

Sequências Nucleotídicas Capazes de Conferir Tolerância ao Frio e/ou ao Congelamento em *Eucalyptus* e *Arabidopsis*

Daniel Barletta Sulis & Giancarlo Pasquali

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal – Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências e Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Mirtaceae e é composto em sua maioria por arbóreas florestais. Entre as principais espécies deste gênero, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. globulus* e híbridos destes apresentam destaque na produção de papel e pastas de celulose. Entretanto, as baixas temperaturas registradas no inverno da região sul do Brasil e a ausência de tolerância ao frio e/ou ao congelamento na maioria das espécies de *Eucalyptus* limitam o crescimento e o desenvolvimento de plantas deste gênero. Frente a estas limitações, buscamos na literatura genes potencialmente capazes de conferir tolerância às baixas temperaturas com vistas a testá-los em plantas modelo e em *Eucalyptus*. Linhagens híbridas de *E. urophylla* x *E. globulus* têm demonstrado resultados promissores em relação à transformação genética mediada por agrobactérias e ao processo de regeneração *in vitro*. Além destas, plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* estão sendo utilizadas para avaliar o potencial dos genes em conferir a tolerância pretendida.

OBJETIVOS

Obtenção de plantas transgênicas de *E. urophylla* x *E. globulus* expressando genes potencialmente capazes de conferir a tolerância ao frio e/ou ao congelamento. Plantas de *A. thaliana* e *N. tabacum*, por se tratarem de plantas-modelo, também serão transformadas para avaliar o potencial dos genes em relação à tolerância pretendida.

METODOLOGIA

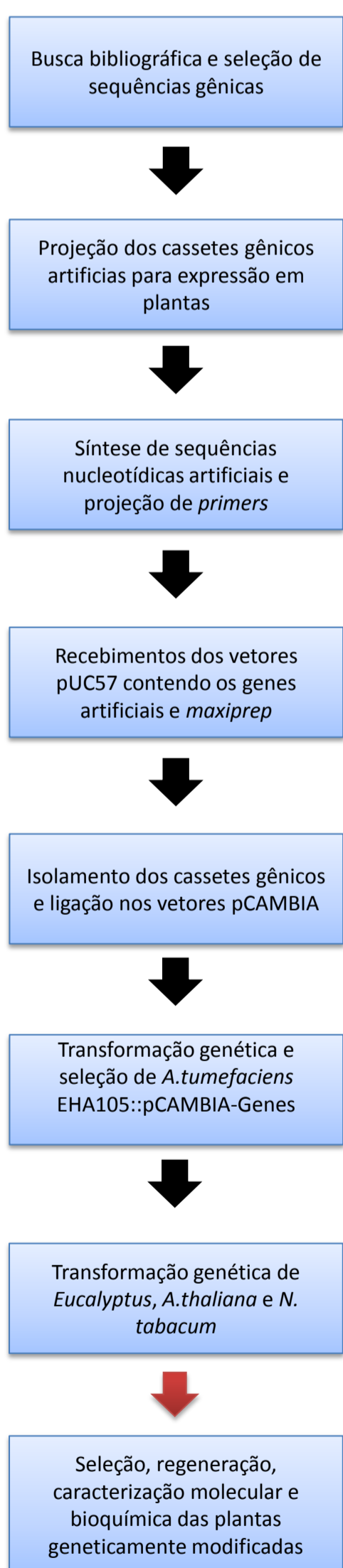


Figura 1. Fluxograma das etapas do projeto em desenvolvimento. A seta em cor vermelha representa a atual etapa deste projeto.

