

Isolamento e Clonagem do Promotor Tecido-específico Completo e Transformação Genética de *Musa spp.*

Joane Marília Santana dos Santos¹; Leandro Eugenio Cardamone Diniz²

Resumo

Bananeira é uma espécie pertencente à família Musaceae típica de regiões tropicais e subtropicais, que apresenta grande importância econômica e social no mundo, uma vez que constitui fonte de renda e alimento para milhões de pessoas, embora o seu cultivo seja afetado por diversos problemas causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos, além de estresses abióticos. Uma das estratégias para a solução dos principais problemas é a obtenção de novas variedades resistentes a doenças, nematóides e insetos mediante programas de melhoramento. As pragas e doenças são responsáveis por severas perdas na produção de banana, que, a depender dos fatores envolvidos, pode ser de até 100%, uma vez que, em muitos casos, não existe nenhuma alternativa de controle. O promotor é uma região reguladora do DNA localizada upstream da sequência codante do gene, sendo constituído por sequências de nucleotídeos que funcionam como ponto de reconhecimento para a ligação da RNA polimerase, conferindo assim, um ponto de controle para a transcrição regulada do gene. Em eucariotos, o início da transcrição depende da ligação ao promotor de um conjunto de proteínas designadas fatores de transcrição. Estes fatores se ligam às sequências promotoras, recrutando a RNA polimerase, a enzima que sintetiza o RNA a partir da região codante do gene. Como os promotores tipicamente são imediatamente adjacentes ao gene em questão, a posição dos promotores é designada relativamente ao sítio de início da transcrição, onde a transcrição do RNA começa por um gene em particular, ou seja, posições upstream são números negativos iniciando a contagem pelo -1, por exemplo, -100 é a posição 100 pares de bases upstream. Com isso, os objetivos deste trabalho foram isolar e clonar uma região promotora de expressão gênica de caráter tecido-específico (folha) completo (full-promoter) e iniciar o processo de validação deste promotor através da transformação genética de uma região promotora de expressão gênica em *Musa spp.*

¹ Graduanda em Ciências Biológicas da Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

² Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, leandro.diniz@embrapa.br.

Palavras-chave: banana, promotor, tecido-específico, transformação.

Introdução

A banana (*Musa spp.*) é uma espécie cultivada em mais de 100 países tropicais e subtropicais. Esta fruteira é o alimento básico na dieta de mais de 400 milhões de pessoas, possuindo um importante papel social e econômico nos países produtores. A banana é uma cultura bastante versátil, capaz de ser cultivada em diferentes ambientes, o que a torna interessante para produção por pequenos produtores, produz o ano todo e é mantenedora da fertilidade do solo. No aspecto nutricional, a banana é uma importante cultura de segurança alimentar, sendo considerada uma rica fonte de energia, sais minerais e vitaminas.

A produção anual mundial ultrapassa 100 milhões de toneladas, sendo que praticamente 87% da área cultivada em todo o mundo é feita por pequenos produtores para consumo doméstico ou para venda em mercados locais e regionais. Os 13% restante da produção mundial de banana destina-se ao mercado exportador e esta sob o domínio de grandes multinacionais americanas. Para muitos países, sobretudo os da América Latina e do Caribe, a exportação de banana constitui uma importante fonte de divisas estrangeiras.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bananas, tendo produzido 6,8 milhões de toneladas (9,3% da produção mundial) no ano 2005, em uma área de 499.230 hectares (FAO, 2007). A bananeira é cultivada de Norte a Sul do País, sendo fundamental para a complementação da dieta alimentar das populações de baixa renda. Praticamente toda fruta produzida é comercializada no mercado interno. A maioria dos bananicultores é composta por pequenos produtores, e o setor da bananicultura no Brasil gera mais de 500 mil empregos diretos. As regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, juntas, respondem por 67% da produção nacional. O consumo efetivo de frutos situa-se na faixa de 70% da produção total, visto que embora as quantidades exportadas sejam mínimas, as perdas pós-colheita chegam a 30% da produção. Em 2002, os Estados maiores produtores foram: São Paulo (1.178.140 toneladas), Bahia (975.620 toneladas), Pará (537.900 toneladas), Santa Catarina (668.003 toneladas) e Minas Gerais (550.503 toneladas) (IBGE-SIDRA, 2007).

