



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JOCHUAN ISRAEL BEZERRA DO NASCIMENTO

**CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *VuGOX1-LIKE* DE
VIGNA UNGUICULATA [L.] WALP**

FORTALEZA

2022

JOCHUAN ISRAEL BEZERRA DO NASCIMENTO

CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *VuGOXI-LIKE* DE *VIGNA*
UNGUICULATA [L.] WALP

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial a obtenção do grau de bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Murilo Siqueira Alves

Fortaleza

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N195c Nascimento, Jochuan Israel Bezerra do.
Clonagem da região codificadora do gene VuGOX1-like de *Vigna Unguiculata* [L.] Walp / Jochuan Israel Bezerra do Nascimento. – 2022.
29 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves.
1. Glicolato oxidase . 2. Tecnologia do DNA recombinante. 3. Feijão-caupi. 4. Biotecnologia vegetal. I.
Título.

CDD 661

JOCHUAN ISRAEL BEZERRA DO NASCIMENTO

CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *VuGOXI-LIKE* DE *VIGNA*
UNGUICULATA [L.] WALP

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial a obtenção do grau de
bacharelado em Biotecnologia

Aprovada em 08/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Erica Monik Silva Roque
Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) é uma cultura de grande importância em vários países da região tropical e subtropical graças a seus aspectos nutricionais e a sua resiliência a seca. Esta espécie vegetal pode ser afetada por uma diversidade de estresses bióticos e abióticos, agravado pelas drásticas mudanças climáticas que o planeta vem passando. Assim, é importante assegurar meios de preservar o cultivo de *V. unguiculata* dada a sua importância social e econômica para o mundo. Em relação a isso, as plantas conseguem responder a estresses ambientais de diversas maneiras e uma delas é através da expressão de genes específicos que geram respostas metabólicas com a função de promover mecanismos de resistência contra o estresse a qual elas estão sendo submetidas. O gene *VuGOX1-like* codifica uma importante enzima do peroxissomo denominada de Glicolato Oxidase 1 (GOX1), a qual é responsável pela liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante o processo fotorrespiratório. H₂O₂ é uma molécula que apresenta um papel chave na sinalização de processos de defesa e morte celular programada em plantas. Estudos anteriores mostraram que GOX1 está associado a resistência contra estresses bióticos e abióticos. No presente trabalho, a partir do uso de técnicas de biologia molecular, a região codificadora do gene *VuGOX1-like* foi clonada e confirmada no vetor de entrada pENTR11-DUAL SELECTION VECTOR. A construção gerada pode ser utilizada para a subclonagem em vetores de expressão, visando o estudo funcional do gene *VuGOX1-like* em futuros ensaios.

Palavras-chave: Glicolato Oxidase; tecnologia do DNA recombinante; feijão-caupi; biotecnologia vegetal.

ABSTRACT

The cowpea bean (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) is a crop of great importance in several countries of the tropical and subtropical region thanks to its nutritional aspects and its resilience to drought. This plant species can be affected by a diversity of biotic and abiotic stresses, aggravated by the drastic climate changes that the planet has been going through. Thus, it is important to ensure means to preserve the cultivation of *V. unguiculata* given its social and economic importance to the world. In relation to this, plants can respond to environmental stresses in several ways and one of them is through the expression of specific genes that generate metabolic responses with the function of promoting resistance mechanisms against the stress to which they are being submitted. The VuGOX1-like gene encodes an important peroxisome enzyme called Glycolate Oxidase 1 (GOX1), which is responsible for the release of hydrogen peroxide (H₂O₂) during the photorespiratory process. H₂O₂ is a molecule that plays a key role in signaling defense processes and programmed cell death in plants. Previous studies have shown that GOX1 is associated with resistance against biotic and abiotic stresses. In the present work, by using molecular biology techniques, the coding region of the VuGOX1-like gene was cloned and confirmed in the input vector pENTR11-DUAL SELECTION VECTOR. The generated construct can be used for subcloning into expression vectors for the functional study of the VuGOX1-like gene in future assays.

Keywords: Glycolate Oxidase; recombinant DNA technology; cowpea; plant biotechnology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1. Desenho experimental.....	12
2.2. Resultados e discussões.....	13
3. CONCLUSÃO.....	23
4. REFERÊNCIAS.....	24
ANEXO A.....	27
ANEXO B.....	28
ANEXO C.....	30

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma das culturas agronômicas de grande importância mundial, sendo cultivado em mais de 100 países em regiões tropicais e subtropicais, tais como a Índia, Estados Unidos, Brasil, Etiópia e Nigéria. (SINGH, 2020). Dentre os principais fatores que corroboram para a ampla distribuição dessa cultura em diversos países está a resiliência da espécie à desidratação, bem como sua atuação na fixação de nitrogênio atmosférico durante a simbiose com parte da microbiota do solo, fazendo com que ela se adapte bem em solos deficientes em nutrientes (KEBEDE et al., 2020). Com relação aos seus aspectos nutricionais, a espécie possui alto conteúdo de proteínas (23-32%) e carboidratos (50-60%) e baixo conteúdo de lipídeos (1%). Além disso, pesquisas têm mostrado que o seu consumo pode ter efeitos benéficos para a saúde devido a presença de propriedades anticarcinogênicas, antidiabéticas, anti-inflamatórias e anti-hipertensivas (JAYATHILAKE et al., 2018).

O crescimento dessa cultura pode ser afetado por diversos estresses bióticos e abióticos. O principal fator de origem de estresse abióticos são as mudanças climáticas que vêm causando o aumento da temperatura e a alteração do padrão de chuvas em diversas regiões do planeta. Como consequência muitas áreas são afetadas pela seca, fazendo com que as plantas apresentem estresse por déficit hídrico, e mesmo culturas resilientes como o feijão-caupi são prejudicadas (AJETOMOBI; ABIODUM, 2010). Com relação a estresses bióticos vários deles podem causar danos a produção do feijão-caupi, como os estresses por insetos das espécies *Maruca vitrata*, *Clavigralla tomentosicollis* e *Riptortus dentipes*, que são responsáveis por danos as vagens da planta (BOUKAR et al., 2018) e doenças como o mosaico severo do caupi causado pelo vírus *Cowpea Severe Mosaic Virus* (CSMV) (BOOKER et al, 2005).

As plantas respondem a estresses ambientais ativando complexas maquinarias moleculares de resposta, dentre elas a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), alteração do fluxo de íons e a expressão de genes específicos (PANDEY et al, 2015). Os mecanismos de reação a um tipo de estresse ambiental ou a uma combinação deles ainda não estão bem elucidados em espécies vegetais não-modelo, como é o caso de *V. unguiculata*. Dessa forma, é importante o estudo de genes que estão associados a essas respostas, já que isso pode permitir a criação de novas estratégias para geração de tolerância em plantas e a identificação de genes de interesse que possam ser usados no melhoramento vegetal (OMOMOWO et al, 2021).

