

Universidade Estadual de Campinas

Laboratório de Genoma Funcional - UNICAMP

Bruna Freire, Agustina Gentile e Marcelo Menossi

Contato: [bruna@lgf.ib.unicamp.br](mailto:bruna@lgf.ib.unicamp.br); [agentile@lgf.ib.unicamp.br](mailto:agentile@lgf.ib.unicamp.br); [menossi@lgf.ib.unicamp.br](mailto:menossi@lgf.ib.unicamp.br)

### Introdução

A cana de açúcar (*Saccharum spp*) tem grande relevância econômica pela produção de açúcar e por ser uma fonte renovável de energia. A seca é um dos principais limitantes do crescimento vegetal e diversos mecanismos de sobrevivência foram desenvolvidos pelas plantas [1]. A base genética desses mecanismos ainda é em boa parte desconhecida. Recentemente foram descritos microRNAs (miRNA), que são estruturas de 21 a 25 nucleotídeos que pareiam com o RNA mensageiro e promovem a repressão do gene alvo. Um destes miRNAs é o ssp-miR171, reprimido por seca, que tem como alvo a proteína ScSCL1 (Scarecrow-like 1), homólogo a um fator de transcrição encontrado em arroz [2], pertencente à família GRAS [3]. Esses genes estão envolvidos com desenvolvimento de raiz, de meristema apical do caule e desenvolvimento axilar [4]. Em *Arabidopsis thaliana*, o gene homólogo ao *ScScl1* é o *Scl6*, o qual também é alvo do miR171. Plantas superexpressando este miRNA mostraram problemas no desenvolvimento geral [5].

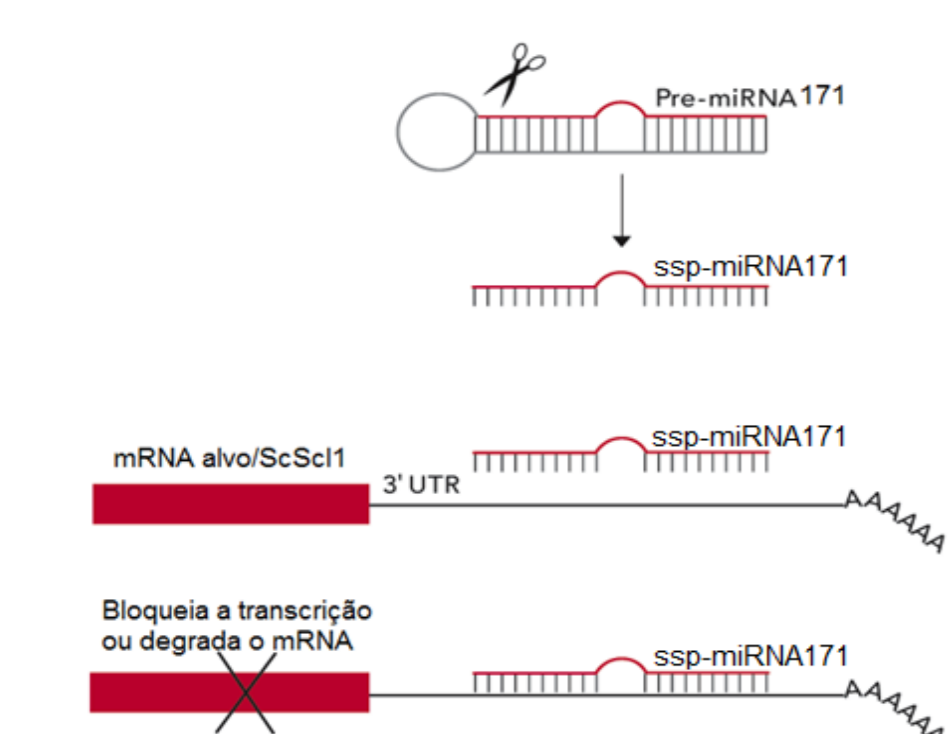


Figura 1: Mecanismo de ação do miR171 sob o gene alvo *ScScl1*.

O suposto mecanismo de ação do ssp-miR171 sobre o gene *ScScl1* é ilustrado na figura 1.

Nossa hipótese é que a repressão do ssp-miR171 aumenta os níveis de *ScScl1*, com o qual esse gene pode ter um efeito positivo na tolerância das plantas à seca. O objetivo do trabalho é validar essa hipótese e para tal propomos superexpressar o gene alvo *ScScl1* em plantas transgênicas e avaliaremos a tolerância a seca nessas plantas.

### Material e métodos

#### 1. Material Vegetal

Plantas de cana de dois cultivares, RB867515 (maior tolerância a seca) e RB855536 (menor tolerância), foram crescidas sob seca ou irrigação em campo durante 7 meses. Após esse tempo, foi coletada a folha +1 (Figura 2) e bibliotecas de pequenos RNAs foram feitas. A análise de expressão de miRNAs mostraram quais miRNAs foram diferencialmente expressos nessas duas situações. O ssp-miR171 foi reprimido na seca nos dois cultivares.

