

CASSIANA SEVERIANO DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO DE CASSETES DE EXPRESSÃO PARA
SILENCIAMENTO DE GENES DA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS
GRAXOS EM SOJA VIA RNA DE INTERFERÊNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S725c
2007

Sousa, Cassiana Severiano de, 1980-

Construção de cassetes de expressão para silenciamento de genes da biossíntese de ácidos graxos em soja via RNA de interferência / Cassiana Severiano de Sousa. – Viçosa, MG, 2007.

ix, 48f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 44-48.

1. Silenciamento gênico. 2. Engenharia genética vegetal. 3. Regulação da expressão gênica. 4. Soja - Melhoramento genético. 5. Soja - Composição. 6. Clonagem molecular.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.65

CASSIANA SEVERIANO DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO DE CASSETES DE EXPRESSÃO PARA
SILENCIAMENTO DE GENES DA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS
GRAXOS EM SOJA VIA RNA DE INTERFERÊNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2007.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-Orientador)

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Co-Orientador)

Prof^a. Andréa de Oliveira Barros Ribon

Prof^a. Andréia Barcelos Passos Lima

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

*Aos meus pais, Maurílio e Maria das Graças.
Às minhas irmãs Maria e Júlia.
À minha avó Elvira.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e por ter me dado força para superar todas as dificuldades e alcançar mais este objetivo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso. Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade. Aos professores do Departamento, pelos ensinamentos que foram fundamentais para minha formação intelectual. Ao secretário Eduardo, pela amizade e por ser o “anjo guarda” dos alunos da Bioquímica Agrícola, sempre disposto a nos ajudar, informando datas importantes, resolvendo problemas e deixando as questões burocráticas menos complicadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, Maurílio e Maria das Graças, pelo amor e pelos esforços sem medida para que eu realizasse os meus sonhos. Eles foram e sempre serão minha base e meu exemplo. Sempre estiveram ao meu lado, me apoiaram e compreenderam a minha ausência. À minha avó, Elvira, pela presença sempre importante e pelos momentos maravilhosos da minha infância. Às minhas irmãs, Maria e Júlia, pelo amor, carinho, apoio e confiança. Elas me incentivaram e torceram pelo meu sucesso. Muitas vezes foram elas que me impulsionaram, me fazendo acreditar em mais essa conquista.

Ao professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação, confiança e pelo exemplo de competência.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros pela co-orientação, apoio, incentivo e pela ajuda nos momentos difíceis. Ao professor Luiz Orlando de Oliveira, pela co-orientação e pelas sugestões dadas a este trabalho.

Ao Professor Vagner Tebaldi de Queiroz, por todos os ensinamentos durante a Iniciação Científica, que foram extremamente importantes para a execução dos experimentos.

À Professora Andréia Barcelos Passos Lima, por todo apoio no início no projeto, na época em que essa área ainda era uma novidade para mim, por ter me

direcionado durante a execução de grande parte dos experimentos e pela ajuda em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Clonagem e Sequenciamento de DNA (SeqDNA) e dos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas I e II (Biomol e Proteína) pela convivência agradável e pela ajuda em todas as ocasiões. Às amigas Polyana e Beatriz, por toda ajuda e colaboração, pelos momentos agradáveis dentro e fora do laboratório e pelas risadas.

Às amigas da república, que se tornaram a minha família em Viçosa desde 2001, pelo total companheirismo e pela força. Um agradecimento especial à Ana Paula, Vanessa e Rejane que me acompanharam até o alcance de mais essa conquista. Muitas vezes rimos e choramos juntas.

Aos funcionários, Aloísio, Gláucia e João Paulo, pela atenção e presteza.

Enfim, a todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e humano.

BIOGRAFIA

CASSIANA SEVERIANO DE SOUSA, filha de Maurílio Ferreira de Sousa e Maria das Graças Severiano de Sousa, nasceu no dia vinte e sete de outubro de 1980, em Cataguases, MG.

Em março de 2001, ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em janeiro de 2005.

Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese em fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	viii
	ABSTRACT.....	ix
1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.	Ácido-graxo dessaturases.....	4
2.2.	1,2–diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase.....	7
2.3.	Silenciamento gênico.....	7
2.4.	Silenciamento gênico por RNA de interferência.....	9
3.	OBJETIVOS.....	12
3.1.	Objetivo geral.....	12
3.2.	Objetivos específicos.....	12
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1.	Material vegetal.....	13
4.2.	Extração de RNA total de sementes de soja.....	13
4.3.	Síntese de cDNA por RT-PCR.....	14
4.4.	Análise das seqüências gênicas para escolha dos sítios de restrição e desenho dos <i>primers</i>	15
4.5.	Teste dos <i>primers</i> para estabelecimento das condições de amplificação.....	16
4.6.	Isolamento dos fragmentos gênicos e clonagem em vetor pGEM T- Easy.....	17
4.7.	Transformação de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico e diagnóstico de colônias.....	18
4.8.	Seqüenciamento do DNA.....	19
4.9.	Subclonagem dos fragmentos específicos em vetores pKANNIBAL.....	19
4.10.	Nomenclatura dos clones com os fragmentos <i>sense</i> e <i>antisense</i> em vetores pKANNIBAL.....	21
4.11.	Transferência das construções dos vetores pKANNIBAL para os vetores pCAMBIA 3301.....	21
4.12.	Nomenclatura dos clones com as construções em vetores pCAMBIA 3301.....	23
4.13.	Substituição do promotor 35SCaMV pelo promotor semente- específico do gene da subunidade α da β -conglucininina em vetores pKANNIBAL.....	23
4.14.	Nomenclatura dos clones contendo as construções dirigidas pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina em vetores pKANNIBAL.....	24

4.15.	Transferência dos cassetes com o promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina dos vetores pKANNIBAL para os vetores pCAMBIA 3301.....	24
4.16.	Nomenclatura dos clones com as construções dirigidas pelo promotor da subunidade α da β -conglucininina em vetores pCAMBIA 3301.....	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1.	Amplificação de cDNA e escolha da temperatura de anelamento.....	26
5.2.	PCR para diagnóstico das colônias transformadas com o vetor pGEM T-Easy.....	28
5.3.	Confirmação das clonagens em vetores pGEM T-Easy.....	28
5.4.	Análise das seqüências e comparação com banco de dados.....	29
5.5.	Confirmação das subclonagens em vetores pKANNIBAL	33
5.6.	Confirmação das clonagens em vetores binários pCAMBIA 3301...	34
5.7.	Confirmação da substituição do promotor 35SCaMV em vetores pKANNIBAL.....	36
5.8.	Confirmação da transferência da construção dirigida pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina para os vetores pCAMBIA 3301.....	38
5.9.	Representação esquemática dos clones obtidos.....	39
6.	CONCLUSÕES.....	42
7.	PERSPECTIVAS.....	43
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

RESUMO

SOUSA, Cassiana Severiano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2007. **Construção de cassetes de expressão para silenciamento de genes da biossíntese de ácidos graxos em soja via RNA de interferência.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-Orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Luiz Orlando de Oliveira.

O óleo de soja é composto em sua maior parte por gordura insaturada, sendo que os ácidos graxos polinsaturados (ácidos linoléico e linolênico), monoinsaturado (ácido oléico) e saturados (ácido palmítico e esteárico) correspondem, em média, a 61%, 25% e 15%, respectivamente. Alterações nas proporções relativas destes ácidos graxos na fração óleo, podem ser obtidas pela modificação genética da expressão de enzimas-chave da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, através de transformação genética de plantas via silenciamento gênico. Dentre essas enzimas, destacam-se as dessaturases, as fosfotransferases e as aciltransferases. Através da modificação da expressão dessas enzimas, é possível a obtenção de linhagens de soja com óleos com menor conteúdo de ácido linolênico, maior conteúdo de ácido oléico e, conseqüentemente, maior estabilidade oxidativa. Os objetivos deste trabalho foram isolar os fragmentos dos genes da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase e construir cassetes de expressão para o silenciamento, via RNA de interferência, para esses três genes em sementes de soja. Foi possível isolar os fragmentos dos três genes, subclonar os fragmentos *sense* e *antisense* no vetor pKANNIBAL e transferir as construções para o vetor binário pCAMBIA 3301. Foram obtidos quatro cassetes de expressão para silenciamento gênico. Destes, dois foram para o gene da oleoil dessaturase, um para o gene da 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e o outro para o gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase. Para os três genes foram obtidos cassetes de silenciamento dirigidos pelo promotor 35SCaMV, sendo que para a dessaturase também foi obtido o cassete com o promotor do gene da subunidade α da proteína de reserva de soja β -conglucininina.

ABSTRACT

SOUSA, Cassiana Severiano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2007. **Construction of cassettes for silencing fatty acid genes expression in soybean by RNA interference.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros e Luiz Orlando de Oliveira.

The soybean oil is composed in majority by unsaturated fatty acids. The poliunsaturated fatty acids (linolenic and linoleic acids), monounsaturated (oleic acid) and saturated (palmitic and estearic acids) correspond, on average, to 61%, 25% e 15%, respectively. Alterations in the relative proportions of fatty acids may be reached through genetic modification of the expression of key enzymes in the polinunsaturated fatty acids biosynthesis, through genetic transformation of plants by gene silencing. Among these enzymes are desaturases, phosphotransferases and acyltransferases. Modificating the expression of these enzymes is possible to obtain oils with lower content of linolenic acid, increased content of oleic acid and, consequently, higher oxidative stability. The objectives of this work were to isolate the fragments of the soybean oleoil desaturase gene, 1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase gene and lisofosfatidilcholine acyltransferase gene and to construct expression cassettes for silencing, by RNA interference, these three genes in soybean seeds. Fragments of the three genes were isolated and subcloned in sense and antisense in the vector pKANNIBAL and the constructions were transferred to the binary vector pCAMBIA 3301. Four expression cassettes for gene silencing were obtained. Two for the oleoil desaturase, one for the 1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase and one for the lisofosfatidilcholine acyltransferase. There were obtained three cassettes for gene silencing driven by the 35SCaMV promoter, and one cassette for the desaturase gene with the gene promoter of the α subunit of soybean storage protein β - conglycinine.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da soja (*Glycine max* L. Merrill) ocupa a maior área plantada do Brasil (45,2%), além de ser uma das mais importantes culturas do mundo. A área cultivada com soja no país é de 20,6 milhões de hectares. O Brasil é o segundo maior produtor mundial dessa leguminosa e a sua produção na safra 2005/2006 foi de aproximadamente 53,4 milhões de toneladas. A estimativa para a produção de soja na safra 2006/2007 é em torno de 53,9-55,2 milhões de toneladas, sendo que os levantamentos realizados nos meses de janeiro e fevereiro de 2007, apontaram produções de 54,8 e 56,3 milhões de toneladas, respectivamente (www.conab.gov.br).

Tal leguminosa vem sendo geneticamente modificada em larga escala e a soja transgênica está sendo utilizada em um número crescente de produtos. Dentre as lavouras geneticamente modificadas mais comercializadas em escala mundial, a soja é a que mais se destaca, apresentando 64% de uma área de 91 milhões de hectares. Houve aumento expressivo com relação a área ocupada com lavouras de soja transgênica ao longo de 11 anos, desde o início de sua comercialização, sendo que o maior aumento no ano de 2006 ocorreu no Brasil, onde foram plantados 2 milhões de hectares com soja transgênica (JAMES, 2006).

As técnicas de melhoramento tradicional podem ser auxiliadas pela engenharia genética, visto que a manipulação genética permite que um ou mais genes sejam transferidos de um organismo para outro, que passa a expressar uma nova característica de especial interesse. Além disso, é possível controlar espacial e temporalmente o padrão de expressão do gene de interesse (TANG & GALILI, 2004).

Os óleos com as características modificadas são de grande interesse para as indústrias de óleo e gordura, uma vez que os mesmos podem apresentar características nutricionais e/ou funcionais melhoradas em relação aos tipos comercializados.

Uma das estratégias utilizadas para a obtenção de soja com modificação na fração lipídica é a modificação genética da expressão de enzimas-chave da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, através de transformação genética de plantas via silenciamento gênico, transcricional ou pós-transcricional (VENDRUSCOLO, 2003; TANG & GALILI, 2004).

A técnica de RNA *interference* (RNAi), mediada por inserção de um transgene na forma de RNA dupla fita (dsRNA) complementar à seqüência do gene alvo, tem mostrado bons resultados na modificação genética da composição de ácidos graxos no óleo, apresentando vantagens em termos de sua eficiência e estabilidade com relação às técnicas de silenciamento por co-supressão ou RNA *antisense* (TANG & GALILI, 2004).

O Programa de Melhoramento da Soja, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, visando à obtenção de linhagens especiais de soja para a agroindústria, desenvolveu um valioso germoplasma que inclui, dentre outras, linhagens com baixos teores de ácido linolênico. No que diz respeito á fração óleo, a principal meta desse programa é aumentar a estabilidade oxidativa do óleo pela redução do conteúdo de ácido linolênico e pelo aumento do conteúdo do ácido oléico (MOREIRA, 1999).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os óleos vegetais possuem como seu principal componente lipídico os triacilgliceróis. Estes são compostos de três ácidos graxos, cada um em ligação éster com a molécula de glicerol. A maioria dos triacilgliceróis de ocorrência natural é mista; eles contêm dois ou mais ácidos graxos diferentes. Os ácidos graxos predominantes são os que possuem 16 e 18 carbonos: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1, Δ^9), ácido linoléico (18:2, $\Delta^9, 12$) e ácido linolênico (18:3, $\Delta^{9, 12, 15}$) (KINNEY, 1994).

A qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e as propriedades físicas, como estabilidade oxidativa e ponto de fusão, são determinados pela composição e pela distribuição dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerol. O teor de ácidos graxos polinsaturados tem sido correlacionado com a redução da estabilidade oxidativa e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja, gerando compostos voláteis, que produzem “*off-flavor*”, rancidez e desempenho reduzido do óleo (YADAV, 1996; MURPHY, 1999).

Embora os óleos altamente insaturados tenham efeitos nutricionais benéficos, a sua exposição a altas temperaturas por longos períodos de tempo leva à quebra oxidativa de duplas ligações de carbono, resultando na formação de aldeídos de cadeia curta, hidroperóxidos e ceto derivados. Isso causa sabor indesejável e reduzido desempenho de fritura do óleo, por aumento da quantidade de compostos polares (WARNER *et al.*, 2001). Além disso, pode-se reduzir o teor de ácidos graxos altamente insaturados a valores muito menores que os encontrados naturalmente, sem que haja prejuízo com relação aos requerimentos nutricionais (ABBADI *et al.*, 2004).

Uma alternativa para diminuir o teor de ácidos graxos polinsaturados é a hidrogenação seletiva do óleo de soja, processo no qual as duplas-ligações de carbono são reduzidas a ligações simples, por ação do hidrogênio na presença de um catalisador (RAY & CARR, 1985). Tal processo reduz o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, principalmente linoléico e linolênico e aumenta a abundância relativa do ácido graxo monoinsaturado oléico.

No entanto, a hidrogenação parcial de óleos leva à produção de ácidos graxos *trans* (YADAV, 1996). Esses isômeros *trans* podem constituir mais de 40% do total de ácidos graxos do óleo de soja tratado quimicamente e têm sido relacionados,

juntamente com o ácido palmítico, com a elevação dos níveis de LDL-colesterol sanguíneo e com a diminuição dos níveis de HLD-colesterol no plasma, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (MENSINK & KATAN, 1990).

Dessa forma, uma estratégia seria substituir os óleos hidrogenados na indústria de alimentos por gorduras e óleos que sejam funcionais e nutricionalmente benéficos (LIU *et al.*; 2002a; LIU *et al.*; 2002b). A modificação da composição dos óleos vegetais pode ser realizada por meio de técnicas de melhoramento tradicional ou com o auxílio de ferramentas da biotecnologia (KINNEY, 1996, WU *et al.*, 2005). A Engenharia Genética, associada às técnicas de melhoramento tradicional, possibilita que genes de qualquer organismo sejam isolados em laboratório e transferidos a outro organismo, quebrando a barreira intra-específica e levando ao desenvolvimento de novas variedades (NODARI & GUERRA, 2001).

A possibilidade de produzir vegetais transgênicos favoreceu o progresso de várias áreas da biologia celular vegetal, abrindo muitas possibilidades na agricultura. Com essa tecnologia, é possível não só modificar a qualidade de lipídios, mas também de amido e proteínas armazenadas em sementes, além de conferir a determinados vegetais, resistência a fungos, vírus, insetos ou tolerância a herbicidas (DUNWELL, 2000).

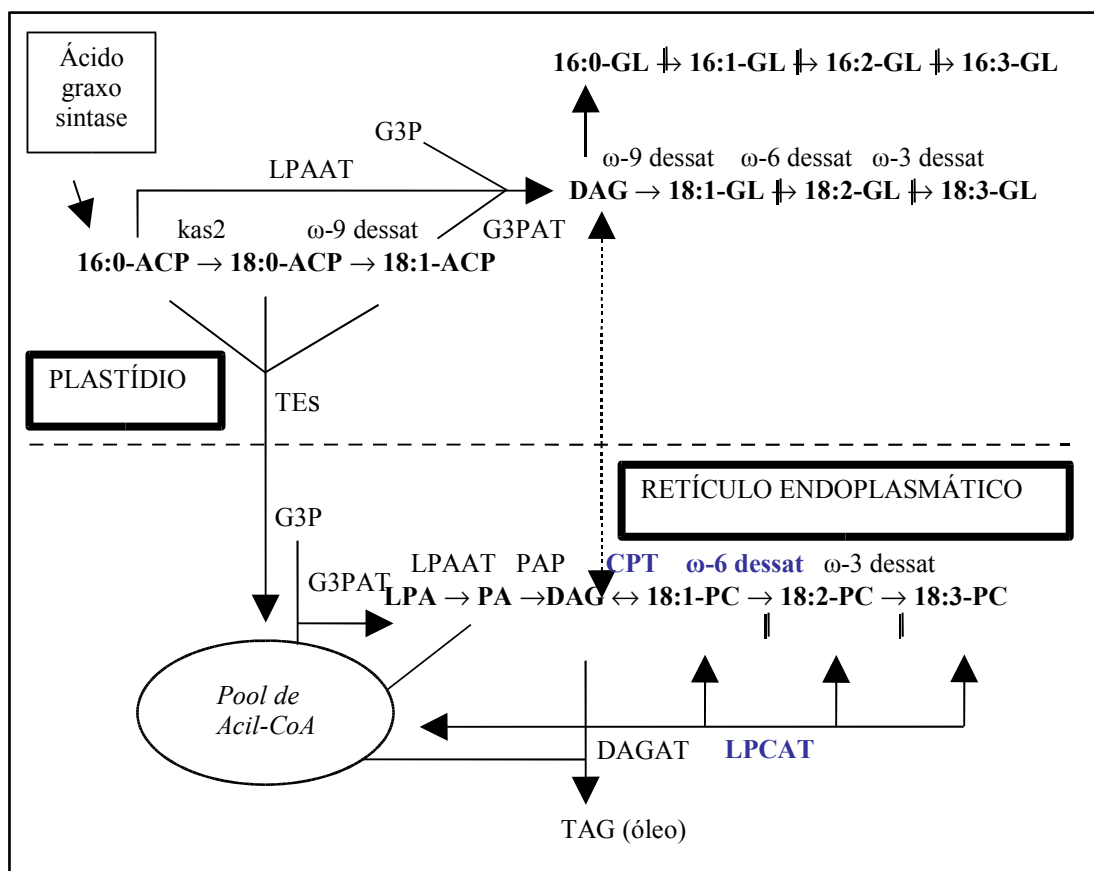
Um mecanismo que vem sendo empregado para a obtenção de soja com características de interesse é a modificação genética de enzimas da biossíntese de ácidos graxos por meio de transformação genética de plantas (TANG & GALILI, 2004).

A transformação genética de plantas via silenciamento gênico representa uma ferramenta poderosa, permitindo que os melhoristas manipulem a composição de produtos de plantas. Em sementes oleaginosas, isso estendeu significativamente a capacidade para alcançar alterações principais nas proporções relativas dos ácidos graxos presentes no óleo, com a finalidade de melhorar o seu valor nutricional sem comprometer sua funcionalidade (PASSOS-LIMA, 2005).

2.1. Ácido-graxo dessaturases

Em soja, a biossíntese de ácidos graxos inicia-se com a formação dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oléico (C18:1) em uma seqüência de reações catalisada pela ácido graxo sintase. Este complexo multienzimático tem como

função adicionar unidades de dois carbonos a cada ciclo até formar o palmitoil-ACP (YADAV, 1996). Para a elongação do palmitoil-ACP a estearoil-ACP a enzima requerida é a β -cetoacil sintase II e a para a conversão do estearoil-ACP em oleoil-ACP a enzima necessária é a estearoil-ACP dessaturase ou ω -9 dessaturase (SOMERVILLE & BROWSE, 1991). Uma vez sintetizados nos plastídios, eles podem ser exportados para o citosol associados à proteína carreadora de grupos acil (ACP) e serem utilizados na produção do óleo de reserva e lipídios estruturais de membranas extracloroplastídicas (YADAV, 1996).



A biossíntese de ácidos graxos insaturados é catalisada por enzimas denominadas ácido-graxo dessaturases. O principal substrato dessas dessaturases microsossomais é a fosfatidilcolina, sendo a via do retículo endoplasmático predominante durante a biossíntese do óleo em sementes em desenvolvimento e em outros tecidos não-fotossintetizantes (HEPPARD *et al.*, 1996; YADAV, 1996).

Ácido-graxo dessaturases são enzimas que catalisam a introdução de duplas ligações na porção hidrocarbônica dos ácidos graxos (KINNEY *et al.*, 2002). As ácido-graxo dessaturases estão diretamente relacionadas com a habilidade das células

em modular as características físicas das membranas celulares, pois a introdução de um número apropriado de insaturações em ácidos graxos de glicerolipídios de membrana diminui a temperatura de fusão e provê membranas com a fluidez necessária (HAZEL, 1995; MURATA *et al.*, 1995).

Em plantas, a reação catalisada pela oleoil dessaturase (ω -6 dessaturase) é a rota primária para a produção de lipídios polinsaturados (HEPPARD *et al.*, 1996). O gene *Fad2-2* que codifica a oleoil dessaturase é responsável pela produção de ácidos graxos polinsaturados, incluindo os lipídios de membrana tanto em tecidos vegetais quanto em sementes em desenvolvimento. O gene *Fad2-1* semente-específico parece ter um papel mais importante na conversão do ácido oléico em linolênico, incluindo os lipídios de armazenamento, durante o desenvolvimento da semente (HEPPARD *et al.*, 1996).

Heppard *et al.* (1996) mostraram uma relação inversa entre o aumento no teor de ácidos graxos polinsaturados de sementes de soja e a diminuição da temperatura, embora a expressão dos genes *Fad2-1* e *Fad2-2* não tenha sido influenciada por alteração da temperatura, demonstrando que as dessaturases são reguladas pós-traducionalmente.

Cada ácido-graxo dessaturase introduz uma ligação insaturada numa posição específica da cadeia carbônica do ácido graxo depois de sua incorporação à molécula de lipídio. A primeira reação de dessaturação é catalisada pela estearoil-CoA dessaturase plastidial para produzir o ácido oléico (18:1 Δ^9). A partir deste, são produzidos os ácidos graxos polinsaturados por meio de sucessivas dessaturações. A primeira delas é catalisada pela oleoil-CoA dessaturase (ω -6 dessaturase) plastidial e microsomal, que introduz uma insaturação no ácido oléico para produção do ácido linoléico (18:1 $\Delta^{9,12}$). Um nova insaturação é introduzida pela linoleil-CoA dessaturase (ω -3 dessaturase) plastidial e microsomal ao ácido linoléico para a produção do ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (HEPPARD *et al.*, 1996).

Através da redução da expressão do gene *Fad2-1* por co-supressão, RNA *antisense* ou RNA *interference* foram obtidos óleos com elevados níveis de ácido oléico (18:1), dentre eles, óleo de soja (KINNEY, 1996; BUHR *et al.*, 2002; KINNEY *et al.*, 2002), canola (KINNEY *et al.*, 2002; STOUTJESDIJK *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2005), algodão (LIU *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002a) e milho (KINNEY *et al.*, 2002).

2.2. 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase

As enzimas 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) também atuam na biossíntese de lipídios no retículo endoplasmático. A CPT tem a função de converter reversivelmente diacilglicerol (DAG) em fosfatidilcolina para a formação de lipídios de membrana e a LPCAT tem a função de repor o estoque de ácidos graxos polinsaturados do *pool* de acil-CoA no citoplasma (YADAV, 1996).

Em relação aos ácidos graxos polinsaturados, os níveis de C18:2 e de C18:3 no óleo dependem das taxas de biossíntese e de suas disponibilidades para a biossíntese do óleo. Essa disponibilidade de ácidos graxos polinsaturados para a incorporação em triacilgliceróis de reserva pode se dar por meio de dois mecanismos: (1) reação reversível da CPT, a qual converte fosfatidilcolina contendo ácidos graxos em DAG, que por sua vez, pode ser utilizado para a biossíntese de óleo via diacilglicerol aciltransferase e (2) reação reversível da LPCAT levando ao enriquecimento do *pool* de acil-CoA com ácidos graxos polinsaturados para uso na biossíntese do óleo (YADAV, 1996).

A permuta de grupamentos acil entre grupamentos acil-CoA e fosfatidilcolina representa o mecanismo predominante na regulação da qualidade de ácidos graxos polinsaturados no *pool* de acil-CoA para a síntese do óleo, em sementes em desenvolvimento (LANNA, 2002).

No caso do metabolismo de lipídios, o isolamento de um gene chave que dirige a síntese de um ácido graxo particular, pode fornecer o meio para se alterar, geneticamente, espécies oleaginosas de interesse econômico (PASSOS-LIMA, 2005).

2.3. Silenciamento gênico

O silenciamento gênico consiste na repressão da expressão de um gene alvo (VAUCHERET *et al.*, 2001), pela inibição da transcrição ou pela destruição do transcrito (TANG & GALILI, 2004).

O silenciamento gênico é um mecanismo automático, ou seja, pode ser induzido localmente e pode se espalhar para distantes locais no organismo (HAMILTON *et al.*, 2002). Esse transporte sistêmico do sinal do silenciamento está relacionado com um sinal móvel, não metabólico, não completamente identificado.

Esse sinal parece interagir com proteínas de membranas e vai movendo-se célula a célula através do floema, semelhante ao padrão de infecção de vírus na planta (MLOTSHWA *et al.*, 2002).

O silenciamento gênico tem como função principal regular a expressão gênica, controlando o número de cópias de determinado gene ou, ainda, ser um mecanismo de defesa contra a superexpressão de transgenes (WASSENEDGER, 2000). O silenciamento parece estar envolvido com a defesa a ácidos nucléicos estranhos, com a proteção do genoma contra a inserção de elementos transponíveis, contra vírus e com a regulação da expressão gênica de famílias multigênicas ou de genes duplicados em plantas (VENDRUSCOLO, 2003; GROENENBOOM *et al.*, 2005).