O gene *VuGOX-like* codifica uma proteína ortóloga a Glicolato Oxidase 1 (GOX1) de *Arabidopsis thaliana*, a qual é uma enzima crucial na fotorrespiração, e cuja função é a oxidação

do glicolato a glioxilato com a conseqüente liberaçãõ de peroxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é uma ROS que apresenta uma funçãõ sinalizadora em processos moleculares de defesa e morte celular programada em plantas. A Glicolato Oxidase apresenta relaçãõ com a resistênciã da planta à estresses bióticos como infecçãõ por nematóides (VILLETH et al., 2015) e o vírus do mosaico (ROQUE, 2022; Dados não publicados) uma vez que durante a exposiçãõ a esses estresses a expressãõ dessa enzima foi alterada. Também foi determinado que genótipos de feijãõ-caupi com maior atividade de estratégias defensivas a seca, possuem uma maior concentraçãõ basal de H_2O_2 (CARVALHO et al., 2019), o que pode indicar uma elevada expressãõ de GOX1. Além disso, um estudo com arroz (*Oryza sativa*) mostrou que a superexpressãõ de GOX1 pode melhorar a performance da fotossíntese em situaçãõ de alta luminosidade e temperatura (CUI et al., 2016).

Portanto, o presente trabalho teve o objetivo de realizar a clonagem completa da regiãõ codificadora do gene *VuGOX1-like*, utilizando o vetor pENTR11-DUAL SELECTION VECTOR (pENTR11-DSV) como vetor de entrada. A construçãõ gerada será utilizada para futuros estudos funcionais do gene em sistemas de expressãõ em bactérias, leveduras e plantas, permitindo a criaçãõ de estratégias para a geraçãõ de tolerância em plantas engenheradas, aumentando o conhecimento sobre os mecanismos de defesa a estresses ambientais.

2. MATERIAIS E METÓDOS

A construção de DNA pENTR11-DUAL SELECTION VECTOR-*VuGOXI-like* (pENTR11-DSV-*VuGOXI-like*) foi previamente obtida no Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, como parte da dissertação de mestrado da estudante Érica Monik Silva Roque (Roque, 2022; Dados não publicados), porém sem confirmação experimental. Brevemente, para a geração desta construção, foram utilizadas as extremidades coesivas geradas pela ação endonucleásica das enzimas BamHI e EcoRI (Promega) sobre o vetor pENTR11-DSV e a região codificadora de *VuGOXI-like* amplificada. Estas extremidades coesivas (região de DNA fita simples complementares) foram ligadas utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Promega), e o produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias competentes de *E.coli* DH10B. Três clones independentes da transformação (G1, G2 e G3) foram estocados em ultrafreezer para armazenamento.

Para a primeira etapa de confirmação da presença da região codificadora amplificada de *VuGOXI-like* no vetor pENTR11-DSV, foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), tipo *End point*, usando plasmídeos previamente extraídos possivelmente contendo a construção de DNA citada acima. Para esta reação, foram analisados plasmídeos de 3 clones independentes em *Escherichia coli* linhagem DH10B (denominados G1, G2 e G3). Os componentes da reação foram os seguintes: 9,5uL de água livre de nucleases; 12,5 uL de Gotaq Colorless Master Mix (Promega); 1 uL do primer de GOX direto (GCTGGATTCAAAGCCATTGC); 1 uL do primer de GOX reverso (CGGTGGCAGTGTGAATCTGT) e 1 uL da amostra de DNA plasmidial (para uma reação de 25 uL). Como controles negativo e positivo do PCR, foram utilizados volumes de água livre de nucleases e de amplicon purificado de *VuGOXI-like*, respectivamente. A PCR foi realizada em um termociclador Eppendorf MasterCycler Nexus, onde as configurações da reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de três etapas contendo desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 52 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os resultados da amplificação foram verificados utilizando-se eletroforese em gel de agarose 1% contendo 1 uL de brometo de etídio em sua composição para 25 mL de gel. O marcador Promega Benchtop 1kb DNA Ladder foi utilizado como marcador de massa molecular, com eletroforese sendo realizada a partir de aplicação de diferença de potencial elétrico de 100 V. Após o término da eletroforese, o padrão de distribuição de bandas foi analisado usando um fotodocumentador DNR MiniBIS Pro. Em seguida, os clones nos quais o padrão de bandas indicava a presença do amplicon do gene *VuGOXI-like* foram selecionados para confirmar os resultados obtidos com os plasmídeos. Para isso, após crescimento dos clones em meio LB (Luria-Bertani) líquido seletivo (contendo o antibiótico Canamicina em concentração 0,1%) por 16 horas a 37° C sob agitação vigorosa, uma alíquota de cada cultura foi utilizada para uma

reação de PCR de cultura. Foram utilizados 1 μ L da amostra da cultura bacteriana e a reação seguiu os mesmos parâmetros utilizados no PCR de plasmídeos, exceto pelo tempo de desnaturação inicial, onde foi utilizado 95° C por 10 minutos.

Após a confirmação da presença de amplicons por PCR de cultura, foi realizada a extração de DNA plasmidial dos clones selecionados, utilizando o método de lise alcalina (SAMBROOK et al, 1989). Resumidamente, um volume de 2 ml de cada cultura bacteriana foi adicionado a microtubos, sendo estes centrifugados durante 1 min em velocidade de 14000rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, e o material precipitado (pellet) foi ressuscitado em 100 μ l de solução de lise I gelada, em seguida foram adicionados 200 μ l de solução de lise II em cada tubo que então foram misturados por inversão 6 vezes. Então foram adicionados 150 μ l da solução de lise III gelada em cada um dos tubos e eles também foram misturados por inversão 10 vezes e deixados em repouso no gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados novamente em 14000rpm por 5 minutos e o sobrenadante de cada um deles foi transferido para tubos novos. Nos novos tubos foram adicionados 900 μ l de etanol absoluto e eles foram deixados em repouso por 1 hora. Em seguida os tubos foram centrifugados novamente por 5 min e o sobrenadante deles foi descartado, então a porção superior do tubo foi secada com o auxílio de papel toalha e novamente os tubos ficaram em repouso durante 1 min enquanto estavam invertidos em contato com o papel toalha. Foram adicionados 1 ml de etanol 70% em cada um dos tubos que então foram invertidos 10 vezes e centrifugados por 5 minutos, o sobrenadante deles então foi descartado e os tubos tiveram que ficar completamente secos em temperatura ambiente. Por fim o pellet dos tubos foi ressuscitado com 50 μ l de tampão TE e foram adicionados 1 μ l de RNase A em cada tubo que então ficaram em repouso por 20 min em temperatura ambiente, em seguida os tubos foram etiquetados e armazenados em temperatura de -20° C. A qualidade das amostras extraídas de DNA plasmidial foi verificada utilizando-se eletroforese em gel de agarose 1%.

