



Clonagem e caracterização funcional do gene *EuGene2* de *Eugenia uniflora*

INTRODUÇÃO

O estresse hídrico é um dos principais obstáculos para a melhora da produtividade de cultivares. Nesse contexto, a espécie nativa brasileira *Eugenia uniflora*, conhecida popularmente como pitangueira, apresenta plasticidade adaptativa à diferentes ecossistemas, podendo ser utilizadas para a busca de recursos genéticos e obtenção de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi clonar e caracterizar um gene de *Eugenia uniflora* denominado *EuGene2*, o qual possui 241 pb e não possui similaridade com nenhum outro gene de outras espécies vegetais.

METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de folhas de plantas naturais da restinga e da mata ciliar. Sementes destas plantas foram coletadas e posteriormente germinadas em casa de vegetação, onde foram submetidas a condição de déficit hídrico após seis meses de cultivo. Após análise do transcriptoma do material obtido, foram selecionados 12 genes com potencial aplicação biotecnológica, entre os quais o gene denominado de *Eugene2* foi selecionado para este trabalho. As bibliotecas de cDNA geradas para o sequenciamento foram utilizadas como molde para a amplificação da sequência codificadora do gene através da técnica de PCR. O fragmento amplificado foi clonado em vetor de entrada pENTR/D-TOPO. Para a identificação da localização subcelular da proteína *EuGene2*, foi realizada recombinação do vetor de entrada com o vetor pART7-YFP através da tecnologia Gateway. A construção foi utilizada para a transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, os quais foram analisados por microscopia confocal conjuntamente com marcadores de retículo endoplasmático (RE-RFP) e de membranas (MP-RFP).

RESULTADOS E PERSPECTIVA

A partir das imagens obtidas, foi observada a localização subcelular da proteína. Apresenta tanto colocalização com o marcador de membranas como com o de retículo, porém não é total, e o padrão de fluorescência é diferente, como pode ser observado nas figuras 1 e 2. O *Eugene2* aparenta estar espalhado por todo o citoplasma da célula, com concentração de sinal em uma mancha (indicada nas figuras por uma seta) não coincidente com os marcadores.