O silenciamento gênico corresponde a uma interação entre seqüências homólogas de DNA ou RNA. O RNA está envolvido nos seguintes tipos de silenciamento gênico dependente de homologia (SGDH): (1) PTGS (silenciamento gênico pós-transcricional), onde a degradação de RNAs homólogos no citoplasma leva a não tradução do gene alvo e (2) TGS (silenciamento gênico transcricional), que está relacionado com o bloqueio na transcrição do gene alvo promovido por metilação na região promotora, a nível nuclear (FAGARD & VAUCHERET, 2000; WASSENEDGER, 2000).

Uma grande vantagem do PTGS é a possibilidade de se evitar efeitos indesejáveis do silenciamento total do gene-alvo, restringindo o silenciamento gênico a um tecido ou a um órgão específico na planta, pela utilização de um promotor tecido-específico para dirigir a construção gênica (KINNEY, 1996; BUHR *et al.*, 2002; TANG & GALILI, 2004).

Segundo Singh (2000), o PTGS tem sido utilizado na modificação da composição lipídica das sementes oleaginosas de soja, canola e girassol. Ele pode ser induzido pela utilização de RNA *antisense*, por co-supressão (*sense*) ou através de construções que expressam um RNA *hairpin* autocomplementar (SINGH, 2000; LIU, 2002b).

Das metodologias de silenciamento gênico induzido por RNA dupla fita (dsRNA), a técnica de RNA *interference* é a mais eficiente (SMITH, 2000).

2.4. Silenciamento gênico por RNA de interferência

A primeira evidência do silenciamento gênico por RNA *interference* remete a estudos com o nematóide *Caenorhabditis elegans* e a utilização de RNA *antisense* para diminuir a expressão do gene *par-1*, que é responsável por estabelecer a polaridade e a divisão assimétrica de embriões de *C. elegans*, garantindo a diversidade das células durante o desenvolvimento (GUO & KEMPHUES, 1995).

Em um estudo semelhante, Fire *et al.* (1998), utilizaram um dsRNA (fita *sense* e *antisense*) também em *C. elegans* e verificaram que o silenciamento demonstrou-se muito mais eficiente do que quando se utilizou cada fita isoladamente e que poucas moléculas eram eficientes para silenciar completamente a expressão do gene homólogo.

A técnica de RNA *interference* (RNAi) é um mecanismo de silenciamento de genes ao nível pós-transcricional, capaz de diminuir a expressão de genes de interesse em uma variedade de organismos (HAMMOND *et al.*, 2001). Ela se caracteriza pela clonagem do gene alvo como repetições invertidas, espaçadas por uma seqüência não relacionada (intron ou região UTR do próprio gene) e dirigida por um promotor forte (SINGH, 2000, LIU *et al.*, 2002b). Segundo Tang & Galili (2004), essa técnica tem demonstrado bons resultados, além de apresentar vantagens em termos de eficiência e estabilidade com relação às técnicas de silenciamento por co-supressão ou RNA *antisense*.

O mecanismo de RNAi é ativado por uma molécula de dsRNA que leva à degradação de genes homólogos, podendo ocorrer tanto em plantas quanto animais (KUSABA, 2004; TANG & GALILI, 2004). Nas plantas, o silenciamento gênico por RNAi funciona como um mecanismo de defesa, além de participar na regulação da expressão de genes durante os processos de desenvolvimento (YU & KUMAR, 2003).

Em plantas, quando um dsRNA transgênico, contendo seqüências invertidas, é gerado e assume a estrutura de grampo, ele é reconhecido por uma enzima denominada DCL 2 (*Dicer-like 2*) (JONES-RHOADES *et al.*, 2006) e clivado em pequenos (21-22 nucleotídeos) e longos (24-26 nucleotídeos) siRNAs, que são os pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNAs*) (ZAMORE, 2004). *Dicer* são enzimas altamente conservadas, compostas de dois domínios modulares de RNase III, um domínio de helicase, um domínio PAZ de provável transferência de

substrato, um domínio de função desconhecida (DUF283) e um motivo de ligação a RNA fita-dupla (BERNSTEIN *et al.*, 2001). A *Dicer* atua de forma dimérica (HANNON, 2002), e processa dsRNAs em pequenos siRNAs de 21-23 nucleotídeos de tamanho, dependendo da espécie. Após serem originados, os siRNAs são metilados e transportados para o citosol, por meio de uma proteína transportadora HASTY de maneira Ran-dependente (JONES-RHOADES *et al.*, 2006). Esses siRNAs são correspondentes às fitas *sense* e *antisense* do RNA alvo, se associam a proteínas celulares formando o complexo de indução de silenciamento (RISC – *RNA Interference Specificity Complex*) e induzem a clivagem e posterior degradação do mRNA alvo (WATERHOUSE & HELLIWELL, 2002; YU & KUMAR, 2003; TANG & GALILI, 2004; MEINS *et al.*, 2005). RISCs são complexos ribonucleoprotéicos que contêm membros da família das proteínas Argonautas (com domínios PAZ-PIWI), siRNAs e mRNAs complementares; além de muitos outros fatores importantes para a sua funcionalidade (HANNON, 2002). As proteínas da família das Argonautas parecem garantir a especificidade do RISC e, juntamente com outras proteínas e enzimas existentes no complexo, determinam a especificidade da resposta a um siRNA particular.

É provável que o domínio PAZ das Argonautas esteja relacionado à ligação aos miRNAs (*microRNAs*) ou siRNAs gerados ou liberados pela *Dicer* (SONG *et al.*, 2003). Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não codificados, derivados de longos transcritos precursores (MALLORY & VAUCHERET, 2004). Eles adotam uma estrutura de *loop*, apresentam característica de dupla fita e funcionam como siRNAs marcando mRNAs específicos para a clivagem (TANG & GALILI, 2004). O domínio PIWI das Argonautas parece interagir com e inibir os domínios de RNase III e de ligação a dsRNA da *Dicer*. Isto foi interpretado como uma interação de transferência de substrato e, ainda é especulado, que as interações do domínio PIWI com a *Dicer* estimularia a liberação dos siRNAs (TAHBAZ *et al.*, 2004). Após sua incorporação ao complexo RISC, o mRNA alvo é clivado em um único ponto e liberado, ficando exposto ao ataque de endonucleases endógenas.

Um siRNA incorporado ao complexo RISC pode ser utilizado em novos ciclos de reconhecimento e clivagem, o que protege esta molécula de uma rápida degradação (HUTVAGNER *et al.*, 2001); mas é improvável que os siRNAs sejam reciclados após serem liberados do complexo RISC (NELSON *et al.*, 2004).

Em plantas e *C. elegans*, uma amplificação do sinal de silenciamento e a sua transferência célula-a-célula têm sido observadas e RNA polimerases dependentes de RNA (RdRp) foram encontradas (BUSHMAN, 2003). Essa enzima é responsável pela geração e amplificação de siRNAs em dsRNAs. Estes siRNAs são usados como *primers* pela RdRp para a geração de novos dsRNAs que servem como novos alvos para a *Dicer* para a produção de mais siRNAs. Graças a este sistema, nesses organismos, um número específico de moléculas de dsRNAs pode inativar várias cópias de transcritos endógenos (AHLQUIST, 2002). Além do sistema de amplificação do sinal, existe também um sistema de transmissão de sinal célula-a-célula conhecido como supressão sistêmica. Em plantas, o movimento do sinal móvel, ainda desconhecido, pode ser realizado por meio dos plasmodesmos e/ou via floema (HANNON, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral isolar fragmentos de cDNA dos genes que codificam três enzimas da biossíntese de ácidos graxos em soja, oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, para a construção de cassetes de expressão, visando o silenciamento via RNA de interferência.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

Desenhar *primers sense* e *antisense* para os genes das enzimas oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase.

Isolar os fragmentos dos genes a partir de cDNA de sementes de soja.

Clonar os fragmentos gênicos na orientação *sense* e *antisense* no vetor pKANNIBAL.

Substituir o promotor 35SCaMV do vetor pKANNIBAL pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucina.

Transformar células de *Escherichia coli* e analisar os clones transformantes.

Transferir os cassetes de expressão para o vetor binário pCAMBIA 3301.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes de soja da variedade comercial CAC-1 cultivada em casa de vegetação sob aquecimento controlado e fotoperíodo de 14 horas de luz.

As sementes utilizadas para a extração do RNA total foram relativas ao segundo estágio de desenvolvimento do grão. Os estádios foram determinados com base no peso de matéria fresca da semente: 1º– 0 a 75 mg; 2º– 76 a 150 mg; 3º– 151 a 225 mg; 4º– 226 a 300 mg; 5º– 301 a 375 mg; 6º– 376 a 450 mg; 7º– 451 a 525 mg e 8º– representado por sementes maduras (LANNA, 2002) e compreenderam quase todo período de enchimento do grão. As sementes foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

4.2. Extração de RNA total de sementes de soja

A extração do RNA total das sementes foi realizada de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989), com algumas alterações ao protocolo original. Todas as etapas foram conduzidas a 4°C e em condições livres de RNases. Foram macerados cerca de 4 g de sementes na presença de nitrogênio líquido e a cada amostra foram adicionados 18 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5; EDTA 1mM e SDS 1%), 6 mL de fenol e 6 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador vórtex por 15 min e centrifugados a 4°C por 10 min a 8.000 g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e nele foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 2M e 2 volumes de etanol 96% e, em seguida, a mistura foi incubada por 1 h a -20°C. Foi realizada uma nova centrifugação a 8.000 g por 15 min e o precipitado resultante foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 2,5 mL de água DEPC (água deionizada tratada com dietil pirocarbonato). Após uma centrifugação de 5 min a 5.000 g, o sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foram adicionados 2,5 mL de cloreto de lítio 4M. O tubo foi incubado por cerca de 12 h a 4°C para promover a precipitação do RNA. A amostra foi então centrifugada a 8.000 g por 30 min e o precipitado foi ressuspensionado em 1,8 mL de água DEPC e acrescido de 0,2 mL de acetato de sódio 2M e 3,6 mL de etanol 96%. Após precipitação por cerca de 6 h a -20°C, a solução foi centrifugada a

8.000 g por 10 min e em seguida, o precipitado foi lavado em etanol 70% e depois de seco, ressuspendido em água DEPC.

As amostras de RNA total foram quantificadas a 260 nm e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X (Tris-Borato 90mM e EDTA 1mM, pH 8,0) contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do RNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (STRATAGENE).

4.3. Síntese de cDNA por RT-PCR

Para as reações de RT-PCR, todas as amostras foram tratadas com RQ1 RNase-free DNase (PROMEGA), conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas em tampão da DNase 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM) por 45 min a 37°C e extraídas com igual volume de fenol e de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) após centrifugação a 11.000 g por 2 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e realizada uma outra extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi submetida à precipitação com acetato de sódio 3M e etanol 96% por 1 h a -20°C e depois centrifugada a 12.000 g por 15 min. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em água DEPC. As amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* (INVITROGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (5 µg) foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ a 70°C por 10 min e em seguida, incubadas no gelo. Foram adicionados tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 5 mM, os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 mM cada e DTT 5 mM, e estas foram incubadas a 42°C por 5 min. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 min. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi degradado pela adição de 2 U de RNase H sob incubação a 37°C por 20 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes exceto a transcriptase reversa.

Inicialmente, as reações de síntese da segunda fita e amplificação por PCR foram realizadas com um par de *primers* de actina de soja (F 5' – CCC CTC AAC CCA AAG GTC AAC AG – 3' e R 5' – GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG – 3') com a finalidade de verificar possíveis contaminações com DNA genômico e normalizar a quantidade de cDNA molde.

4.4. Análise das seqüências gênicas para escolha dos sítios de restrição e desenho dos *primers*

A seqüência de nucleotídeos do cDNA total correspondente aos genes que codificam as enzimas microsossomais oleoil dessaturase e 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase de *Glycine max* (números de acesso L43920 e U12735, respectivamente), foram obtidas em um banco de dados público *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI). Como a seqüência de nucleotídeos do cDNA total correspondente ao gene que codifica a enzima microsossomal lisofosfatidilcolina aciltransferase de *Glycine max* não se encontra depositada em banco de dados, esta foi obtida através de um *contig* formado por ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de soja. A formação deste *contig* foi realizada pelo Dr. Eliseu Binneck, pesquisador da Embrapa Soja (CNPSO) e gentilmente cedido por ele. As seqüências foram analisadas pelo BLAST (www.worchbench.sdsc.edu).