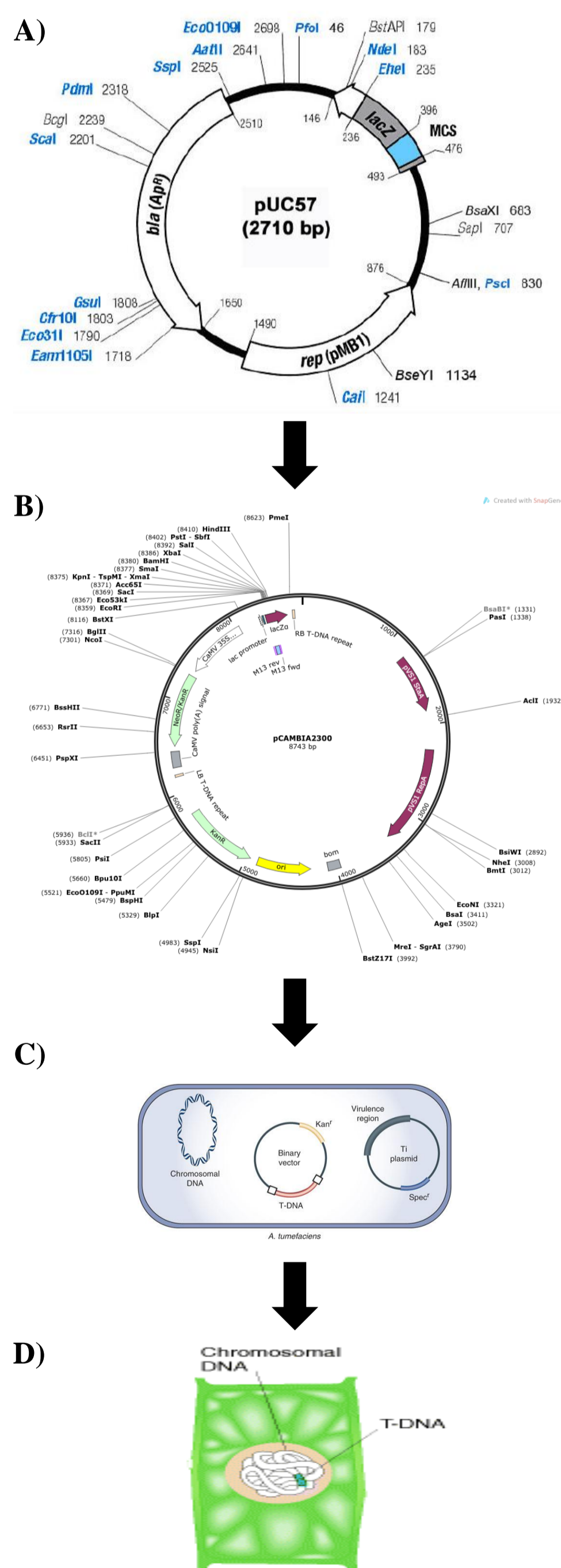


Figura 2. Etapas de clonagem molecular e transformação genética de plantas. A) Vetor de clonagem molecular pUC57. B) Vetor binário de expressão pCAMBIA2300. C) Célula de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo binário de expressão. D) Célula vegetal contendo os genes de interesse inseridos no genoma.

RESULTADOS

Após robusta busca bibliográfica, foram definidas as regiões promotoras, codificadoras de proteínas e terminadoras para compor os genes artificiais. Como demonstrado na Figura 3, as sequências gênicas foram organizadas em dois cassetes de expressão.