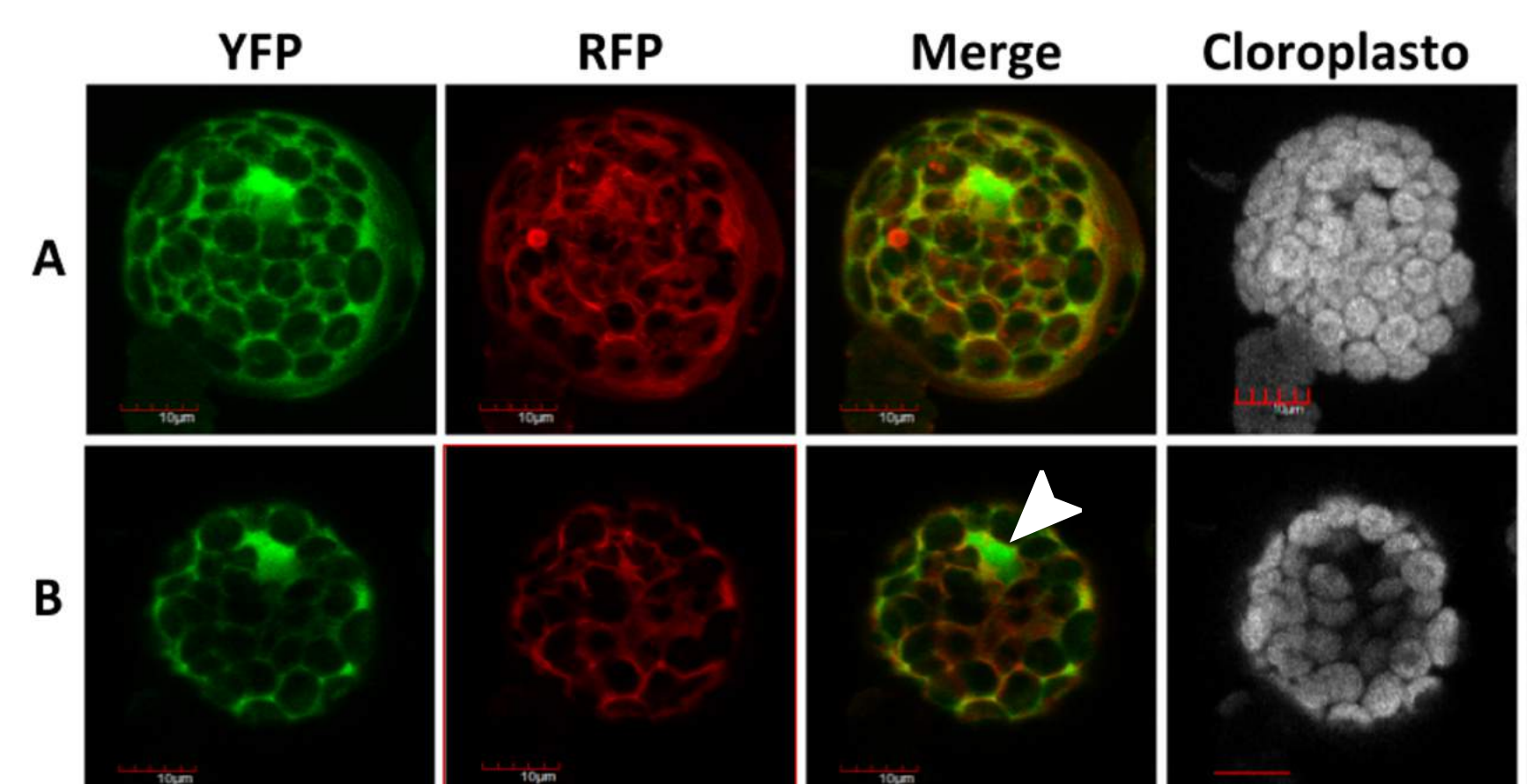


Figura 1: Co-localização de *Eugene2*-YFP com marcador de Membranas (MP-RFP). (A) Projeção de intensidade sobre o eixo z; (B) Sem projeção. Flechas indicando pontos de não co-localização. Escala: 10 μ m.

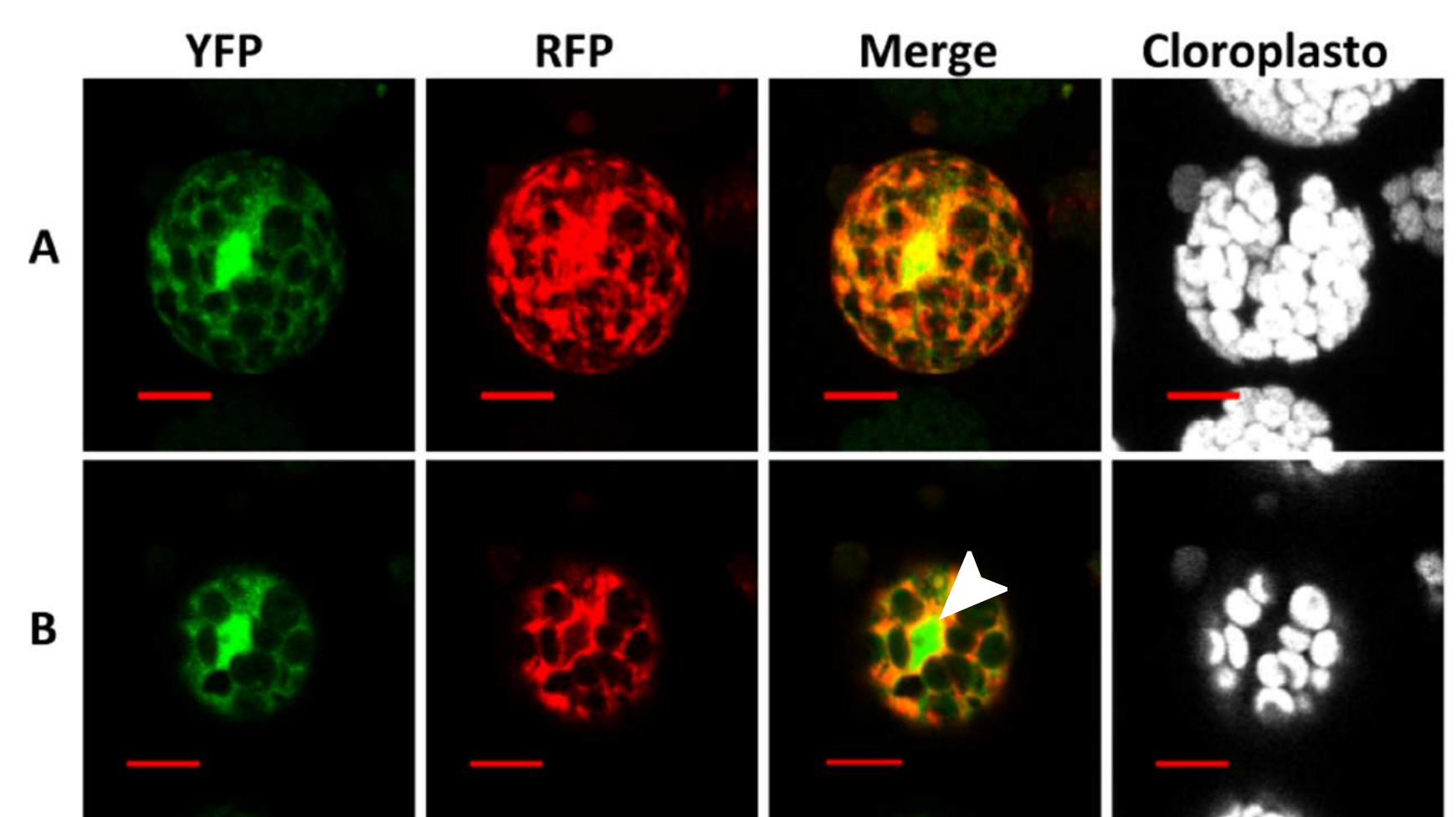


Figura 2: Co-localização de *Eugene2*-YFP com marcador de Retículo Endoplasmático (RE-RFP). (A) Projeção de intensidade sobre o eixo z; (B) Sem projeção. Flechas indicando pontos de não co-localização. Escala: 10 μ m.

Como perspectiva para este trabalho, será realizado um experimento de colocalização com marcador de citoplasma.