Bananeira é uma espécie pertencente à família Musaceae típica de regiões tropicais e subtropicais, que apresenta grande importância econômica e social no mundo, uma vez que constitui fonte de renda e alimento para milhões de pessoas, embora o seu cultivo seja afetado por diversos problemas causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos, além de estresses abióticos (Ribeiro, 2011). Uma das estratégias para a solução dos principais problemas é a obtenção de novas variedades resistentes a doenças, nematóides e insetos mediante programas de melhoramento (SILVA et al., 2003).

O cultivo comercial de banana demanda, no seu contexto global, um amplo uso de pesticidas, levando a uma constante ameaça ao meio ambiente e à saúde humana nos países produtores pobres e à viabilidade econômica das indústrias. Somente um patógeno, o fungo *M. fijiensis* exige em alguns países da América Latina entre 50-60 aplicações anual de fungicida. A importância do controle genético desse patógeno é de caráter urgente, já que a produção da banana em nível mundial vem passando por uma série de análises públicas de caráter crítico que demandam segurança alimentar e ambiental, dentro de um contexto de sustentabilidade da cultura.

O promotor é uma região reguladora do DNA localizada upstream da sequência codante do gene, sendo constituído por sequências de nucleotídeos que funcionam como ponto de reconhecimento para a ligação da RNA polimerase, conferindo assim, um ponto de controle para a transcrição regulada do gene. Em eucariotos, o início da transcrição depende da ligação ao promotor de um conjunto de proteínas designadas fatores de transcrição. Estes fatores se ligam às sequências promotoras, recrutando a RNA polimerase, a enzima que sintetiza o RNA a partir da região codante do gene (REMY et al., 2005). Como os promotores tipicamente são imediatamente adjacentes ao gene em questão, a posição dos promotores é designada relativamente ao sítio de início da transcrição, onde a transcrição do RNA começa por um gene em particular, ou seja, posições upstream são números negativos iniciando a contagem pelo -1, por exemplo, -100 é a posição 100 pares de bases upstream (SANTOS et al., 2007). Com isso, os objetivos deste trabalho foram isolar e clonar uma região promotora de expressão gênica de caráter tecido-específico (folha) completo (full-promoter) e iniciar o processo de validação deste promotor através da transformação genética de uma região promotora de expressão gênica em *Musa* spp.

Material e Métodos

Uma sequência potencialmente promotora de expressão gênica de caráter tecido-específico foi selecionado no genoma da bananeira para clonagem e transformação genética de suspensão celular de uma variedade de bananeira, em sua versão completa (sem deleção, na versão de 2 kb). Para isso foram utilizados: i) isolamento, clonagem e transformação genética de suspensão celular embriogênica de banana via *Agrobacterium* utilizando uma região promotora (versão completa) de expressão gênica em *Musa spp*; ii) isolamento da região promotora (versão completa) de expressão gênica em *Musa spp.* de caráter tecido-específica.

Os clones de BAC contendo o gene selecionado (associado ao promotor de interesse) foram obtidas no Global Musa Genomics Consortium (GMGC - <http://www.musagenomics.org/>). Para o isolamento do DNA plasmidial contendo o inserto onde se encontra o gene foi preparado 5 ml de meio LB líquido (contendo 12,5 µg/mL de cloranfenicol) e em seguida inoculado no meio líquido parte do meio de cultura estoque (stab culture) utilizando ponteira estéril; em seguida este meio líquido foi mantido sob agitação (220 rpm) a 37°C por 16 horas. Após crescimento das bactérias foram preparadas duas alíquotas de 1 ml contendo 25% de glicerol e mantidas a -80°C e os demais 3 ml foram utilizados para extração de DNA utilizando o kit Large-Construct (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. Este DNA extraído foi quantificado e padronizado a 50 ng/µl. Amplicons contendo as sequências dos promotores foram obtidos mediante uso do kit ProofStart PCR (QIAGEN), e as condições de amplificação foram adaptadas à sequência do promotor a ser isolado, segundo recomendações do fabricante.

