

Estabelecimento de uma coleção de plasmídeos para transformação genética de eucalipto

Daniele C. Kael

Graduanda em Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná

Isabel Rodrigues Gerhardt

Engenheira-agrônoma, Doutora, Pesquisadora da Embrapa Florestas,

isabel.gerhardt@embrapa.br

Plasmídeos são moléculas circulares de DNA, capazes de se replicar de maneira independente do DNA cromossomal do hospedeiro. Ocorrem naturalmente em bactérias e são importantes ferramentas para a engenharia genética, usados para inserir genes ou promotores em organismos de interesse. Nesse caso, são chamados de vetores e contêm genes que conferem resistência a antibióticos nas células transformadas por eles, além de uma região chamada de sítio de clonagem múltipla, onde fragmentos de DNA são inseridos. Para transformação de plantas, existem diferentes tipos de plasmídeos, utilizados em análises de força e tecido-especificidade de promotores ou clonagem de genes. O objetivo deste trabalho foi estabelecer na Embrapa Florestas uma coleção de plasmídeos para transformação genética de eucalipto. Para isso, foram obtidos cerca de 20 plasmídeos provenientes do CAMBIA e do CSIRO, cujos DNAs foram enviados por essas instituições australianas aderidos em folhas de papel. Os DNAs dos plasmídeos foram eluídos em 20 μ l de água deionizada e 3 μ l foram usados para transformação de *Escherichia coli*, linhagem DH5 α (Invitrogen), por meio de choque térmico. As células bacterianas transformadas foram selecionadas em meio LB sólido, contendo como antibióticos canamicina ou ampicilina. Cerca de 10 colônias bacterianas foram isoladas após cada transformação e colocadas para crescer por 12 horas em meio LB líquido. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina, utilizando-se o kit Wizard Plus SV (Promega). Após quantificação do DNA de cada plasmídeo, foram digeridos 500 ng de DNA plasmidial com a enzima de restrição *Hind*III, de modo a obter perfis de restrição para confirmar a identidade dos plasmídeos obtidos. Até o momento foram isolados os DNAs dos plasmídeos pCAMBIA1300, pCAMBIA1303, pCAMBIA2301, pCAMBIA3301 e pHANIBAL. Eles serão utilizados em experimentos para estudos de promotores raiz-específicos e análise de função de genes envolvidos em mecanismos de alocação e partição de carbono nos projetos “Transformação genética de *Eucalyptus* sp. com construções gênicas contendo os genes AtDREB1A e AtDREB2A visando tolerância à seca e ao frio” e “Controle genético da alocação e partição de carbono em *Eucalyptus*”, respectivamente.

Palavras-chave: clonagem; engenharia genética; vetor.

Apoio/financiamento: CAMBIA; CSIRO; Embrapa.