (Figuras 26C; D).

Nas folhas os genes que codificam a invertase alcalina e sacarose sintase alteram o padrão de expressão de acordo com a disponibilidade da luz. No entanto, foi possível observar

que no escuro contínuo o gene foi reprimido, sendo necessário a manutenção do ciclo dia/noite para manter o padrão de expressão normal dos genes do metabolismo de açúcar nas folhas (Figura 26B). O mesmo pode ser observado nos hipocótilos e raízes que foram reprimidos no escuro contínuo (Figuras 26C; D, respectivamente), mostrando indícios que os genes relacionados com o metabolismo da sacarose nos tecidos em desenvolvimento, podem ter seus padrões de expressão alterados em função da disponibilidade de luz.

Apesar dos resultados mostrarem que a luz influencia no controle da expressão desses genes não foi possível, definir o tipo de luz. Dessa forma, tornam-se necessários outros estudos a fim de melhor elucidar esta questão.

A

Tratamentos	$\beta$ -Gal1	XTH1	AlkIN1	SUS1	Conseqüência da reserva
Luz + Auxina	Dark	Dark	Light	Dark	Degradação
Carbono	Dark	Dark	Light	Dark	Mobilização
Luz contínua	Light	Light	Dark	Dark	Degradação e mobilização
Escuro contínuo	Light	Dark	Light	Light	Transglicosilação

B

Tratamentos	$\beta$ -Gal1	XTH1	AlkIN1	SUS1	Conseqüência para a folha
Luz + Auxina	Dark	Dark	Dark	Dark	Desenvolvimento e crescimento
Luz contínua	Dark	Light	Dark	Dark	Desenvolvimento e crescimento
Escuro contínuo	Light	Dark	Light	Light	Desenvolvimento lento

C

Tratamentos	$\beta$ -Gal1	XTH1	AlkIN1	SUS1	Conseqüência para o hipocótilo
Auxina	Dark	Dark	Dark	Light	Morfogênese da parede celular
Carbono	Dark	Dark	Dark	Light	Alongamento e desenvolvimento
Luz contínua	Dark	Light	Dark	Light	Morfogênese, alongamento e Desenvolvimento
Escuro contínuo	Dark	Light	Light	Light	Não tem reestruturação da parede

D

Tratamentos	$\beta$ -Gal1	XTH1	AlkIN1	SUS1	Conseqüência para a raiz
Auxina	Dark	Dark	Dark	Dark	Morfogênese da parede celular
Carbono	Dark	Dark	Dark	Dark	Crescimento e desenvolvimento
Luz contínua	Dark	Light	Dark	Dark	Morfogênese e Desenvolvimento
Escuro contínuo	Light	Light	Light	Light	Não tem desenvolvimento nem crescimento

**Figura 26.** Padrão de expressão dos genes da  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ GAL1) da xiloglucano endotransglicosilase (XTH1), invertase alcalina (AlkIN1) e sacarose sintase (SUS1) e possível consequência para a plântula de jatobá em função da degradação e mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones em resposta a auxina endógena, disponibilidade de carbono e alternância de luz. Cotilédones (A); folhas (B); hipocótilos (C) e raízes (D). Cinza escuro = genes induzidos; Cinza claro = genes reprimidos; Sem preenchimento = genes que possivelmente não sofreram alteração direta dos fatores analisados em relação ao controle.

O fato de terem sido observados ciclos diurnos nas atividades e na expressão de genes da degradação do xiloglucano e do metabolismo de sacarose levanta a hipótese de que o relógio circadiano possa também estar envolvido no controle da mobilização de reservas em plântulas de jatobá. O relógio circadiano é composto por múltiplos osciladores que são coordenados por diferentes vias (Dowson-Day & Millar 1999; Bell-Pedersen et al. 2005). O parâmetro mais estudado e bem caracterizado nas plantas é o estímulo pela luz (McClung 2001). As plantas são extremamente sensíveis a pequenas alterações da luz e estão aptas a conseguir sempre benefícios através da fotossíntese (Fankhauser & Staiger 2002). Os vegetais utilizam a luz como fonte de energia e como um sinal que fornece informação sobre o ambiente. Tais sinais são transformados em processos elétricos, metabólicos e genéticos que controlam a expressão gênica, assumindo, um importante papel no desenvolvimento, através do controle em processos como a germinação de sementes e o estabelecimento da plântula (Millar & Kay 1991; Nagy et al. 1993; Devlin, 2002; Tanaka et al. 2002). Além disso, as plantas têm a capacidade de perceber flutuações na intensidade, qualidade espectral, direção e no tempo de exposição à luz (Fankhauser & Staiger 2002). Experimentos de *microarray* em *A. thaliana* revelaram que 2 a 36% do genoma, apresentam um controle transcricional regulado pela alternância de luz e escuro (Schaffer et al. 2001; Michael & McClung 2003, Harmer & Kay 2005).

Até o momento são limitados os relatos sobre análise da expressão de genes envolvidos na mobilização do xiloglucano. No entanto, existem alguns trabalhos de mecanismos análogos, como a degradação do amido p.ex., que apresenta um controle pelo ciclo circadiano e pela disponibilidade de luz (Harmer et al. 2000; Schaffer et al. 2001; Dodd et al. 2003; Smith et al. 2004; Sokolov et al. 2006; Weise et al. 2006). O amido é sintetizado nas folhas durante o dia e remobilizado durante a noite para sustentar a síntese de sacarose, exportação de carbono para outros tecidos em desenvolvimento e respiração (Caspar et al. 1985; Geiger et al. 1995). Análises em diferentes espécies revelam que enzimas como a  $\beta$ -amilase, BMY3, GBSSI e amido sintase I em *A. thaliana* e  $\beta$ -amilase em *M. crystallinum* envolvidas na degradação do amido são controladas pela disponibilidade de luz (Dodd et al. 2003; Tenorio et al. 2003). Harmer et al. (2000) concluíram em seus trabalhos que a degradação do amido é controlada pelo ciclo dia/noite e que o ciclo tem um importante papel no particionamento de açúcares assimilados para diferentes vias metabólicas. Os autores relatam ainda que as enzimas envolvidas na degradação do amido apresentam um pico de expressão no fim do dia ou no meio da noite dependendo da

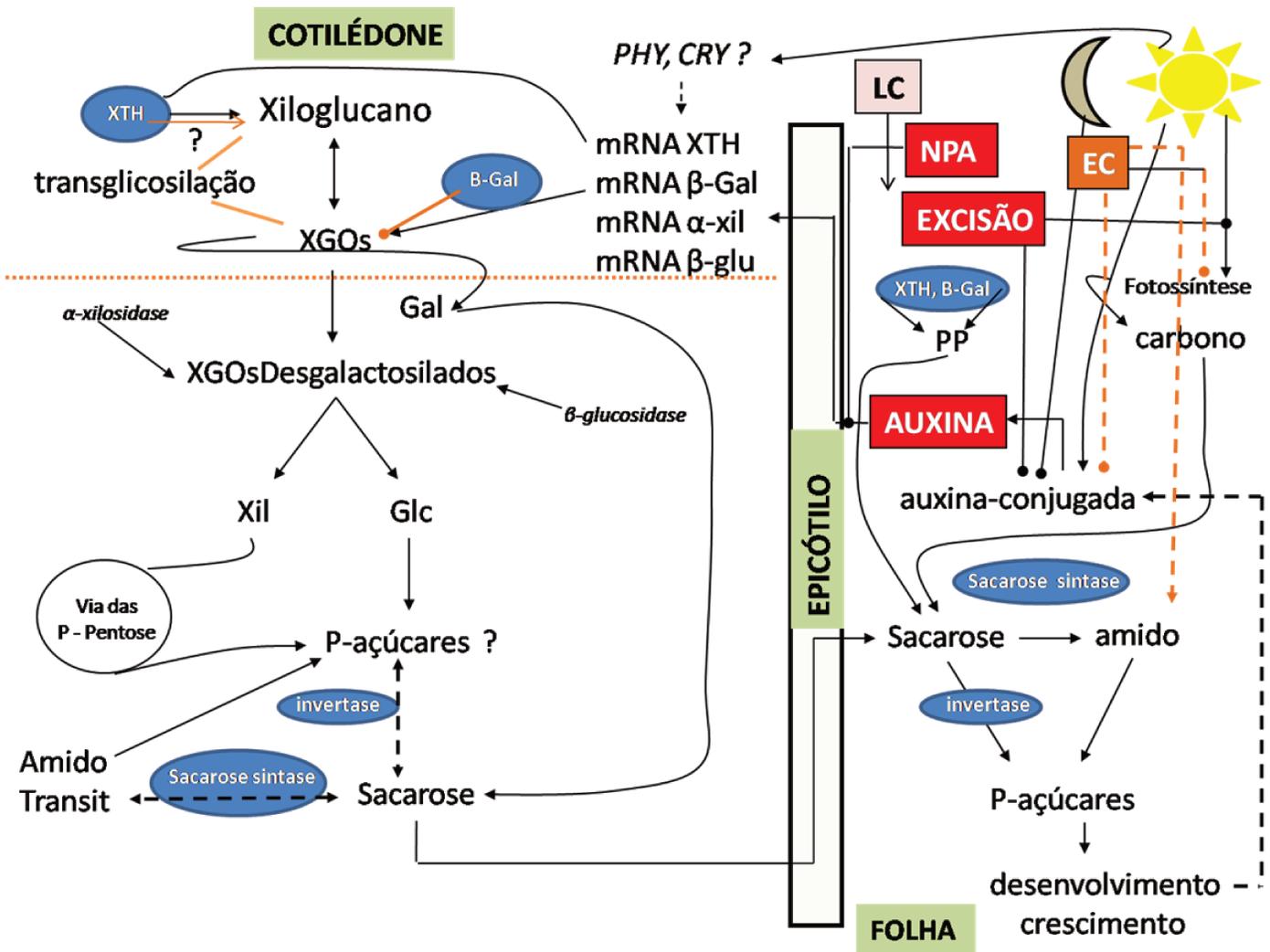
enzima analisada. Lu et al. (2005) analisaram ecótipos de *Arabidopsis* e concluíram que enzimas envolvidas na degradação do amido variaram em resposta a disponibilidade de luz tendo um importante papel na oscilação dos níveis dos transcritos analisados. Os autores concluíram ainda que em um ciclo dia/noite normal não ocorre deficiência de carboidrato que levem a oscilação desses transcritos. Sokolov et al. (2006) revelaram que a síntese e mobilização do amido é regulada pelo ciclo dia/noite e por vários fatores ambientais. A expressão dos genes nas folhas, hipocótilos e raízes no jatobá, mostra uma dependência da fonte de carbono proveniente da degradação do xiloglucano de reserva nos cotilédones, e a necessidade do ciclo dia/noite para que a plântula possa crescer e desenvolver a partir da expressão de genes associados com a morfogênese da parede celular e do metabolismo de sacarose.

A presença de um ou dois picos de expressão, dependendo do gene e do tecido analisado corrobora com dados na literatura. Harmer et al. (2000) revelaram em seus estudos que vários genes relacionados à fotossíntese apresentam um pico de expressão próximo ao meio do dia, enquanto, que genes envolvidos no consumo, transporte e armazenamento de açúcar apresentam pico de expressão perto do final do dia. Durante a noite genes envolvidos na mobilização do amido atingem os níveis mais altos de expressão. Análises de genes CAB (*chlorophyll a/b binding protein* – genes que codificam uma parte da maquinaria fotossintética das plantas) predizem que os transcritos iniciam o acúmulo previamente ao amanhecer, mostrando um pico de expressão na primeira parte do dia e depois diminuem, tendo novo pico ao anoitecer (Gallagher et al. 1985; Paulsen & Bogorad 1988; Millar & Kay 1991). Millar et al. (1992) observaram a expressão da CAB em sementes de *A. thaliana* e verificaram a presença de dois picos um no início do dia e outro no início da noite. Rogers et al. (2005) analisaram genes envolvidos na biossíntese da lignina em *A. thaliana* e observaram o mesmo padrão. Alguns genes que codificam reguladores centrais do relógio biológico como TOC1 (*Timing of CAB 1 expression*), CCA1 (*circadian clock associated 1*) e LHY (*Late Elongated Hypocotyls*), também mostram esse padrão (Somers et al. 1998; Strayer et al. 2000).