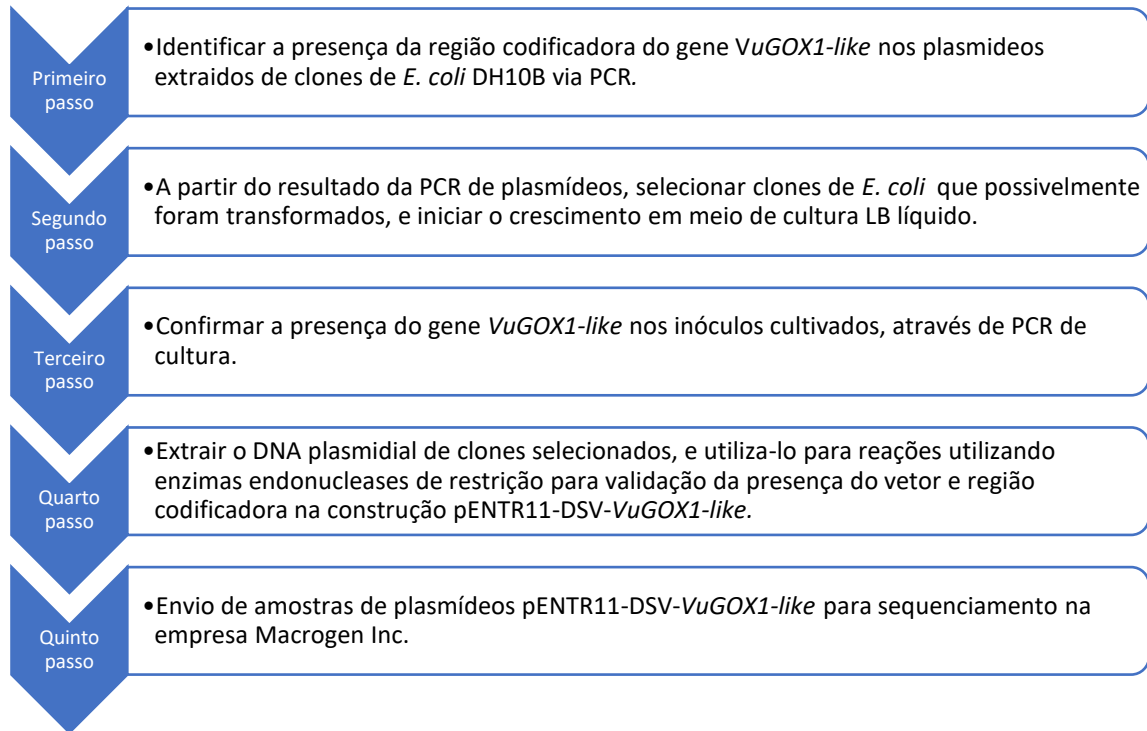
Após a análise dos resultados de PCR de cultura e de DNA plasmidial extraído, uma terceira etapa de confirmação foi realizada, utilizando reações com enzimas endonucleases de restrição tipo II. Foram realizadas reações em tubos distintos usando diferentes combinações de enzimas de restrição, onde em cada um dos tubos estavam presentes 1 μ l do tampão de reação específico para cada combinação de enzimas, 0,1 μ l de BSA acetilado, 8,4 μ l do DNA plasmidial e 0,5 μ l de enzimas. As misturas de reação foram realizadas em banho maria a 37 °C durante 2 horas. Após esse período, as reações foram paradas a 65 °C durante 20 minutos para a desativação das enzimas. Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Os perfis de clivagem enzimática foram analisados de acordo com o esperado para cada conjunto de enzimas com o auxílio do programa NEBcutter (VINCZE, 2003).

Por fim, como última etapa de confirmação da clonagem, uma amostra de DNA plasmidial do clone G1 foi enviada para sequenciamento de DNA na empresa Macrogen Inc., onde serão utilizados

oligonucleotídeos específicos para o gene *VuGOXI-like*, bem como para amplificação de regiões do vetor pENTR11-DSV. Esta etapa encontra-se em espera dos resultados do sequenciamento da amostra.

