

IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DE PROMOTORES RAIZ-ESPECÍFICOS DE EUCALIPTO

Renata Lúcia Grunennvaldt¹, Daniele Cristina Kael², Juliana Degenhardt³, Marguerite Quoirin¹, Isabel Rodrigues Gerhardt^{3, 4}

¹Universidade Federal do Paraná
Curitiba – Paraná - E-mail: regrunennvaldt@gmail.com

²Universidade Tuiuti do Paraná
Curitiba – Paraná

³EMBRAPA Florestas
Colombo – Paraná

⁴UMIP GenClima
Campinas – SP

RESUMO

A utilização de promotores tecido-específicos é uma das principais estratégias para direcionar a expressão de transgenes a determinados órgãos ou tipos celulares. Por isso, o objetivo deste trabalho foi a clonagem de promotores raiz-específicos, a partir de dados de RNA-Seq obtidos de bibliotecas de raiz, xilema e folha de eucalipto. Dois genes com padrão de expressão preferencial em raiz foram inicialmente selecionados para isolamento da região promotora. Fragmentos de 1kb foram clonados em vetor binário pCAMBIA2301, fusionados ao gene repórter da beta-glucuronidase (GUS), para transformação de Populus tremula x Populus alba via Agrobacterium tumefaciens.

Palavras-chave: promotor raiz-específico; eucalipto; GUS

INTRODUÇÃO

Uma das estratégias para obtenção de plantas com características desejadas é a introdução de genes de interesse via transformação genética. Tecnologias transgênicas permitem a incorporação de genes capazes de alterar e aprimorar características de interesse econômico, como alta produção de biomassa, resistência a doenças e qualidade da madeira em espécies florestais, de maneira rápida e com a mínima alteração do genoma.¹

A identificação e caracterização de promotores órgão-específicos ou estímulo-dependentes representa uma prioridade entre as ferramentas moleculares. Os promotores podem ser usados em construções gênicas que visam à produção de variedades comerciais, nas quais a expressão generalizada do transgene na planta muitas vezes não é desejada.²

O objetivo deste trabalho foi isolar e clonar promotores raiz-específicos de *Eucalyptus* spp., visando seu uso em construções gênicas para a geração de plantas transgênicas tolerantes a estresses abióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

As estratégias de RNA-Seq e análise de expressão diferencial de genes foram utilizadas para avaliar as sequências produzidas a partir de bibliotecas de cDNA de raiz, caule e folha de



III SIMBBTEC
Londrina 2013

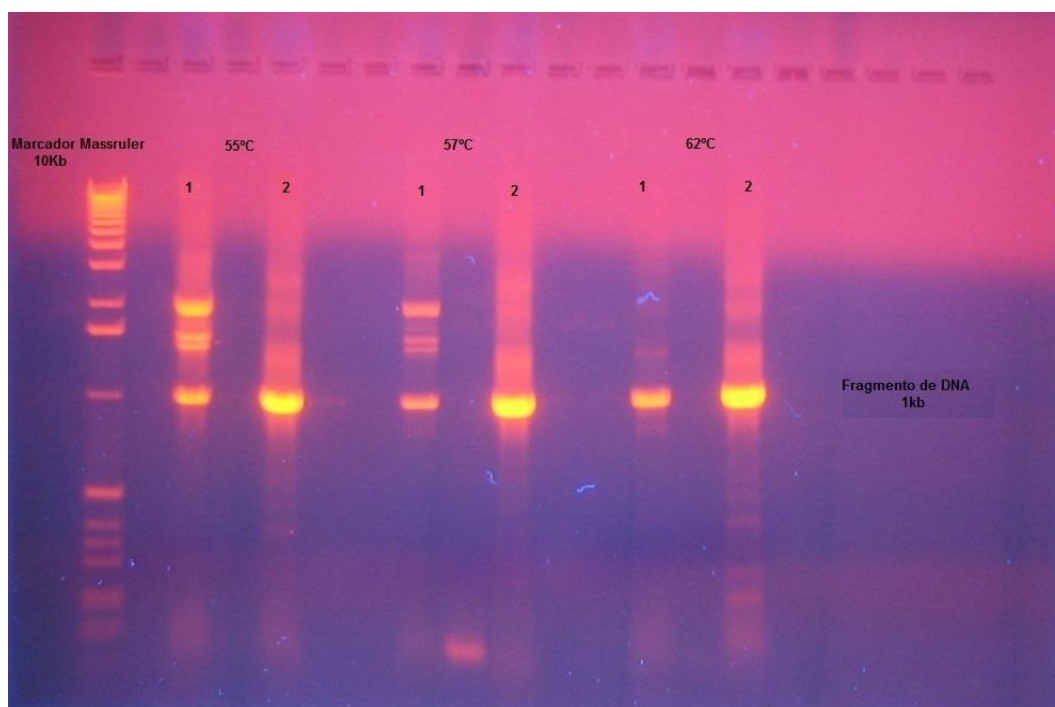
Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

