



# **Ensaio *in vitro* e caracterização de plantas silenciadas (RNAi) para a enzima Cafeoil Chiquimato Esterase de cana-de-açúcar**

**Palavras-Chave:** *Cafeoil Chiquimato Esterase, Lignina, Parede Celular, Cana-de-açúcar.*

**Autores/as:**

**Daniel Eiji Hinoue de Souza [UNICAMP]**

**Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (orientador) [UNICAMP]**

---

## **INTRODUÇÃO:**

A cana-de-açúcar, *Saccharum spp.*, é um importante cultivo para a agroindústria nacional, gerando 27,6 bilhões de reais somente em 2016 segundo a pesquisa do IBGE “Produção agrícola municipal: Culturas Temporárias e Permanentes”. Neste contexto, o principal recurso energético produzido por esta indústria canavieira é o bioetanol, cuja maior demanda ao longo do tempo pela otimização da cadeia produtiva levou ao desenvolvimento do etanol de segunda geração, isto é, aquele produzido a partir da fermentação do bagaço de cana-de-açúcar anteriormente descartado.

A sacarificação é um pré-tratamento do processo de produção de bioetanol, nela a celulose presente na parede celular vegetal é hidrolisada, sendo então convertida em monossacarídeos fermentáveis. Contudo, a presença de elementos recalcitrantes da parede celular, tais como a hemicelulose e a lignina, são empecilhos para a reação, pois formam complexos que dificultam o acesso das hidrolases sobre o seu substrato. Logo, a fim de que se aumente a eficiência da sacarificação, abordagens envolvendo a manipulação destes elementos recalcitrantes são à primeira vista promissoras.

Nesse cenário, a Cafeoil Chiquimato Esterase (CSE) é uma enzima relacionada com a biossíntese dos monômeros que irão compor o polímero da lignina. Além disso, trabalhos anteriores como o de Vanholme (2013) tiveram esta proteína como objeto de estudo, demonstrando não só que ela está presente em organismos modelos, i.e *Arabidopsis thaliana*, como também que a diminuição de sua expressão implica em um menor conteúdo de lignina em ensaios com plantas mutantes para tal gene.

Portanto, este projeto teve como objetivo identificar a sequência homóloga da CSE em *Saccharum spp.* variedade SP80-3280 e caracterizá-la *in vitro* a partir da quantificação e formação de compostos intermediários. Além disso, outro intuito do projeto foi analisar a expressão do seu gene em diferentes tecidos vegetais e avaliar as alterações no processo de sacarificação entre indivíduos mutantes e selvagens.

## METODOLOGIA:

### 1. Análise das sequências da CSE de *A. thaliana* e *Saccharum spp.*

Para a obtenção da CDS completa da CSE em *Arabidopsis thaliana* foi utilizado informações do banco de dados da TAIR (disponível em <http://arabidopsis.org>), já para a identificação de seu possível ortólogo de cana-de-açúcar, foi utilizado o banco de dados da SUCEST.

A seguir, as duas sequências foram traduzidas utilizando o Translate tool (disponível em <https://web.expasy.org/translate/>) e seus respectivos outputs foram submetidos ao alinhamento múltiplo com representantes da subfamília Panicoideae, grupo que *Saccharum spp.* faz parte, com a ferramenta ClustalW.

Panicoideae, uma das subfamílias de Poaceae, é um grupo monofilético de gramíneas (Teerawatananon; Jacobs; Hodkinson, 2011). Desta forma, com o propósito de se comparar sequências ortólogas da CSE e sua atividade biológica dentro deste clado, foram selecionadas espécies como *Brachypodium distachion*, *Panicum virgatum* e *Zea mays*, cujos dados referentes às sequências são oriundas de hytozome 12 (*P. virgatum*, entrada: Pavir.Ab00639.1 (primary)) e BLAST (*B. distachion*, entrada: XP\_014753211.1; *Z. mays*, entrada: GenBank: PWZ39687.1)

### 2. PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma etapa essencial para a caracterização *in vitro* de uma proteína, o objetivo inicial deste projeto. A reação foi realizada com o Kappa2G Robust PCR kit (Kappa Biosystems), utilizando o seu Buffer A com temperatura de desnaturação, anelamento e extensão igual a 95°C, 65°C e 72°C respectivamente e tendo o DNA genômico de cana-de-açúcar variedade SP80-3280 como template. Por fim, os primers desenhados (figura 1) além de replicar a completude do gene estudado, adicionaram também sítios de enzimas de restrição e bases adicionais para que o produto gerado pudesse ser digerido e utilizado em técnicas posteriores.

