



TIAGO LUZ FARANI

**“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *SCCIPK8* DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM* SPP.)”**

***“FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE *SCCIPK8* GENE FROM SUGARCANE (*SACCHARUM*
spp.)”***

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TIAGO LUZ FARANI

**“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *SCCIPK8* DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM* SPP.)”**

**“FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE *SCCIPK8* GENE FROM SUGARCANE (*SACCHARUM*
spp.)”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in the area of Genetics and Molecular Biology, field of study Plant Genetics and Plant Breeding.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
TAGO LUZ FARANI, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. MARCELO MEÑOSSI TEIXEIRA**

CAMPINAS-SP
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F221c Farani, Tiago Luz, 1983-
Caracterização funcional do gene ScCIPK8 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) / Tiago Luz Farani. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Sacarose. 3. Seca. I. Teixeira, Marcelo Menossi, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional characterization of the ScCIPK8 gene from sugarcane (*Saccharum* spp.)

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane

Sucrose

Drought

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Menossi Teixeira [Orientador]

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Helaine Carrer

Monalisa Sampaio Carneiro

Sabrina Moutinho Chabregas

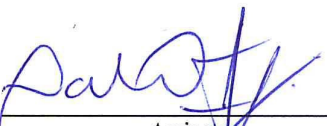
Data de defesa: 06-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

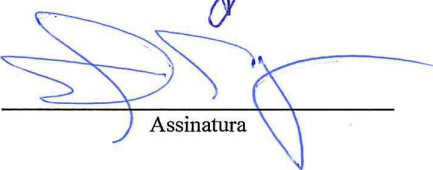
Campinas, 06 de dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

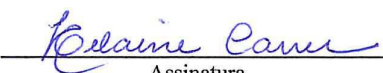
Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Orientador)


Assinatura

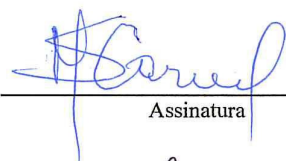
Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira


Assinatura

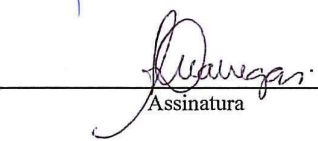
Profa. Dra. Helaine Carrer


Assinatura

Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro


Assinatura

Dra. Sabrina Moutinho Chabregas


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo

Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

Dra. Odalys García Cabrera

Assinatura

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes culturas vegetais do mundo, sendo o Brasil o principal produtor. A relevância mundial desta planta tem aumentado e muito tem sido investido na obtenção de variedades de cana-de-açúcar com maiores teores de sacarose e mais resistentes a estresses bióticos e abióticos. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar funcionalmente o gene *ScCIPK8*, relacionado ao acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar. Com a finalidade de elucidar as redes de interação da proteína ScCIPK8, ensaios de duplo-híbrido em leveduras foram realizados. Foi identificado que a proteína ScCIPK8 interage com as proteínas ScCBL1, ScCBL3 e ScCBL6, mas não interage com as proteínas ScCBL2, ScCBL9 e ScCBL10. As interações identificadas em leveduras foram confirmadas *in planta* por ensaios de BiFC. No intuito de identificar alvos de interação diferentes das proteínas CBLs, foram realizados *screenings* de duas bibliotecas de cDNA transformadas em leveduras. Foram identificadas a interação da proteína ScCIPK8 com as porções C-terminal de uma provável proteína do tipo PP2C e de uma provável proteína MYC2. Avaliamos adicionalmente a resposta à seca do gene *ScCIPK8* e dos seus alvos de interação através de ensaios de PCR em tempo real. O gene *ScCIPK8* é induzido em uma variedade de cana-de-açúcar tolerante à seca após dois dias de estresse hídrico e é induzido após quatro dias de estresse hídrico, tanto na variedade sensível quanto na tolerante à seca. Por outro lado, o gene *ScPP2C-1* é induzido apenas na variedade tolerante à seca após dois dias de estresse hídrico. As expressões dos genes *ScCBL1* e *ScCBL6* não foram alteradas de forma significativa nas condições testadas. Por outro lado, a expressão do gene *ScCBL3* foi reprimida nas plantas da variedade tolerante sob quatro dias de seca e manteve-se inalterado em todas as outras condições testadas. Por fim, plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene *ScCIPK8* foram obtidas e avaliadas quanto à resistência a estresses hídrico e salino. Não foi verificada diferença significativa na tolerância das plantas transformadas com o gene *ScCIPK8* em relação aos controles utilizados.