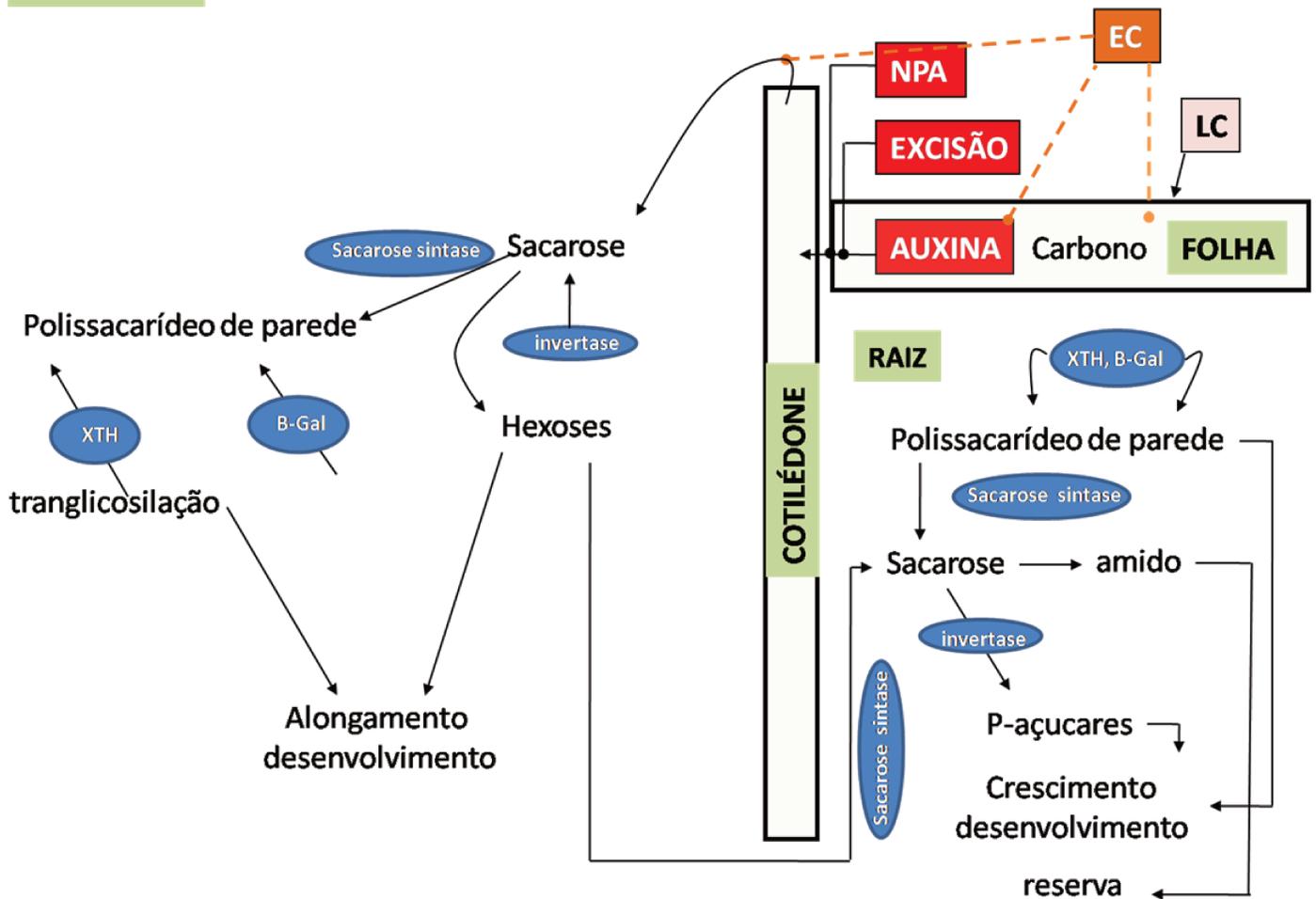
A maioria dos estudos sobre a expressão de genes envolvidos na variação do ciclo/dia noite revela a ocorrência de um único pico, que pode ser observado em qualquer momento ao longo do dia. Porém, existem relatos que mencionam que um gene pode apresentar mais de um pico de expressão em um período de 24 horas, conforme mencionado por Somers et al. (1998), Alabadí & Carbonell (1999), Harmer et al. (2000), Strayer et al. (2000), Parfitt et al. (2004),

Harmer & Kay (2005). De acordo com Harmer et al. (2000) todos os genes envolvidos na ação diária da fotossíntese que resultam na produção de açúcares, transporte para órgãos dreno não fotossintéticos, armazenamento ou consumo de açúcares são controlados pelo ciclo circadiano.

Os dados apresentados no presente trabalho servem não só para avaliar ou entender as formas de controle dos genes da  $\beta$ -galactosidase, XTH, invertase alcalina e sacarose sintase durante a mobilização de reserva nos cotilédones, como também servem para caracterizar os padrões de expressão dos genes em diferentes condições, além de corroborar com informações adicionais a dados moleculares citados na literatura. Através dos resultados obtidos da expressão dos 4 genes analisados, em conjunto com os dados de atividade previamente descritos na literatura é possível sugerir um modelo para o controle da degradação e mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones em resposta a auxina endógena e a alternância de luz durante a fase inicial do desenvolvimento para plântulas de *H. courbaril* (Figura 27).



## HIPOCÓTILO



**Figura 27.** Modelo para o controle da degradação e mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones em resposta a auxina endógena e a alternância de luz durante a fase inicial do desenvolvimento em plântulas de *H. courbaril*. Cotilédono e folha (A); hipocótilo e raiz (B).

## 11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é primeiro trabalho que isola cDNAs parciais e analisa padrões de expressão de genes como a  $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase, invertase alcalina e sacarose sintase, envolvidos na mobilização de reserva em uma espécie arbórea.

Nossos resultados mostram que a invertase clonada da raiz do jatobá é uma invertase alcalina, sendo caracterizada pela presença de resíduos de aminoácidos localizados em domínios fortemente conservados. Pelo fato de termos obtido uma seqüência parcial, não foi possível observar a presença de todos os domínios conservados. Porém, a seqüência do gene obtido do jatobá apresenta três domínios conservados dos quatro e cinco dos dez resíduos de aminoácidos que a caracterizam como uma invertase alcalina. Não existe função atribuída à invertase alcalina, até o momento, apenas alguns trabalhos como o de Ross et al. (1996) observaram que a invertase neutra (apresenta grande similaridade na seqüência de aminoácidos com a invertase alcalina) tem um importante papel na determinação da força dreno em batata. Lee & Sturm (1996) sugeriram que a função das invertases neutras é hidrolisar a sacarose no citoplasma de células que tenham carência de quantidades significativas da atividade de invertase ácida. Bussis et al. (1997) revelaram que a presença da invertase neutra proporcionou a redução na concentração predominante da pressão osmótica, liberando hexoses em compartimentos com alta atividade de enzimas hexose-fosforilase, afetando o *status* energético das células. De acordo com Lou et al. (2007) a invertase neutra é considerada um modulador central da assimilação do particionamento de carbono e respostas a patógenos. Não se sabe exatamente qual seria o papel da invertase alcalina nos cotilédones ou mesmo nos outros tecidos analisados, no entanto é possível sugerir que o gene tenha um importante papel no particionamento de carbono durante essa fase inicial do desenvolvimento em que a reserva esta sendo degradada e disponibilizada e pode esta envolvida também na hidrólise de sacarose para disponibilizar hexose para o metabolismo geral dos respectivos tecidos. De uma forma geral, foi observado transcrito em todos os tecidos durante 24 horas, apresentando respostas tanto a auxina endógena quanto a disponibilidade de carboidrato durante a degradação de reserva.

Todos os genes analisados no presente estudo pertencem a famílias multigênicas e respondem diferentemente as formas de controle nos diferentes tecidos, gerando uma especulação de se tratarem de diferentes genes, já que os *primers* utilizados amplificam regiões

conservadas. Porém, respostas similares, já foram observadas em outras espécies, em tecidos distintos, onde foi possível demonstrar a identidade de um único gene nos diferentes tecidos (Sebková et al. 1995; Becnel et al. 2007). Sabe-se também que o mesmo gene pode responder a múltiplas formas de controle como já observado para a XET. Segundo Iliev et al. (2002) o gene que codifica a XET possui um único elemento *cis-acting* que é responsável por múltiplos estímulos. De acordo com os autores, várias vias transdução de sinais (estímulos ambientais) atuam no mesmo ponto provocando um aumento de um regulador endógeno, que podem mediar alterações na expressão gênica a nível transcricional. Estudos realizados por Cona et al. (2003) também revelaram que dois genes que codificam a PAO (*Polyamine Oxidase*) tem possíveis motivos *cis-acting* responsáveis pela resposta a luz ou auxina sugerindo a possibilidade de um controle transcricional da expressão da PAO por hormônio ou pela luz. Contudo não se sabe como diversos estímulos podem levar a uma resposta molecular comum na regulação desses genes. Para confirmar essas hipóteses seriam necessários experimentos adicionais.

As análises dos padrões de expressão da  $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase, invertase alcalina e sacarose sintase, revelaram uma expressão diferencial nos cotilédones, folhas, hipocótilos e raízes em resposta à inibição de auxina endógena. Os genes responsáveis pela degradação do xiloglucano nos cotilédones e morfogênese da parede celular nas folhas hipocótilos e raízes ( $\beta$ -galactosidase e a xiloglucano endotransglicosilase) apresentaram três tipos de controle: 1) controle da expressão em resposta à inibição do transporte polar de auxina; 2) restrição ao fluxo de carbono; 3) controle da expressão em resposta a inibição do transporte polar de auxina e à luz. Enquanto que os genes responsáveis pelo metabolismo da sacarose (invertase alcalina e sacarose sintase) não apresentaram controle por luz. Nos cotilédones, os genes responsáveis pela degradação do xiloglucano são expressos apenas durante o período de luz, enquanto que nos outros tecidos a expressão foi observada durante 24 horas. Esses resultados sugerem que os genes envolvidos na degradação do xiloglucano podem ser controlados, pela disponibilidade de luz.

Nossas análises permitiram sugerir que a planta necessita da reserva como fonte de carbono nesta fase para gerar carbono e que a auxina endógena e a luz nos cotilédones passam a ser essenciais para as necessidades vitais da planta, já que disponibiliza carbono para o desenvolvimento dos tecidos dreno.

Os resultados obtidos apresentaram fortes indícios do controle da expressão dos genes pela auxina endógena, pela disponibilidade de carbono e pela disponibilidade de luz, porém outros fatores relacionados como a ausência da parte aérea não podem ser descartados.

