

SEQÜENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE

DA FAMÍLIA *ARF1* DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM *Eucalyptus*

CARDOSO, Paola Crystina Bergamini¹; **COELHO**, Alexandre Siqueira Guedes²

Palavras-chave: Fatores de transcrição, ARF, *Eucalyptus*.

1. INTRODUÇÃO:

No Brasil, o plantio de florestas de *Eucalyptus* fornece a matéria-prima para indústrias de papel e celulose e contribui significativamente para a balança comercial brasileira. Para sustentar a competitividade diante das indústrias estrangeiras, há necessidade de se aumentar a produção e a produtividade das florestas de *Eucalyptus*, sendo o melhoramento genético uma importante estratégia neste sentido. O projeto *Genolyptus* – Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus* – tem como objetivo central o descobrimento, seqüenciamento, mapeamento e a determinação de funções de genes de importância econômica em espécies do gênero *Eucalyptus*, visando a incorporação de tecnologias de genética e genômica nos programas de melhoramento e produção florestal. Nesse sentido, dentre as seqüências obtidas até o momento figuram diversos fragmentos identificados como genes responsáveis pela produção de proteínas que atuam como fatores de transcrição, os quais são definidos como proteínas que se ligam a seqüências específicas de DNA e que são capazes de ativar ou reprimir a transcrição. A família ARF (*Auxin Response Factor*) de fatores de transcrição merece destaque, pois regula a expressão de genes de resposta à auxina, um hormônio vegetal que influencia uma variedade de processos fisiológicos. Neste contexto, o isolamento, o seqüenciamento e a caracterização molecular destes genes se justificam na medida em que o polimorfismo presente nestes locos puder ser utilizado em programas de melhoramento genético visando à obtenção de genótipos superiores de elevado valor econômico.

2. METODOLOGIA:

2.1 – Obtenção das seqüências.

Foram obtidos clones anotados como fatores de transcrição da família ARF a partir do banco de dados de *ESTs* do projeto *Genolyptus* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/eucalyptus/>). Estes pertenciam às espécies *Eucalyptus globulus* (EUGL), *Eucalyptus grandis* (EUGR), *Eucalyptus urophylla* (EUUR) e a mistura de tecidos de diversas espécies de *Eucalyptus* (EUSP). Seqüências de nucleotídeos de cada um dos 23 membros da família ARF já caracterizadas em *Arabidopsis thaliana* foram obtidas através de busca no *GenBank* NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As seqüências de *Eucalyptus* sp e de *A. thaliana* foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal-X (Thompson *et al.*, 1997). A reconstrução filogenética das proteínas em questão foi executada através do algoritmo de Neighbor-Joining. A consistência dos nós do dendrograma foi avaliada pelo método *bootstrap* com 1000 randomizações. O programa TreeView foi usado para visualizar o dendrograma.

2.2 - Cultura das colônias de bactérias.

Suspensões de bactérias transformadas, das diferentes bibliotecas de cDNA, foram transferidas para placas de Petri 160mm com meio sólido LB acrescido de 15 mg/mL de ampicilina, 20 mg/mL de X-gal e 0,5M de IPTG. As placas foram encubadas 37°C durante 16 hs. As colônias de bactéria foram inoculadas em microplaca-cultura

contendo 750 µL de meio "Circle Grow" 40gr/L acrescido de ampicilina 100 mg/L. Foi realizada a minipreparação dos plasmídeos por lise alcalina através do protocolo padrão utilizado pela rede Genolyptus.

2.3 - Estimativa do tamanho do fragmento.

As amostras de cDNA foram amplificadas através da reação de PCR. O sistema de amplificação continha: 4,5 ng de DNA plasmidial, 2,5 mM de cada dNTPs, 1U de Taq DNA Polimerase, tampão 10 X, 1,5mM de MgCl₂ e 2 mM de Primer Reverso (T7) e 2 mM de primer forward (Genolyptus C), 1,04 µL de BSA e quantidade de água Milli-Q suficiente para um volume final de 13µL. Foi realizada uma corrida em gel de agarose 1% para estimar o tamanho dos fragmentos

2.4- Seqüenciamento do DNA.

Os fragmentos de cDNA foram submetidos à reação de seqüenciamento seguindo o método de Sanger. A solução de reação consistiu de 2 µL de DNA plasmidial, 1 µL de Dyenamic, 2 µL de *save-money*, 2,5 pmoles de primer T7 e H₂O milli-Q para um volume de 10 µL. Foi feita também a mesma reação utilizando 2,5 pmoles de *primer Genolyptus-C*. As condições utilizadas para a reação de seqüenciamento foram: 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

2.5-Análise das seqüências.