ABSTRACT

Sugarcane is one of the most important crop plants in the world and Brazil is the leading manufacturer. The world importance of sugarcane is increasing and much has been invested on obtaining better plants with increasing sucrose content and resistance to biotic and abiotic stresses. The present work aims to characterize the sugarcane *ScCIPK8* gene involved in sucrose accumulation. To gain insights on the ScCIPK8 protein-protein interaction network, yeast two-hybrid assays were conducted. It was shown that ScCIPK8 protein interacted with ScCBL1, ScCBL3 and ScCBL6, but not with ScCBL2, ScCBL9 and ScCBL10. BiFC assays were conducted to confirm *in planta* the interactions observed in yeast cells. Yeast two-hybrid screenings using two different cDNA libraries were conducted to identify unknown targets of ScCIPK8 protein. It was shown that ScCIPK8 interacted with the C-terminal portions of a putative PP2C and a putative MYC2 protein. We also performed qPCR assays in order to evaluate the drought response of *ScCIPK8* gene and its target genes. *ScCIPK8* gene expression was induced in a tolerant sugarcane variety after two days of drought stress and was induced in both the sensitive and tolerant sugarcane varieties after four days of drought stress. On the other hand, *ScPP2C-1* gene expression was induced in the tolerant variety after two days of drought stress. The expression of *ScCBL1* and *ScCBL6* was not significantly changed under the tested conditions, while *ScCBL3* expression was repressed in the tolerant variety after four days of drought stress. Finally, *Arabidopsis thaliana* transgenic plants overexpressing *ScCIPK8* were obtained and evaluated for their resistance to drought and salinity stresses. We could not observe any significant difference regarding drought tolerance between control and transgenic plants transformed with *ScCIPK8*.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO.....	1
1. Importância econômica da cana-de-açúcar.....	1
2. Projeto SUCEST e SUCAST	3
3. As proteínas SnRKs.....	4
4. As proteínas CIPKs.....	5
5. O cross-talk entre metabolismo de açúcar e a resposta ao estresse salino e por seca.....	9
OBJETIVOS.....	14
APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	15
CAPÍTULO 1.....	16
ABSTRACT	18
INTRODUCTION.....	19
MATERIAL AND METHODS.....	21
RESULTS.....	25
DISCUSSION	28
ACKNOWLEDGEMENTS	30
REFERENCES	31
CAPÍTULO 2.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CNPq – pelo apoio financeiro ao projeto e pela bolsa de doutorado concedida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi pela confiança depositada em mim durante estes anos de iniciação científica e doutorado. Sempre levarei comigo seu exemplo excelência, seriedade e paixão pela pesquisa.

Aos membros da banca de defesa, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Aos membros do Laboratório de Genoma Funcional. Agradeço a cada um de vocês pelo companheirismo, pela amizade, pelos “bandeijões”, pelos campeonatos de “Pro Evolution Soccer”. Vocês são “Top Five”.

A Juliana Felix, que iniciou os estudos com o gene *ScCIPK8* e me orientou na minha iniciação científica.

A Agustina Gentile, que me ajudou muito com os ensaios de duplo-híbrido e PCR em tempo real.

Ao meu querido amigo Kevin Padilla. Agradeço a sua sincera amizade, que persiste apesar da distância que nos separa.

A Aíla, por ter sido um porto seguro nos momentos de incertezas e por ter sempre me incentivado a persistir e concluir o meu doutorado.

À família Ribeiro que me acolheu em Campinas e me apoiou sempre.

Aos meus pais, Luís e Ana, e ao meu irmão Gabriel, por terem sido um exemplo e por terem me dado as condições para chegar até aqui.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação esquemática das estruturas dos domínios das proteínas da família SnRK.....	4
Figura 2. Estrutura geral dos domínios das proteínas CIPK e CBLs.....	6
Figura 3. Modelo de uma rede de interação CBL/CIPK em resposta ao estresse salino.....	8

CAPÍTULO 1

Figure 1. Schematic view of ScCIPK8 and the six ScCBLs predicted amino acid sequences.....	35
Figure 2. ScCIPK8 interaction with ScCBL proteins.....	36

CAPÍTULO 2

Figura 1. Diagrama do ensaio de germinação de sementes de transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
Figura 2. Interação da proteína ScCIPK8 com os clones F1 e F7.....	49
Figura 3. Padrão de expressão dos genes <i>ScCIPK8</i> , <i>ScCBL1</i> , <i>ScCBL3</i> , <i>ScCBL6</i> e <i>ScPP2C-1</i> sob seca em uma variedade sensível (RB72454) e uma variedade tolerante (RB92579) de cana-de-açúcar sob estresse hídrico.....	51
Figura 4. Mapa da construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8 utilizada para a obtenção das plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	52

Figura 5. Ensaio de germinação de sementes de plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> em meios contendo diferentes concentrações de manitol.....	53
Figura 6. Ensaio de germinação de sementes de plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> em meios contendo diferentes concentrações de NaCl.....	54
Figura 7. Expressão do gene <i>ScCIPK8</i> em plantas transgênicas transformadas com a construção ScCIPK8::PFP101-HA-VP16.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

CAPITULO 1

Table 1. Sugarcane CIPK8 and CBL proteins.....	34
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Clones positivos identificados nos ensaios de duplo-híbrido em leveduras e similares a proteínas de função conhecida.....	48
--	----

