

Localização subcelular da proteína *ScZnf* de cana de açúcar

Palavras-Chave: Cana-de-açúcar, Estresse hídrico, Localização subcelular

Autores:

Luciana Gasparoti, IB - UNICAMP

Bruno Spinassé Floreste (co-orientador), IB-UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (orientador), IB-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A cana de açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das mais importantes espécies vegetais cultivadas no mundo, acumulando grande quantidade de sacarose, que pode atingir níveis de até 50% do peso seco em seus colmos (Botha and Black, 2000), contribuindo para a produção de açúcar e etanol. O Brasil é o maior produtor mundial (FAO, 2023). Em relação a produção de biocombustível, o país atingiu uma produção estimada de 27,9 bilhões de litros de etanol provenientes da cana-de-açúcar (CONAB, 2023).

As condições abióticas estressantes podem comprometer o desempenho e a sobrevivência das plantas, atuando como fatores limitantes do desenvolvimento. Dentre os recursos físico-químicos essenciais, a água é o mais restritivo (Boyer, 1982), sendo a seca considerada o principal fator de estresse abiótico, podendo provocar perdas de até 60% na produtividade agrícola (Cruz de Carvalho, 2008; Ramesh, 2000; Gentile et al., 2015). As plantas reagem a esse tipo de estresse por meio de estratégias adaptativas que variam conforme o genótipo (Chaves, 2002), e, em nível celular, esse estresse pode causar plasmólise, redução do tamanho celular e alterações estruturais em cloroplastos (Zhang et al., 2015). Diante das previsões de agravamento da seca devido ao aquecimento global (Dai, 2011), o Brasil enfrenta o desafio de expandir a produção de cana-de-açúcar para atender à crescente demanda, ao mesmo tempo em que precisa superar os impactos das mudanças climáticas.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório utilizaram *Arabidopsis thaliana* para identificar genes que conferem maior tolerância à seca em variedades de cana-de-açúcar. Seleccionamos genes com base em sua expressão nos cultivares de cana RB867515 (alta tolerância à seca) e RB855536 (baixa tolerância à seca) (Diniz et al., 2020). O gene *ScZnf* de cana de açúcar, responsável pela codificação de uma proteína do tipo zinc finger (ZnF) foi um dos genes avaliados. O gene *ScZnf* foi

superexpresso em *Arabidopsis* e submetido a estresse hídrico severo. As plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *ScZnf* apresentaram maior taxa de sobrevivência em relação às plantas controle transformadas com vetor vazio (Gonçalves et al, dados não publicados).

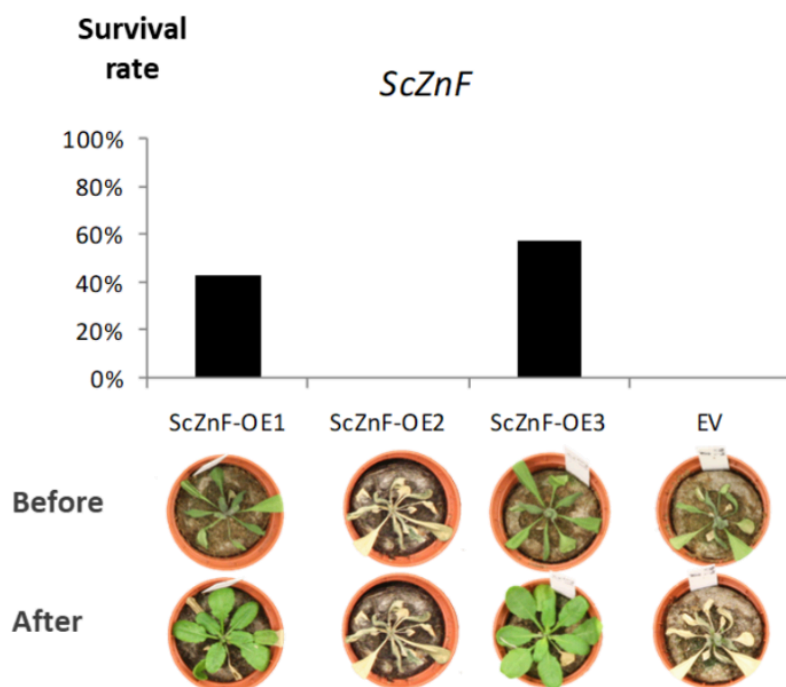


Figura 1. Avaliação da tolerância ao déficit hídrico severo. Plantas transformadas com um vetor vazio foram usadas como controle. Foram utilizadas dez plantas de cada um dos três eventos independentes. O experimento foi repetido duas vezes com resultados semelhantes. *ScZnf*-OE1 e -OE3 são eventos independentes superexpressando *ScZnf*; EV: plantas transformadas com um vetor vazio, sem o gene *ScZnf*. (Gonçalves et al., dados não publicados).