As seqüências de *Eucalyptus* obtidas foram submetidas à análise de qualidade através dos programas Phred/Cross-match. Pares de bases com valores de *phred*<20 foram mascaradas (N). A análise das seqüências de cDNA foi realizada através do programa Bio edit para retirar os fragmentos que pertenciam ao vetor, primer e adaptadores. Essa seqüência foi então comparada com outras seqüências ARFs de diferentes espécies depositadas no banco de dados do NCBI usando a ferramenta BLAST.

2.6- Desenho dos primers

Os primers foram desenhados a partir das seqüências geradas utilizando o programa PRIMER 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A partir da análise do dendograma, seqüências anotadas como ARF1 foram identificadas como pertencentes a diferentes classes da família ARF de fatores de transcrição (Okushima, *et al.* 2005). A seqüência EUGR-09 formou um grupo consistente com as seqüências ARF3 e ARF4. A proteína ARF3 atua no desenvolvimento do gineceu. As seqüências EUGR-02, EUGR-03, EUGR-18 e EUGL-01 apresentaram similaridade à seqüência ARF2, essa proteína atua como um comunicador entre o etileno e a auxina na regulação do desenvolvimento do hipocótilo. As demais seqüências de *Eucalyptus* são bastante semelhantes entre si, e formam um grupo distinto das proteínas descritas em *Arabidopsis*. Foi feito um novo sequenciamento dos clones EUGL-01, EUGR-02, EUGL-06 e EUGR-09 O cDNA foi seqüenciado nos sentidos *forward* e *reverse*. Os primers foram desenhados utilizando as seqüências EUGR-09 (Tabela I) e EUGR-02 (tabela II). O fragmento de EUGR-09 que foi seqüenciado corresponde a uma região que apresenta 5 exons. E o fragmento seqüenciado da EUGR-02 abrange uma região de 6 exons. Os *primers* desenhados serão utilizados para seqüenciar estes genes no genoma de diferentes espécies de *Eucalyptus*, incluindo-se os íntros e as regiões reguladoras (em *cis*), para que possa ser a caracterização completa destes genes possa ser efetuada.

Tabela I: *Primers* desenhados a partir da seqüência obtida para o clone EUGR-09.

<i>primers</i>	Seqüência 5' → 3'	Tamanho do fragmento a ser amplificado (Kb)
<i>primer F</i>	TGTAGAGAACGCCAGCAATG	1281
<i>primer R</i>	TTTGGCTCACAAAACATCCA	

Tabela II: *Primers* desenhados a partir da seqüência obtida para o clone EUGR-02.

<i>primers</i>	Seqüência 5' → 3'	Tamanho do fragmento a ser amplificado (Kb)
<i>primer F</i>	CGTCTCATCCTTCCTTTTGC	1376
<i>primer R</i>	TATGTCGAAAACGCCATTCA	

Foi realizado a alinhamento entre as seqüências protéicas de *A. thaliana* e *Eucalyptus* permitindo a identificação das regiões que caracterizam os membros da família AFR. A partir do segmento produzido foi possível conhecer a parte inicial da proteína codificada por EUGR-09 e EUGR-02 em *Eucalyptus*.

4-CONCLUSÃO:

Os resultados permitiram a detecção de genes em *Eucalyptus* muito semelhantes àqueles responsáveis pela produção de proteínas ARF já descritos na literatura. Neste sentido, EUGR-09 pode possivelmente participar do controle do desenvolvimento do gineceu. EUGR-02, EUGR-03, EUGR18 e EUGL-01 atuam como comunicadores entre o etileno e a auxina na regulação do desenvolvimento do hipocótilo. A parte do gene que foi seqüenciada apresenta o motivo conservado ELWHACAGPL que representa o início do domínio de ligação característico dos membros da família ARF. Embora o alinhamento das seqüências já obtidas tenha permitido a detecção de sítios polimórficos em seqüências de *Eucalyptus*, a utilização dos *primers* desenhados neste trabalho permitirá uma caracterização mais ampla do polimorfismo existente em diferentes espécies.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Okushima, Y.; Overvoorde, P. J.; Arima, K.; Alonso, J. M.; Chan, A.; Chang, C.; Ecker, J. R.; Hughes, B.; Lui, A.; Nguyen, D.; Onodera, C.; Quach, H.; Smith, A.; Yu, G.; Theologis, A. Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and Overlapping Functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell*, 17(2):444-63, Feb 2005.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids. Res.* 24:4876-4882. 1997.

FONTE DE FINANCIAMENTO: CNPq/PIBIC, Fundo Verde-Amarelo, Rede Genolyptus.

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Genética e Genômica de Plantas, paolabergamini@yahoo.com.br

² Orientador/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, acoelho@icb.ufg.br