Os *primers* específicos foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* *Input* *Program* (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>). Os sítios de restrição compatíveis para as clonagens foram adicionados a extremidade 5' de cada par antecidos por uma cauda GGC. Para os fragmentos *sense* foram utilizados os sítios de restrição das enzimas *Xho*I e *Kpn*I e para os fragmentos *antisense*, os sítio de *Bam*HI e *Cla*I. A viabilidade dos *primers* foi verificada por meio do programa *QuickPrimer* do pacote DNASTAR (DNASTAR INC.). As seqüências dos *primers* estão mostradas a seguir:

Dessaturase *sense*:

F: 5' - GGC **CTC GAG** CAC AAA GCC ACC ATT CAC TG - 3'

R: 5' - GGC **GGT ACC** AGG GAA CCT GTG TTG GAG TG - 3'

Dessaturase *antisense*:

F: 5' - GGC **GGA TCC** CAC AAA GCC ACC ATT CAC TG - 3'

R: 5' - GGC **ATC GAT** AGG GAA CCT GTG TTG GAG TG - 3'

LPCAT *sense*:

F: 5' - GGC **CTC GAG** TTG AAA ATT GAA GCG GGT TG - 3'

R: 5' - GGC **GGT ACC** TTT TGG TGT TGA CCC TCC AG - 3'

LPCAT *antisense*:

F: 5' - GGC **GGA TCC** TTG AAA ATT GAA GCG GGT TG - 3'

R: 5' - GGC **ATC GAT** TTT TGG TGT TGA CCC TCC AG - 3'

CPT *sense*:

F: 5' - GGC **CTC GAG** GTG CAA CCT GGG AGC ATT AT - 3'

R: 5' - GGC **GGT ACC** GTG GCA TGC TTC CAT TCT TT - 3'

CPT *antisense*:

F: 5' - GGC **GGA TCC** GTG CAA CCT GGG AGC ATT AT - 3'

R: 5' - GGC **ATC GAT** GTG GCA TGC TTC CAT TCT TT - 3'

As letras destacas em negrito e sublinhadas nos *primers forward* e *reverse* para a orientação *sense* indicam os sítios de restrição das enzimas *XhoI*, *KpnI*, respectivamente, e as letras destacas em negrito e sublinhadas nos *primers forward* e *reverse* para a orientação *antisense* indicam os sítios de restrição das enzimas *BamHI* e *ClaI*, respectivamente. Os nomes dos genes foram abreviados para simplificar a denominação dos *primers*.

4.5. Teste dos *primers* para estabelecimento das condições de amplificação

Os fragmentos dos três genes foram amplificados por meio de reações de síntese da segunda fita de cDNA sintetizado a partir do RNA total. Cada reação de

amplificação continha 2µL da reação de síntese da primeira fita, Tris-HCl 10 mM pH8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,0 mM, os quatro dNTPs, 0,2 mM cada, 5,0 µM de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA), apresentando um volume total de 25 µL de reação.

As reações de amplificação foram realizadas em um gradiente de temperatura, com as temperaturas de anelamento variando de 55 a 66°C, em um aparelho termociclador do tipo *Robocycler Gradient 96* (STRATAGENE). Os ciclos de amplificação foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos constituídos por: uma etapa de desnaturação a 94°C por 30 s, uma etapa de anelamento dos *primers* ao cDNA molde que variou de 55 a 66°C por 30 s e uma etapa de extensão a 72°C por 45 s. Posteriormente, foi realizada uma última etapa de extensão a 72°C por 4 min.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, por meio do sistema *Eagle Eye II* (STRATAGENE) e fotodocumentado.

4.6. Isolamento dos fragmentos gênicos e clonagem em vetor pGEM T-Easy

Os fragmentos *sense* e *antisense* dos três genes específicos foram isolados através de reações de síntese da segunda fita da cDNA sintetizado a partir do RNA total, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente.

Para as reações de amplificação foi utilizado aparelho termociclador Perkin-Elmer, modelo 9600 (APPLIED BIOSYSTEMS). Os ciclos de amplificação foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos constituídos por: uma etapa de desnaturação a 94°C por 30 s, uma etapa de anelamento dos primers a 64°C por 30 s e uma etapa de extensão a 72°C por 45 s. Posteriormente, foi realizada uma última etapa de extensão a 72°C por 4 min.

Após a amplificação, os seis produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, por meio do sistema *Eagle Eye II* (STRATAGENE) e fotodocumentado.

Os produtos de PCR, após a confirmação da amplificação, foram purificados por meio do kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN), para posterior clonagem em vetor pGEM T-Easy (PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7. Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico e diagnóstico de colônias

As células de *E. coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Foram adicionados 5 μ L da reação de ligação a 200 μ L de células ultracompetentes em um microtubo e este foi incubado por 30 min no gelo. Após o choque térmico a 42°C por 45 s, as células foram mantidas no gelo por 2 min e, em seguida, foram adicionados 800 μ L de meio SOC (extrato de levedura 0,5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicerol 10%). Após a incubação a 37°C por 1 h a 150 rpm, as células foram concentradas por centrifugação a 1500 g por 10 min em centrífuga 5415D (EPPENDORF), ressuspensas em 200 μ L de meio SOC, dos quais 100 μ L foram plaqueados em meio LB (10% de Bactotriptona, 5% de extrato de levedura, 10% de NaCl) contendo ampicilina 50 μ g/ μ L, 1 mg de X-Gal e 10 mM de IPTG. As placas foram incubadas por cerca de 14 h a 37°C.

Para cada uma das seis transformações foi feita a seleção de 10 colônias aleatoriamente e o diagnóstico para a confirmação da transformação foi feito por meio de PCR seguindo as mesmas condições descritas anteriormente.

Em seguida, foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%, em TBE 1X, com brometo de etídio 0,2 μ g/mL. Após a eletroforese, foi utilizado o sistema *Eagle Eye II* (STRATAGENE) para a visualização e fotodocumentação do gel.

Os clones positivos foram selecionados e transferidos para tubos contendo meio LB e ampicilina 50 μ g/ μ L e incubados a 37°C e 180 rpm por cerca de 14 h.

Decorrido este intervalo, foi retirada uma alíquota das culturas bacterianas e armazenadas a -80°C, em glicerol 40%. O restante foi utilizado para a extração do DNA plasmidial, através do kit comercial (Kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* - PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante, que foi utilizado para os procedimentos subsequentes.

4.8. Seqüenciamento do DNA

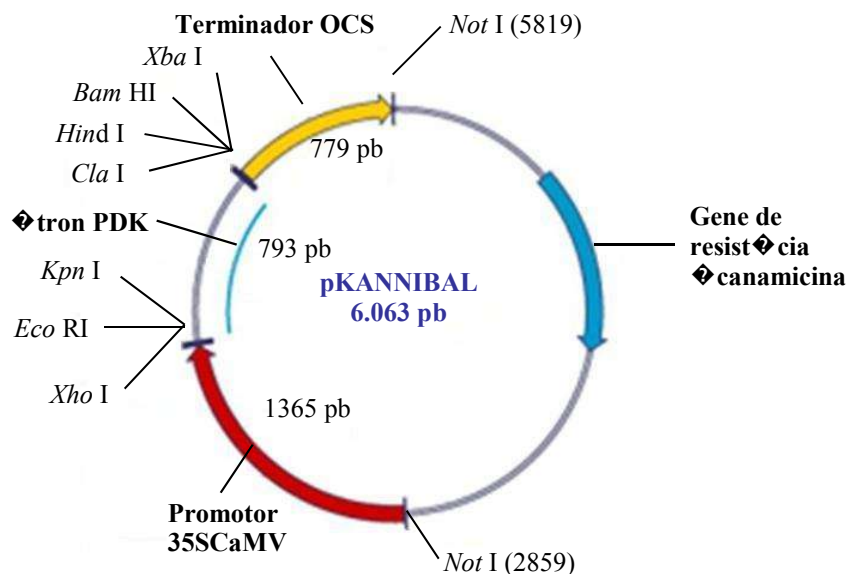
O seqüenciamento dos clones positivos foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM 377 *Genetic Analyzer* (PE APPLIED BIOSYSTEMS), utilizando o kit ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. As reações basearam-se na técnica de terminação de cadeia por dideoxinucléotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER *et al.* (1977).

As reações foram conduzidas por meio de amplificação linear por PCR, utilizando os *primers* específicos *forward* e *reverse* de cada gene.

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no *GenBank* e o alinhamento foi feito usando o BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4.9. Subclonagem dos fragmentos específicos em vetores pKANNIBAL

Após o seqüenciamento e a confirmação dos fragmentos clonados, estes foram excisados do vetor pGEM T-Easy para serem clonados no vetor pKANNIBAL (WESLEY *et al.*, 2001) de 6.063 pb, gentilmente cedido pelo Dr. Francisco Aragão (EMBRAPA/CENARGEN). Este vetor contém, além do promotor 35SCaMV, a região de clonagem para a seqüência *sense*, o íntron do gene que codifica a piruvato desidrogenase quinase (PDK), a região de clonagem da seqüência *antisense* e o terminador do gene que codifica a octopina sintase (OCS). A marca de seleção deste plasmídeo é o gene *npt*, cujo produto confere resistência à canamicina.



Para as reações de restrição enzimática foram utilizadas as enzimas *XhoI* e *KpnI* para a clivagem dos fragmentos *sense* e *BamHI* e *ClaI* para a clivagem dos fragmentos *antisense*.

Os vetores pKANNIBAL foram clivados com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para clivar os fragmentos, para que ficassem com os mesmos sítios de clonagem e fosse possível realizar as reações de ligação.

A subclonagem dos fragmentos ocorreu em duas etapas. Primeiro foram subclonados os fragmentos *antisense* e, após a confirmação destes por PCR e restrição enzimática, foram subclonados os fragmentos *sense*.

A clivagem dos vetores pGEM T-Easy que continham os fragmentos *antisense* e do vetor pKANNIBAL fechado foi realizada com 5 U da enzima *ClaI*, aproximadamente 500 ng de DNA e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 10 mM) a 37°C por 1 h. Para a realização da segunda reação de clivagem, foi adicionado um volume de NaCl 0,5 M para que a concentração desse sal no tampão fosse de 100 mM e em seguida, 5 U da enzima *BamHI*. A reação foi mantida a 37°C por 1 h.

As reações de clivagem foram analisadas em gel de agarose 0,8%, em TBE 1X, com brometo de etídio 0,2 µg/mL, os fragmentos clivados foram purificados do gel com o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) e utilizados para a subclonagem nos vetores pKANNIBAL aberto para construção dos cassetes.

As reações de ligação foram feitas para um volume final de 10 µL, utilizando a relação de 5:1 de DNA (50 ng) e vetor (10 ng), tampão de reação (Tris-HCl pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM e 25% de polietileno glicol-8000) e 1 U de T4 DNA ligase (INVITROGEN). As reações foram mantidas a 4°C por 14 h.

Em seguida, foi realizada transformação de *E. coli* por choque térmico, diagnóstico das colônias e extração do DNA plasmidial, conforme descrito no item 3.7, com exceção da etapa final da transformação, na qual as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina 50 µg/µL.

Para a subclonagem dos fragmentos *sense*, foi feita a clivagem dos vetores pGEM T-Easy que continham os fragmentos *antisense* e dos vetores pKANNIBAL com os braços *sense* fechado. Essa etapa foi realizada com 5 U da enzima *XhoI*, aproximadamente 500 ng de PCR e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 10 mM e NaCl 50 mM) a 37°C por 1 h. Em seguida, foi feita a

precipitação por cerca de 1 h a -80°C com 10% de acetato de sódio 3M e 1 volume de etanol 96% gelado. Seguiu-se com centrifugação a 13.000g por 15 min e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por mais 5 min, sob mesma rotação. O DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuscitado em água. Em seguida, foi realizada a segunda reação de restrição, com 5 U da enzima *KpnI* e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5,0 mM) a 37°C por 1 h.

As reações de clivagem, purificação, ligação, transformação de *E. coli* e diagnóstico das colônias foram realizadas seguindo as mesmas condições descritas para a subclonagem dos fragmentos *antisense*. A confirmação da clonagem foi realizada por meio de reações de restrição enzimática e por PCR.

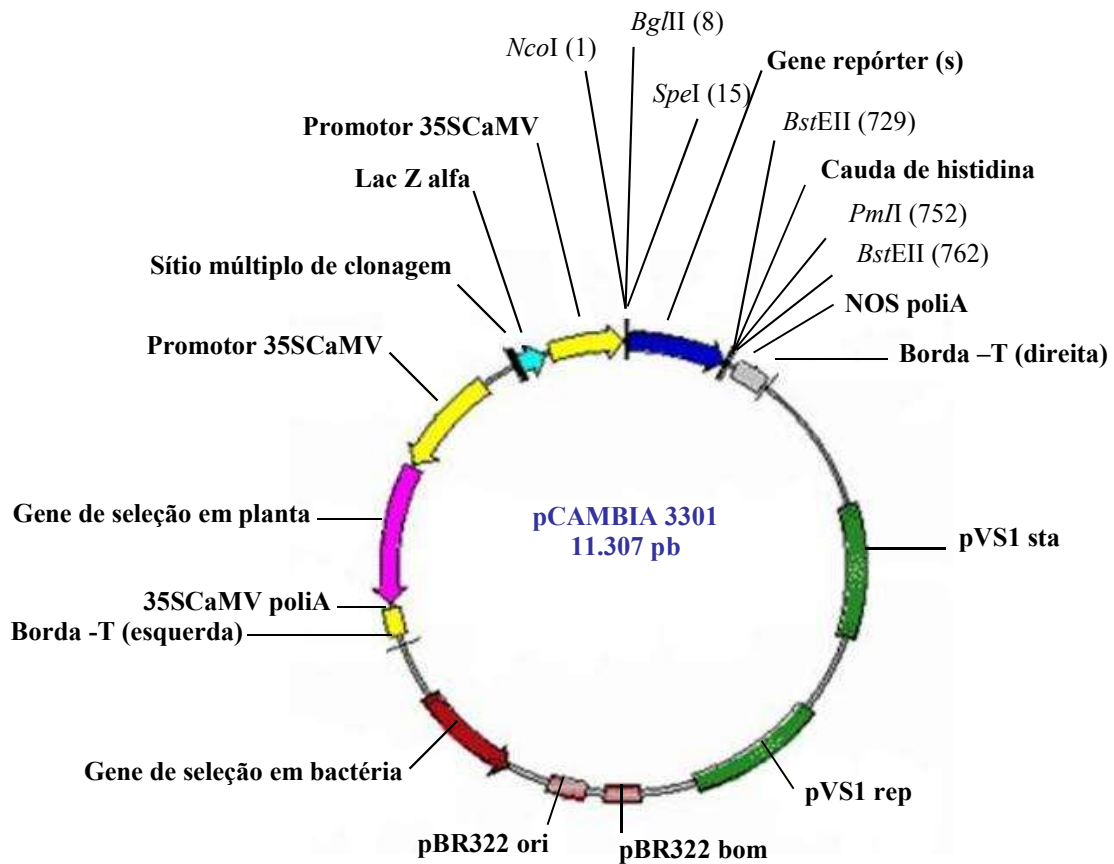
4.10. Nomenclatura dos clones com os fragmentos *sense* e *antisense* em vetores pKANNIBAL

Os clones que continham os fragmentos *sense* e *antisense* foram denominados de acordo com o promotor utilizado (35SCaMV) e o gene de interesse para o silenciamento. Dessa forma, a nomenclatura utilizada foi a seguinte: p35S Dessaturase RNAi, p35S CPT RNAi e p35S LPCAT RNAi, para os genes referentes à oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase.