Primer_CSE_SacI_Forward
ATAGAGCTCATGCAGGCGGAGGGGAC
Primer_CSE_HindIII_Reverse
ATGAAGCTTTTATTCGACAGGTATGTCACGATGCC

Figura 1: Primers utilizados contendo os sítios para SacI e HindIII e bases adicionais.

Ao final da reação com 35 ciclos, o número de pares de base do produto de PCR foi analisado com GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) em um gel de agarose 1% com brometo de etídio submerso em tampão TAE 1X. Posteriormente, o produto de PCR foi concentrado e purificado com o kit Monarch™ DNA Gel Extraction Kit da New England BioLabs Inc.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A comparação entre os ortólogos da CSE pode ser observado na figura 2, em verde estão as enzimas com suas funções preservadas como em *A. thaliana*, em vermelho estão aquelas que apresentaram perda de função, já em cinza encontra-se a espécie estudada neste projeto, a cana-de-açúcar. Sendo assim, ao relacionarmos as relações filogenéticas tendo *A. thaliana* como grupo externo, pode-se perceber que até

mesmo dentro de grupos taxonômicos mais próximos é possível encontrar representantes que preservaram ou tiveram alterações na atividade original de tal enzima.

Além disso, os primers utilizados permitiram um ótimo rendimento da reação, na figura 3 no anexo pode-se observar o inserto já purificado e concentrado, com o seu éxon com aproximadamente 1000 pares de bases, já que a sua sequência genômica não apresentou íntrons (dados não mostrados).

Espécie	Tamanho (aa)
<i>A.thaliana</i>	332
<i>P.virgatum</i>	339
<i>B. distachyon</i>	329
<i>Z. mays</i>	334
<i>Saccharum spp.</i>	336

Figura 2: Espécies vegetais que apresentam a enzima CSE (verde: funcional, vermelho: com perda de função) e seus respectivos tamanhos.

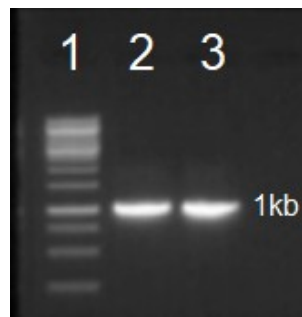


Figura 3: Resultado de eletroforese. 1: Generuler 1kb (marcador de peso molecular); 2, 3: inserto amplificado e purificado.

## CONCLUSÕES:

Através da pesquisa bibliográfica foi possível observar que a enzima CSE possui ortólogos dentro das duas classes da família das angiospermas, além disso sua atividade, ainda que perdida em espécies como *Z. mays* e *B. distachyon*, é preservada em outras tais como *P. virgatum* como visto em Ha et al (2016). Portanto, tendo em vista a distribuição existente nas espécies que apresentam a Cafeoil Chiquimato Esterase com sua atividade original, somada à sua íntima relação com a lignina e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal, o estudo de mecanismos que modulam estes fatores é de essencial importância para uma exploração econômica dos resíduos oriundos da sacarificação mais eficaz.

Ademais, este projeto pôde não só compilar informações pertinentes ao estudo da modulação do conteúdo de lignina pela enzima CSE, como também pôde realizar experimentações com primers que resultaram em produtos de PCR em quantidade suficiente para as posteriores análises *in vitro* da enzima de cana-de-açúcar variedade SP80-3280.

## Bibliografia

HA, C. M. et al. An essential role of caffeoyl shikimate esterase in monolignol biosynthesis in *Medicago truncatula*. **Plant J.** v. 86, 363–375, 2016.

**PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL: Culturas Temporárias e Permanentes.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), v. 43, 2016.

TEERAWATANANON, A.; JACOBS, S. W.; HODKINSON, T. R. (2011). Phylogenetics of Panicoideae (Poaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *Telopea*, 13(1-2), 115-142.

VANHOLME, R. et al. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, DC, v. 341, p. 1103-1106, 6 ago. 2013.