Diante dos resultados obtidos da expressão gênica e dos dados das atividades previamente observados por Santos et al. (2004) e Amaral (2005) é possível sugerir que o controle da degradação do xiloglucano de reserva possa ser transcricional. Apesar dos picos de atividade da  $\beta$ -galactosidase e da XTH ocorrem no período noturno e os picos de expressão terem sido observados durante o período de luz, deve ser considerado que existe uma atividade basal das enzimas durante todo o período de luz. Até o momento não existe uma hipótese que demonstre uma relação entre o controle transcricional e a degradação de reserva no jatobá. Os resultados observados por Santos et al. (2004), onde os cotilédones foram cobertos com papel alumínio e como consequência ocorre a perda de atividade e paralização da mobilização corroboram diretamente com os dados observados neste trabalho, onde foi possível observar que o gene que promove a etapa subsequente da transglicosilação (desgalactosilação) da reserva, a  $\beta$ -galactosidase, é completamente inibida no escuro, ou seja, se as plântulas permanecerem no escuro, não ocorre atividade das enzimas, consequentemente não ocorre degradação da reserva, isso porque, o gene que promove a desgalactosilação não está sendo transcrito (Ver figura 27). Molle (2007) analisaram a atividade de invertases e da sacarose sintase nas mesmas plântulas controle utilizadas para análise da expressão gênica e verificaram que a enzima também apresenta uma atividade basal em todos os horários coletados (0h, 2h, 6h, 12 e 18 horas). Komatsu et al. (2002) analisaram a atividade da sacarose sintase e estabeleceram uma relação positiva entre a quantidade de transcritos, atividade e acúmulo de açúcar durante o desenvolvimento de frutos de *Citrus*.

De uma forma geral, nossos resultados reforçam a proposta de Santos et al. (2004) de que existe um conjunto de mecanismos sincronizados que faz com que a mobilização das reservas cotiledonares nas plântulas de jatobá seja altamente eficiente, sugerindo que a plântula em desenvolvimento tenha um desempenho alto. Do ponto de vista biológico, esta é uma vantagem muito grande para uma plântula que se desenvolve em um ambiente extremamente competitivo e pouco iluminado, onde alguns centímetros a mais na altura ou alguns  $\text{cm}^2$  a mais de área foliar, podem definir o sucesso ou não no estabelecimento do indivíduo na floresta.

## 12. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Obtenção de cDNAs parciais para os genes da  $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase, invertase alcalina e sacarose sintase em uma espécie arbórea;
- ✓ Obtenção de uma seqüência que codifica uma invertase alcalina e caracterização do padrão de expressão em diferentes tecidos de uma espécie arbórea;
- ✓ Caracterização do padrão de expressão dos genes da  $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase, invertase alcalina e sacarose sintase durante a degradação e mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones na fase inicial do desenvolvimento das plântulas de *Hymenaea courbaril*;
- ✓ Manutenção do ciclo dia/noite para que ocorra a degradação do xiloglucano de reserva nos cotilédones;
- ✓ É necessária a presença de luz e auxina nos cotilédones para que ocorra a transcrição dos genes envolvidos na degradação ( $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase) do xiloglucano de reserva;
- ✓ A XTH participa do mecanismo de transglicosilação no escuro nos cotilédones;
- ✓ A  $\beta$ -galactosidase corresponde ao fator limitante no processo de degradação do xiloglucano de reserva nos cotilédones no escuro;
- ✓ A invertase alcalina e a sacarose sintase limitam o desenvolvimento e crescimento das folhas, hipocótilos e raízes no escuro;

- ✓ Controle transcricional através da  $\beta$ -galactosidase para mobilização do xiloglucano de reserva no jatobá;
- ✓ A mobilização do xiloglucano de reserva nesta fase analisada, controla a relação fonte dreno, permitindo o desenvolvimento das folhas, hipocótilo e raiz e o estabelecimento e crescimento das plântulas de *Hymenaea courbaril*.

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel S, Ballas N, Wong LM and Theologis A. 1996. DNA elements responsive to auxin. *Bioessays* 18: 647-654.
- Aidar MPM, Martinez CA, Costa AC, Costa PMF, Dietrich SMC and Buckeridge MS. 2002. Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota Neotropica*. 2 (<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/en/abstract?article+BN01602012002>).
- Akamatsu T, Hnzawa Y, Ohtake Y, Takahashi T, Nishitani K and Komeda Y. 1999. Expression of endoxyloglucan transferase genes in acaulis mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 121: 715-721.
- Alabbadí D and Carbonell J. 1999. Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and vegetative tissues of pea. *Plant Mol. Biol.* 39: 933-943.
- Alabbadí D, Gil J, Blázquez MA and García-Martínez JL. 2004. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* 134: 1050-1057.
- Albrecht G and Muströph A. 2003. Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased *in situ* activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta* 217: 252-260.
- Alcântara PHN. Isolamento e caracterização das enzimas xiloglucano endo transglicosilase e β-galactosidase do catabolismo do xiloglucano de reserva dos cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Alcântara PHN, Dietrich SMC and Buckeridge MS. 1999. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific β-galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 653-663.
- Alcântara PHN, Martim L, Silva CO, Dietrich SMC and Buckeridge MS. 2006. Purification of a beta-galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. *Plant Physiol. Bioch.* 44: 619-627.
- Amaral LMV. Metabolismo de carboidratos estruturais e de reserva em cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. (JATOBÁ). 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Amor Y, Haigler CH, Wainscott M and Delmer D. 1995. A membrane-associated form of SuSy and its potential role in the synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9353-9357.
- Antosiewicz DM, Purugganan MM, Polisensky DH and Braam J. 1997. Cellular localization of *Arabidopsis* xyloglucan endotransglycosylase-related proteins-during development and after wind stimulation. *Plant Physiol.* 115: 1319-1328.
- Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Akazawa T and Pozueta-Romero J. 2001. Reappraisal of the currently prevailing model of starch biosynthesis in photosynthetic tissues: A proposal involving the cytosolic production of ADP-glucose by sucrose synthase and occurrence of cyclic turnover of starch in the chloroplast. *Plant Cell Physiol.* 42: 1311-1320.
- Barratt DHP, Barber L, Kruger NJ, Smith AM, Wang TL and Martin C. 2001. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol.* 127: 655-664.
- Bate NJ, Niu X, Wang Y, Reimann KS and Helentjaris TG. 2004. An invertase inhibitor from maize localizes to the embryo surrounding region during early kernel development. *Plant Physiol.* 134: 246-254.
- Baud S, Vaultier MN and Rochat C. 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 55: 397-409.
- Baur-Hoch B, Machler F and Nosberger J. 1990. Effect of carbohydrate demand on the mobilization of starch in stolons and roots of white clover (*Trifolium repens* L.) after defoliation. *J. Exp. Bot.* 41: 573-578.
- Becnel J, Natarajan M, Kipp A and Braam J. 2006. Developmental expression patterns of *Arabidopsis* XTH genes reported by transgenes and Genevestigator. *Plant Mol. Biol.* 61: 451-167
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest D, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL and Zoran M. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Gen.* 1-13 (published online).
- Blasing O, Gibson Y, Gunther M, Hohne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible WR and Stitt M. 2005. Sugars and circadian regulation make major contributions to global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 3257-3281.
- Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U and Weber H. 2003. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J. Exp. Bot.* 54: 503-512.

- Borisjuk L, Walenta S, Rolletschek H, Mueller-Klieser W, Wobus U and Weber H. 2002. Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant J.* 29: 521-530.
- Brummell DA and Harpster MA. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47: 311-340.
- Buckeridge MS and Dietrich SMC. 1990. Galactomannans from Brazilian legume seeds. *Rev. Bras. Bot.* 13: 109-112.
- Buckeridge MS and Reid JSG. 1994. Purification and properties of a novel  $\beta$ -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192: 502-511.
- Buckeridge MS, Aidar MPM, Santos HP and Tiné MA. 2000a. Acúmulo de Reservas. In: Germinação. Do básico ao aplicado. Ferreira AG and Borgheti F (Eds.). Artmed, Porto Alegre pp.31-50.
- Buckeridge MS, Crombie HJ, Mendes CJM, Reid JSG, Gidley MJ and Vieira CJ. 1997. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *H. courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. *Carboh. Res.* 303: 233-237.
- Buckeridge MS, Hutcheoni I and Reid JSG. 2005. The role of exo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -galactanase in the mobilisation of polysaccharides from the cotyledonary cell walls of *Lupinus angustifolius* L. following germination. *Ann. Bot.* 96: 435-444.
- Buckeridge MS, Mortari LC, and Machado MR. 2007 Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema? In: Rego GM, Negrelle RRB and Morellato LPC. Fenologia - Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos. Colombo, PR: Embrapa Florestas (no prelo).
- Buckeridge MS, Rocha DC, Reid JSG and Dietrich SMC. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiol. Plant.* 86: 145-151.
- Buckeridge MS, Santos HP, Tiné MA and Aidar MPM. 2000b. Mobilização de Reservas. In: Germinação. Do básico ao aplicado. Ferreira AG & Borgheti F (Eds.). Artmed, Porto Alegre pp.163-185.

- Buckeridge MS, Vergara CE and Carpita NC. 1999. The mechanism of synthesis of a cereal mixed-linkage (1→3),(1→4)β-D-glucan: Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiol.* 120: 1105-1116.
- Busato AP, Vargas-Rechia CG and Reicher F. 2001. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. *Phytoch.* 58: 525-531.
- Bussis D, Heineke D, Sonnewald W, Willmitzer L, Raschke K and Heldt HW. 1997. Solute accumulation and decrease photosynthesis in leaves of potato plants expressing yeast-derived invertase either in the apoplast, vacuole or cytosol. *Planta* 202: 126-136.
- Campbell P and Braam J. 1998. Co- and/ or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity. *Plant J.* 15: 553-561.
- Carey AT, Holt K, Picard S, Wikle R, Tucker GA, Bird CR, Schuch W and Seymour GB. 1995. Tomato exo-(1→4)-β-D-galactanase. Isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol.* 108: 1099-1107.
- Carey AT, Smith DL, Harrison E, Bird CR, Gross KC, Seymour GB and Tucker GA. 2001. Down-regulation of a ripening-related β-galactosidase gene (TBG1) in transgenic tomato fruits. *J. Exp. Biol.* 52: 663-668.
- Carlson SJ and Chourey PS. 1996. Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Mol. Gen. Genet.* 252: 303-310.
- Carlson SJ, Chourey PS, Helentjaris T and Datta R. 2002. Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Mol. Biol.* 49: 15-29.
- Carpita NC. 1984. Cell wall development in maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 76: 205-212.
- Carpita NC and Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of wall during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Caspar T, Huber SC and Somerville C. 1985. Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.). Deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol.* 79: 11-17.
- Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 281-309.

- Catalá C, Rose JKC and Bennett AB. 2000. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 122: 527–534.
- Catalá C, Rose JKC and Bennett AB. 1997. Auxin regulation and spatial localization of endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase and xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J.* 12: 417-426.
- Catalá C, Rose JKC York WS, Albersheim P, Darvill AG and Bennett AB. 2001. Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls. *Plant Physiol.* 127: 1180-1192.
- Chang S, Puryear J and Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolation RNA from Pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- Chang YK, Silva MR, Gutkoski LC, Sebio L and Da Silva MAAP. 1998. Development of extruded snacks using jatoba (*Hymenaea stigonocarpa* Mart) flour and cassava starch blends. *J. Sci. Food Agric.* 78: 59–66.
- Chanliaud E, Burrows KM, Jeronimidis G and Gidley M. 2002. Mechanical properties plant cell wall analogues. *Planta* 215: 989-996.
- Chen S, Hajirezaei M and Bornke F. 2005. Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in Tobacco reflects their functional specialization during dark governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiol.* 139: 1163-1174.
- Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M and Conkling MA. 1992. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1861-1864.
- Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ and Ruan YL. 1998. Genetic evidence that the two isoenzymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genetic.* 259: 88-96.
- Cona A, Cenci F, Cervelli M, Federico R, Mariottini P, Moreno S and Angelini R. 2003. Polyamine oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is up-regulated by light and down-regulated by auxin in the outer tissues of the maize mesocotyl. *Plant Physiol.* 131: 803–813.
- Copeland L. 1990. Enzymes of sucrose metabolism. *Met. Plant Bioch.* 3: 73-85.
- Corrêa MP. 1984. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, IBDF. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, pp. 593-599.

- Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Mol. Cell Biol.* 6: 850-861.
- Cosgrove DJ. 1993. Wall extensibility: its nature, measurement, and relationship to plant cell growth. *New Phytol.* 124: 1-23.
- Crombie HJ, Chengappa S, Hellyer A and Reid JSG. 1998. A xyloglucan oligosaccharide-active, transglycosylating  $\beta$ -D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L) seedlings—purification, properties and characterization of a cDNA clone. *Plant J.* 15: 27-38.
- Cui D, Neill SJ, Tang Z and Cai W. 2005. Gibberellin-regulated XET is differentially induced by auxin in rice leaf sheath bases during gravitropic bending. *J. Exp. Bot.* 56: 1327–1334.
- Cunningham A, Martin SS and Langenheim JH. 1973. Resin acids from two Amazonian species of *Hymenaea*. *Phytochemistry* 12: 633–635.
- Cunningham A, Martin SS and Langenheim JH. 1974. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in trunk resin of Amazonian *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* 13: 294–295.
- Daohong W, Bochu W, Biao L, Chuanren D and Jin Z. 2004. Extraction of total RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates. *Coll. Surf. B: Bio* 36: 111-114.
- Darley CP, Forrester AM and McQueen-Mason SJ. 2001. The molecular basis of plant cell extension. *Plant Mol. Biol.* 47: 179-195.
- Davies C, Boss PK and Robinson SP. 1997. Treatment of crape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol.* 11: 551 161.
- Déjardin A, Rochat C, Wuillém S and Boutin JP. 1997. Contribution of sucrose synthase, ADP - glucose pyrophosphorilase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant Cell Envir.* 20: 1421-1430.
- De Silva J, Jarman CD, Arrowsmith DA, Stronach MS, Chengappa S, Sidebottom C and Reid JSG. 1993. Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(1→4)- $\beta$ -D-glucanase (xyloglucan endotransglycosylase) from nasturtium seeds. *Plant J.* 3: 701-711.
- Devlin PF. 2002. Signs of the: environmental input to the circadian clock. *J. Exp. Bot.* 53: 1535-1550.
- Dodd NA, Griffiths H, Taybi T, Cushman JC, Borland AM. 2003. Integrating diel starch metabolism with the circadian and environmental regulation of *Crassulacean* acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta* 216: 789-797.

- Doehlert DC. 1990. Distribution of enzyme activities within the developing maize (*Zea mays*) kernel in relation to starch, oil and protein accumulation. *Plant Physiol.* 78: 561-567.
- Dopico B, Nicolas G and Labrador E. 1989. Partial purification of cell wall  $\beta$ -galactosidase from *Cicer arietinum* epicotyls. Relationship with cell wall autolytic processes. *Physiol. Plant.* 75: 458-464.
- Dowson-Day MJ and Millar A. 1999. Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J.* 17: 63-71.
- Druart N, Roover JD, Van den Ende W, Goupil P, van Laere A and Rambour S. 2001. Sucrose assimilation during early developmental stages of chicory (*Cichorium intybus* L.) plants. *Planta* 212: 436-443.
- Edwards M, Bowman YJL, Dea ICM and Reid JSG. 1988. A  $\beta$ -D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons. *J. Biol. Chem.* 263: 4333-4337.
- Edwards M, Dea ICM, Bulpin PV and Reid JSG. 1986. Purification and properties of a novel xiloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase from germinating nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). *J. Biol. Chem.* 261: 9489-9494.
- Edwards ME, Dea ICM, Bulpin PV and Reid JSG. 1985. Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. *Planta* 163: 133-140.
- Emes MJ, Bowsher CG, Hedley C, Burrell MM, Scrase-Field ES and Tetlow IJ. 2003. Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm. *J. Exp. Bot.* 54: 569-575.
- Esteban R, Dopico B, Munoz FJ, Romo S, Martin I and Labrador E. 2003. Cloning of a *Cicer arietinum*  $\beta$ -galactosidase with pectin-degrading function. *Plant Cell Physiol.* 44: 718-725.
- Fankhauser C and Staiger D. 2002. Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* 216: 1-16.
- Fanutti C, Gidley MJ and Reid JSG. 1993. Action of a pure xiloglucan endo-transglycosylase (formerly called xiloglucan-specific endo-(1,4)-beta-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. *Plant J.* 3: 691-700.
- Farkas V, Sulová Z, Stratilova E, Hanna R and MaClachlan G. 1992. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 365-370.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK and Matthews KJ. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282: 821-828.
- Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau JP, Kato Y, Lorences EP, Maclachlan GA, McNeil M, Mort AJ, Reid JSG, Seitz HU, Selvendran RR, Voragen AGJ and White AR. 1993. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.* 89: 1-3.
- Gallagher JA, Cairns AJ and Pollock CJ. 2004. Cloning and characterization of putative fructosyltransferase and two putative invertase genes from the temperate grass *Lolium temulentum* L. *J. Exp. Bot.* 55: 557-569.
- Gallagher TF, Jenkins GI and Ellis RJ. 1985. Rapid modulation of transcription of nuclear genes encoding chloroplast proteins by light. *FEBS Lett.* 186: 241-245.
- Gardiner JC, Taylor NG and Turner SR. 2003. Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem. *Plant Cell* 15: 1740-1748.
- Geigenberger P, Langenberger S, Wilke I, Heineke D, Heldt HW and Stitt M. 1993. Sucrose is metabolized by sucrose synthase and glycolysis within the phloem complex of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* 190: 446-453.
- Geiger DR, Shieh WJ and Yu XM. 1995. Photosynthetic carbon metabolism and translocation in wild-type and starch-deficient mutant *Nicotiana sylvestris* L. *Plant Physiol.* 107: 507-514.
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jurgens G and Palme K. 2001. Auxin transport inhibitors block PINT cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Gerhardt K. 1993. Tree seedling development in tropical dry abandoned pasture and secondary forest in Costa Rica. *J. Veg. Sci.* 4: 95-102.
- Gesteira AS, Micheli F, Ferreira CF and Cascardo CM. 2003. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. *BioTech.* 35: 494-500.
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL and Komina O. 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 120: 867-878.
- Gross KC and Sams CE. 1984. Change in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* 23: 2457-2461.

- Haigler CH, Ivanova-Datcheva M, Hogan PS, Salnikov VV, Hwang S, Martin K and Delmer DP. 2001. Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol. Biol.* 47: 29-51.
- Hajirezaei MR, Takahata Y, Trethewey RN, Willmitzer L and Sonnewald U. 2000. Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *J. Exp. Bot.* 51: 439-445.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Ja K and Kay SA. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by circadian clock. *Science* 290: 2110-2113.
- Harmer SL and Kay AS. 2005. Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1926-1940.
- Hayashi T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 139-168.
- Hayashi T and MacLachlan G. 1984. Pea xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organization. *Plant Physiol.* 75: 596-604.
- Heim U, Weber H, Baumlein H and Wobus U. 1993. A sucrose synthase gene of *Vicia faba* L.: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* 191: 394-401.
- Heinricher E. 1888. Zur Biologie der gattung Impatiens. *Flora Jena* 71.
- Hensel A, Brummell DA, Hanna R and MacLachlan G. 1991. Auxin-dependent breakdown of xyloglucan in cotyledons of germinating nasturtium seeds. *Planta* 183: 321-326.
- Heyer A, Raap M, Schroeder B, Marty B and Willmitzer L. 2004. Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39: 161-169.
- Hsieh HL, Okamoto H, Wang ML, Ang LH, Matsui M, Goodman H and Deng XW. 2000. FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and downstream regulator COPT in light control of *Arabidopsis* development. *Genes Dev.* 14: 1958-1970.
- Huber SC and Akazawa T. 1986. A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured *Sycamore* cells. *Plant Physiol.* 81: 1008-1013.
- Iacono F, Bertamini M, Scienza A and Coombe BG. 1995. Differential effects of canopy manipulation and shading of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet sauvignon. Leaf gas exchange, photosynthetic electron transport rate and sugar accumulation in berries. *Vitis* 34: 201-206.

- Iglesias N, Abelenda JA, Rodiño M, Sampedro J, Revilla G and Zarra I. 2006. Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 55–63.
- Iliev EA, Xu W, Polisensky DH, Oh MH, Torisky RS, Clouse SD and Braam J. 2002. Transcriptional and posttranscriptional regulation of *Arabidopsis* TCH4 expression by diverse stimuli. Roles of *cis* regions and Brassinosteroids. *Plant Physiol.* 130: 770–783.
- Imamura PM, Marsaioli AJ, Barata LES and Rúveda EA. 1977. <sup>13</sup>C NMR spectral analysis of Eperuane diterpenes. *Phytochemistry* 16: 1842–1844.
- Ishimaru M and Kobayashi S. 2002. Expression of a xyloglucan endotransglycosylase gene is closely related to grape berry softening. *Plant Sci.* 162: 621-628.
- Jacobs M and Gilbert SF. 1983. Basal localization of the presumptive auxin carrier in pea stem cells. *Science* 220: 1297-1300.
- Ji X, Ende WVD, Laere AV, Cheng S and Bennett J. 2005. Structure, evolution and expression of two invertase gene families of rice. *J. Mol. Evol.* 60: 615-634.
- Jones DT, Taylor WR and Thornton JM. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Com. Appl. Biosc.* 8: 275-282.
- Keegstra K and Raikhel N. 2001. Plant glycosyltransferases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 219-224.
- Kerr ID and Bennett MJ. 2007. New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem J.* 401: 613-622.
- Khoo SF, Oehlschlager AC and Ourisson G. 1973. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinoideae) seed pod resin. *Tetrahedron* 29: 3379–3388.
- Kim JY, Mahê A, Brangeon J and Prioul JL. 2000. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol.* 124: 71-84.
- King GA and Davies KM. 1995. Cloning of a harvest-induced  $\beta$ -galactosidase from tips of harvested asparagus spears. *Plant Physiol.* 108: 419-420.
- Kingston-Smith AH, Walker RP and Pollock CJ. 1999. Invertase in leaves: conundrum or control point? *J. Exp. Biol.* 50: 735-743.

- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M, and Friml J. 2006. Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* 18: 3171-3181.
- Koch KE. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Op. Plant Biol.* 7: 235-246.
- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.
- Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR and Avigne WT. 1992. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 4: 59-69.
- Koch KE and Zeng Y. 2002. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 474-483.
- Kolossova N, Miller B, Ralph S, Ellis BE, Douglas C, Ritland K and Bohlmann J. 2004. Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. *BioTech.* 36: 821-824.
- Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, Omura M and Akihama T. 2002. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *J. Exp. Bot.* 53: 61-71.
- Kooiman P. 1960. On the occurrence of amyloids in plants seeds. *Ac. Bot. Neerl.* 9: 208-219.
- Kotake T, Nakagawa N, Takeda K and Sakurai. 2000. Auxin-induced elongation growth and expressions of cell wall-bound exo and endo- $\beta$ -glucanases in barley coleoptiles. *Plant Cell Physiol.* 41: 1272-1278.
- Kutschera U and Briggs WR. 1987a. Differential effect of auxin on *in vivo* extensibility of cortical cylinder and epidermis in Pea internodes. *Plant Physiol.* 84: 1361-1366.
- Kutschera U and Briggs WR. 1987b. Rapid auxin-induced stimulation of cell wall synthesis in pea internodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2747-2751.
- Labavitch JM and Ray PT. 1974. Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 54: 499-502.
- Lara MV, Drincovich MF, Andreo CS. 2004. Induction of a crassulacean acid-like metabolism in the C(4) succulent plant, *Portulaca oleracea* L.: study of enzymes involved in carbon fixation and carbohydrate metabolism. *Plant Cell Physiol.* 45: 618-626.