4.11. Transferência das construções dos vetores pKANNIBAL para os vetores pCAMBIA 3301

Após a confirmação da clonagem dos fragmentos *sense* e *antisense*, as construções (promotor 35SCaMV+ fragmento *sense* + íntron PDK+ fragmento *antisense* + terminador OCS) foram excisadas do vetor pKANNIBAL e, posteriormente, clonadas no vetor binário pCAMBIA 3301. Esse vetor possui 11.307pb, contém uma região de T-DNA (5.077 pb) e apresenta o promotor 35SCaMV dirigindo a expressão do gene *gus* (que codifica a β-glucuronidase), o terminador do gene que codifica a nopalina sintase (NOS), além do gene *bar* para a seleção em plantas. Esse gene codifica a enzima fosfonitricina acetiltransferase, que

confere resistência a herbicidas que contenham glufosinato de amônio como composto ativo.



A clivagem para a liberação das construções e abertura do vetor pCAMBIA 3301 foi realizada com 5 U da enzima *PstI*, aproximadamente 500 ng de DNA e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 10 mM e NaCl 50 mM) a 37°C por 1 h. Em seguida, foi feita a precipitação por cerca de 1 h a -80°C com 10% de acetato de sódio 3 M e 1 volume de etanol 96% gelado. Seguiu-se com centrifugação a 13.000g por 15 min e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por mais 5 min, sob mesma rotação. O DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em água. Em seguida, foi realizada a segunda reação de restrição, com 5 U da enzima *SacI* e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5,0 Mm) a 37°C por 1 h.

As reações de clivagem das construções foram analisadas em gel de agarose 0,8%, em TBE 1X, com brometo de etídio 0,2 µg/mL e os fragmentos correspondentes às construções foram excisados do gel, purificados com o kit

QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) e utilizados para as reações de ligação com o vetor pCAMBIA 3301 aberto.

As reações de ligação foram feitas para um volume final de 10 μ L, utilizando a relação de 5:1 de DNA (50 ng) e vetor (10 ng), tampão de reação (Tris-HCl pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM e 25% de polietileno glicol-8000) e 1 U de T4 DNA ligase (INVITROGEN). As reações foram mantidas a 4°C por 14 h.

Em seguida, foi realizada transformação de *E. coli* por choque térmico, diagnóstico das colônias e extração do DNA plasmidial, conforme descrito no item 3.7, com exceção da etapa final da transformação, na qual as células foram plaqueadas em meio sólido contendo canamicina 50 μ g/ μ L. A confirmação da clonagem foi realizada por meio de reações de restrição enzimática e por PCR.

4.12. Nomenclatura dos clones com as construções em vetores pCAMBIA 3301

Os clones que continham as construções foram denominados de acordo com o promotor utilizado (35SCaMV), o nome do vetor de forma abreviada (CB) e o gene de interesse para o silenciamento. Dessa forma, a nomenclatura utilizada foi a seguinte: p35SCB Dessaturase RNAi, p35SCB CPT RNAi e p35SCB LPCAT RNAi, para os genes referentes à oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente.

4.13. Substituição do promotor 35SCaMV pelo promotor semente-específico do gene da subunidade α da β -conglucina em vetores pKANNIBAL

Os clones p35S Dessaturase RNAi, p35S CPT RNAi e p35S LPCAT RNAi tiveram o promotor 35SCaMV substituído pelo promotor semente-específico do gene da subunidade α da β -conglucina. Tal procedimento foi realizado por meio de clivagem enzimática com as enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*. O promotor, previamente isolado em nosso laboratório (BARROS, 2006), também foi clivado com as mesmas enzimas de restrição.

A clivagem para a liberação do promotor 35SCaMV foi realizada com 5 U da enzima *SacI*, aproximadamente 500 ng de DNA e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e MgCl₂ 50 mM) a 37°C por 1 h. Em seguida, foi feita a precipitação por cerca de 1 h a -80°C com 10% de acetato de sódio 3 M e 1 volume de etanol 96%

gelado. Seguiu-se com centrifugação a 13.000g por 15 min e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por mais 5 min, sob mesma rotação. O DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água. Em seguida, foi realizada a segunda reação de restrição, com 5 U da enzima *Xho*I e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 10 mM e NaCl 50 mM) a 37°C por 1 h.

As reações de clivagem dos cassetes foram analisadas em gel de agarose 0,8%, em TBE 1X, com brometo de etídio 0,2 µg/mL e os fragmentos correspondentes aos clones sem o promotor 35SCaMV foram excisados do gel, purificados deste com o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) e utilizados para as reações de ligação com o promotor do gene da subunidade α da β -conglucina, previamente clivado.

As reações de ligação, transformação de *E. coli*, diagnóstico das colônias e extração do DNA plasmidial foram realizadas seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. A confirmação da clonagem foi realizada por meio de reações de restrição enzimática e por PCR.

4.14. Nomenclatura dos clones contendo as construções dirigidas pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucina em vetores pKANNIBAL

Os clones que continham as construções dirigidas pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucina em vetores pKANNIBAL também foram denominados de acordo com o nome do promotor de forma abreviada (β) e o gene de interesse para o silenciamento. Dessa forma, a nomenclatura utilizada foi a seguinte: p β Dessaturase RNAi, p β CPT RNAi e p β LPCAT RNAi, para os genes referentes à oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente.

4.15. Transferência dos cassetes com o promotor do gene da subunidade α da β -conglucina dos vetores pKANNIBAL para os vetores pCAMBIA 3301

Após a confirmação da clonagem do promotor semente-específico, os cassetes (promotor do gene da subunidade α da β -conglucina + fragmento *sense* +

íntron PDK+ fragmento *antisense* + terminador OCS) foram excisados do vetor pKANNIBAL e, posteriormente, clonados no vetor binário pCAMBIA 3301.

Os procedimentos de clivagem, purificação, reação de ligação, transformação e confirmação da clonagem foram realizados conforme descrito para a transferência das construções com o promotor 35SCaMV também do vetor pKANNIBAL para o vetor pCAMBIA 3301 (item 3.11).

4.16. Nomenclatura dos clones com as construções dirigidas pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina em vetores pCAMBIA 3301

Os clones que continham as construções dirigidas pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina em vetores pCAMBIA3301 também foram denominados de acordo com o nome do promotor de forma abreviada (β), o nome do vetor de forma abreviada (CB) e o gene de interesse para o silenciamento. Dessa forma, a nomenclatura utilizada foi a seguinte: p β CB Dessaturase RNAi, p β CB CPT RNAi e p β CB LPCAT RNAi, para os genes referentes à oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amplificação de cDNA e escolha da temperatura de anelamento

Para a construção dos cassetes de expressão, o cDNA foi sintetizado por RT-PCR, a partir do RNA total de sementes de soja e os fragmentos foram obtidos por PCR. Também foi realizado um gradiente para a temperatura de anelamento dos *primers* que variou de 55 a 66°C, para verificação da melhor temperatura de anelamento a ser utilizada nos ensaios de PCR subseqüentes. Conforme observado nas Figuras 1A, 1B e 1C, o tamanho dos fragmentos amplificados foi correspondente ao tamanho esperado para o produto amplificado pelos *primers* sintetizados neste trabalho. Estes foram de 372, 300 e 331 pb para os fragmentos *sense* e *antisense* referentes à oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente. O gradiente de temperatura utilizado demonstrou que, apesar de ter havido amplificação dos fragmentos em todas as temperaturas utilizadas, em temperaturas mais altas, a amplificação foi mais eficiente e sem o aparecimento de fragmentos inespecíficos. Diante deste resultado, foi escolhida a temperatura de 64°C para o anelamento dos *primers*, para todos os fragmentos, nas amplificações subseqüentes.

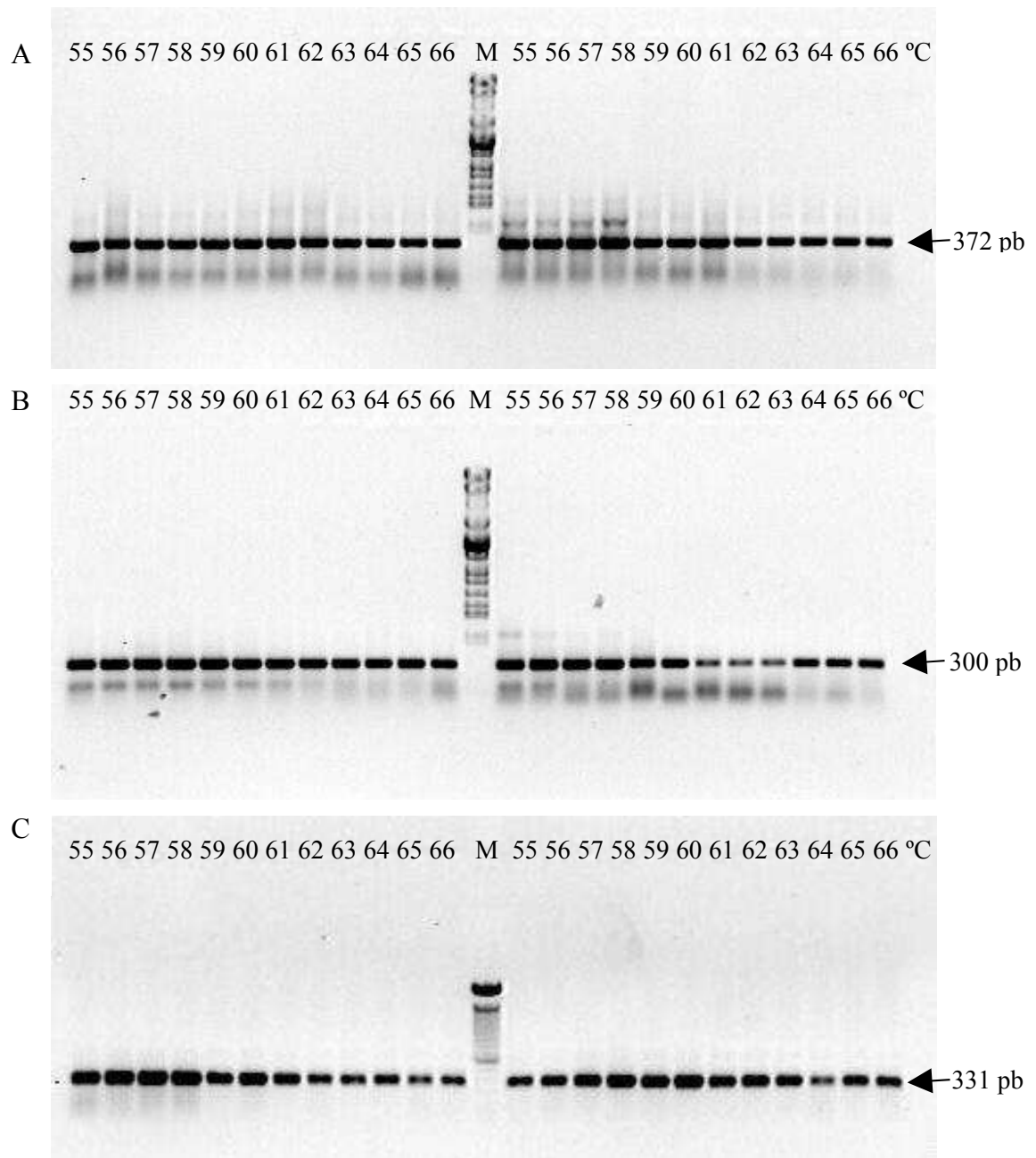


Figura 1 - Teste de gradiente de temperatura de anelamento para amplificação do cDNA obtido por RT-PCR do RNA total de sementes de soja. O gradiente variou de 55 a 66°C. A letra M corresponde ao DNA de fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*, utilizado como marcador de tamanho. As letras A, B e C, correspondem aos ensaios de PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes à oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente. Os fragmentos *sense* estão à esquerda do marcador e os *antisense* estão à direita.

5.2. PCR para diagnóstico das colônias transformadas com o vetor pGEM T-Easy

Após a amplificação dos fragmentos *sense* e *antisense* dos genes de interesse, estes foram clonados no vetor pGEM T-Easy e, posteriormente, células de *E. coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico. Após a transformação, foram selecionadas 10 colônias de cada transformação para a realização do PCR. Foram utilizados os *primers sense* e *antisense* específicos para cada um dos fragmentos de interesse. Foi selecionada uma colônia positiva de cada transformação para a extração do DNA plasmidial, ensaios de restrição enzimática para confirmação da presença dos fragmentos, sequenciamento e posteriores subclonagens.

