

ISOLAMENTO DE ESTs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS INDUZIDOS POR ETANOL EM *Saccharum* spp.

Marryelli de Oliveira Goulart¹; Maria Thereza Bazzo Martins²; Alan Carvalho Andrade³; Hugo Bruno Correa Molinari⁴

¹ Centro Universitário de Brasília – UniCEUB marryelli.oliveira@gmail.com

² Universidade Católica de Brasília – UCB maitebazzo@yahoo.com.br

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN alan@cenargen.embrapa.br

⁴ Embrapa Agroenergia – CNPAE hugo.molinari@embrapa.br

Palavras-chave: cana-de-açúcar, GeneSnareTM, etanol, promotor.

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea do gênero *Saccharum* amplamente cultivada em diversos países tropicais e subtropicais. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e a cultura destina-se principalmente para a produção de etanol, açúcar e energia elétrica. Por ser uma cultura de grande importância econômica a identificação e caracterização de genes e promotores são ferramentas fundamentais para programas de melhoramento genético da espécie. A busca por promotores tecido-específicos que respondam a compostos químicos como o etanol, que possui características favoráveis como baixo custo e biodegradabilidade, são ferramentas valiosas na biotecnologia de plantas, pois os mesmos permitem o controle de um dado gene tanto temporal como espacialmente. Neste trabalho, plantas da variedade RB855156 de cana-de-açúcar com três meses de idade foram submetidas à pulverização com solução etanólica (2% v/v) e água (controle). Foram coletadas amostras foliares nos intervalos de tempo, 0, 1, 2, 4 e 8 horas após a pulverização. O material vegetal foi macerado em N₂ líquido e o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzolTM conforme as recomendações do fabricante. A técnica GeneSnareTM foi empregada para o estudo do padrão da expressão gênica, e através dessa foi possível obter 20 ESTs (Expressed Sequence Tags) diferencialmente expressos, os quais foram excisados do gel de agarose (1,2% p/v) e purificados utilizando o kit Wizard[®] SV Gel conforme as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram ligados ao vetor pCR[®]2.1. Após esse procedimento os vetores serão clonados, os respectivos cDNAs seqüenciados e submetidos à busca por similaridade com seqüências depositadas no GeneBank e/ou Gene Index. As seqüências analisadas serão validadas pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) visando confirmar o padrão de expressão diferencial dos ESTs. Os cDNA full length e o correspondente genômico dos fragmentos selecionados serão isolados e caracterizados a partir do RNA total e do DNA genômico, respectivamente. Uma vez caracterizados, suas regiões promotoras serão isoladas via PCR inverso e/ou Genome WalkerTM visando a obtenção de futuras ferramentas biotecnológicas importantes para manipulação do padrão de expressão de genes de interesse para o setor sucroalcooleiro.