- Lazan H, Syu-Yih NG, Lee-Yin G and Ali MZ. 2004. Papaya  $\beta$ -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiol. Bioch.* 42: 847-853.
- LeClere S, Tellez R, Rampey RA and Matsuda SPT. 2002. Characterization of a family of IAA-Amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 20446-20452.
- Lee HS and Sturm A. 1996. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol.* 112: 1513-1522.
- Lee YT and Langenheim JH. 1975. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). *Chemistry of California Press Ltd.* 69: 1-109.
- Lee EJ, Matsumura Y, Soga K, Hoson T and Koizumi N. 2007. Glycosyl hydrolases of cell wall are induced by sugar starvation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 48 (3): 405-413.
- Léon P and Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8: 110-116.
- Levy S, Maclachlan G and Staehelin LA. 1997. Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during *in vitro* binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. *Plant J.* 11: 373-386.
- Leyser O and Berleth T. 1999. A molecular basis for auxin action. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 131-137.
- Li CY, Weiss D and Goldschmidt EE. 2003. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternated-bearing Citrus trees. *Ann. Bot.* 92: 137-143.
- Li SC, Han JW, Chen KC and Chen CS. 2001. Purification and characterization of isoforms of  $\beta$ -galactosidases in mung bean seedlings. *Phytochemistry* 57: 349-359.
- Li XQ and Zhang D. 2003. Gene expression activity and pathway selection for sucrose metabolism in developing storage root of sweet potato. *Plant Cell Physiol.* 44: 630-636.
- Lima DU, Chaves RO and Buckeridge MS. 2003. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. *Carboh. Polymers* 52: 367-373.
- Liscum E and Reed JW. 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 49: 387-400.
- Lorences EP and Zarra I. 1987. Auxin-induced growth in hypocotyls segments of *Pinus pinster* Ailton. *J. Exp. Bot.* 191: 960-967.

- Lou Y, Gou JY and Xue HW. 2007. PIP5K9, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *Plant Cell* 19: 163–181.
- Lu Y, Gehan JP and Sharkey TD. 2005. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* 138: 2280-2291.
- Marsaioli AJ, Leitão Filho HF and De Campello JP. 1975. Diterpenes in bark of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* 14: 1882–1883.
- Martin I, Dopico B, Munoz FJ, Esteban R, Oomen RJ, Driouich A, Vincken JP, Visser R and Labrador E. 2005. *In vivo* expression of *Cicer arietinum* beta-galactosidase in potato tubers leads to a reduction of the galactan side-chains in cell wall pectin. *Plant Cell Physiol.* 46: 1613-1622.
- Martin T, Fromme EWB, Salanoubat M and Willmitzer L. 1993. Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolisation of sucrose both during phloem loading and sink organs. *Plant J.* 4: 367-377.
- McCann MC, Defernez M, Urbanowicz BR, Tewari JC, Langewisch T, Olek A, Wella B, Wilson RH and Carpita NC. 2007. Neural network analyses of infrared spectra for classifying cell wall architectures. *Plant Physiol.* 143: 1314-1326.
- McCann MC and Roberts K. 1991. Architecture of the primary cell wall. In: Lloyd CW. *The cytoskeletal basis of the plant growth and form.* Acad. Press, London. pp. 109-129.
- McClung CR. 2001. Circadian rhythms in plants. 2001. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 139-162.
- McDougall GJ and Fry SC. 1989. Structure-activity relationship for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. *Plant Physiol.* 89: 883-887.
- Michael TP and McClung CR. 2003. Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 629-639.
- Millar AJ and Kay SA. 1991. Circadian control of *cab* gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3: 541-550.
- Millar AJ, Short SR, Chua NH and Kay SA. 1992. A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4: 1075-1087.
- Minhoto MJ. O efeito da temperatura na ação da xiloglucano endo-beta-transglicosilase sobre xiloglucanos de reserva. 2002. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

- Moctezuma D, Smith DL and Gross KC. 2003. Effect of ethylene on mRNA abundance of three  $\beta$ -galactosidase genes in wild -type and mutant tomato fruit. *Post. Biol. Techn.* 28: 207-217.
- Molle FRD. Atividade de enzimas do catabolismo de sacarose em plântulas de *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. 2007. Dissertação de Mestrado. Instituto Botânico, São Paulo.
- Morris DA and Arthur ED. 1984. Invertase and auxin-induced elongatin in internodal segments of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 23: 2163-2167.
- Nagy F, Fejes E, Wehmeyer B, Dallman G and Schaffer E. 1993. The circadian oscillator is regulated by a very low fluence response of phytochrome in wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6290-6294.
- Nakamura T, Yokoyama R, Tomita, E and Nishitani K. 2003. Two azuli bean XTH genes, VAXTH1 and VaXTH2, with similar tissue-specific expression profiles, are differently regulated by auxin. *Plant Cell Physiol.* 44: 16-24.
- Nakano T and Djerassi C. 1961. Terpenoids XLVI Copalic acid. *J. Org. Chem.* 26: 167-173.
- Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K and Matsui M. 2001. DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyls length. *Plant J.* 25: 213-221.
- Neves MCA, Neves PCA, Zanini JC, Medeiros YS, Yunes RA and Calixto JB. 1993. Analgesic and antin-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. *Phytot. Res.* 7: 356-362.
- Nishitani K. 1997. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.* 173: 157-206.
- Nishitani K. 1995. Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. *J. Plant Res.* 108: 2105-2117.
- Nishitani K and Masuda Y. 1982. Roles of auxin and gibberelic acid in growth and maturation of epicotyls of *Vigna angularis*: Cell wall changes. *Physiol. Plant* 56: 38-45.
- Nishitani K and Masuda Y. 1983. Auxin-induced changes in the cell wall xyloglucans: Effects of auxin on the two different subfractions of xyloglucans in the epicotyl cell wall of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol.* 24: 345-355.

- Nishitani K and Tominaga RJ. 1992. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyses transfer of a segment of a xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* 267: 21058-21064.
- Nogueira RT, Shepherd GJ, Laverde Jr. A, Marsaioli AJ and Imamura PM. 2001. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry* 58: 1153–1157.
- Nolte KD and Kock KE. 1993. Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol.* 101: 899-905.
- O'Donoghue EM, Somerfield SD, Sinclair BK and King GA. 1998. Characterization of the harvest-induced expression of  $\beta$ -galactosidase in *Asparagus officinalis*. *Plant Physiol. Bioch.* 36: 721-729.
- Oh MH, Romanow WG, Smith RC, Zamski E, Sasse J and Clouse SD. 1998. Soybean BRU1 encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid-promoted elongation. *Plant Cell Physiol.* 39: 124-130.
- Okazawa K, Sato Y, Nakagawa T, Asada K, Kato I, Tomita E and Nishitani K. 1993. Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in the plant cell walls. *J. Biol. Chem.* 268: 25364-25328.
- Osato Y, Yokoyama R and Nishitani K. 2006. A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth: a functional analysis using RNAi plants. *J. Plant Res.* 119: 153–162.
- Parfitt D, Herbert R, Rogers HJ and Francis D. 2004. Differential expression of putative floral genes in *Pharbitis nil* shoot apices cultured on glucose compared with sucrose. *J. Exp. Bot.* 55: 2169-2177.
- Paulsen H and Bogorad L. 1988. Diurnal and circadian rhythms in the accumulation and synthesis of mRNA for the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein in tobacco. *Plant Physiol.* 88: 1104-1109.
- Perrot-Rechenmann C and Napier RM. 2005. Auxins. *Vitam. Horm.* 72: 203-233.
- Pilling E and Hofte H. 2003. Feedback from the wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 611-616.

- Pritchard J, Hetherington PR, Fry SC and Thomos AD. 1993. Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *J. Exp. Bot.* 265: 1281-1289.
- Quereix A, Dewar RC, Gaudillere JP, Dayau S and Valancogne C. 2001. Sink feedback regulation of photosynthesis in vines: measurements and a model. *J. Exp. Bot.* 53: 2313-2322.
- Reed JW. 2001. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 6: 420-425.
- Reis D, Vian B, Darzens D and Roland JC. 1987. Sequential patterns of intramural digestion of galactoxyloglucan in tamarind seedlings. *Planta* 170: 60-73.
- Reiss R. 1889. Über die Natur der Reservecellulose und über ihre Auflösungweise bei der Keimung der Samen. *Landwirtsch Jahrb* 18: 711–765.
- Reiter WD. 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 536-542.
- Ricard B, Toai TV, Chourey P and Saglio P. 1998. Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. *Plant Physiol.* 116: 1323-1331.
- Rogers LA, Dubos C, Cullis IF, Surman C, Poole M, Willment J, Mansfield SD and Campbell MM. 2005. Light, the circadian clock, a sugar perception in the control of lignin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56: 1651-1663.
- Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 198-206.
- Roitsch T, Bittner M and Godt DE. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* 108: 285-294.
- Roitsch T and Gonzalez MC. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9: 606-613.
- Romo S, Jiménez T, Labrador E and Dopico B. 2005. The gene for xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase from *Cicer arietinum* is strongly expressed in elongating tissues. *Plant Physiol Biochem.* 43 (2): 169-176.
- Rook F and Bevan MW. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *J. Exp. Bot.* 54: 495-501.

- Rook F, Hadingham SA, Li Y and Bevan MW. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ.* 29: 426-434.
- Rose JK, Braam J, Fry SC and Nishitani K. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* 43: 1421-1435.
- Ross GS, Wagrzyn T, MacRae EA and Redgwell RJ. 1994. Apple  $\beta$ -galactosidase: activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol.* 106: 521-528.
- Ross HA, McRae D and Davies HV. 1996. Sucrolytic enzyme activities in cotyledons of the Faba bean. *Plant Physiol.* 111: 239-338.
- Ruan YL, Chourey PS, Delmer DP and Perez-Grau L. 1997. The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed. *Plant Physiol.* 115: 375-385.
- Ruan YL, Llewellyn DJ and Furbank RT. 2003. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation and seed development. *Plant Cell* 15: 952-964.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Salnikov VV, Grimson MJ, Seagull RW and Haigler CH. 2003. Localization of sucrose synthase and callose a freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers. *Prot.* 221: 175-184.
- Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM and Bressan RA. 1999. An improved RNA isolation method for plants tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 11-17.
- Sambrook J and Russel D. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2001. Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 3<sup>o</sup>Ed.
- Santos HP and Buckeridge MS. 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Ann. Bot.* 94: 819-830.
- Santos HP, Purgatto E, Mercier H and Buckeridge MS. 2004. The control of storage xyloglucan mobilisation in cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. *Plant Physiol.* 135: 287-299.

- Saura-Valls M, Fauré R, Ragas S, Piens K, Brumer H, Teer TT, Cottaz S, Driguez H and Planas A. 2006. Kinetic analysis using low-molecular mass xyloglucan oligosaccharides defines the catalytic mechanism of a *Populus* xyloglucan endotransglycosylase. *Biochem. J.* 395: 99-106.
- Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M and Wisman E. 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 113-123.
- Schaffer WE, Rohwer JM and Botha FC. 2004. Protein-level expression and localization of sucrose synthase in the sugarcane culm. *Physiol. Plant* 121: 187-195.
- Schrader S and Sauter J. 2002. Seasonal changes of sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench robusta) and their possible role in carbohydrate metabolism. *J. Plant Physiol.* 159: 833-843.
- Schweinichen VC and Buttner M. 2005. Expression a plant cell wall invertase in roots of *Arabidopsis* leads to early flowering and increase in whole plant biomass. *Plant Biol.* 7: 469-475.
- Sebková V, Unger C, Hardegger M and Sturm A. 1995. Biochemical, physiological, and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*. *Plant Physiol.* 108: 75-83.
- Sekimata M, Ogura K, Tsumuraya Y, Hasimoto Y and Yamamoto S. 1989. A  $\beta$ -galactosidase from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Plant Physiol.* 90: 567-574.
- Sharma AD, Gill PK and Singh P. 2002. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. *Analyt. Bioch.* 314: 319-321.
- Sheen J, Zhou L and Jang JC. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 410-418.
- Shindler T, Bergfeld R and Schopfer P. 1995. Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant J.* 7: 25-36.
- Simos G, Giannakouros and Georgatsos JG. 1989. Plant  $\beta$ -galactosidases: purification by affinity chromatography and properties. *Phytochemistry* 28: 2587-2592.
- Smith DL, Abbott JA and Gross KC. 2002. Down-regulation of tomato  $\beta$ -galactosidase 4 results in decrease fruit softening. *Plant Physiol.* 129: 1755-1762.

