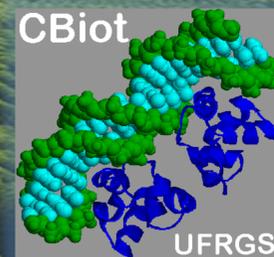


Sequências Nucleotídicas Capazes de Conferir Tolerância ao Frio e/ou ao Congelamento em Plantas de *Eucalyptus globulus* e *Arabidopsis thaliana*

Daniel Barletta Sulis¹, Giancarlo Pasquali¹

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

Eucalyptus globulus é uma espécie arbórea florestal natural da Austrália que, atualmente, está amplamente disseminada e cultivada por diversas regiões do mundo para a produção de celulose e papel. No Brasil, esta espécie e seus híbridos encontram-se principalmente nos estados da região sul. Além da produção de papel e celulose, híbridos de *E. globulus* são utilizados na produção de *pellets* (carvão), pisos e laminados, na construção civil e na indústria moveleira. Empresas fortes do setor têm elevado seus plantios de *Eucalyptus*, uma vez que resultados melhores vêm sendo apresentados a cada ano. Entretanto, devido ao clima frio da região sul do Brasil, as variedades desta arbórea apresentam deficiências em relação ao crescimento e, conseqüentemente, perda de massa. Atualmente, há um número bastante reduzido de protocolos de transformação genética e de regeneração de plantas transgênicas de *Eucalyptus* disponíveis na literatura científica. Assim, o desenvolvimento de linhagens de *Eucalyptus* tolerantes ao frio e/ou ao congelamento é extremamente importante.

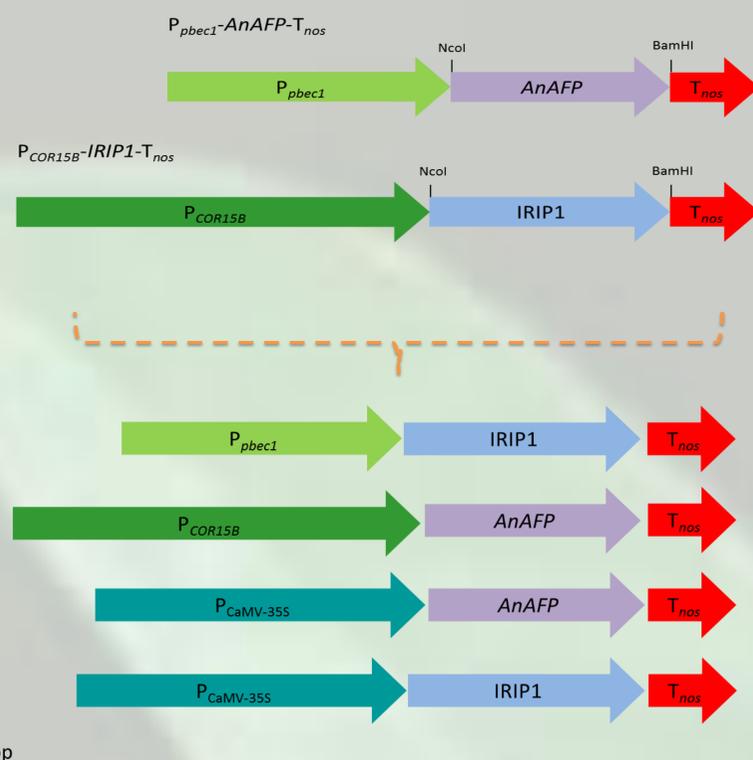
OBJETIVO

É objetivo principal a obtenção de plantas transgênicas de *E. globulus* expressando genes potencialmente capazes de conferir a tolerância ao frio/congelamento. Plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana benthamiana*, por se tratarem de modelos, também serão transformadas para avaliar o potencial dos genes em relação à tolerância pretendida.