2.1. Desenho experimental

Figura 1- Fluxograma das etapas do experimento

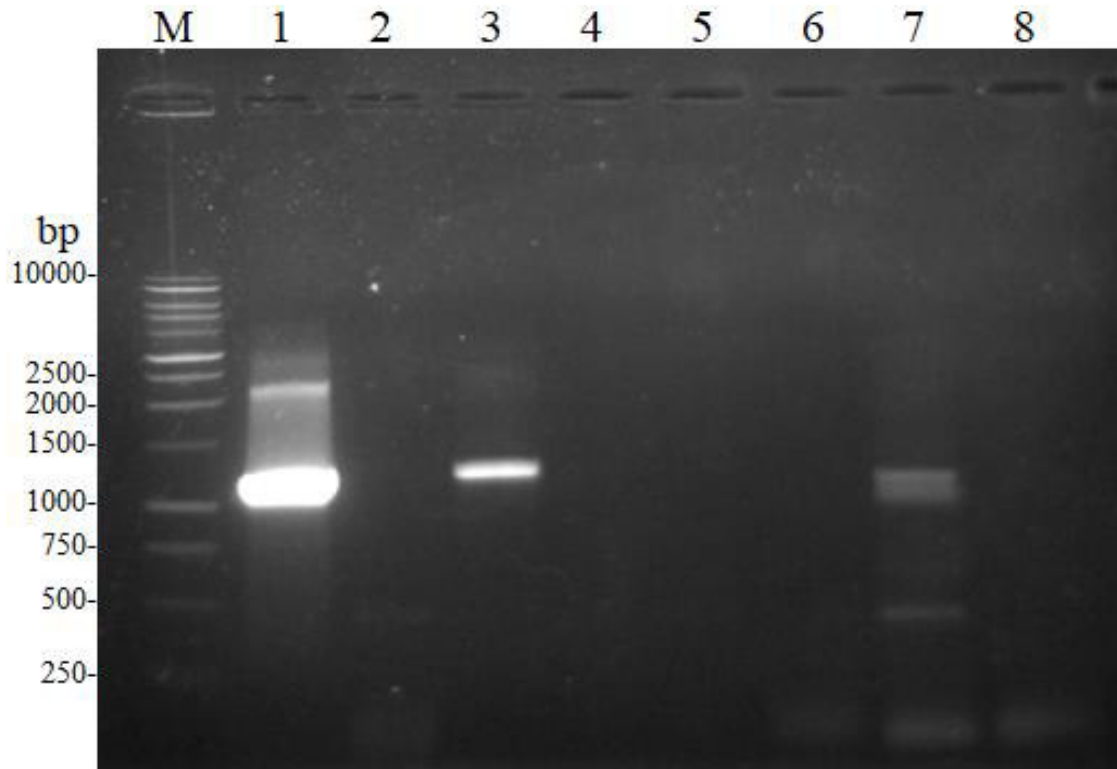


Fonte: Figura do autor

2.2. Resultados e discussão

A primeira PCR utilizando primers de *VuGOX1-like* foi realizada com o DNA plasmidial de clones de *E. coli* DH10B possivelmente transformadas. Essa reação apresentou uma banda na região entre 1500bp e 1000bp, como é possível ver na Figura 2. Este resultado é uma indicação de que a transformação das bactérias presentes no clone G1 foi um sucesso enquanto os clones G2 e G3 não foram transformados com o plasmídeo pENTR11-DSV-*VuGOX1-like*, pois não apresentaram nenhuma banda. Outro fator que aumenta a confiabilidade nessa interpretação é que o gene *VuGOX1-like* possui uma região codificadora de 1119bp, de acordo com o genoma v1.2 de *Vigna unguiculata* obtido do banco de dados Phytozome (GOODSTEIN *et al*, 2012), e as bandas resultantes da PCR do DNA plasmidial extraído do clone G1 estão bem próximas dessa região. Na faixa 7 também é possível observar uma banda próxima de 500bp e uma provável explicação para isso é de que ela seja resultante de algum contaminante advindo do preparo das reações de PCR ou de algum remanescente de DNA genômico, já que é possível observar a mesma banda na faixa 2. Além disso, também é possível visualizar em algumas faixas bandas abaixo de 250bp que podem ser originadas devido a dímeros de primers.

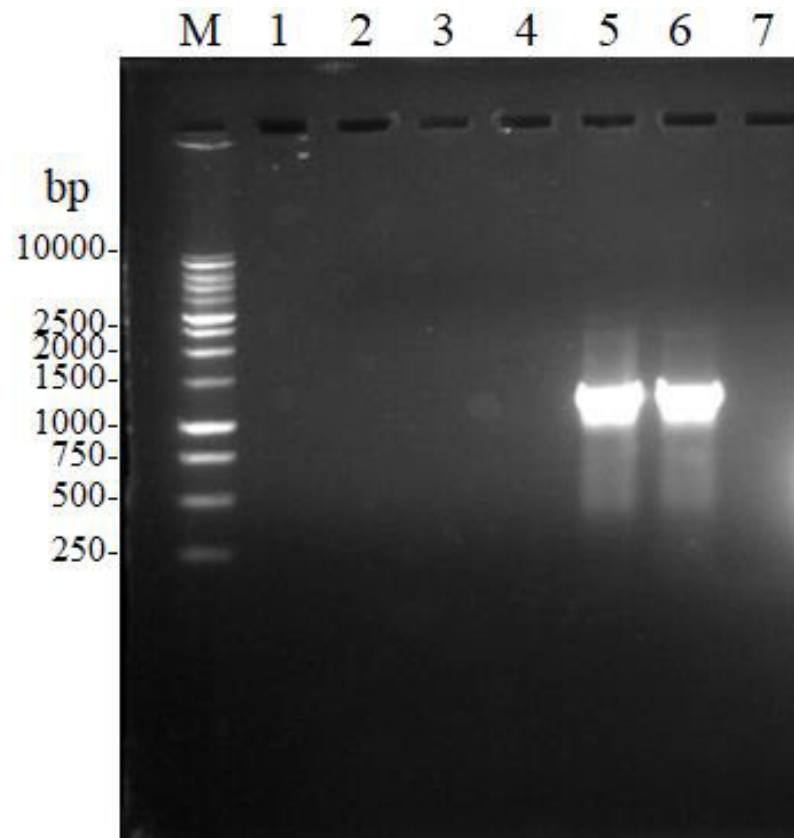
Figura 2 - Gel de agarose 1%, utilizando amostras de PCR com DNA plasmidial como molde. Ordem das amostras: (1) PCR de miniprep do clone G1, (2) PCR de miniprep do clone G2, (3) PCR de miniprep de G1, (4) PCR miniprep de G2, (5) miniprep de G3, (6) PCR com água livre de nucleases, (7) PCR com amplicon purificado de *VuGOX1-like*, (8) PCR com água livre de nucleases.



Fonte: Figura do autor

A partir da análise do gel foi possível determinar que somente a colônia G1 apresentava a região codificadora do gene *VuGOX1-like* clonada, e com isso foi necessário multiplicar as bactérias dessa colônia para obtenção de mais material para extração. A segunda reação de PCR, realizada com culturas crescidas do estoque do tubo G1, apresentou resultados semelhantes ao PCR utilizando o plasmídeo, o que demonstrou que o plasmídeo recombinante estava presente nas culturas, como é possível verificar nas faixas 6 e 7 da Figura 3.