- Smith DL, Starrett DA and Gross KC. 1998. A gene coding for tomato fruit  $\beta$ -Galactosidase II is expressed during fruit ripening. *Plant Physiol.* 117: 417–423.
- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thomeycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hyton C, Zeeman SC and Smith AM. 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and postranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 136: 2687-2699.
- Smith RC, Matthews PR, Schunmann PHD and Chandler PM. 1996. The regulation of leaf elongation and xyloglucan endotransglycosylase by gibberellin in “Himalaya” barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 1395-1404.
- Sokolov LN, Dominguez-Solis JR, Allary AL, Buchanan BB and Luan S. 2006. A redox-regulated chloroplast protein phosphatase binds to starch diurnally and functions in its accumulation. *PNAS* 103: 9732–9737.
- Somers DE, Devlin P and Kay SA. 1998. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282: 1488-1490.
- Sonnewald U, Hajirezaei MR, Kossmann J, Heyer A, Trethewey RN and Willmitzer L. 1997. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nat. Bio.* 15: 794-797.
- Souza RP and Valio IFM. 1999. Carbon translocation as affected by shade in saplings of shade tolerant and intolerant species. *Biol. Plant.* 42: 631-636.
- Stebbins GL. 1974. *Flowering Plants. Evolution above the species level.* Edward Arnold Ltd. London.
- Steele NM, Suluva Z, Campbell P, Braam J, Farkas V and Fry SC. 2001. Ten isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase from plant cell walls select and cleave the donor substrate stochastically. *Biochem. J.* 355: 671-679.
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Ramam R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA and Kay SA. 2000. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, and autoregulatory response regulator homolog. *Science* 4: 768-771.
- Sturm A. 1999. Invertases: Primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* 121: 1-8.

- Sturm A, Sebkova V, Lorenz K, Hardegger M, Leinhard S and Unger C. 1995. Development- and organ specific expression of the genes for sucrose synthase and three isozymes of acid  $\beta$ -fructofuranosidase in carrot. *Planta* 195: 601-610.
- Sturm A and Tang GQ. 1999. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.* 41: 465-479.
- Subbaiah CC and Sachs MM. 2001. Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedling. *Plant Physiol.* 125: 585-594.
- Suda CNK and Giorgini JF. 2003. Multiple forms of endo-1,4- $\beta$ -glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophylla* L. *J. Exp. Bot.* 54: 2045-2052.
- Sun J, Loboda T, Sung SJS and Black Jr. CC. 1992. Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol.* 96: 1163-1169.
- Sung SS, Sheih WJ, Geiger DR and Black CC. 1994. Growth, sucrose synthase, and invertase activities of developing *Phaseolus vulgaris* L. fruits. *Plant Cell Environ.* 17: 419-426.
- Taiz L and Zeiger E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3 Ed. Artmed. Porto Alegre. 720p.
- Talbott LD and Ray PM. 1992. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides: Effects of auxin and turgor. *Plant Physiol.* 98: 369-379.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Tanaka SI, Nakamura S, Mochizuki N and Nagatani A. 2002. Phytochrome in cotyledons regulates the expression of genes in the hypocotyl through auxin-dependent and -independent pathways. *Plant Cell Physiol.* 43: 1171-1181.
- Tang GQ and Sturm A. 1999. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.* 41: 465-479.
- Tang GQ, Luscher M and Sturm A. 1999. Antisense repression and vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 11: 1-14.
- Tateishi A, Inoue H and Yamaki S. 2002. Cloning and expression of  $\beta$ -galactosidase cDNA related softening of avocado (*Persea americana*). *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 71: 48-55.

- Tenorio G, Orea A, Romero JM and Mérida A. 2003. Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I *Arabidopsis* leaves during the day/night cycle. *Plant Mol. Biol.* 51: 949-958.
- Theologis A and Ray P. 1982. Early auxin-regulated polyadenylated mRNA sequences in pea stem tissue (indoleacetic acid/cell elongation/ cell-free translation/gene expression/ hormone action). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 418-421.
- Terry ME and Jones RL. 1981. Soluble cell wall polysaccharides released from pea stems by centrifugation. *Plant Physiol.* 68: 531-537.
- Thomas BR and Rodriguez RL. 1994. Metabolic signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol.* 106: 1235-1239.
- Thomas BR, Terashima M, Katoh S, Stoltz T and Rodriguez RL. 1995. Metabolic regulation of source-sink relations in cereal seedlings. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol.
- Thompson DS. 2005. How do cell walls regulate plant growth? *J. Exp. Bot.* 56: 2275-2285.
- Tiné MAS, Cortelazzo AL and Buckeridge MS. 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Plant Sci.* 154: 117-126.
- Tiné MAS, Silva CO, Lima DU, Carpita NC and Buckeridge MS. 2006. Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Carboh. Polymers* 66: 444-454.
- Tymowska-Lalanne Z and Kreis M. 1998. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* 207: 259-265.
- Uggla C, Magell E, Moritz T and Sundberg B. 2001. Functions and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. *Plant Physiol.* 125: 2029-2039.
- Uozu S, Tanaka-Ueguchi M, Kitano H, Hattori K and Matsuoka M. 2000. Characterization of XET-related genes of rice. *Plant Physiol.* 122: 853-859.
- Vandenbussche F, Vriezen WH, Smalle J, Laarhoven LJJ, Harren FJM and Straeten DVD. 2003. Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased light intensity. *Plant Physiol.* 133: 517-527.
- Vargas W, Cumino A, Salerno GL. 2003. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta* 216: 951-960.

- Vissenberg K, Fry SC and Verbelen JP. 2001. Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 127: 1125-1135.
- Wakabayashi K, Sakurai N and Kuraishi S. 1991. Differential effect of auxin on molecular weight distributions of xyloglucans in cell walls of outer and inner tissues from segments of dark grown squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls. *Plant Physiol.* 95: 1070-1076.
- Walker L and Estelle M. 1998. Molecular mechanisms of auxin action. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 434-439.
- Wang AY, Kao MH, Yang WH, Sayion Y, Liu LF, Lee PD and Su JC. 1999. Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant Cell Physiol.* 40: 800-807.
- Wang F, Sanz A, Brenner ML and Smith A. 1993. Sucrose synthase, starch accumulation and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol.* 101: 321-327.
- Wang XD, Wang ZP and Zou YP. 1996. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silicagel. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 369-373.
- Wardlaw IF. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol.* 116: 341-381.
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Buchner P and Wobus U. 1995. Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7: 1835-1846.
- Weise SE, Schrader SM, Kleinbeck KR and Sharkey TD. 2006. Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch. *Plant Physiol.* 141: 879-886.
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H and Wobus U. 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar rations in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J.* 33: 395-411.
- Wilder and Albersheim, 1973. The structure of plant cell wall. *Plant Physiol.* 51: 889-893.
- Willemoes JG, Beltrano J and Montaldi ER. 1998. Diagravitropic growth promoted by high sucrose contents in *Paspalum vaginatum* and its reversion by GA. *Can. J. Bot.* 66: 2035-2037.
- Winter H and Huber SC. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 31-67.

- Wobus U and Weber H. 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 4: 401-407.
- Wong HC, Fear AL, Calhoun RD, Eichinger GH, Mayer R, Amikam D, Benziman M, Gelfand DH, Meade JH, Emerick AW et al. 1990. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8130-8134.
- Wu Z and Burns JK. 2004. A  $\beta$ -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of “Valencia” orange (*Citrus sinensis*). *J. Exp. Biol.* 55: 1483-1490.
- Xu J, Avigne WT, McCarty DR and Kock K. 1996. A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression invertase gene family. *Plant Cell* 8: 1209-1220.
- Xu W, Puruggana MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC and Braam J. 1995. *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* 7: 1555-1567.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q and Liu L. 2004. Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331-343.
- Yong W, Link B, O’Malley R, Teeari J, Hunter CT, Lu AC, Li X, Bleecker AB, Kock KE, McCann MC, McCarty DR, Patterson SE, Reiter WD, Staiger C, Thomas SR, Vermerris W and Carpita NC. 2005. Genomics of plant cell wall biogenesis. *Planta* 221: 747-751.
- Young OA, Zheng M, Bevan DR, Esen A, Shiu SH, Benson J, Peng HP, Miller ST, Cheng CL, Poulton JE and Shih MC. 2007. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hidrolase family 35. *Phytochemistry* 68: 1510-1520.
- Zhou R, Cheng L and Dandekar AM. 2006. Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. *J. Exp. Bot.* 15: [Epub ahead of print].
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L and Sonnewald U. 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 7: 97-107.
- Zurek DM and Clouse SD. 1994. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongation soybean epicotyls. *Plant Physiol.* 104: 161-170.

### 13. ANEXOS

**Anexo 1.** Filogenia das seqüências de aminoácidos para obtenção dos *primers* da invertase neutra,  $\beta$ -galactosidase e xiloglucano endotransglicosilase, disponíveis no GenBank. Em destaque, o grupo selecionado foi o que apresentou maior quantidade de representantes da família das leguminosas e foi utilizado para desenhar os *primers* degenerados. Invertase neutra (A), XET (B) e  $\beta$ -Galactosidase (C). A letra F indica um membro da família Fabaceae/Leguminoeseae. As seqüências alinhadas foram analisadas pelo programa NJ (Ver Material e métodos). Os valores apresentados na árvore representam os *bootstraps*.