5.3. Confirmação das clonagens em vetores pGEM T-Easy

Os fragmentos *sense* e *antisense* foram liberados do vetor pGEM T-Easy por clivagem enzimática com as mesmas enzimas de restrição citadas anteriormente (Figura 2). Os fragmentos *sense* e *antisense* da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase possuem 372, 300 e 331 pb, respectivamente. Os fragmentos liberados através da restrição enzimática corresponderam ao tamanho esperado.

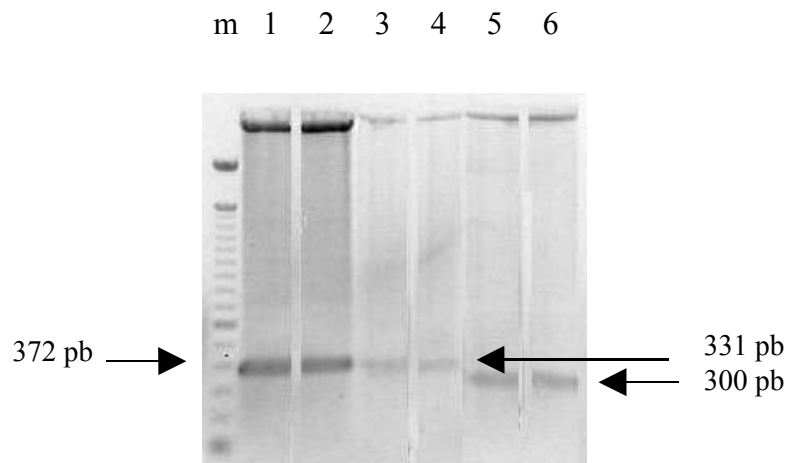


Figura 2 – Clivagem enzimática para liberação dos fragmentos gênicos clonados em vetores pGEM T-Easy. A letra m representa o marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN). Os números 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, indicam, respectivamente, os fragmentos liberados referentes à oleoil dessaturase, lisofosfatidilcolina aciltransferase e 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase. Os números ímpares são referentes aos fragmentos *sense* e os números pares aos fragmentos *antisense*.

As bandas referentes aos fragmentos de interesse foram excisadas, purificadas do gel, seqüenciadas e, posteriormente, clonadas em vetores pKANNIBAL.

5.4. Análise das seqüências e comparação com banco de dados

As seqüências isoladas da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase foram alinhadas com o auxílio do BLAST, o que confirmou a similaridade de cada fragmento com as seqüências dos genes aos quais eles se referem (Figuras 3, 4 e 5). Para os genes da oleoil dessaturase e 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase foram feitos alinhamentos de nucleotídeos com as seqüências de cDNA depositadas no *GenBank* e utilizadas para o desenho dos *primers*. Para o gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase foi feito o alinhamento de nucleotídeos com uma seqüência obtida através do *contig* formado por ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de soja e utilizado para o desenho dos *primers*, pois a seqüência nucleotídica completa deste gene ainda não foi seqüenciada. Foram obtidos 95%, 99% e 97% de identidade para os alinhamentos realizados para a oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente.


```

          >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Dessaturase 1 CACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAACTCAAGAAAGCCATTCCACCGCACTGCTTTCA
60
L43920.1 176 CACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAACTCAAGAAAGCAATTCCACCACACTGCTTTCA
235
          |||
Dessaturase 61 GCGTTCCTCCTCACTTCATTGTCTATGTTGTTTATGACCTTTCATTGGCTTTCATTTT
120
L43920.1 236 GCGTTCCTCCTCACTTCATTCTCTATGTTGTTTATGACCTTTCATTGGCTTTCATTTT
295
          |||
Dessaturase 121 CTACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCTCCCTCACCCCTTTTCCCTCATTGCATGGCC
180
L43920.1 296 CTACATTGCCACCACCTACTTCCACCTCCTCCCTCAACCCCTTTTCCCTCATTGCATGGCC
355
          |||
Dessaturase 181 AATCTATTGGGTTCTCCAAGGTTGCATTCTTACTGGCGTGTTGGGTGATTGCTCACGAGTG
240
L43920.1 356 AATCTATTGGGTTCTCCAAGGTTGCCTTCTCACTGGTGTTGGGTGATTGCTCACGAGTG
415
          |||
Dessaturase 241 TGGTCACCATGCCTTTCAGCAAGTACCCATGGGTTGATGATGTTGTGGGTTTGACCGTTCA
300
L43920.1 416 TGGTCACCATGCCTTTCAGCAAGTACCAATGGGTTGATGATGTTGTGGGTTTGACCGTTCA
475
          |||
Dessaturase 301 CTCAGCACTTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCCGCCACCACTCCAA
360
L43920.1 476 CTCAACACTTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCCGCCATCACTCCAA
535
          <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
Dessaturase 361 CACAGGTTCCCT 372
          |||
L43920.1 536 CACAGGTTCCCT 547
          <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

```

Figura 3 – Alinhamento da seqüência isolada referente à oleoil dessaturase com a seqüência obtida no banco de dados (L43920.1 - mRNA completo da FAD2-1 oleoil dessaturase microsomal de *Glycine max*). As letras destacadas em *negrito* correspondem aos *primers* sem os sítios de restrição e as setas indicam os sítios de anelamento destes.

```

                      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
CPT           1  GTGGCATGCTTCCATTCTTTCCCTTCACAACCTTGTA AACATTACTAACATTGCATGTGA 60
U12735.1  921 GTGGCATGCTTCCATTCTTTCCCTTCACAACCTTGTA AACATTACTAACATTGCATGTGA 862

CPT           61  CTGTTGGTGTAACACCAAAAAGCTATCATTAAACACAATATAGCTTTGAATGTCGGGATTC 120
U12735.1  861 CTGTTGGTGTAACACCAAAAAGCTATCATTAAACACAATATAGCTTTGAATGTCGGGATTC 802

CPT           121  CCCC AAGATAAGGAAGCCAATTTAAG AATGGCAAAGACTTTCCA AATTGCTGAACCCACC 180
U12735.1  801 CCCC AAGATAAGGAAGCCAATTTAAG AATGGCAAAGACTTTCCA AATTGCTGAACCCACC 742

CPT           181  ACTCAGCACCCACGATAGCAGTGAAAAAGTGACAGATGTATATTATCATAAGACCCTCTG 240
U12735.1  741 ACTCAGCACCCACGATAGCAGTGAAAAAGTGACAGATGTATATTATCATAAGACCCTCTG 682

CPT           241  TAGGCCCATTTATAACAGGCAGTATAAGTGTATTGGTGAAATAATGCTCCCAGGTTGCAC 300
U12735.1  681 TAGGCCCATTTATAACAGGCAGTATAAGTGTATTGGTGAAATAATGCTCCCAGGTTGCAC 622
                      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

```

Figura 4 – Alinhamento da seqüência isolada referente a 1,2-diacilglicerol colina fosfotransferase com a seqüência obtida no banco de dados (V12735.1 – mRNA completo da aminoalcoholphosphotransferase (AAPT1) de *Glycine max*). As letras destacadas em negrito correspondem aos primers sem os sítios de restrição e as setas indicam os sítios de anelamento destes.



Figura 5 – Alinhamento da seqüência isolada referente à lisofosfatidilcolina aciltransferase com a seqüência obtida através do *contig*. As letras destacadas em negrito correspondem aos *primers* sem os sítios de restrição e as setas indicam os sítios de anelamento destes.

5.5. Confirmação das subclonagens em vetores pKANNIBAL

Para a subclonagem em vetores pKANNIBAL, os fragmentos *antisense* foram liberados do vetor pGEM T-Easy por meio de clivagem com as enzimas *ClaI* e *BamHI*, purificados e ligados aos vetores pKANNIBAL. Os clones positivos foram denominados p35S Dessaturase *antisense*, p35S CPT *antisense* e p35S LPCAT *antisense*, por possuírem somente os fragmentos *antisense*.

Para a subclonagem dos fragmentos *sense*, estes foram liberados do vetor pGEM T-Easy usando as enzimas *XhoI* e *KpnI* e subclonados no vetor pKANNIBAL, utilizando os clones p35S Dessaturase *antisense*, p35S CPT *antisense* e p35S LPCAT *antisense*. Os clones positivos foram denominados p35S Dessaturase RNAi, p35S CPT RNAi e p35S LPCAT RNAi e possuem 6.648, 6.504 e 6.566 pb, respectivamente. As clonagens foram confirmadas por PCR e por reação enzimática. A Figura 6 mostra que os fragmentos *sense* e *antisense* liberados corresponderam ao tamanho esperado de 372, 300 e 331 pb para os genes da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente.

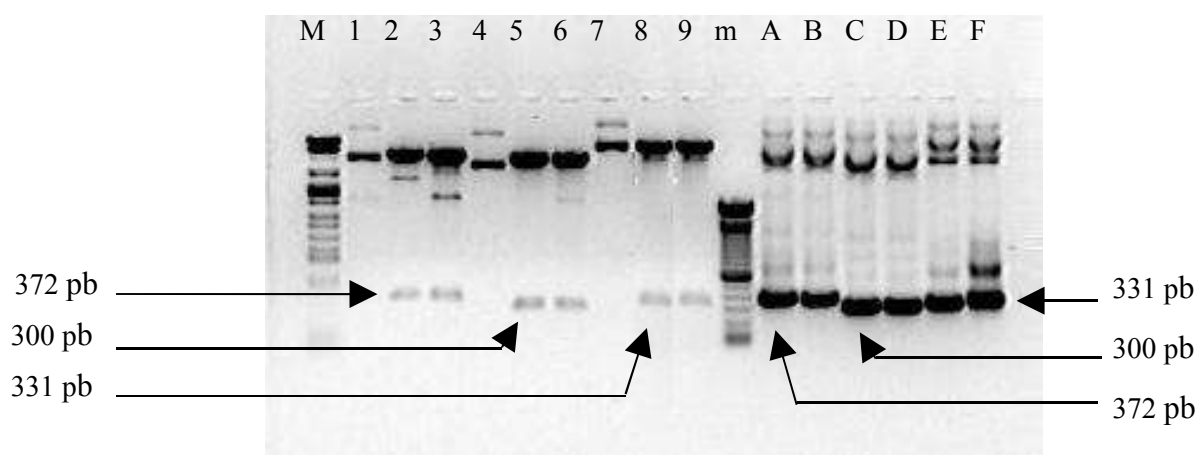


Figura 6 – Clivagem enzimática e PCR para confirmação das clonagens em vetor pKANNIBAL. A letra M corresponde ao DNA de fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*, utilizado como marcador de tamanho e a letra m corresponde ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN). Os números são referentes às clivagens e as letras são referentes aos PCRs. As canaletas 1, 4 e 7 indicam os clones 35S Dessaturase RNAi, 35S CPT RNAi e 35S LPCAT RNAi fechados, respectivamente. As canaletas 2 e 3, 5 e 6, 8 e 9 indicam as clivagens para liberação dos fragmentos *sense* e *antisense*. As letras A e B, C e D, E e F correspondem aos fragmentos *sense* e *antisense* amplificados dos genes da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente.

5.6. Confirmação das clonagens em vetores binários pCAMBIA 3301

Os clones p35S Dessaturase RNAi, p35S CPT RNAi e p35S LPCAT RNAi contêm o cassete para o silenciamento dos genes de interesse, mas não apresentam uma marca para seleção em plantas. Além disso, como a transformação de plantas será realizada por meio de *Agrobacterium tumefaciens*, uma estrutura de T-DNA também se faz necessária. Assim, as três construções foram subclonadas no vetor binário pCAMBIA 3301. Nessa etapa, as enzimas de restrição utilizadas foram *SacI* e *PstI*, por serem enzimas que correspondiam aos sítios de clivagem tanto no vetor pKANNIBAL quanto no vetor pCAMBIA 3301, sendo possível transferir a construção completa com apenas uma etapa de restrição enzimática.

As construções completas (promotor 35SCaMV + fragmento *sense* + íntron PDK + fragmento *antisense* + terminador OCS) para os genes da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase possuem 3.681, 3.537 e 3.599 pb, respectivamente. Os clones positivos foram denominados

p35SCB Dessaturase RNAi, p35SCB CPT RNAi e p35SCB LPCAT RNAi e possuem 14.988, 14.844 e 14.906 pb, respectivamente. Novamente, as clonagens foram confirmadas por PCR e restrição enzimática do DNA plasmidial dos clones isolados. As Figuras 7A, 7B e 8 confirmam a transferência dos cassetes do vetor pKANNIBAL para o vetor pCAMBIA 3301. Os fragmentos *sense* e *antisense* que foram liberados dos vetores apresentaram o tamanho esperado. Houve a liberação de fragmentos de 372, 331 e 300 pb por meio da restrição enzimática e a amplificação de fragmentos de tamanho correspondente através do PCR com os *primers* específicos, ambos se referindo aos fragmentos *sense* e *antisense* dos três genes.