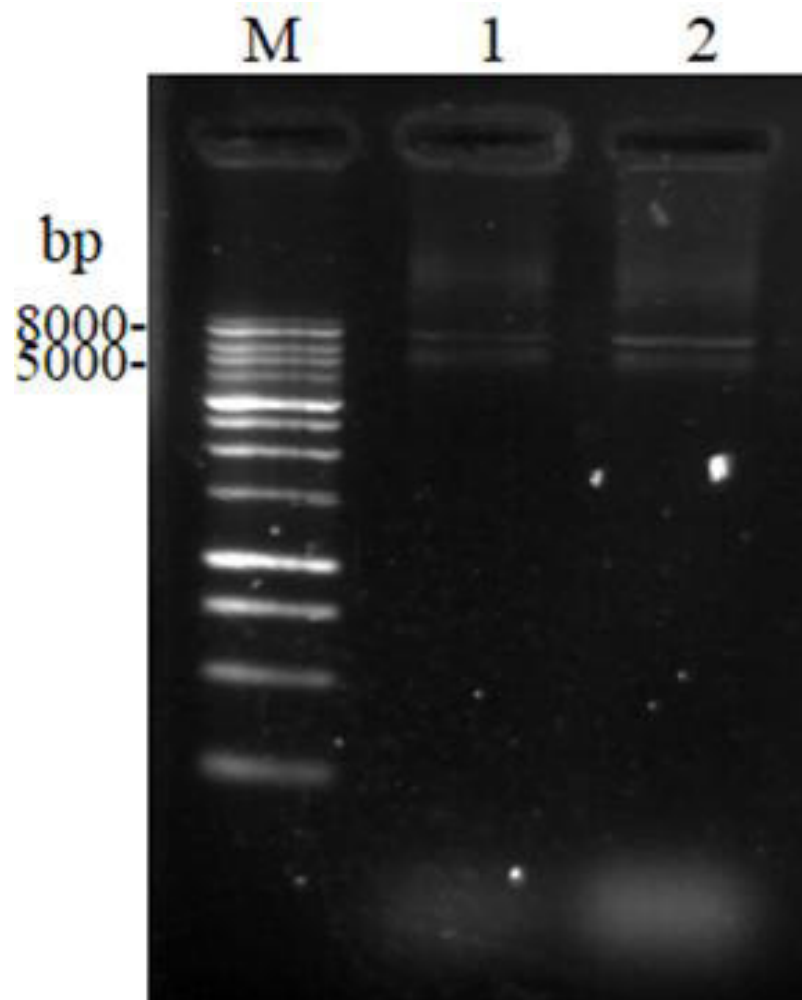
Figura 3 - Gel de agarose 1%, utilizando amostras de PCR de cultura. Ordem das amostras: (5) e (6) resultado de PCR de cultura bacteriana G1.



Fonte: Figura do autor

A partir desse resultado, o DNA plasmidial do clone G1 inoculado foi extraído. A figura 4 retrata o resultado de duas destas extrações, onde é possível verificar bandas cujo tamanho encontra-se entre 8000bp e 5000bp. Esse resultado é explicado pelo fato de o plasmídeo estar em sua forma circular, apresentando sua topologia aberta, torcida (helicoidizada) e super-torcida (super-helicoidizada) durante a eletroforese, diferindo do tamanho esperado para o plasmídeo na forma linear (com tamanho esperado de aproximadamente 3427bp (vetor pENTR11-DSV e região codificadora de *VuGOX1-like* somados).

Figura 4 - Gel de agarose 1%, com DNA plasmidial recém extraído. Ordem das amostras: (1) e (2) DNA plasmidial extraído e tratado com RNase A.

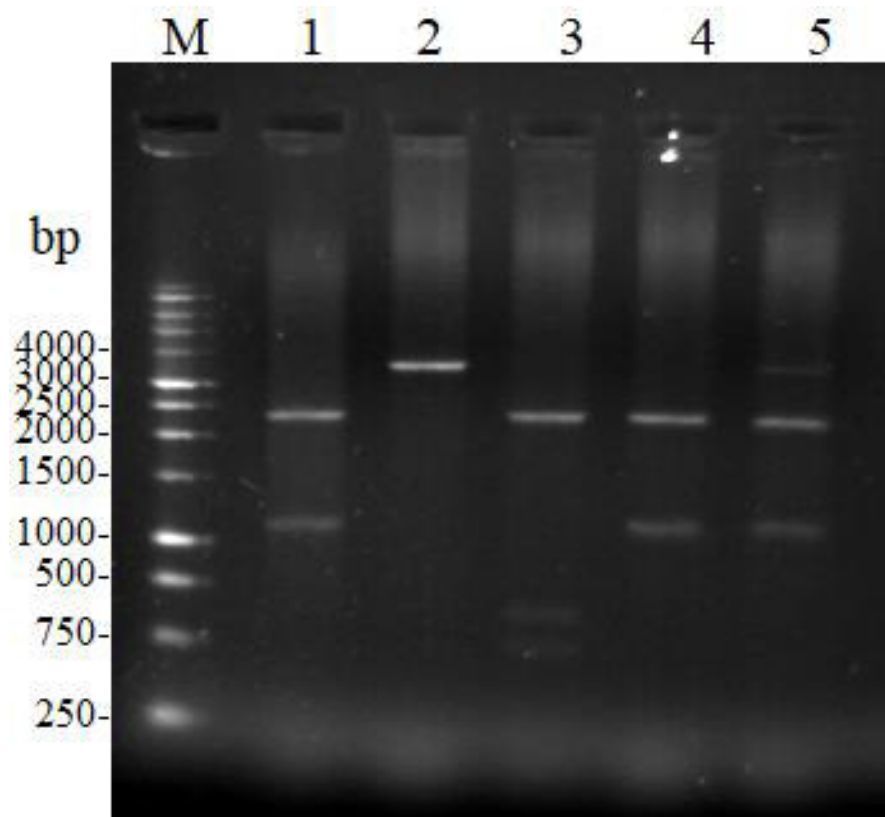


Fonte: Figura do autor

As reações de digestão enzimáticas com as enzimas endonucleases de restrição usando os plasmídeos extraídos apresentaram o resultado mostrado na Figura 5. Na primeira faixa, onde a reação ocorreu utilizando as enzimas BamHI e EcoRI é possível observar duas bandas, uma de aproximadamente 1000 pares de bases, e outra com tamanho entre 2000 bp e 2500 bp. Este mesmo resultado pode ser visualizado nas faixas 4 e 5, onde as reações utilizaram as enzimas Sall e EcoRI, e Sall e XhoI, respectivamente. Esses comprimentos de bandas são esperados pois o plasmídeo pENTR11-DSV apresenta um sítio múltiplo de clonagem com sequências de clivagem para essas enzimas, fazendo com que a sequência de *VuGOX-like* seja separada do restante do plasmídeo. A banda na região próxima a 1000 bp é equivalente a região codificadora do gene *VuGOX-like*, e a banda entre 2000 bp e 2500 bp é equivalente ao plasmídeo sem os genes *ccdB* (gene tóxico para determinadas linhagens de *E. coli*) e *Cm* (gene que codifica uma enzima ligada a resistência a cloranfenicol), removidos após a clivagem pelas enzimas BamHI e EcoRI.

Na faixa 2, onde a reação ocorreu somente com a presença da enzima NotI, é possível observar só uma banda entre 4000 bp e 3000 bp, e a explicação para isso é que o plasmídeo só apresenta um sítio de clivagem para essa enzima e o corte fez com que o plasmídeo saísse de uma conformação circular para uma linear, sem que nenhuma sequência dele fosse excisada e com isso ele manteve o seu tamanho total de aproximadamente 3427 bp. A banda superior mais fraca presente na canaleta 5 também é explicada por isso, uma vez que é um indício de que uma das enzimas não conseguiu reagir com a amostra de DNA completamente, fazendo com que parte do DNA só fosse cortado em um único ponto, como verificado na faixa 2. Já na faixa 3, onde a reação ocorreu com as enzimas BamHI e EcoRV há a presença de duas bandas entre 500 bp e 750 bp, além da banda correspondente ao plasmídeo. Isso é explicado pela presença de um sítio de restrição para EcoRV dentro da região codificadora do gene *VuGOX1-like*, fazendo com que ele seja clivado, e gere duas bandas de tamanhos distintos.