1.2. Clonagem da região promotora isolada em pDRIVE e pCAMBIA1319z.

Estes amplicons foram submetidos ao kit A-adding (QIAGEN), e depois inseridos no vetor T/A pDRIVE (QIAGEN). Depois de inseridos no vetor pDRIVE, estes foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue (Stratagene). O DNA plasmidial contendo o amplicon foi isolado das células bacterianas utilizando o kit QIAprep spin mini-prep (QIAGEN), e submetidos a digestão com enzimas de restrição para estimativa/confirmação do tamanho do inserto. Estes clones foram então submetidos à sequenciamento para confirmação da identidade dos insertos. Em havendo a confirmação da identidade dos insertos, os mesmos seriam transferidos para o vetor pCAMBIA1319z.

Este vetor apresenta uma versão sem promotor do gene *gusA* (N358Q), com o íntron do gene da catalase imediatamente “downstream” a uma sequência truncada de *lacZa* contendo o sítio múltiplo de clonagem dos vetores pUC8 ou pUC9. O vetor pCAMBIA1391z apresenta o gene de resistência a higromicina como gene marcador de resistência para seleção de plantas, e o gene de resistência a kanamicina como gene marcador de resistência para seleção de bactéria transformada. O *lacZa* truncado é funcional para discriminação entre colônias azuis e brancas de estirpes de *E. coli*. Após esta confirmação, os promotores clonados seriam utilizados para transformação de células em suspensão de bananeiras de duas variedades disponibilizadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF).

Resultados e Discussão

Após o recebimento dos clones BAC pelo Global Musa Genomics Consortium (GMGC) procedemos ao processo de extração de DNA destas bactérias a fim de isolarmos os fragmentos de DNA que tínhamos o interesse em trabalhar para a obtenção das sequências de DNA dos promotores de interesse. No entanto, em um primeiro momento para nenhum dos clones BAC recebidos foi possível proceder a extração do DNA. As bactérias não cresciam no meio LB com cloranfenicol. Alternativamente tentamos crescer as bactérias em meio 2YT contendo também o antibiótico. Novamente sem sucesso.

Após 3 meses de tentativa solicitamos novamente ao GMGC novas bactérias para serem enviadas o que foi feito somente no mês de maio deste ano. Após este grande atraso conseguimos proceder a extração do DNA dos clones BAC para isolamento da sequência promotora de interesse. Uma vez feita a extração fizemos a digestão com enzimas de restrição para liberação do fragmento e confirmação do tamanho do fragmento esperado, sendo confirmado em gel de agarose.

Após esta confirmação procedeu-se a clonagem da região promotora utilizando os vetores pDRIVE e pCAMBIA1319z, nesta etapa novo atraso devido a ineficiência dos vetores, que já estavam armazenados a muito tempo. Mesmo assim, após 5 tentativas foi possível a seleção dos clones para serem utilizados na transformação. Para a utilização dos clones selecionados foram feitos sequenciamentos de todos os clones selecionados (cerca de 60), os quais só foram sequenciados no início de julho, o que infelizmente não possibilitou a conclusão desta etapa por

ainda não ter sido enviado. Após esta etapa, serão feitas as etapas de transformação das suspensões celulares e seleção dos transformantes utilizando antibióticos seletivos nos meios de cultura.

Conclusões

Os promotores de caráter tecido-específico foram com muito atraso selecionados e isolados, no entanto, para que a etapa de transformação das suspensões celulares seja finalizada precisamos dos dados de sequenciamento. As células em suspensão de banana já estão prontas para serem transformadas.

Referências

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Doenças da bananeira. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P (Ed.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológica, , 2003. P. 687.

FAO. 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 13 setembro 2013.

IBGE-SIDRA. 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>>. Acesso em 13 setembro 2013.

REMY, S.; THIRY, E.; COEMANS, B.; WINDELINCKX, S.; SWENNEN, R.; SÁGI, L. Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. **BioTechniques**, Notick, v. 38, n. 5, p. 763-770, 2005.

SANTOS, E.; REMY, S.; THIRY, E.; WINDELINCKX, S.; SWENNEN, R.; SÁGI, L. Characterization and isolation of a T-DNA tagged banana promoter active during in vitro regeneration and low temperature stress. **Journal of Experimental Botany**, London, 2007.

SOUZA JÚNIOR, M. T.; SANTOS, C. M. R.; MARTINS, N. F.; et al. **DATAMusa**: banco de dados de genômica de Musa spp. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 24 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 107).