

SALÃO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XXIX SIC
UFRGS
PROPESQ



múltipla 
UNIVERSIDADE
inovadora  inspiradora

Evento	Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2017
Local	Campus do Vale
Título	Análise Estrutural e Funcional de Fatores de Transcrição DOF de Eucalyptus grandis
Autor	RAFAELA DE ARAUJO HACZKIEWICZ GAIGA
Orientador	GIANCARLO PASQUALI

Análise Estrutural e Funcional de Fatores de Transcrição DOF de *Eucalyptus grandis*

Rafaela de A.H. Gaiga, Raíssa Volpatto Marques & Giancarlo Pasquali

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

A madeira e seus derivados justificam a grande importância econômica do eucalipto e de outras arbóreas. A regulação da gênese da madeira representa uma das áreas de mais alta complexidade no estudo de plantas. A família de fatores de transcrição *Dof* (ligação a DNA com um dedo, do inglês, ‘DNA binding with One Finger’) compreende proteínas exclusivas de plantas, caracterizadas pela presença de um motivo de ligação ao DNA semelhante ao domínio ‘dedo-de-zinco’ (do inglês, ‘zinc finger’). Estas proteínas podem agir tanto como ativadores quanto repressores da transcrição gênica e parecem ter evoluído para controlar a expressão de genes de processos característicos de plantas. Considerando o número de fatores *Dof* descritos em plantas bem como a diversidade de metabolismos controlados por estas proteínas, a manipulação gênica dos genes codificadores oferece grande potencial para a obtenção de plantas mais produtivas ou com características mais benéficas às práticas agrossilviculturais. A partir de resultados anteriormente obtidos pelo grupo com a caracterização filogenética e dos perfis de expressão dos genes *Dof* de *Eucalyptus grandis* e tendo-se por base as estratégias utilizadas para a caracterização dos genes *Dof* de *Vitis vinifera*, identificamos genes *Dof* de *E. grandis* com perfil de expressão preferencial em tecidos vasculares de caules, raízes e folhas, bem como com mais alta homologia a genes *Dof* anteriormente caracterizados por outros autores e comprometidos com a gênese dos tecidos vasculares. Os genes de *E. grandis* escolhidos para estudo foram D00607, D01698 e K00405. Amplicons das sequências codificadoras dos três genes foram obtidas a partir da extração de RNA total a partir de tecido vascular (floema) de *E. grandis* e a consequente realização de RT-PCR para a síntese de cDNA. Todos os três genes foram adaptados ao vetor pENTR/D-TOPO (Invitrogen) para clonagem em *Escherichia coli One Shot Mach1 T1* (Invitrogen). Os genes em pENTR/D-TOPO foram então sequenciados integralmente, comprovando-se a identidade das sequências. Os insertos foram então transferidos por recombinação para o vetor binário pH7WG2D (VIB) com vistas à superexpressão em plantas. Neste vetor binário, foi confirmada a presença dos fragmentos para os três genes, estando estes sob a regulação do promotor e terminador CaMV-35S. Subsequentemente, foi realizada a transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 via choque térmico com os plasmídeos pH7WG2D contendo os três cassetes gênicos. Colônias bacterianas para todas as amostras resultaram em bandas de amplificação de tamanho esperado para cada gene. Foi realizada, então, a transformação genética de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 com as linhagens de *A. tumefaciens*:pH7WG2D-*Dof* pela metodologia de imersão de inflorescências. As plantas transgênicas ainda serão analisadas anatomo-morfológicamente, sendo descrito seus fenótipos advindos da superexpressão de fatores *Dof*. Paralelamente, experimentos foram realizados para a produção das proteínas DOF em *E. coli* e caracterização bioquímica e funcional das mesmas. Até o momento, foram realizadas PCRs para a amplificação dos três genes previamente clonados em pENTR/D-TOPO utilizando-se *primers* específicos às regiões 5’ e 3’ dos genes de forma a permitir a ligação dos três genes ao vetor pGEX-4T-1. Sequências dos sítios de clivagem das enzimas BamHI e EcoRI foram adicionados aos *primers forward* e *reverse*, respectivamente. Como resultado, as três ORFs foram perfeitamente amplificadas e serão tentativamente ligadas a pGEX-4T-1 e subsequente transformação de *E. coli* e expressão gênica.