Figura 5 - Gel de agarose 1%, com o resultado de reações de restrição utilizando o plasmídeo pENTR11-DSV-VuGOX1-like. Ordem das amostras: (1) BamHI+EcoRI, (2) NotI, (3) BamHI+EcoRV, (4) Sall+EcoRI, (5) Sall+XhoI.



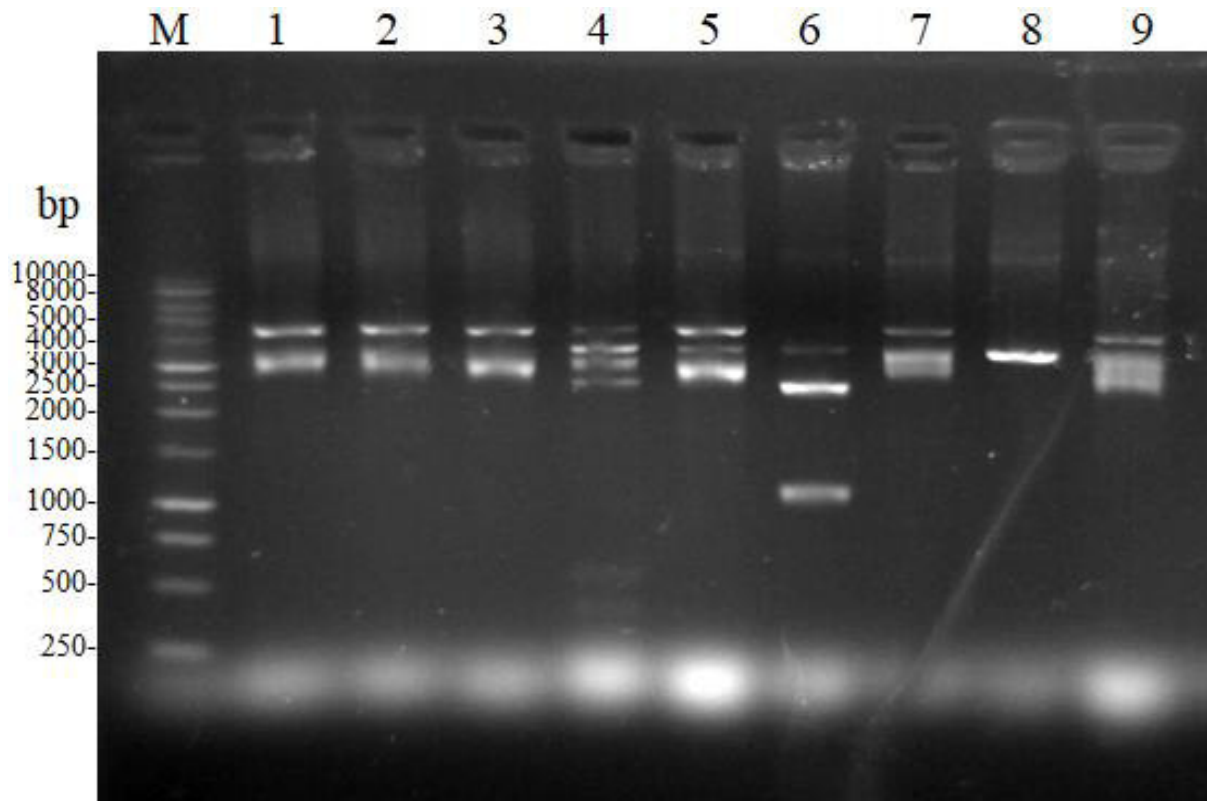
Fonte: Figura do autor

As outras reações usaram enzimas que não possuíam sítios de restrição para o isolamento da região codificadora do gene *VuGOX1-like*. Na figura 6 é possível observar que as faixas 1, 2, 3, 5, 7 e 9 onde as enzimas utilizadas foram SacI, KpnI, HindIII, XbaI, SmaI e BgIII, respectivamente, possuem padrões de bandas semelhantes e eles indicam que as enzimas não clivaram o DNA plasmidial. Nas faixas 1, 3 e 9 isso é explicado pela ausência de sítios de restrição no plasmídeo para as enzimas utilizadas. Já as faixas 2, 5 e 7 possuem um único sítio de restrição, mesmo assim não houve cortes e uma possível explicação para isso é que certas regiões do plasmídeo talvez tenham sido modificadas através de sequências de inserção originadas do genoma da bactéria *Escherichia coli* DH10B (DURFEE *et al*, 2008) o que impediu o reconhecimento pelas enzimas dessas regiões.

Na faixa 4 a enzima PstI possui 3 regiões de corte no plasmídeo, podendo gerar fragmentos de tamanhos 411 bp, 552 bp e 2464 bp. É possível observar bandas que são equivalentes aos fragmentos 411 bp e 552 bp na parte inferior do gel e uma banda equivalente a 2464 bp próxima à altura do marcador 2500 bp. Além disso, é possível observar a presença de uma banda entre 3000 bp e 4000 bp que equivale a plasmídeos que foram cortados em um único ponto e duas outras bandas, uma entre 4000 bp e 5000 bp e outra banda próxima a 3000 bp que provavelmente são plasmídeos na forma circular a qual a enzima não conseguiu reagir em nenhum ponto por se assemelharem ao padrão observado nas faixas onde não ocorreram cortes nos plasmídeos.

Na faixa 6 onde a reação ocorreu somente com a presença da enzima ApaI é possível observar 3 bandas, a explicação para isso é semelhante à da faixa 5 da figura 5, a construção pENTR11-DSV-VuGOX1-like possui 2 sítios de restrição para a enzima fazendo com que o plasmídeo seja cortado em 2 pontos. Isso gera a banda entre 1000 bp e 1500 bp, que coincidentemente possui tamanho semelhante a região codificadora do gene *VuGOX1-like*; a banda entre 2000 bp e 2500 bp equivalente ao resto do plasmídeo; e a banda entre 3000 bp e 4000 bp que equivale a plasmídeos que não reagiram completamente com a enzima e por isso só foram cortados em um único ponto. Na faixa 8 a enzima NheI possui somente um sítio de restrição e, portanto, o plasmídeo só foi cortado em um único ponto, gerando uma única banda na região entre 3000 bp e 4000 bp.