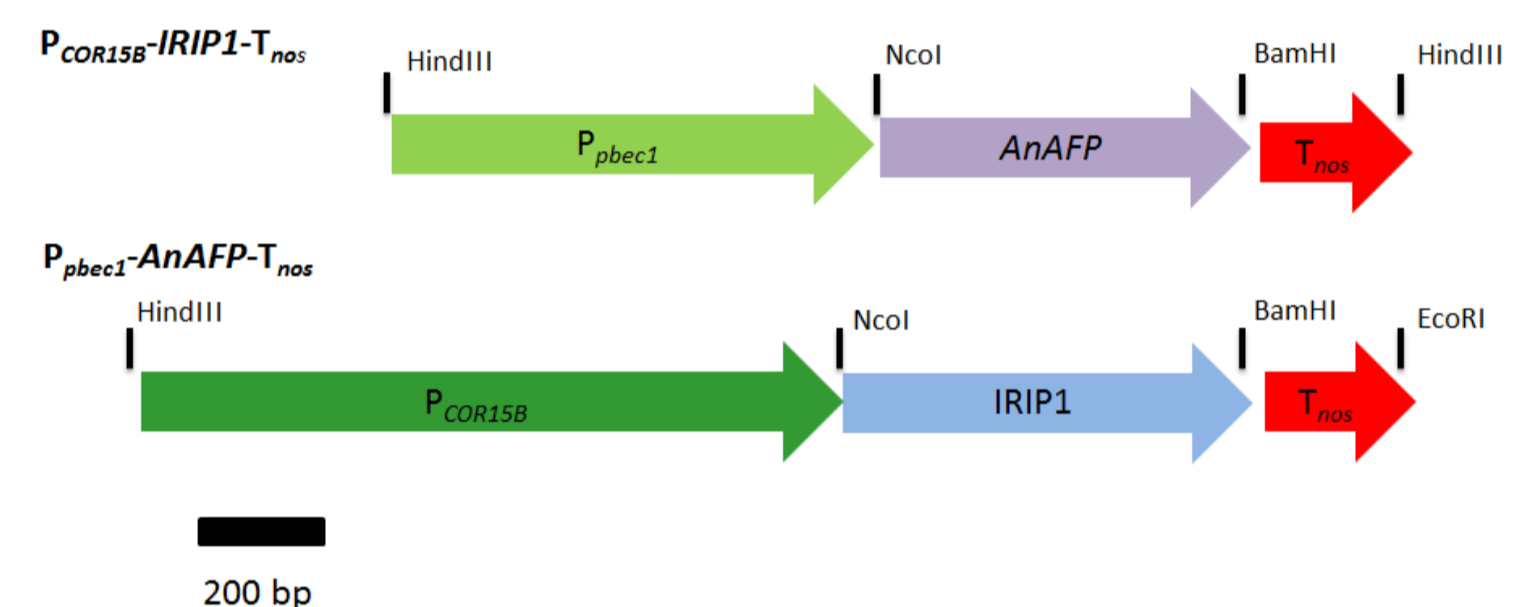


Figura 3. Representação dos cassetes gênicos de expressão P_{pbec1} -AnAFP-Tnos e P_{cor15B} -IRIP1-Tnos.

Os cassetes P_{Cor15B} -IRIP1-Tnos e P_{pbec1} -AnAFP-Tnos foram isolados do vetor pUC57 utilizando-se a enzima de restrição HindIII e a combinação entre as enzimas HindIII e EcoRI, respectivamente. Paralelamente, os vetores binários de expressão pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 foram clivados com as mesmas enzimas referidas acima (Figura 4).