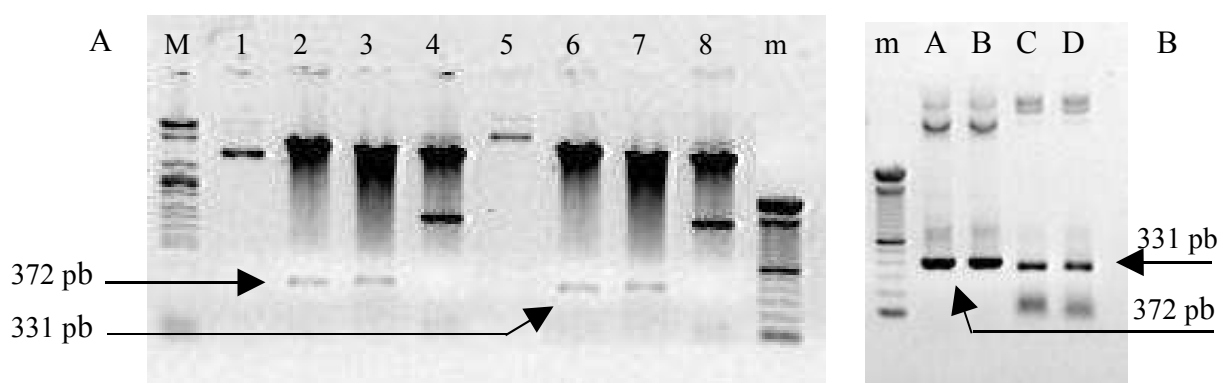


Figura 7 – Clivagem enzimática (A) e PCR (B) para confirmação das clonagens no vetor binário pCAMBIA 3301. A letra M corresponde ao DNA de fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*, utilizado como marcador de tamanho e a letra m corresponde ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN). As canaletas 1 e 5 indicam os clones p35SCB Dessaturase RNAi e p35SCB LPCAT RNAi fechados, respectivamente. As canaletas 2, 3 e 4, 6, 7 e 8 indicam as clivagens para liberação dos fragmentos *sense*, *antisense* e da construção completa, referentes aos clones p35SCB Dessaturase RNAi e p35SCB LPCAT RNAi, respectivamente. As letras A e B, C e D correspondem aos fragmentos *sense* e *antisense* amplificados dos genes da oleoil dessaturase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente.

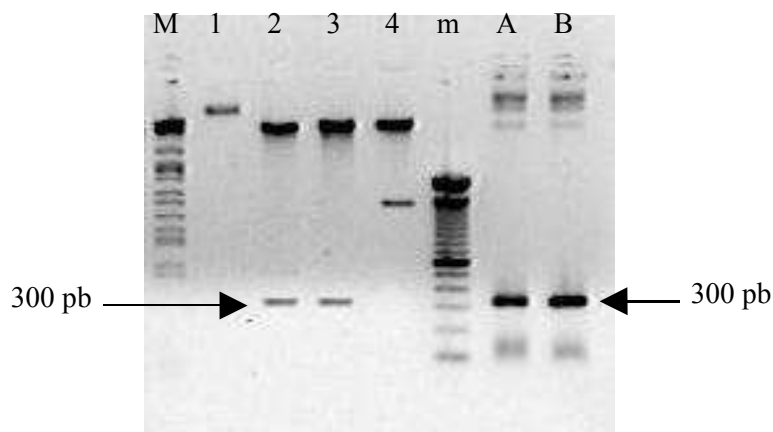


Figura 8 – Clivagem enzimática e PCR para confirmação das clonagens em vetor pCAMBIA3301. A letra M corresponde ao DNA de fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*, utilizado como marcador de tamanho e a letra m corresponde ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN). Os números são referentes às clivagens e as letras são referentes aos PCRs. A canaleta 1 indica o clone 35SCB CPT RNAi fechado. As canaletas 2, 3 e 4 indicam as clivagens para liberação dos fragmentos *sense*, *antisense* e da construção completa. As letras A e B correspondem aos fragmentos *sense* e *antisense* amplificados do gene da 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase.

5.7. Confirmação da substituição do promotor 35SCaMV em vetores pKANNIBAL

Os clones descritos anteriormente possuem o promotor 35SCaMV do mosaico da couve-flor, que é expresso constitutivamente e em altos níveis. Tal promotor vem sendo há bastante tempo utilizado na Engenharia Genética de Plantas (ODELL *et al.*, 1985).

Entretanto, uma estratégia seria a substituição de promotores constitutivos por promotores tecido-específicos. No presente trabalho, foi utilizado um promotor semente-específico de soja, do gene da subunidade α da β -conglucina, de 634 pb, previamente isolado em nosso laboratório.

A expressão semente-específica de transgenes é requerida para várias aplicações na Engenharia Genética, entre elas a melhoria da qualidade nutricional de grãos por engenharia metabólica. Dentre esses promotores, destacam-se os promotores dos genes da β -conglucina de soja, por estarem bem caracterizados e serem bastante utilizados para construções em dicotiledôneas (BARROS, 2006).

Os clones p35S Dessaturase RNAi, p35S CPT RNAi e p35S LPCAT RNAi foram clivados com as enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*, para liberação do promotor 35SCaMV e, em seguida, ligados ao promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina, previamente clivado com as mesmas enzimas de restrição. Entretanto só foi possível a obtenção de clone positivo para o gene da oleoil dessaturase e este foi denominado p β Dessaturase RNAi. A clonagem foi confirmada por PCR e restrição enzimática do DNA plasmidial do clone isolado. De acordo com a Figura 9, pode-se observar que o clone possui o promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina dirigindo a construção, pois houve a liberação de um fragmento de 634 pb correspondente ao promotor. A construção completa (promotor Beta + fragmento *sense* + íntron PDK + fragmento *antisense* + terminador OCS) possui 2.950 pb. Os fragmentos *sense* e *antisense* também apresentaram o tamanho esperado. Houve a amplificação de fragmentos de 372 pb através do PCR com os *primers* específicos.

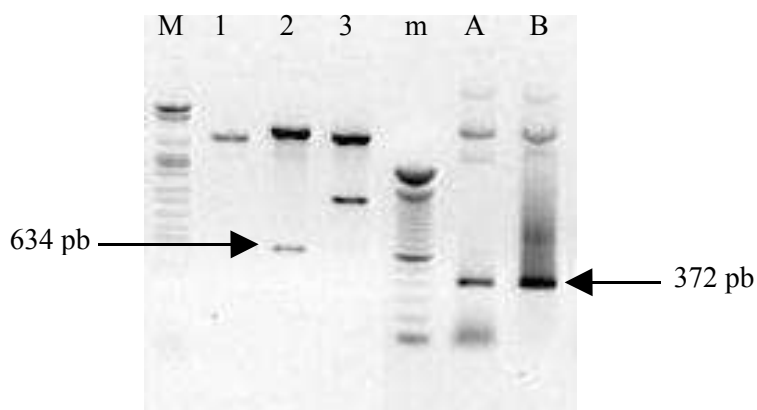


Figura 9 – Clivagem enzimática e PCR para confirmação da presença do promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina no vetor pKANNIBAL. A letra M corresponde ao DNA de fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*, utilizado como marcador de tamanho e a letra m corresponde ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN). A canaleta 1 indica o clone p β Dessaturase RNAi fechado. As canaletas 2 e 3 representam as clivagens para liberação do promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina e da construção completa, respectivamente. As letras A e B correspondem, respectivamente, aos fragmentos *sense* e *antisense* amplificados do gene da oleoil dessaturase.

Não foram obtidos clones positivos para os genes da 1,2 diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase. Para estes genes, foram realizados a troca do promotor, a transformação de *E. coli* e o PCR para diagnóstico das colônias. No entanto, não houve crescimento das colônias em meio LB líquido contendo canamicina, o que impossibilitou a extração do DNA plasmidial para a confirmação das clonagens.

5.8. Confirmação da transferência da construção dirigida pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina para os vetores pCAMBIA 3301

A etapa de transferência do cassete com o promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina foi realizada somente com o clone p β Dessaturase RNAi.

Após a confirmação da substituição do promotor 35SCaMV pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina no vetor pKANNIBAL, a construção foi liberada do clone p β Dessaturase RNAi e inserida no vetor binário pCAMBIA 3301.

As clonagens foram confirmadas por PCR e clivagem enzimática do DNA plasmidial do clone isolado. O clone positivo foi denominado p β CB Dessaturase RNAi. A Figura 10 demonstra que o clone possui o promotor do gene da subunidade

α da β -conglucina dirigindo a construção. Por meio de restrição enzimática houve a liberação de um fragmento de 634 pb correspondente ao promotor e de um fragmento de 2.950 pb correspondente à construção completa (promotor Beta + fragmento *sense* + íntron PDK + fragmento *antisense* + terminador OCS). A presença dos fragmentos *sense* e *antisense* foi confirmada através do PCR por amplificação de fragmentos de 372 pb utilizando os *primers* específicos.

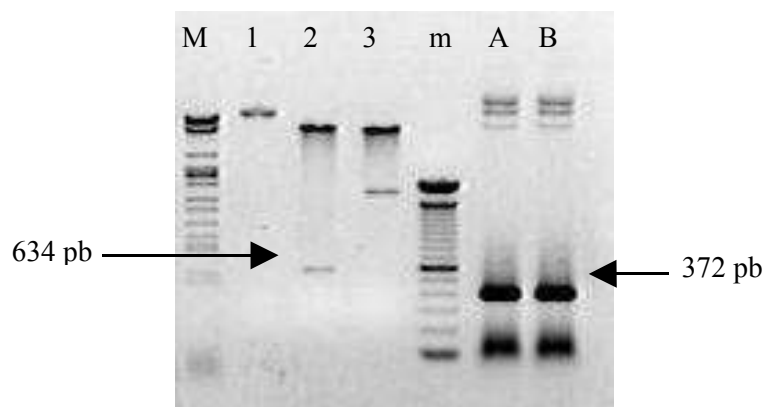


Figura 10 – Clivagem enzimática e PCR para confirmação da clonagem no vetor binário pCAMBIA 3301. A letra M corresponde ao DNA de fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*, utilizado como marcador de tamanho e a letra m corresponde ao marcador tamanho de 100 pb (INVITROGEN). A canaleta 1 indica o clone p β CB Dessaturase RNAi fechado. As canaletas 2 e 3 representam as clivagens para liberação do promotor e da construção completa, respectivamente. As letras A e B correspondem, respectivamente, aos fragmentos *sense* e *antisense* amplificados do gene da oleoil dessaturase.

5.9. Representação esquemática dos clones obtidos

Os clones finais obtidos estão representados de maneira esquemática nas Figuras 11 e 12. Eles correspondem às construções para silenciamento gênico, via RNA de interferência, dos genes da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, sob controle do promotor 35SCaMV ou do promotor do gene da subunidade α da β -conglucina. Os cassetes estão clonados no vetor binário pCAMBIA 3301, utilizado para a transformação genética de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*.

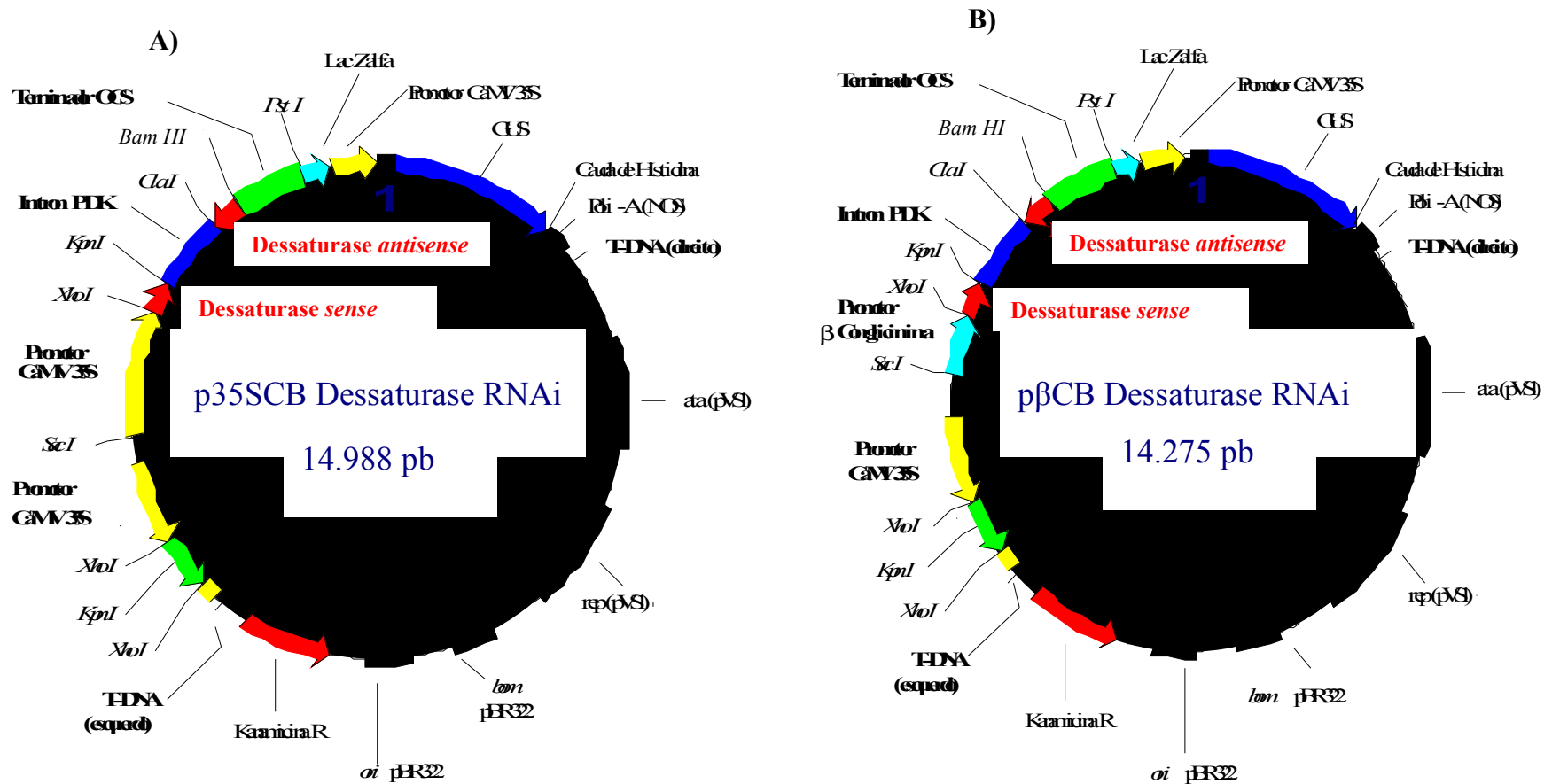


Figura 11 - Representação esquemática dos clones contendo as construções para silenciamento gênico, RNA *interference*, do gene da oleoil dessaturase em soja. Os cassetes estão sob controle do promotor 35SCaMV (A) e do promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina (B).