diferentes genótipos de eucalipto. Dois genes com expressão preferencial em raiz foram selecionados, dos quais amplificou-se 1 kb da região promotora a partir do DNA extraído de folha de eucalipto pelo método CTAB³. As regiões amplificadas foram clonadas primeiramente em plasmídeo pGEM-T Easy (Invitrogen) para posterior inserção no plasmídeo pCAMBIA2301, vetor binário de transformação de plantas que contém o gene repórter *GUS*, a partir de sua digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de otimizar as condições para isolar a região promotora dos genes selecionados, reações de PCR em gradiente foram realizadas, testando-se diferentes temperaturas de anelamento. De acordo com a Figura 1, observa-se que a melhor temperatura foi a de 62°C, na qual obteve-se a amplificação das regiões promotoras dos dois genes, com menor produção de bandas inespecíficas.

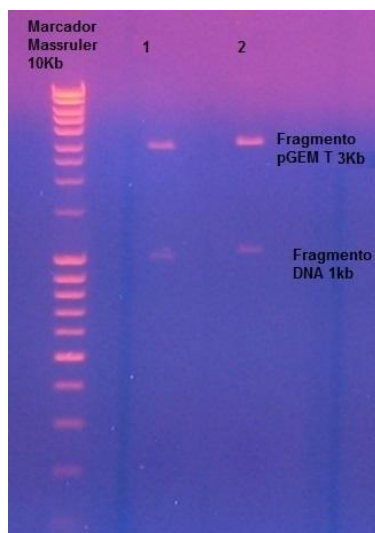
Figura 1: Gel de agarose 1% das reações de PCR em gradiente, mostrando as diferentes temperaturas de anelamento utilizadas. 1: Promotor A; 2: Promotor B.



Depois de amplificadas, as regiões promotoras (com sítios de restrição *EcoRI* e *BglII* flanqueando as extremidades dos fragmentos) foram clonadas em vetor pGEM-T Easy para posterior inserção no plasmídeo pCAMBIA2301. O plasmídeo pCambia2301 é um vetor binário que apresenta o gene de seleção de plantas *NPTII* (resistência ao antibiótico canamicina) e também o gene repórter *UIDA* (*GUS*) sob o controle do promotor constitutivo 35S. Para liberar o fragmento correspondente à região do promotor 35S e, dessa forma, permitir que a região promotora específica de raiz seja inserida no seu lugar, o pCAMBIA2301 foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII*.

O vetor pGEM-T Easy, contendo as regiões promotoras específicas de raiz, foi digerido com as mesmas enzimas *EcoRI* e *BglII*, a fim de liberar o fragmento de 1Kb. Conforme observa-se na Figura 2 houve a liberação do fragmento de 1kb referente à região promotora dos dois genes selecionados.

Figura 2: Gel de agarose 0,7% da digestão do pGEM-T Easy com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII*, para liberação do fragmento de 1kb correspondente a região promotora específica de raiz. 1: Promotor A; 2: Promotor B.



O plasmídeo pCAMBIA2301 e as regiões promotoras específicas de raiz foram utilizados na reação de ligação. O vetor contendo o inserto foi então utilizado diretamente para transformação de *E. coli* TOP 10, por eletroporação. As colônias selecionadas tiveram o DNA plasmidial isolado e digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII*, para a confirmação da inserção da região promotora. Após sequenciamento, os vetores serão usados na transformação de *Populus tremula x Populus alba* via *Agrobacterium tumefaciens*.

CONCLUSÕES

Os objetivos originalmente propostos (isolamento das regiões promotoras e construção de um cassete de expressão contendo os promotores específicos de raiz em fusão com gene repórter *GUS*) foram alcançados, o que permitirá a transformação de plantas de *Populus* via *Agrobacterium tumefaciens* para comprovação da tecido-especificidade dos promotores isolados.

REFERÊNCIAS

- (1) GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E.grandis x urophylla* via *Agrobacterium***. 2002. 107f. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas) Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.



Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia
Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

- (2) RIBEIRO, C.L. **Caracterização molecular de um promotor raiz-específico de eucalipto**. 2009. 53f. Trabalho de Conclusão (Bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu.
- (3) Chang S., Puryear J., Cairney J. **A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees**. Plant Molecular Biology Reporter 11: 113-116. 1993.