Figura 6 - Gel de agarose 1%, com o resultado de reações de restrição utilizando o plasmídeo pENTR11-DSV-VuGOX1-like. Ordem das amostras: (1) SacI, (2) KpnI, (3) HindIII, (4) PstI, (5) XbaI, (6) ApaI, (7) SmaI, (8) NheI, (9) BgIII.



Fonte: Figura do autor

Os resultados obtidos são similares às simulações utilizando a ferramenta on-line NEBcutter, que simula reações de clivagem por enzimas de restrição, o que demonstra que a clonagem da região codificadora do gene *VuGOX1-like* foi realizada com sucesso, e que ele está pronto para ser transferido para diferentes plasmídeos de expressão.

3. CONCLUSÃO

Os resultados das reações de PCR e as reações com as enzimas de restrição confirmaram a construção de DNA contendo a região codificadora de *VuGOX1-like* no plasmídeo pENTR11-DSV nas bactérias originadas do clone G1 de *Escherichia coli* DH10B. Além disso, a resistência das bactérias de *E. coli* ao antibiótico canamicina também certificou a presença do gene de resistência específico do vetor pENTR11-DSV. Resta atestar a completa integridade da região codificadora do gene *VuGOX1-like* a partir de ensaios de sequenciamento de DNA, o qual está sendo encaminhado no presente momento.

REFERÊNCIAS

- AJETOMOBI, J; A ABIODUN. Climate change impacts on cowpea productivity in Nigeria. **African Journal Of Food, Agriculture, Nutrition And Development**, [S.L.], v. 10, n. 3, 28 abr. 2010. African Journals Online (AJOL).
<http://dx.doi.org/10.4314/ajfand.v10i3.54082>.
- BOOKER, H. M.; UMAHARAN, P.; MCDAVID, C. R. Effect of Cowpea severe mosaic virus on Crop Growth Characteristics and Yield of Cowpea. **Plant Disease**, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 515-520, maio 2005. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-89-0515>.
- BOUKAR, Ousmane; BELKO, Nouhoun; CHAMARTHI, Siva; TOGOLA, Abou; BATIENO, Joseph; OWUSU, Emmanuel; HARUNA, Mohammed; DIALLO, Sory; UMAR, Muhammed Lawan; OLUFAJO, Olusoji. Cowpea (*Vigna unguiculata*): genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, [S.L.], v. 138, n. 4, p. 415-424, 9 maio 2018. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/pbr.12589>.
- CARVALHO, Márcia; CASTRO, Isaura; MOUTINHO-PEREIRA, José; CORREIA, Carlos; EGEE-CORTINES, Marcos; MATOS, Manuela; ROSA, Eduardo; CARNIDE, Valdemar; LINO-NETO, Teresa. Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. **Journal Of Plant Physiology**, [S.L.], v. 241, p. 153001, out. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153001>.
- CUI, Li-Li; LU, Yu-Sheng; LI, Yong; YANG, Chengwei; PENG, Xin-Xiang. Overexpression of Glycolate Oxidase Confers Improved Photosynthesis under High Light and High Temperature in Rice. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 7, 4 ago. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01165>.
- DURFEE, Tim; NELSON, Richard; BALDWIN, Schuyler; PLUNKETT, Guy; BURLAND, Valerie; MAU, Bob; PETROSINO, Joseph F.; QIN, Xiang; MUZNY, Donna M.; AYELE, Mulu. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 190, n. 7, p. 2597-2606, abr. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01695-07>
- GOODSTEIN, David M.; SHU, Shengqiang; HOWSON, Russell; NEUPANE, Rochak; HAYES, Richard D.; FAZO, Joni; MITROS, Therese; DIRKS, William; HELLSTEN, Uffe;

PUTNAM, Nicholas. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1178-1186, 22 nov. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr944>

JAYATHILAKE, Chathuni; VISVANATHAN, Rizliya; DEEN, Afka; BANGAMUWAGE, Ruksheela; JAYAWARDANA, Barana C; NAMMI, Srinivas; LIYANAGE, Ruvini. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 98, n. 13, p. 4793-4806, 30 jun. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9074>

KEBEDE, Erana; BEKEKO, Zelalem. Expounding the production and importance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Ethiopia. **Cogent Food & Agriculture**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1769805, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2020.1769805>.

OMOMOWO, Olawale Israel; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Constraints and Prospects of Improving Cowpea Productivity to Ensure Food, Nutritional Security and Environmental Sustainability. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 12, 22 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.751731>.

PANDEY, Prachi; RAMEGOWDA, Venkategowda; SENTHIL-KUMAR, Muthappa. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 6, 16 set. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00723>.

ROQUE, Erica Monik Silva. **ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DA FAMÍLIA DE GENES GLICOLATO OXIDASE (GOX) EM PLANTAS E PERFIL DE EXPRESSÃO DE *VuGOX1* DURANTE ESTRESSE BIÓTICO EM *Vigna unguiculata* [L.] Walp.** 2022. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

SINGH, Bharat. Origin, Distribution and Importance. *In*: SINGH, Bharat. **Cowpea: The Food Legume of the 21st Century**. [S. l.]: Crop Science Society of America, 2020. cap. 1.

SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

VILLETH, Gabriela R. C.; CARMO, Lilian S. T.; SILVA, Luciano P.; FONTES, Wagner; GRYNBERG, Priscila; SARAIVA, Mario; BRASILEIRO, Ana C. M.; CARNEIRO, Regina

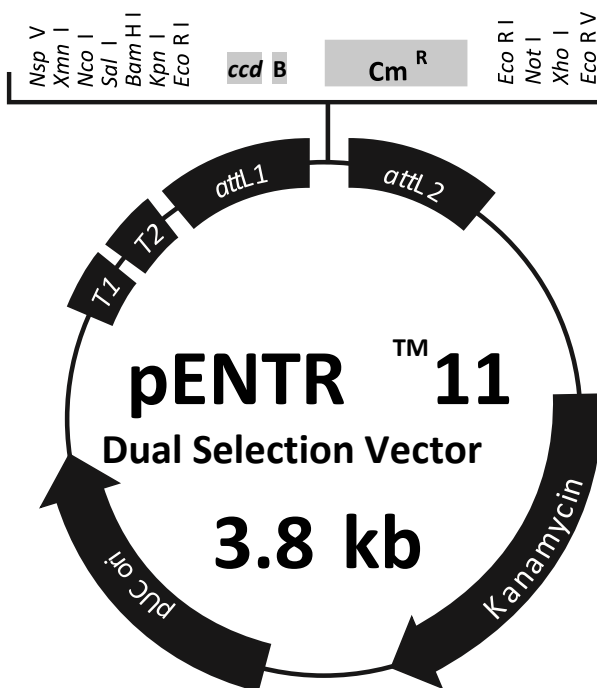
M. D.; OLIVEIRA, José T. A.; GROSSI-DE-SÁ, Maria F. Cowpea-Meloidogyne incognita interaction: root proteomic analysis during early stages of nematode infection. **Proteomics**, [S.L.], v. 15, n. 10, p. 1746-1759, 17 abr. 2015. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201400561>.