METODOLOGIA

Com base em ampla bibliografia, duas potenciais sequências codificadoras de proteínas relacionadas à tolerância ao frio foram escolhidas para compor cassetes gênicos de expressão, além de duas regiões promotoras descritas como responsivas ao frio e uma região terminadora. As sequências codificadoras escolhidas foram a dos genes *IRIP4* e *AnAFP* derivados de *Deschampsia antarctica* e *Ammopiptanthus nanus*, respectivamente. As regiões promotoras escolhidas foram *COR15B* e *Ppbec1* derivadas de *A. thaliana* e *Prunus persica*. A sequência terminadora para os cassetes de expressão foi a região 3'-nos da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*. Foram assim definidos dois cassetes de expressão para síntese: P_{COR15B} -*IRIP1*- T_{nos} e P_{pbec1} -*AnAFP*- T_{nos} . Foram adicionados sítios de reconhecimento e clivagem das enzimas de restrição NcoI e BamHI nas regiões 5' e 3', respectivamente, das sequências codificadoras, sendo eliminados quaisquer outras sequências de restrição equivalentes. Os cassetes gênicos assim projetados foram encaminhados à empresa *GenScript* (EUA) para síntese. Após recebimento dos cassetes de expressão clonados no vetor pUC57, as sequências codificadoras e promotoras serão recombinadas como indicado na Figura 1. Posteriormente, como representado na Figura 2, as construções serão transferidas de pUC57 para pENTR/D-TOPO (Invitrogen) e recombinadas com pKGW (VBI) para a transformação de *A. tumefaciens* e, finalmente, das plantas *A. thaliana*, *N. benthamiana* e *E. globulus*.

RESULTADOS



200 bp

Figura 1. Representação dos cassetes de expressão definidos que serão usados para transformação das plantas de *A. thaliana*, *N. benthamiana* e *E. globulus*. Os dois cassetes apresentados no topo da figura foram sintetizados pela *GenScript* e recebidos para as etapas seguintes de clonagem.

PRÓXIMOS PASSOS

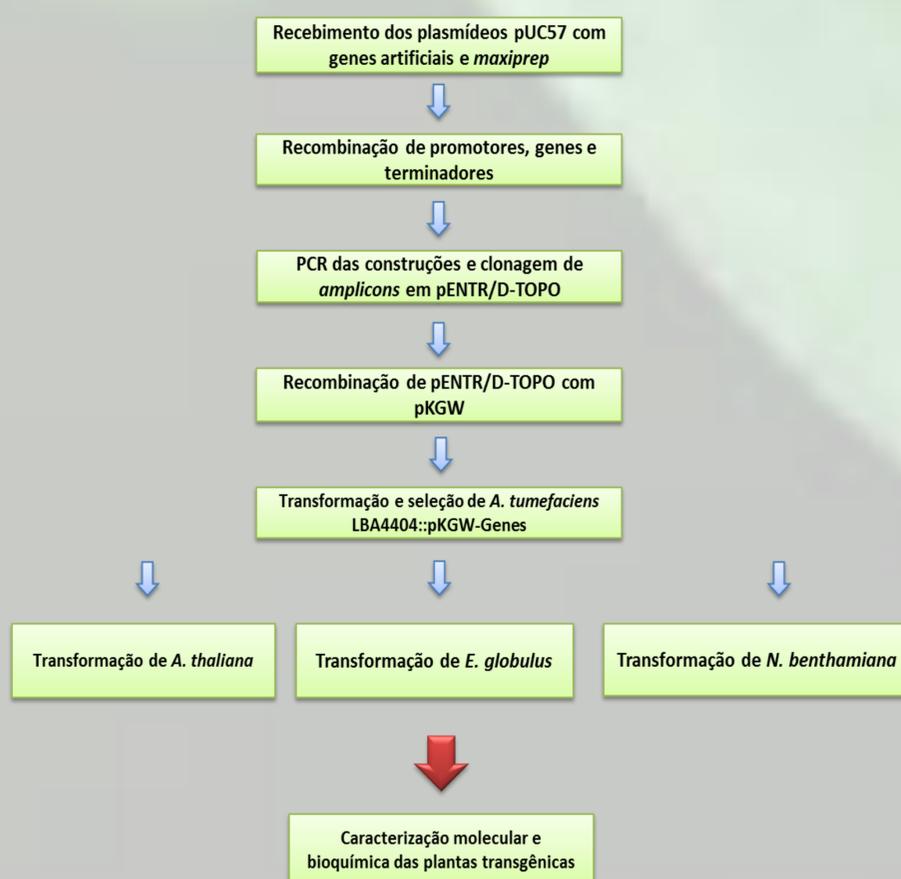


Figura 2. Próximas etapas do projeto. Atualmente estão sendo realizadas as recombinações dos elementos promotores em relação aos genes e terminadores de interesse.