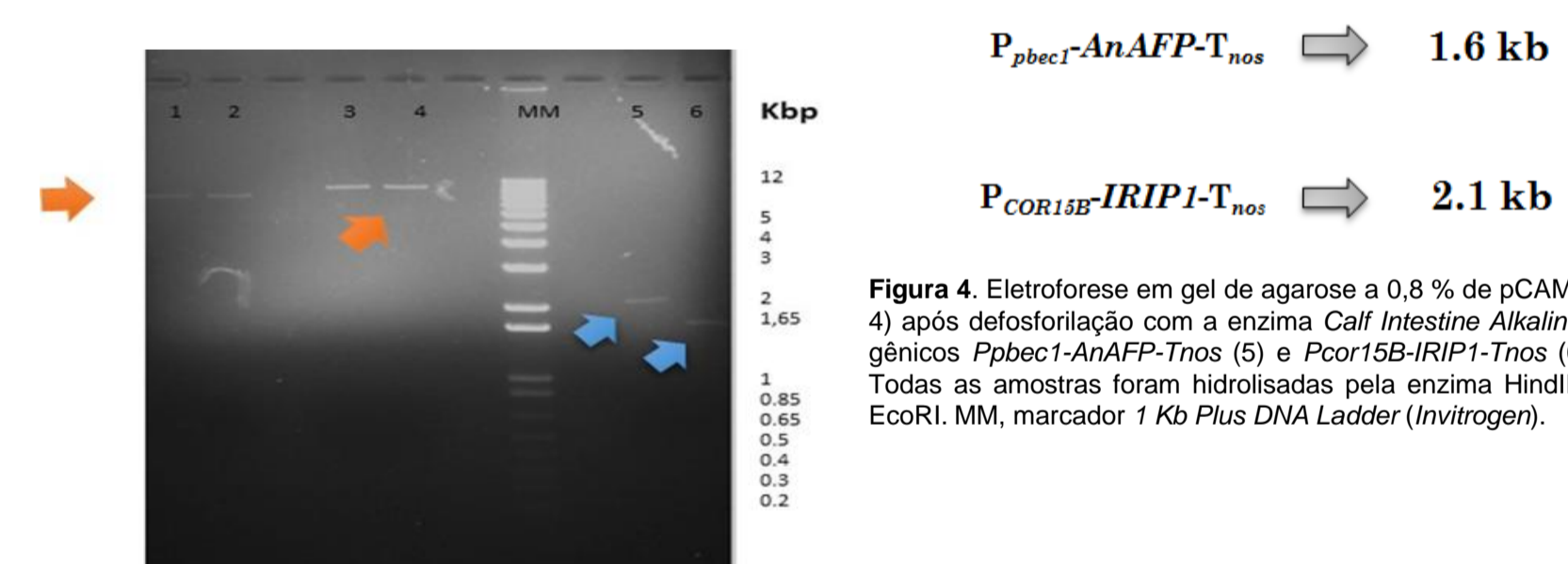


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de pCAMBIA1300 (1 e 2) e pCAMBIA2300 (3 e 4) após defosforilação com a enzima *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (Promega) e cassetes gênicos P_{pbec1} -AnAFP-Tnos (5) e P_{cor15B} -IRIP1-Tnos (6) purificados de pUC57 (GenScript). Todas as amostras foram hidrolisadas pela enzima HindIII ou com a combinação de HindIII e EcoRI. MM, marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Os cassetes gênicos foram ligados pela enzima T4 DNA ligase aos vetores binários da série pCAMBIA (Figura 5). Células de *A. tumefaciens* EHA105 foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por choque térmico e utilizadas para a transformação genética de *A. thaliana* e *N. tabacum* (Figura 6).