A via ubiquitina-proteassoma é um dos mecanismos utilizados pelas plantas em resposta ao estresse causado por fatores abióticos. Esse processo é coordenado em múltiplas etapas pelo conjunto de enzimas E1, E2 e E3. Sendo as enzimas E3 ligase de ubiquitina responsáveis pelo reconhecimento do substrato através de sequências específicas, conferindo especificidade ao processo de ubiquitinação (Al-Saharin et al, 2020). A proteína ZnF deduzida de cana de açúcar apresenta domínio conservado presente na família de ligases de ubiquitina E3 associadas a membrana (Marchler-Bauer A et al, 2017), sugerindo sua atuação nesse processo.

Em organismos vegetais, a compartimentalização celular garante a separação e especialização de funções em organelas distintas, processo essencial para a complexidade e evolução dos organismos multicelulares (Cavalier-Smith, 2003). Assim, a determinação da localização subcelular de uma proteína é fundamental para a compreensão de sua função. Neste contexto, o presente projeto busca aprofundar o conhecimento sobre o papel do gene *ScZnf* na resposta ao estresse ocasionado por déficit hídrico em plantas de cana de açúcar, a partir da determinação da localização subcelular da proteína *ScZnf*.

METODOLOGIA E RESULTADOS:

Para a construção do cassete de expressão para localização subcelular foram desenhados oligonucleotídeos específicos (Tabela 1).

Primers	Sequência (5' - 3')
1A	TGTGGTCTCAAATGGTTAGGAACCAGGAACT
1B	TGTGGTCTCACGAACAGAGGAGCTTAAGCATCT
2A	ATGAAGAGACTGATGGCTCT
2B	AGAGCCATCAGTCTCTTCAT
3A	AGTCGAGACTTGGGAGGATA
3B	TATCCTCCCAAGTCTCGACT
4A	CACCATGGTTAGGAACCAGGAACT
4B	GAGGAGCTTAAGCATCTTCA

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos (primers) desenhados do gene *ScZnf* para as reações de PCR de sobreposição e clonagem via método Golden Gate.

O gene *ScZnf* foi amplificado a partir de cDNA de cana de açúcar com os primers 4A e 4B (Tabela 1). O produto PCR foi extraído e purificado do gel de agarose e em seguida foi clonado no vetor pJET 1.2 (Thermo Scientific), sendo então denominado pJET-*Znf*. Para a confirmação do inserto no vetor de entrada, foi feita a reação de digestão com a enzima *NcoI*, gerando dois fragmentos esperados de tamanhos 2719 bp e 1200 bp. (Figura 2).

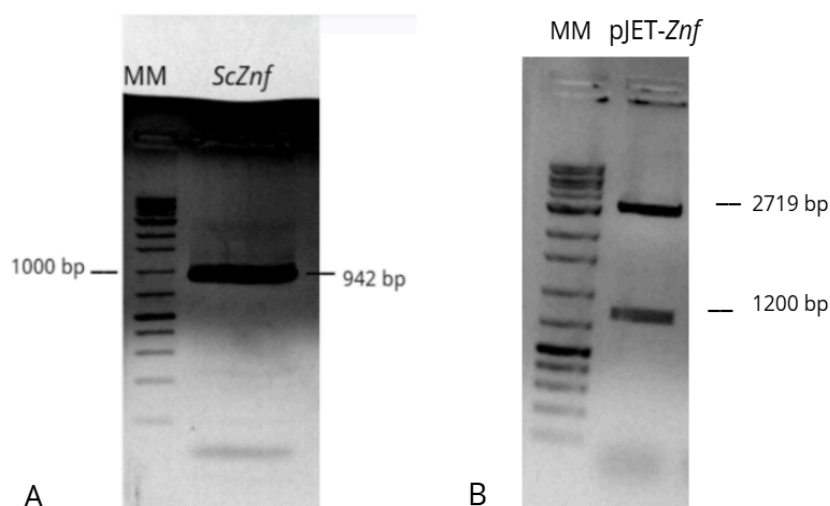


Figura 2. A) Amplificação por PCR da sequência codificante do *ScZnf* de 942 bp por oligonucleotídeos específicos. B) Reação de digestão do vetor pJET-*Znf* com enzima de restrição *NcoI*, gerando dois fragmentos de 2719 bp e 1200 bp. MM (marcador molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder).