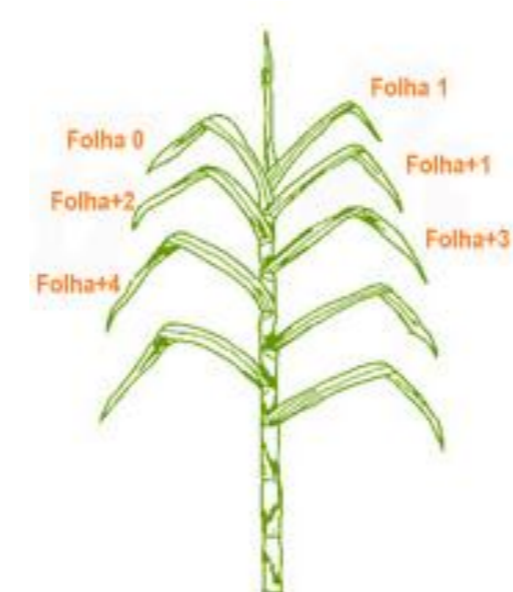


Figura 2: Esquema de uma planta de cana, mostrando a disposição das folhas.

#### 2. Amplificação do gene por PCR

O RNA total de cana foi extraído e preparou-se cDNA. Para a amplificação do gene utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram desenhados oligonucleotídeos direto e reverso a partir da sequência completa do gene.

#### 3. Construção do cassete de superexpressão.

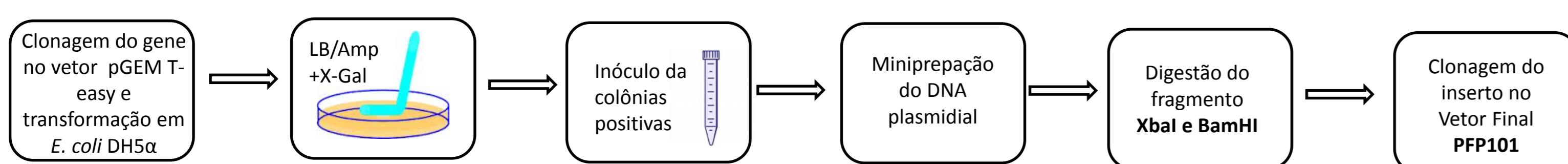


Figura 3: Esquema da construção do cassete de superexpressão.

#### 4. Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de células competentes foi realizada pelo método de choque térmico. As células foram mantidas a 28°C por três dias em placas de LB. Foram usados rifampicina e gentamicina para selecionar agrobactéria e espectinomomicina, para selecionar células com o vetor PFP101.

#### 5. Crescimento das plantas de *Arabidopsis thaliana*

Sementes do tipo selvagem de *Arabidopsis thaliana* foram esterilizadas, mantidas em meio MS, por quatro dias à 4°C no escuro para estratificação para quebra da dormência e uniformização da germinação. As sementes foram cultivadas por 10 dias a 23°C em MS com vitaminas, pH 5.8, com fotoperíodo de 12 horas dia/12 horas noite. Em seguida foram transferidas para terra e vermiculita numa razão de 3:1.

#### 6. Construção do vetor isca para duplo híbrido em leveduras

Para descobrir proteínas que interagem com a proteína ScSCL1, o gene completo foi clonado no vetor inicial pTZ57R/T e transferido para *E. coli*. As células foram plaqueadas em meio LB com ampicilina e X-Gal. As colônias positivas foram usadas para minipreparação de DNA plasmidial. Esta construção foi denominada pTZ57R/T::ScScl1. O gene digerido com as enzimas de restrição adequadas será clonado no vetor isca de duplo híbrido pGBKT7.

### Resultados

#### 1- Clonagem do gene *ScScl1* para superexpressão em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

A partir do clone do SUCEST foi amplificado a região codificante completa do gene *ScScl1*, utilizando primers contendo sítios de enzimas adequadas. O produto amplificado apresentou o tamanho esperado, de 2.127 pares de base (pb).

O fragmento amplificado foi ligado no vetor pGEMT-easy. A confirmação da ligação foi feita por digestão com as enzimas XbaI e BamHI. A região codificante foi clonada no vetor PFP101, digerido previamente com as mesmas enzimas, originando o vetor PFP101::ScScl1. Outras digestões (Figura 4) assim como o sequenciamento confirmaram a clonagem.