(A)

```

+----AAG51132.1 - A. thaliana
+1000.0
! +----AAG52223.1 - A. thaliana
+-----886.0
! ! +----NP 564177. - A. thaliana
! +1000.0
! +----AAM65926.1 - A. thaliana
+616.0
! ! +----BAD44643.1 - A. thaliana
! ! +1000.0
! ! +984.0 +----CAB78074.1 - A. thaliana
! ! ! !
! +404.0 +-----AAN13200.1 - A. thaliana
+457.0 !
! ! ! +----CAG30577 - L. corniculatus (F)
! ! +-----1000.0
! ! +----CAG30577.1 - L. corniculatus (F)
+1000.0 !
! ! ! +----XP 466154.1 - O. sativa
! ! +-----1000.0
! ! +----BAD33266.1 - O. sativa

+1000.0 !
! ! +-----CAB80203.1 - A. thaliana
! !
! ! +----BAD08010.1 - O. sativa
! +-----1000.0
! +----XP 463958.1 - O. sativa
!
! +----AAF26084.1 - A. thaliana
! +1000.0
! +1000.0 +----AAO64115.1 - A. thaliana
+1000.0 ! !
! ! +829.0 +-----AAO42161.1 - A. thaliana
! ! ! !
! ! ! ! +----AAM53335.1 - A. thaliana
! ! ! +-----1000.0
! ! +420.0 +----AAP37746.1 - A. thaliana
! ! ! !
! ! ! ! +----AAP40464.1 - A. thaliana
! ! ! ! +1000.0
! ! ! +----750.0 +----AG51337.1 - A. thaliana
+525.0 +-----995.0 !
! ! ! +-----CAA76145.1 - D. carota
! ! !
! ! ! +----BAD53496.1 - O. sativa
! ! ! +1000.0
! ! ! +-----1000.0 +----BAD54740.1 - O. sativa
! ! !
+1000.0 ! +-----NP 908764. - O. sativa
! ! !
! ! ! +----AAS79609.1 - I. trifida
! ! +-----568.0
! ! +----CAD19320.1 - B. vulgaris

+1000.0 !
! ! ! +----BAB09123.1 - A. thaliana
! ! +-----1000.0
+559.0 ! +----AAL08305.1 - A. thaliana
! ! !
! ! ! +-----CAA05869.1 - L. temulentum
+1000.0 !
! ! +-----BAD25431.1 - O. sativa
! !
! ! +-----BAD25614.1 - O. sativa
!
+-----XP 466072.1 - O. sativa
```

```
+----T07678 - P. vulgaris (F)
+1000.0
+-----443.0 +----BAB01849.1 - A. thaliana
!
!
!
!
!
+-----AAS46244.1 - L. esculentum
+----BAB08789.1 - A. thaliana
! +-----1000.0
+564.0 ! +----BAB08788.1 - A. thaliana
! ! !
! ! !
! ! ! +----AAU89381.1 - M. truncatula (F)
! ! ! +1000.0
! ! ! +733.0 +----AAU89382.1 - M. truncatula (F)
! ! ! ! !
! ! ! +----1000.0 +----AAO92743.1 - G. hirsutum
! +689.0 ! !
! ! ! +-----AAS46243.1 - L. esculentum
! ! !
! ! ! +735.0 +-----BAC03237.1 - V. Angularis (F)
! ! ! ! +449.0
+329.0 ! ! ! ! ! +----BAB17788.1 - P. sativum (F)
! ! ! ! ! +943.0 +1000.0
! ! ! ! ! ! ! +----CAA06217.1 - C. arietinum (F)
! ! ! +990.0 +1000.0 !
! ! ! ! ! +-----BAC03238.1 - V. angularis (F)
! ! ! ! !
! ! ! ! +-----C49539 - A. thaliana
! ! !
+807.0 ! ! +----BAB78506.1 - V. labrusca
! ! ! +-----1000.0
! ! ! +----AAS46242.1 - L. esculentum
! ! !
! ! ! +----BAD94531.1 - A thaliana
+1000.0 ! +-----1000.0
! ! ! +----BAB11071.1 - A thaliana
! ! !
! ! ! +-----CAD88260.1 - C. sativus
+1000.0 !
! ! ! +----CAD87533.1 - C. sativus
! ! +-----708.0
! ! +----AAS46241.1 - L. esculentum
! !
! +-----CAD87536.1 - C. sativus
!
+-----CAD87534.1 - C. sativus
```

```

+----AAG29193.1 - A. thaliana
+1000.0
! +----BAB10473.1 - A. thaliana
+998.0
! ! +----E84543 - A. thaliana
! +999.0
+929.0 +----CAG30724.1 - H. vulgare
! !
! ! +----BAB11029.1 - A. thaliana
! +----909.0
+1000.0 +----AAL31090.1 - O. sativa
! !
! ! +----T00787 - A. thaliana
! ! +1000.0
! +----991.0 +----AAQ62586.1 - G. max (F)
! !
+966.0 +-----C84685 - A. thaliana
! !
! ! +----AAF67342.1 - V. radiata (F)
! ! +1000.0
! ! +995.0 +----CAA10128.1 - C. arietinum (F)
! ! ! !
! ! ! +-----AAK81874.1 - V. vinifera
+952.0 +-----1000.0
! ! ! +----AAM14371.1 - A. thaliana
! ! ! +591.0
! ! +1000.0 +----B85429 - A. thaliana
+500.0 ! !
! ! ! +-----AAL07134.1 - A. thaliana
! ! !
+1000.0 ! +-----BAB01923.1 - A. thaliana
! ! !
! ! +-----BAA97206.1 - A. thaliana
+943.0 !
! ! +-----CAH18936.1 - P. communis
+976.0 !
! ! +-----AAF67341.1 - V. radiata (L)
! !
! +-----CAA09457.1 - C. arietinum (L)
!
+-----CAA06309.1 - C. arietinum (L)

```

**Anexo 2.** Número de acesso dos cDNAs parciais do jatobá no GenBank.

1. HcSUS1GeneBank: EU370970
2. HcAlkINV1GeneBank: EU370968
3. HcXTH1GeneBank: EU370971
4. HcBgal1GeneBank: EU370969
5. ActinGeneBank: EU370967

**Anexo 3.** Dados de densidade óptica integrada (IOD) das bandas detectadas nos géis em duas de nove repetições. Os valores médios de IOD foram utilizados nos gráficos referentes as análises dos tratamentos de auxina endógena e alternância de luz. SE = erro padrão. \* = 10X maior.

## COTILÉDONES – IOD

<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	17332	20083	8707,5	1375,5
6h	20158	18153	9155,5	002,5
12h	42871	44802	3836,5	65,5
8h	728	773	50,5	2,5
0h	17332	20083	8707,5	375,5
<b>BGAL1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	513	645	579	6
6h	1932	2096	2014	2
12h	1012	2051	1531,5	19,5
18h	500	560	530	0
0h	513	645	579	6
<b>BGAL1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	5536	6064	5800	64
6h	1338	1227	1282,5	5,5
12h	852	1488	1170	18
18h	580	600	590	0
0h	5536	6064	5800	64
<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	5564	5664	5614	50
6h	10892	10937	10914,5	22,5
*12h	31638	32638	32138	500
18h	162	192	177	15
0h	5564	5664	5614	50
<b>BGAL1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	196	206	201	5
6h	734	754	744	10
12h	741	791	766	25
18h	5564	5895	5729,5	165,5
*0h	196	206	201	5
<b>BGAL1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	31638	32638	32138	500
6h	234	244	239	5
12h	337	347	342	5
18h	36352	37752	37052	700
0h	31638	32638	32138	500

<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	1848	1312	1580	268
6h	1307	2126	1716,5	409,5
*12h	9000	9000	9000	0
18h	985	1021	1003	18
0h	1848	1312	1580	268
<b>XTH1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	518	843	680,5	162,5
6h	1858	1308	1583	275
12h	1041	1242	1141,5	100,5
18h	901	784	842,5	58,5
0h	518	843	680,5	162,5
<b>XTH1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	868	976	922	54
6h	879	428	653,5	225,5
12h	549	516	532,5	16,5
18h	392	850	621	229
0h	868	976	922	54
<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	614	624	619	5
6h	805	818	811,5	6,5
12h	339	437	388	49
18h	551	511	531	20
0h	614	624	619	5
<b>XTH1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	441	461	451	10
6h	734	750	742	8
12h	781	788	784,5	3,5
18h	630	636	633	3
0h	441	461	451	10
<b>XTH1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
*0h	4199	4209	4204	5
*6h	4396	4290	4343	53
*12h	4221	4322	4271,5	50,5
*18h	4199	4277	4238	39
*0h	4199	4209	4204	5

<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	89783	86314	88048,5	1734,5
6h	97386	91135	94260,5	3125,5
12h	71844	69896	70870	974
18h	3334	3334	3334	0
0h	89783	86314	88048,5	1734,5
<b>AlkIN1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	89298	79256	84277	5021
6h	169000	187000	178000	9000
12h	109000	112000	110500	1500
18h	65049	61920	63484,5	1564,5
0h	89298	79256	84277	5021
<b>AlkIN1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	71070	70229	70649,5	420,5
6h	97211	90034	93622,5	3588,5
12h	4861	3177	4019	842
18h	5665	5799	5732	67
0h	71070	70229	70649,5	420,5
<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	15392	14492	14942	450
6h	10828	10928	10878	50
12h	13242	14552	13897	625
18h	500	550	525	25
0h	15392	14492	14942	450
<b>AlkIN1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	33298	34208	33753	455
6h	74958	74950	74954	4
12h	8260	8360	8310	50
18h	60090	70090	65090	5000
0h	33298	34208	33753	455
<b>AlkIN1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	4456	5560	5008	552
6h	223	330	276,5	53,5
12h	7369	9875	8622	1253
18h	425	435	430	5
0h	4456	5560	5008	552

<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	38189	38117	38153	36
6h	37338	35719	36528,5	809,5
12h	98000	99000	98500	500
18h	8543	8000	8271,5	271,5
0h	38189	38117	38153	36
<b>SUS1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	6612	4030	5321	1291
6h	3674	3437	3555,5	118,5
12h	5070	7434	6252	1182
18h	506	458	482	24
0h	6612	4030	5321	1291
<b>SUS1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	28349	27988	28168,5	180,5
6h	32617	30000	31308,5	1308,5
12h	4190	3009	3599,5	590,5
18h	50200	53200	51700	1500
0h	28349	27988	28168,5	180,5
<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	8609	9623	9116	507
6h	11426	12426	11926	500
*12h	11500	12000	117500	250
18h	170	153	161,5	8,5
0h	8609	9623	9116	507
<b>SUS1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	9030	9130	9080	50
6h	25145	24155	24650	495
12h	13737	13867	13802	65
18h	1886	1989	1937,5	51,5
0h	9030	9130	9080	50
<b>SUS1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	6336	6438	6387	51
6h	10096	10396	10246	150
12h	11566	11766	11666	100
18h	6526	6756	6641	115
0h	6336	6438	6387	51

## FOLHAS - IOD

<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	1418	2409	1913,5	495,5
6h	20845	18902	19873,5	971,5
12h	29171	28100	28635,5	535,5
*18h	13800	10600	12200	1600
0h	1418	2409	1913,5	495,5
<b>BGAL1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	22545	24772	23658,5	1113,5
6h	3029	3677	3353	324
12h	2111	1710	1910,5	200,5
18h	1119	1256	1187,5	68,5
0h	22545	24772	23658,5	1113,5
<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	1250	1350	1300	50
6h	24994	26994	25994	1000
12h	27006	26030	26518	488
18h	99914	100120	100017	103
0h	1250	1350	1300	50
<b>BGAL1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	102000	102200	102100	100
6h	1350	1400	1375	25
12h	102000	100000	101000	1000
18h	106000	105700	105850	150
0h	102000	102200	102100	100
<b>BGAL1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	1510	1610	1560	50
6h	24214	23296	23755	459
12h	39087	43199	41143	2056
18h	21420	21520	21470	50
0h	1510	1610	1560	50

<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	14966	12896	13931	1035
6h	108000	111000	109500	1500
12h	116000	82277	99138,5	16861,5
18h	102000	129000	115500	13500
0h	14966	12896	13931	1035
<b>XTH1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	12976	10116	11546	1430
6h	5726	4049	4887,5	838,5
12h	7907	7954	7930,5	23,5
18h	1528	1407	1467,5	60,5
0h	12976	10116	11546	1430
<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	20130	21130	20630	500
6h	36036	37099	36567,5	531,5
12h	44259	46159	45209	950
18h	85814	87814	86814	1000
0h	20130	21130	20630	500
<b>XTH1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	86123	81123	83623	2500
6h	37165	38199	37682	517
12h	20859	22859	21859	1000
18h	21122	23322	22222	1100
0h	86123	81123	83623	2500
<b>XTH1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	87222	86292	86757	465
6h	37012	36088	36550	462
12h	47954	44954	46454	1500
18h	87693	85699	86696	997
0h	87222	86292	86757	465

<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	170000	201000	185500	15500
6h	44200	48000	46100	1900
12h	83038	83598	83318	280
18h	181000	185000	183000	2000
0h	170000	201000	185500	15500
<b>AlkIN1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	7565	10829	9197	1632
6h	2264	1298	1781	483
12h	1394	13404	7399	6005
18h	3312	5204	4258	946
0h	7565	10829	9197	1632
<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	75659	76659	76159	500
6h	110775	116613	113694	2919
12h	43905	45905	44905	1000
18h	35932	38932	37432	1500
0h	75659	76659	76159	500
<b>AlkIN1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	90828	92828	91828	1000
6h	43897	45097	44497	600
12h	45982	43082	44532	1450
18h	90920	93020	91970	1050
0h	90828	92828	91828	1000
<b>AlkIN1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	7856	8056	7956	100
6h	5240	5040	5140	100
12h	10911	13911	12411	1500
18h	7739	7039	7389	350
0h	7856	8056	7956	100