A região codificante do gene *ScZnf* contém dois sítios de reconhecimento para a enzima *BsaI*, o que impede sua clonagem direta pelo método Golden Gate. Para contornar essa limitação, foi realizada mutagênese sítio-dirigida por meio de PCR de sobreposição. A partir do vetor pJET-*Znf*, foram

realizadas reações de PCR de sobreposição com os primers 2A a 4C (Tabela 1) a fim de promover a substituição do códon ACC por ACT, visando a remoção desses sítios sem alterar a sequência codificante do gene (Heckman, Pease; 2007).

Após a inserção das mutações de interesse nos códons mencionados anteriormente, foi realizada a clonagem via Golden Gate para se obter a fusão entre a sequência codificante do gene *ScZnf* e a proteína fluorescente GFP sob controle do promotor constitutivo pUbi. Em seguida, a reação foi transformada em células competentes de *Escherichia coli* DH5α para manutenção e propagação do vetor. O plasmídeo contendo a construção gênica de interesse foi extraído a partir de protocolo de miniprep de lise alcalina e foi realizada a reação de digestão com a enzima de restrição NcoI, resultando em dois fragmentos esperados de 1740 bp e 7011 bp, o que confirma que a fusão entre o gene *ScZnf* e a GFP foi bem sucedida (Figura 3).

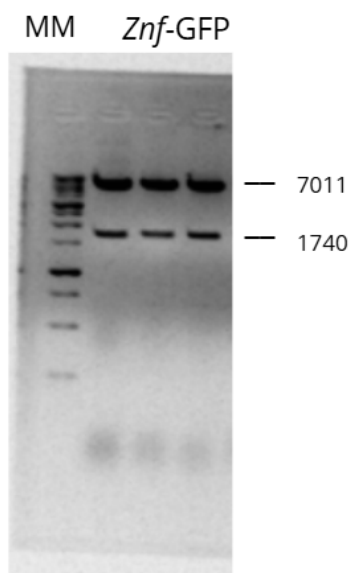


Figura 3: Reação de digestão do vetor *Znf-GFP* com enzima de restrição NcoI, gerando dois fragmentos de 1700 bp e 7011 bp. MM (marcador molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder).

Após a construção do cassete de expressão concluída, o último passo é o ensaio de localização subcelular através da transformação de células de epitélio de cebola com o DNA de interesse através de biobalística, etapa que está sendo realizada no momento.

BIBLIOGRAFIA

Botha, F. C. and Black, K. G. (2000). Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane. *Funct. Plant Biol.* 27, 81–85. doi: 10.1071/PP99098

Food And Agriculture Organization of The United Nations. Food Outlook: biannual report on global food markets. Rome/ Italy, FAO, 2023. Disponível em: www.fao.org/documents/card/en/c/cc7285en

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acomp. safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, v.11 – Safra 2023/24, n.3 - Terceiro levantamento, p. 1-56, Novembro 2023. . Disponível em: www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar

Gentile, A, Dias, L.I., Mattos, R.S., Ferreira, T.H., Menossi M. (2015) MicroRNAs and drought responses in sugarcane. *Frontiers in Plant Science*. 6:58

Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218, 443–448. doi:10.1126/science.218.4571.443.

Cruz De Carvalho, M.H. (2008) Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, Georgetown, v.3, p. 156 165.

Ramesh, P. (2000). Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *J. Agron. Crop Sci.* 185, 83–89.

Chaves, M. M. (2002). How Plants Cope with Water Stress in the Field? *Photosynthesis and Growth*. *Ann. Bot.* 89, 907–916. doi:10.1093/aob/mcf105.

Dai, A. (2011). Drought under global warming: A review. *Wiley Interdiscip. Rev. Clim. Chang.* 2, 45–65. doi:10.1002/wcc.81.

Zhang, F.-J., Zhang, K.-K., Du, C.-Z., Li, J., Xing, Y.-X., Yang, L.-T., et al. (2015). Effect of Drought Stress on Anatomical Structure and Chloroplast Ultrastructure in Leaves of Sugarcane. *Sugar Tech* 17, 41–48. doi:10.1007/s12355-014-0337-y

Diniz AL, da Silva DIR, Lembke CG, Costa MD-BL, ten-Caten F, Li F, Vilela RD, Menossi M, Ware D, Endres L, Souza GM. (2020) Amino Acid and Carbohydrate Metabolism Are Coordinated to Maintain Energetic Balance during Drought in Sugarcane. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23):9124. doi.org/10.3390/ijms21239124.

Marchler-Bauer A et al. (2017), "*CDD/SPARCLE*: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", *Nucleic Acids Res.*45(D)200-3.

Cavalier-Smith, T. (2009). Predation and eukaryote cell origins: A coevolutionary perspective. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 307–322.

Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2(4), 924–932. doi:10.1038/nprot.2007.132