VINCZE, T. NEBcutter: a program to cleave dna with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 31, n. 13, p. 3688-3691, 1 jul. 2003. Oxford University Press (OUP).

<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg526>.

ANEXO A - MAPA DO VETOR pENTR11 -DUAL SELECTION VECTOR



Comments for pENTRTM11 3781 nucleotides

rrnB T1 transcription termination sequence: bases 106-

149 *rrnB T2* transcription termination sequence: bases

281-308 *attL1*: bases 358-457 (complementary strand)

ccdB gene: bases 570-872 (complementary strand)

Chloramphenicol resistance gene (*Cm^R*): bases 1217-1872 (complementary strand)

attL2: bases 2010-2109

Kanamycin resistance gene: bases 2232-3041

pUC origin: bases 3105-3778

 **invitrogen**TM

ANEXO B - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO VETOR PENTR11-DUAL SELECTION VECTOR:

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTAGCATGGATC
TCGGGGACGTCTAACTACTAAGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAA
ACGAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGA
ACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGTGAAGCA
ACGGCCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAAC
TAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTCCTG
TTAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTG
ACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTA
CAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCAATTCTCTAAGGAAATACTTAAC
CATGGTCGACTGGATCCGGTACCGAATTCGTCGACCTGCAGACTGGCTGTGTATA
AGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGATGT
CATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTCCCCGATAACGGAGACCGGCAC
ACTGGCCATATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCACCACC
GGGTAAAGTTCACGGGGGACTTTATCTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGG
ATCACCATCCGTCGCCCCGGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACA
GACGATAACGGCTCTCTTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCATTTACCAGCC
CCTGTTCTCGTCAGCAAAAGAGCCGTTCAATTAATAAACCGGGCGACCTCAGCC
ATCCCTTCCTGATTTTCCGCTTTCAGCGTTCGGCACGCAGACGACGGGCTTCATT
CTGCATGGTTGTGCTTACCAGACCGGAGATATTGACATCATATATGCCTTGAGCA
ACTGATAGCTGTGCTGTCAACTGTCACTGTAATACGCTGCTTCATAGCATAACCTC
TTTTTGACATACTTCGGGTATACATATCAGTATATATTCTTATACCGCAAAAATCA
GCGCGCAAATACGCATACTGTTATCTGGCTTTTAGTAAGCCGGATCCTCTAGATT
ACGCCCCGCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGA
CATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCA
CCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTT
GTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCT
GAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTTCAC
CGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGGAAATCGTCGTG
GTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGAAAACGGTGTA
CAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGGA
ATTCCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAA
ACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACG
GTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTAC
GATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTA
GCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACGGATCCTAACTCAAAATCCACACATTAT
ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGCGGCCGCGAATT
CGCGGCCGCACTCGAGATATCTAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCATTAT
AAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCATCATCAGTCAAAAT
AAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGAT
GTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTA
CATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAG
GCCGCGATTAAATCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGC
GATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATG
CGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGA
TGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAG
CATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGAAA

AACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGAT
GCGCTGGCAGTGTTCCCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTT
TAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGT
TTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAG
TCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCCGGATTCAGTCGTCACATCAT
GGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTAT
TGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGG
AACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGG
TATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTT
TCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACATTATTCAGATTGGGCCCCCGTTCCAC
TGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT
GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGT
TTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAG
CGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
GAACTCTGTAGCACCCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
GGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT
GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG
CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT
CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA
TAGTCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGT
CAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT
GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

ANEXO C – SEQUÊNCIA DA REGIÃO CODIFICADORA DE VUGOX1-LIKE*

ATGGGGGAGATCACCAATGTCAGTGAGTATGAGGCTATTGCAAAGCAGAAATTA
 CCAAAGATGGTGTGTTGACTACTACGCATCTGGTGCAGAGGACCAGTGGACTCTGC
 AAGAGAACAGAAATGCCTTTTCCAGAATTTTGTTCGGCCTCGTATTCTTATTGAT
 GTGAGCAAGATAGACATGACAACCACTGTCTTGGGCTTCAAATATCCATGCCAA
 TCATGATTGCCCAACAGCCATGCAGAAAATGGCTCATCCAGAGGGAGAATATG
 CCACAGCAAGAGCTGCCTCTGCAGCTGGAACAATCATGACTTTGTCTTCGTGGGC
 CACTTCAAGTGTGGAAGAGGTGGCTTCAACAGGACCTGGCATTTCGCTTTTCCAG
 CTATATGTGTACAAGGACAGGAATGTGGTTGCTCAGCTTGTGAGAAGAGCTGAAA
 GGGCTGGATTCAAAGCCATTGCCCTTACAGTTGATACCCAAGACTAGGACGCAG
 AGAAGCT **GATATC** AAGAACAGATTCACACTGCCACCGTTTTTGACCTTGAAGAAC
 TTTGAAGGATTGGACCTTGGAAAGATGGACAAAGCTGATGATTCTGGACTTGCTT
 CATATGTTGCTGGTCAAATTGATCGCACTCTAAGCTGGCAGGATGTGAAGTGGCT
 TCAAACAATCACCACTCTGCCAATTCTGGTGAAGGGTGTGCTGACTGCAGAGGAC
 ACTAGGATAGCTGTACAAAGTGGTGCAGCAGGAATTATAGTGTCCAATCATGGA
 GCCAGACAACCTTGACTATGTTCCAGCCACCATATCAGCATTAGAAGAGGTTGTCA
 AAGCTGCTGAAGGTCGTCTTCCTGTTTTTTTTGGATGGTGGAGTTCGCCGTGGA
 ACTGATGTCTTCAAGGCATTGGCACTAGGTGCCTCTGGCATATTTATTGGACGCCCTGT
 GGTGTTCTCCTTGGCTGCTGAAGGAGAGGCTGGTGTAAAGAAAAGTGTTCAGATG
 CTACGTGAAGAGTTTGAGCTAACCATGGCATTGAGCGGTTGTCGTTCACTAAAGG
 AAATCACTCGTGATCACATTGTGACCGATTGGGACCAGCCTCGCGTTCAGCCTCG
 CGTCCGTGCGTTGTTGTGA

Sítio de restrição da enzima EcoRV grifado em vermelho*