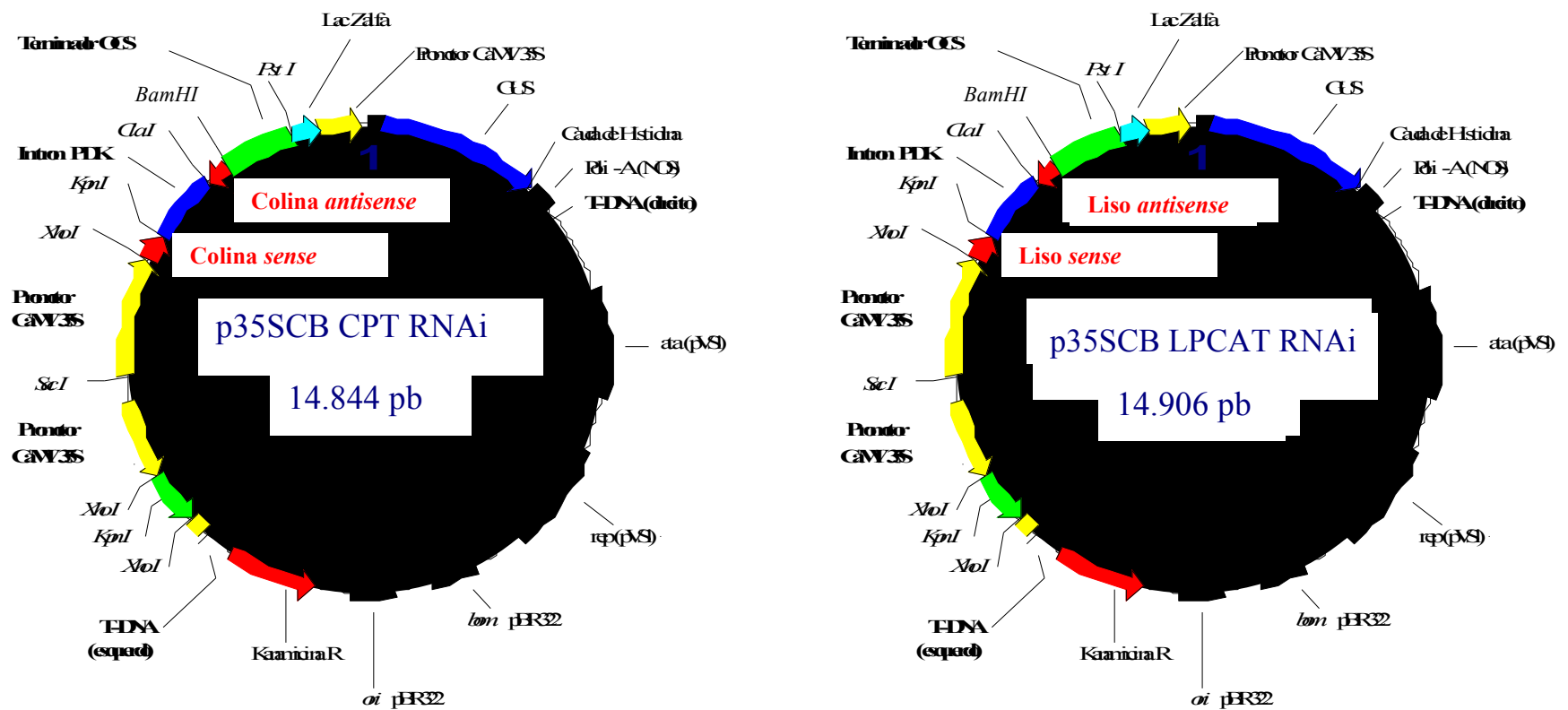


Figura 12 - Representação esquemática do clone contendo a construção para silenciamento gênico, RNA *interference*, dos gene da 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase em soja. Os cassetes estão sob controle do promotor 35SCaMV.

6. CONCLUSÕES

Foi possível isolar e subclonar os fragmentos *sense* e *antisense* de 372, 300 e 331 pb referentes aos genes da oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, respectivamente, em vetores pKANNIBAL.

Foram obtidos quatro cassetes de expressão para silenciamento gênico, via RNA de interferência. Dois destes foram para o gene da oleoil dessaturase, sendo um deles dirigido pelo promotor 35SCaMV e o outro pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina. Os cassetes obtidos para os genes da 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase estão sob a direção do promotor 35SCaMV.

7. PERSPECTIVAS

Os experimentos continuam, visando obter os cassetes de expressão para silenciamento gênico, via RNA de interferência, dirigidos pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucina, para os genes da 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase.

Os cassetes serão utilizados para a transformação genética de nós cotiledonares e/ou embriões somáticos de soja, via *Agrobacterium tumefaciens*.

As variedades, a serem obtidas, contendo reduzido conteúdo de ácido linolênico e maior conteúdo de ácido oléico serão incorporadas no Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADI, A.; DOMERG, F.; BAUER, J.; NAPIER, J. A.; WELTI, R.; ZÄHRINGER, U.; CIRPUS, P.; HEINZ, E. Biosynthesis of Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Transgenic Oilseeds: Constraints on Their Accumulation. **The Plant Cell**, 16: 2734-2748, 2004.

AHLQUIST, P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. **Science**, 296: 1270-1273, 2002.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. GAPPED BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, 25: 3389-3402, 1997.

BARROS, B. A. **Construção de cassetes de expressão para o silenciamento gênico de fatores antinutricionais de soja, via interferência por RNA**. Viçosa: UFV, 69p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, 409: 363-366, 2001.

BUHR, T.; SATO, S.; EBRAHIM, F.; XING, A.; ZHOU, Y.; MATHIESEN, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. **The Plant Journal**, 30: 155-163, 2002.

BUSHMAN, F. RNA interference: Applications in Vertebrates. **Molecular Therapy**, 7: 9-11, 2003.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) Safra de grãos no Brasil no período de 1976/1977 a 2006/2007. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em 1 de março de 2006.

DUNWELL, J. M. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, 51: 487-496, 2000.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 51: 167-194, 2000.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 39: 806-811, 1998.

GROENENBOOM, M. A. C., MARÉE, A. F. M., HOGEWEG, P. The RNA Silencing Pathway: The Bits and Pieces That Matter. **PLoS Computational Biology**, 1: 155-165, 2005.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, 81: 611-620, 1995.

HAMILTON, A.; VOINNET, O.; CHAPPELL, L.; BAULCOMBE, D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. **The EMBO Journal**, 21: 4671-4679, 2002.

HAMMOND, S. M.; BOETCHER, S.; CAUDY, A. A.; KOBAYASHI, R.; HANNON, G. J. Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. **Science**, 293 (5532): 1146-1150, 2001.

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

HAZEL, J. R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Review of Physiology**, 57: 19-42, 1995.

HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. **Plant Physiology**, 110: 311-319, 1996.

HUTVAGNER, G.; MCLCHLAN, J.; PASQUINELLI, A. E.; BALINT, E.; TUSCHI, T.; ZAMORE, P. D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. **Science**, 293: 834-838, 2001.

JAMES, C. 2006. Preview: Global of Commercialized Biotech/GM Crops. **ISAAA Briefs**, ISAAA: Ithaca, NY, 35:49-51, 2006.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 57: 19-53, 2006.

KINNEY, A. J. Genetic modification of the storage lipids of plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 5: 144-151, 1994.

KINNEY, A. J. Development of genetically engineered soybean oils for food application. **Journal of Food Lipids**, 3: 273-292, 1996.

KINNEY, A. J., CAHOON, E. B., HITZ, W. D. Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. **Crop Genetics Research and Development**, Dupont Experimental Station, Wilmington, USA, pág 1099, 2002.

KUSABA, M. RNA interference in crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 15: 139-143, 2004.

LANNA, A. C. **Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja**. Viçosa: UFV, 84p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

LIU, Q.; SINGH, S.; GREEN, A. Genetic modification of cotton seed oil using inverted-repeat gene-silencing techniques. **Biotechnological Aspects: Methods**, 297-299, 2000.

LIU, Q.; SINGH, S.; GREEN, A. High-Oleic and High-Stearic Cottonseed Oils: Nutritionally Improved Cooking Oils Developed Using Gene Silencing **Journal of the American College of Nutrition**, 21: 205–211, 2002a.

LIU, Q.; SINGH, P. S.; GREEN, A. G. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**, 29: 1732-1743, 2002b.

MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. MicroRNAs: something important between the genes. **Current Opinion in Plant Biology**, 7: 120–125, 2004.

MEINS, F.; SI-AMMOUR, A.; BLEVINS, T. RNA silencing systems and their relevance to plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 21: 297-318, 2005.

MENSINK, R. P; KATAN, M.B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **The New England Journal of Medicine**, 323: 439-445, 1990.

MLOTSHWA, S.; VOINET, O.; METTE, M. F.; MATZKE, C; VAUCHERET, H; DING, S. W.; PRUSS, G; VANCE, V, B. RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal. **The Plant Cell**, 14: 289-301, 2002.

MOREIRA, M. A. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Soja**. Embrapa - Soja, Londrina-Paraná, 99-104, 17 a 20 de maio de 1999.

MURATA, N.; WADA, H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. **Biochemical Journal**, 308: 1–8, 1995.

MURPHY, D. J. Manipulation of plant oil composition for the production of valuable chemicals – progress, problems and prospects. In: Shahidi *et al.* (Eds.). **Chemical via Higher Plant Bioengineering**, New York. 21-35, 1999.

NELSON, P. T.; HATZIGEORGIU, A. G.; MOURELATOS, Z. miRNP: mRNA association in polyribosomes in human neuronal cell line. **RNA**, 10: 360-365, 2004.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, 18 (1): 81-116, 2001.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. N. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, 313: 810-812, 1985.

PASSOS-LIMA, A. B. **Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleoil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja.** Viçosa: UFV, 117p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

RAY, J. D.; CARR, B. T. Empirical modeling of soybean oil hydrogenation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 62: 1218-1222, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 74: 5463-5467, 1977.

SINGH, S.; GREEN, A., STOUTJESDIJK, P.; LIU, Q. Inverted-repeat DNA: a new gene-silencing tool for seed lipid modification. **Biochemical Society Transactions**, 28: 925-927, 2000.

SMITH, N. A. Total silencing by a intron-spliced hairpin RNA. **Nature**, 407: 319-320, 2000.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Plant lipids: metabolism, mutants and membranes. **Science**, 252:80-87, 1991.

SONG, J. J.; LUI, J.; TOLI, N. H.; SCHNEIDERMAN, J.; SMITH, S. K.; MARTIENSSEN, R. A. HANNON, G. J.; JOSHUA-TOR, L. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. **Nature Structural Biology**, 10: 1026-1032, 2003

STOUTJESDIJK, P. A., SINGH, P. S.; LIU, Q.; HURLSTONE, C. J.; WATERHOUSE, P. A.; GREEN, A. G. hpRNA-Mediated Targeting of the Arabidopsis *FAD2* Gene Gives Highly Efficient and Stable Silencing. **Plant Physiology**, 129: 1723-1731, 2002.

TANG, G.; GALILI, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. **Trends in Biotechnology**, 22: 09, September, 2004.

TAHBAZ, N.; KOLB, F. A.; ZHANG, H.; JARONCZYK, K.; FILIPOWICS, W.; HOBMAN, T. C. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. **EMBO Reports**, 5: 189-194, 2004.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, 114: 3083-3091, 2001.

VENDRUSCOLO, E. C. G., Silenciamento Gênico e Transgênicos **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 31: julho/dezembro, 2003

WARNER, K.; NEFF, W. E.; BYRDWELL, W. C.; GARDNER, H. W. Effect of oleic and linoleic acids on the production of deep-fried odor in heated triolein and triolinolein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 899-905, 2001.

WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, 43: 203-220, 2000.

WATERHOUSE, P. M.; HELLIWELL C. A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, 4: 29-38, 2002.

WESLEY, S. V.; HELLIWELL, C. A.; SMITH, N. A.; WANG, M.; TOUSE, D. T.; LIU, Q.; GOODING, P. S.; SINGH, S. P.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P. A.; ROBINSON, S. P.; GLEAVE, A. P.; GREEN, AL G.; WATERHOUSE, P. M. Construct design for efficient, effective and high-throughout gene silencing in plants. **Plant Journal**, 27: 581-590, 2001.

WU, G.; TRUKSA, M.; DATLA, N.; VRINTEN, P.; BAUER, J.; ZANK, T.; CIRPUS, P.; HEINZ, E.; QIU, X. Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. **Nature Biotechnology**, 23: 1013-1017, 2005.

YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D. P. S., SHOEMAKER, R. C. (Eds) **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL.127-188, 1996.

YU, H., KUMAR, P. P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. **Plant Cell Report**, 22: 167-174, 2003.

ZAMORE, P. D. Plant RNAi: how a viral silencing suppressor inactivates siRNA. **Current Biology**, 14: 198-200, 2004.