<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
*0h	30600	30700	30650	50
*6h	5397	8923	7160	1763
*12h	8459	7600	8029,5	429,5
*18h	5127	5182	5154,5	27,5
*0h	30600	30700	30650	50
<b>SUS1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	4808	5914	5361	553
6h	2080	3106	2593	513
12h	144	865	504,5	360,5
18h	1265	5247	3256	1991
0h	4808	5914	5361	553
<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	31030	31150	31090	60
6h	24243	28243	26243	2000
12h	33489	34489	33989	500
18h	31030	31150	31090	60
0h	31030	31150	31090	60
<b>SUS1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	29256	33256	31256	2000
6h	1250	1450	1350	100
12h	90621	92621	91621	1000
18h	62521	62671	62596	75
0h	29256	33256	31256	2000
<b>SUS1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	1130	1230	1180	50
6h	23589	21300	22444,5	1144,5
12h	37250	40300	38775	1525
18h	31072	31140	31106	34
0h	1130	1230	1180	50

## HIPOCÓTILOS - IOD

<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	5900	6053	5976,5	76,5
6h	178000	176000	177000	1000
12h	60430	62433	61431,5	1001,5
18h	65603	64967	65285	318
0h	5900	6053	5976,5	76,5
<b>BGAL1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	24360	24532	24446	86
6h	4826	6500	5663	837
12h	3294	2977	3135,5	158,5
18h	4119	5287	4703	584
0h	24360	24532	24446	86
<b>BGAL1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	6814	5446	6130	684
6h	2265	2381	2323	58
12h	3048	4976	4012	964
18h	10510	8144	9327	1183
0h	6814	5446	6130	684
<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	3450	3600	3525	75
6h	95659	98659	97159	1500
12h	30588	35588	33088	2500
18h	33330	33130	33230	100
0h	3450	3600	3525	75
<b>BGAL1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	93824	95824	94824	1000
6h	93488	99488	96488	3000
12h	50735	53799	52267	1532
18h	102000	103000	102500	500
0h	93824	95824	94824	1000
<b>BGAL1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	59995	62995	61495	1500
6h	32980	44980	38980	6000
12h	1459	1859	1659	200
18h	72627	77627	75127	1500
0h	59995	62995	61495	1500

<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	122000	112000	117000	5000
6h	3920	2900	3410	510
*12h	14700	13200	13950	750
18h	72627	67990	70308,5	2318,5
0h	122000	112000	117000	5000
<b>XTH1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	76818	84097	80457,5	3639,5
6h	99021	99021	99021	0
12h	1262	2804	2033	771
18h	1515	1403	1459	56
0h	76818	84097	80457,5	3639,5
<b>XTH1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	450	650	550	100
6h	3198	3141	3169,5	28,5
12h	1589	2404	1996,5	407,5
18h	1562	1209	1385,5	176,5
0h	450	650	550	100
<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
*0h	103000	100000	101500	1500
6h	7482	7882	7682	200
12h	40545	42311	41428	883
18h	43898	46898	45398	1500
0h	103000	100000	101500	1500
<b>XTH1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	9287	9138	9212,5	74,5
6h	11814	11814	11814	0
12h	9696	10000	9848	152
18h	19681	17881	18781	900
0h	9287	9138	9212,5	74,5
<b>XTH1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	9385	9100	922,5	142,5
6h	10165	11665	10915	750
12h	9696	10000	9848	152
18h	21471	17471	19471	2000
0h	9385	9100	9242,5	142,5

<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	466000	436000	451000	15000
6h	323000	205000	264000	59000
12h	326000	206000	266000	60000
18h	180076	157656	168866	11210
0h	466000	436000	451000	15000
<b>AlkIN1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	7162	11074	9118	1956
6h	4860	5112	4986	126
12h	9880	7450	8665	1215
18h	168857	181565	175211	6354
0h	7162	11074	9118	1956
<b>AlkIN1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	3763	2314	3038,5	724,5
6h	2511	2359	2435	76
12h	1929	1414	1671,5	257,5
18h	1568	1557	1562,5	5,5
0h	3763	2314	3038,5	724,5
<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	97622	99622	98622	1000
6h	51330	56380	53855	2525
12h	43404	48404	45904	2500
18h	15684	17699	16691,5	1007,5
0h	97622	99622	98622	1000
<b>AlkIN1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	88236	84236	86236	2000
6h	89696	90699	90197,5	501,5
12h	81106	85199	83152,5	2046,5
18h	49795	55795	52795	3000
0h	88236	84236	86236	2000
<b>AlkIN1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	8026	8126	8076	50
6h	2798	2908	2853	55
12h	113	313	213	100
18h	1348	1648	1498	150
0h	8026	8126	8076	50

<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
*0h	20600	17100	18850	1750
6h	3978	5291	4634,5	656,5
12h	463	564	513,5	50,5
18h	1334	1105	1219,5	114,5
*0h	20600	17100	18850	1750
<b>SUS1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	6510	7583	7046,5	536,5
6h	9839	10559	10199	360
12h	47923	28384	38153,5	9769,5
18h	6295	4251	5273	1022
0h	6510	7583	7046,5	536,5
<b>SUS1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	2361	4748	3554,5	1193,5
6h	4193	1016	2604,5	1588,5
12h	329	367	348	19
18h	557	568	5625	5,5
0h	2361	4748	3554,5	1193,5
<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	74712	74012	74362	350
6h	7295	8195	7745	450
12h	11836	8899	10367,5	1468,5
18h	409	599	504	85
0h	74712	74012	74362	350
<b>SUS1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	7026	7326	7176	150
6h	8782	8982	8882	100
12h	9912	9999	9955,5	43,5
18h	11482	11502	11492	10
0h	7026	7326	7176	150
<b>SUS1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	12	20	16	4
6h	20	25	22,5	2,5
12h	27	60	43,5	16,5
18h	76	77	76,5	0,5
0h	12	20	16	4

## RAÍZES - IOD

<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	235000	202000	218500	16500
6h	45863	25480	35671,5	10191,5
12h	32958	29474	31216	1742
18h	9369	8875	9122	247
0h	235000	202000	218500	16500
<b>BGAL1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	1501	1114	1307,5	193,5
6h	3578	2427	3002,5	575,5
12h	2419	2119	2269	150
18h	20933	26682	23807,5	2874,5
0h	1501	1114	1307,5	193,5
<b>BGAL1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	60264	59977	60120,5	143,5
6h	14935	14930	14932,5	2,5
12h	30525	30535	30530	5
18h	41005	38882	39943,5	1061,5
0h	60264	59977	60120,5	143,5
<b>BGAL1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	136000	136099	136049,5	49,5
6h	34536	30536	32536	2000
12h	34840	39940	37390	2550
18h	18439	19439	18939	500
0h	136000	136099	136049,5	49,5
<b>BGAL1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	135000	134099	134549,5	450,5
6h	136000	137000	136500	500
12h	136000	136500	136250	250
18h	33603	34993	34298	695
0h	135000	134099	134549,5	450,5
<b>BGAL1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	16577	16977	16777	200
6h	16860	18990	17925	1065
12h	100	150	125	25
18h	18153	18653	18403	250
0h	16577	16977	16777	200

<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	370000	387000	378500	8500
6h	220000	187000	203500	16500
12h	231000	200000	215500	15500
18h	3944	3874	3909	35
0h	370000	387000	378500	8500
<b>XTH1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	133000	94699	1138549,5	19150,5
6h	214000	204000	209000	5000
12h	192892	205400	199146	6254
18h	121000	99511	110255,5	10744,5
0h	133000	94699	113849,5	19150,5
<b>XTH1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	2982	2793	2887,5	94,5
6h	833	478	655,5	177,5
12h	812	663	737,5	74,5
18h	148	99	123,5	24,5
0h	2982	2793	2887,5	94,5
<b>XTH1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	235000	238099	236549,5	1549,5
6h	32653	34553	33603	950
12h	34666	35766	35216	550
18h	69	80	74,5	5,5
0h	235000	238099	236549,5	1549,5
<b>XTH1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	138801	129899	134350	4451
6h	28832	30992	29912	1080
12h	28345	31745	30045	1700
18h	18565	19565	19065	500
0h	138801	129899	134350	4451
<b>XTH1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	40871	45598	43234,5	2363,5
6h	65	70	67,5	2,5
12h	501	512	506,5	5,5
18h	164	170	167	3
0h	40871	45598	43234,5	2363,5

<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	1180	1073	1126,5	53,5
6h	137000	68402	102701	34299
12h	194000	259000	226000	32500
18h	77438	79700	78569	1131
0h	1180	1073	1126,5	53,5
<b>AlkIN1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	65217	32945	49081	16136
6h	70030	106000	88015	17985
12h	67327	33664	50495,5	16831,5
18h	74369	84240	79304,5	4935,5
0h	65217	32945	49081	16136
<b>AlkIN1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	2593	1034	1813,5	779,5
6h	14559	15881	15220	661
12h	9399	6895	8147	1252
18h	75503	86025	80764	5261
0h	2593	1034	1813,5	779,5
<b>AlkIN1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	99	120	109,5	10,5
6h	35360	38360	36860	1500
12h	237000	259000	248000	11000
18h	98500	93870	96185	2315
0h	99	120	109,5	10,5
<b>AlkIN1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	35827	38827	37327	1500
6h	35381	37681	36531	1150
12h	35079	35979	35529	450
18h	97200	91000	94100	3100
0h	35827	38827	37327	1500
<b>AlkIN1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	565	590	577,5	12,5
6h	18675	19025	18850	175
12h	18088	18908	18498	410
18h	18504	18904	18704	200
0h	565	590	577,5	12,5

<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	618	1324	971	353
*6h	12700	12200	12450	250
12h	62726	78179	70452,5	7726,5
*18h	20000	19400	19700	300
0h	618	1324	971	353
<b>SUS1 EXC</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	360	106	233	127
6h	88	52	70	18
12h	523	330	426,5	96,5
18h	95	73	84	11
0h	360	106	233	127
<b>SUS1 NPA</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	219	272	245,5	26,5
6h	3946	2015	2980,5	065
12h	160	189	174,5	14,5
18h	41	85	63	22
0h	219	272	245,5	26,5
<b>SUS1 Controle</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	0	0	0	0
6h	30808	32508	31658	850
12h	37990	31770	34880	3110
18h	119000	112000	115500	3500
0h	0	0	0	0
<b>SUS1 Luz</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	31058	31558	31308	250
6h	31689	31889	31789	100
12h	31606	31906	31756	150
18h	30735	33235	31985	1250
0h	31058	31558	31308	250
<b>SUS1 Escuro</b>	<b>Gel 1</b>	<b>Gel 2</b>	<b>Media</b>	<b>SE</b>
0h	30652	35552	33102	2450
6h	1101	1041	1071	30
12h	30196	31296	30746	550
18h	0	0	0	0
0h	30652	35552	33102	2450

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada **“Isolamento de cDNAs parciais dos genes da  $\beta$ -galactosidase, xiloglucano endotransglicosilase, invertase alcalina e sacarose sintase e análise dos padrões de expressão durante a fase inicial do desenvolvimento de plântulas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.)”**

( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

( X ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº 2007/04, aprovado em 08/10/07), intitulado “Transcriptoma do jatobá (*Hymenaea courbaril*)”.

( ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº \_\_\_\_\_).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).

  
Aline Dias Brandão  
Aluna

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz  
- Co-Orientador -

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Nome: \_\_\_\_\_  
Função:  Prof. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA  
Presidente  
Comissão Interna de Biossegurança  
CIBio/IB - UNICAMP