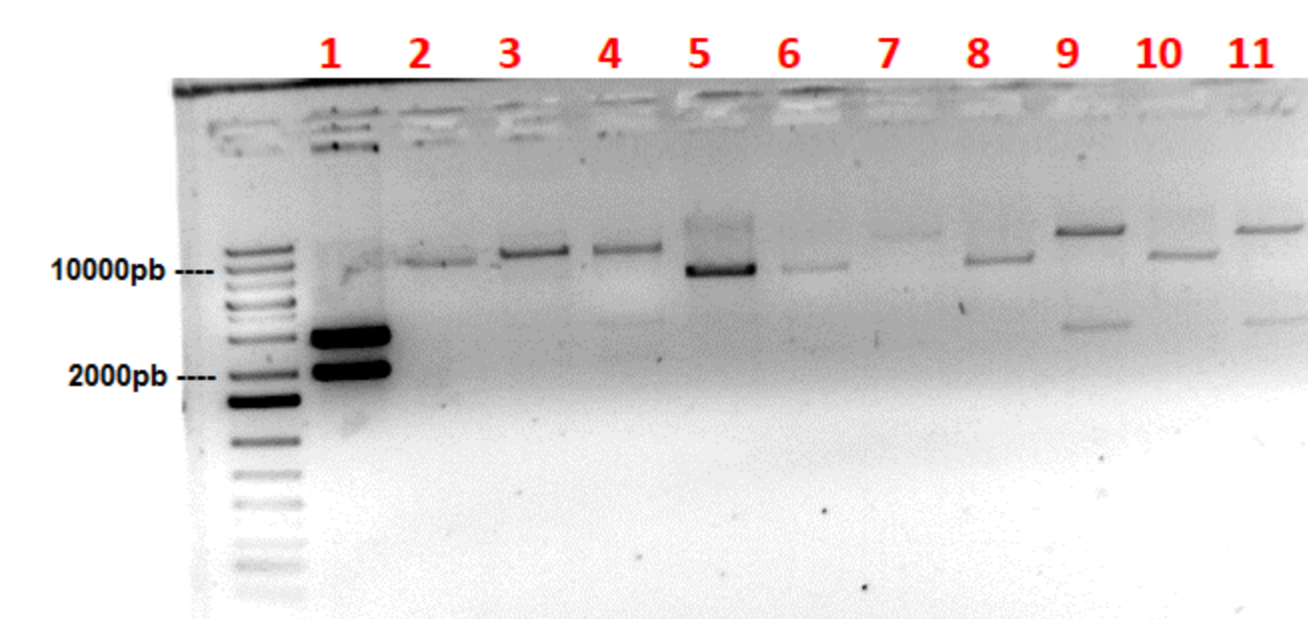


Figura 4: Gel de eletroforese de digestões do vetor PFP101::ScScl1. Amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 10: digestões com perfil de fragmentos que não correspondem ao padrão esperado da construção PFP101::ScScl1; amostras 9 e 11: digestões que confirmam a construção PFP101::ScScl1, com os dois fragmentos de tamanho esperado, com 2127 pb do gene e aproximadamente 9000 pb do vetor.

A construção foi transferida para *Agrobacterium tumefaciens*, para a subsequente transformação em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Sementes dessas plantas foram tratadas e colocadas para crescer em câmara de cultivo. No momento aguardamos o florescimento, para transformação das plantas via agrobactéria.

#### 2- Clonagem do gene *ScScl1* para o teste de duplo híbrido em leveduras

O gene completo foi amplificado e clonado no vetor pTZ57R/T, transformado em *E. coli*. Após a minipreparação para extração do DNA plasmidial, o vetor foi digerido com as enzimas NdeI e BamHI (Figura 5).

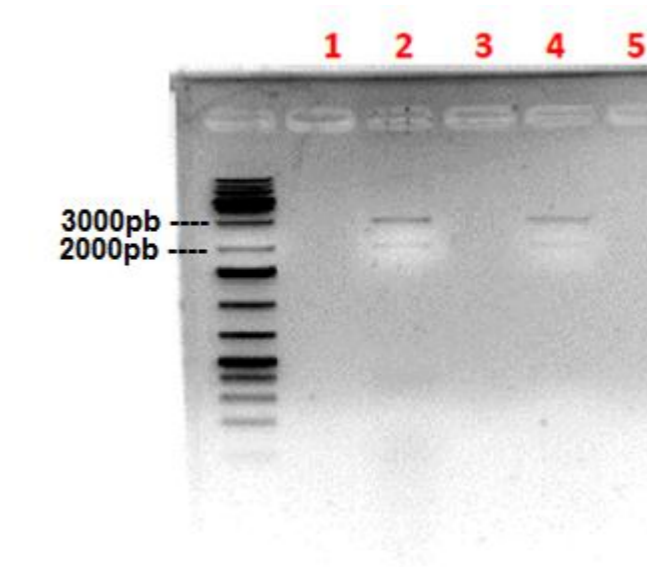


Figura 5: Gel da construção pTZ57R/T::ScScl1, 2 e 4: construção pTZ57R/T::ScScl1, com duas bandas do tamanho esperado do vetor e do inserto.

No momento estão sendo realizados os experimentos para clonar o inserto digerido com as enzimas NdeI e BamHI no vetor pGBKT7.

### Bibliografia

- [1] Santos R. e Carlesso R. (1998). Déficit Hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 2:287-294.
- [2] Sasaki et al., (2002). The genome sequence and structure of rice chromosome. Nature 420:312-316.
- [3] Hirsch S. e Oldroyd GED (2009). GRAS domain transcription factors that regulate plant development. Plant Signaling & Behavior 4:698-700.
- [4] Lee et al., (2008) Large-Scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 67:659-670.
- [5] Wang et al. (2010). MicroRNA171c-targeted *SCL6-II*, *SCL6-III*, and *SCL6-IV* genes regulate shoot branching in *Arabidopsis*; Molecular Plant 3:794-806.