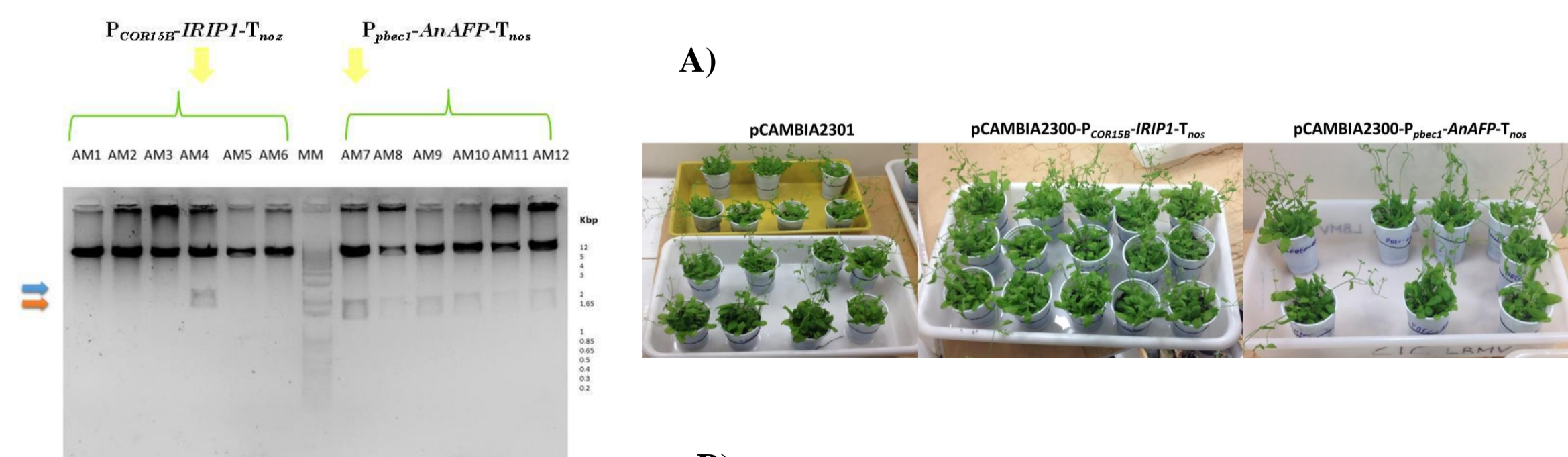


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de amostras plasmidiais de pCAMBIA2300- P_{cor15B} -IRIP1-Tnos (AM1 a AM6) e pCAMBIA2300- P_{pbec1} -AnAFP-Tnos (AM7 a AM12). As amostras foram hidrolisadas pela enzima HindIII ou com a combinação de HindIII e EcoRI. MM, Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As setas em azul e laranja indicam bandas de DNA referentes aos cassetes gênicos (1,6 e 2,1 kb) esperados. As setas em amarelo indicam os plasmídeos recombinantes positivos selecionados e cujas sequências foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

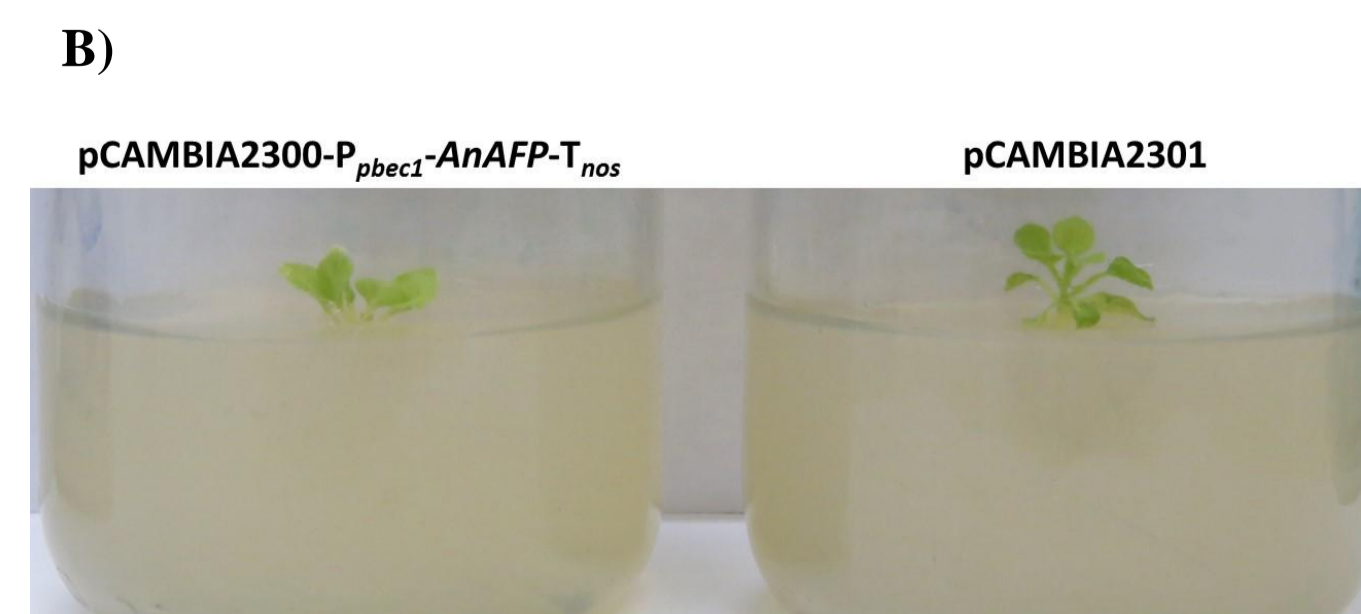


Figura 6. Plantas de *A. thaliana* após o processo de transformação genética (A) e de *N. tabacum* em processo de seleção e regeneração das plantas geneticamente modificadas (B).

PRÓXIMOS PASSOS

1. Regeneração e seleção das plantas geneticamente modificadas.
2. Caracterização molecular das plantas geneticamente modificadas por PCR, RT-qPCR e AFLP.
3. Ensaios para averiguar a aquisição de maior tolerância ao frio.
4. Transformação, regeneração, seleção e caracterização de plantas transgênicas de *E. urophylla* x *E. globulus*.