

PROJETO GENOLYPTUS E O SEQÜENCIAMENTO DO TRANSCRIPTOMA DE EUCALYPTUS: PRIMEIRO GRUPO DE BIBLIOTECAS DE EXPRESSÃO.

Rochele Patricia Kirch, Daniela Müller Kurban, Adriane Klamt, Rosana Vianello Brondani, Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Sérgio Hermínio Brommoschenkel, Júlio César de Mattos Cascardo, Giancarlo Pasquali (orient.) (Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS).

O objetivo central do Projeto “GENOLYPTUS: Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de Eucalyptus” é o descobrimento, o seqüenciamento, o mapeamento e a determinação da função de genes de importância econômica de diferentes espécies de Eucalyptus, visando a incorporação de tecnologias de genética genômica nos programas de melhoramento e produção florestal. O Subprojeto “Seqüenciamento do Transcriptoma de Eucalyptus” intitula o trabalho maciço e sistemático de seqüenciamento de 150.000 clones de cDNA a partir de diversas bibliotecas de expressão, algumas delas normalizadas. O objetivo é a identificação de todos os estimados 25 a 30 mil genes do eucalipto, com ênfase especial em genes envolvidos na formação da madeira. O primeiro grupo de oito bibliotecas de expressão foi construído a partir de mRNA extraído de tecidos de *E. grandis* (folhas jovens, folhas totalmente expandidas, flores inteiras, plântulas inteiras e xilema), além de xilema de *E. pellita*, *E. globulus* e *E. urophylla*. Três diferentes métodos de extração de RNA total foram avaliados e os melhores resultados renderam quantidades médias de 300 (g de RNA total e de ótima qualidade, conforme medidas espectrofotométricas e visualização em géis de agarose após eletroforese. Dois métodos de purificação de mRNA foram avaliados, obtendo-se quantidades de 0, 5 a 5 (g de mRNA entre os diferentes tecidos. A síntese de cDNA e a ligação ao vetor pSPORT1 (Invitrogen) rendeu bibliotecas primárias (não amplificadas) com títulos que variaram de $3,6 \times 10^4$ a $8,5 \times 10^6$ ufc/(g de vetor. Os tamanhos de insertos variaram de 500 a 2.300 pb, com tamanhos médios de 1.300 pb para a maioria dos clones. O seqüenciamento automático e a análise das seqüências geradas revelaram que todas as bibliotecas construídas, com exceção da biblioteca de flores de *E. grandis*, apresentaram baixíssimos índices de vetores vazios e redundância. Essas bibliotecas foram validadas para o seqüenciamento maciço pelos diferentes grupos participantes. A biblioteca de flores foi invalidada e será reconstruída. (CNPq-Proj. Integrado).