INTRODUÇÃO

1. Importância econômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das culturas mais importantes do planeta, principalmente pela sua singular capacidade de acumular grandes quantidades de sacarose nos seus entrenós, a qual é utilizada para a produção de açúcar e de bioetanol. A importância do bioetanol tem aumentando nos últimos anos em razão da instabilidade política dos países exportadores de petróleo e dos problemas ambientais gerados pelo seu uso, em particular o aquecimento global (Goldemberg, 2008). Mesmo com a recente descoberta no Brasil de campos extensos abaixo da camada geológica de sal (pré-sal), a oferta mundial não deve ser significativamente alterada, uma vez que a produção do pré-sal deve ser absorvida internamente pelo Brasil (Salameh, 2012).

O bioetanol produzido a partir da fermentação de açúcares e amidos de plantas utilizadas na alimentação como milho, cana-de-açúcar, soja, trigo e *Cassava*, é denominado de bioetanol de primeira geração. Por outro lado, o bioetanol de segunda geração é aquele produzido a partir da hidrólise (enzimática, física ou química) do material lignocelulósico presente na parede celular das plantas (Tollefson, 2008). Os custos de produção do etanol de segunda geração ainda são muito elevados, porém, uma vez viabilizada a sua produção em larga escala, abre-se a possibilidade da utilização de uma variedade maior de espécies de plantas, bem como da utilização de subprodutos como folhas e caules de algumas plantas ou rejeitos da indústria de papel (Saha e Ramachandran, 2013).

O bioetanol derivado do açúcar de cana-de-açúcar e do amido de milho é forma mais utilizada de biocombustíveis atualmente. A cana-de-açúcar destaca-se entre as plantas utilizadas para a produção de bioetanol por apresentar o processo com maior eficiência energética e o melhor custo/benefício (Goldemberg, 2008). O modelo de produção de bioetanol nas usinas brasileiras caracteriza-se pela queima do bagaço gerado como resíduo da produção do açúcar e do bioetanol como fonte de energia, processo conhecido como cogeração. A energia gerada é

utilizada para alimentar as usinas e o excesso gerado é comercializado (Teixeira et al., 2010). A possibilidade da utilização do bagaço como fonte para a produção de bioetanol de segunda geração pode tornar a produção do bioetanol produzido a partir da cana-de-açúcar ainda mais eficiente.

No Brasil, políticas governamentais iniciadas na década de 1970 conhecidas como o Pró-álcool criaram um mercado consumidor interno para o bioetanol que incentivou o desenvolvimento tecnológico das usinas e a obtenção de variedades de cana-de-açúcar com maiores produtividades. A partir da década de 2000, a crescente produção de automóveis movidos a gasolina e etanol, conhecidos como Flex-fuel, tem dado um novo incentivo ao mercado do bioetanol brasileiro. No ano de 2012, foram licenciados 3.162.874 automóveis Flex-fuel, representando 87 % do total de automóveis licenciados no mesmo período (ANFAVEA, 2013).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia. No Brasil, o agronegócio da cana-de-açúcar gera aproximadamente US\$ 20 bilhões por ano e é um dos setores da economia brasileira que mais gera empregos diretos e indiretos. A produção nacional da safra 2013/2014 está estimada 652 milhões de toneladas, ocupando uma área estimada em 8,8 milhões de hectares e apresentando uma produtividade média de 74,1 toneladas por hectare. Deste total, a previsão é de que 312,2 milhões de toneladas sejam destinadas à produção de açúcar e 339,8 milhões de toneladas sejam destinadas à produção de etanol. A região Centro-Sul é a principal produtora de cana-de-açúcar do país, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, contando com uma área estimada em 4,5 milhões de hectares, uma produção total estimada em 363,4 milhões de toneladas, e uma produtividade média de 80,4 toneladas por hectare (Conab, 2013).

Assim, além dos aspectos econômicos, a busca por variedades de cana-de-açúcar produtivas e resistentes a diversos estresses representa um importante componente para a sustentabilidade ambiental. Dessa forma, é extremamente importante conhecer como atuam os diferentes produtos gênicos nos processos fisiológicos envolvidos no metabolismo de açúcares e nos mecanismos de tolerância a estresses para a identificação de alvos potenciais para o melhoramento genético dirigido das variedades de cana-de-açúcar.

2. Projeto SUCEST e SUCAST

O projeto EST de cana-de-açúcar (SUCEST) (Vettore et al., 2001) é uma iniciativa que possibilitou uma maior compreensão dos processos fisiológicos da cana-de-açúcar, contribuindo sobremaneira nos estudos visando a produção de variedades de cana-de-açúcar com maiores teores de açúcar e mais tolerantes a diversos estresses. Um total de 43.141 prováveis transcritos de cana-de-açúcar (SASs, *Sugarcane Assembled Sequences*) foram identificados e desde então diferentes linhas de pesquisa foram iniciadas no intuito de caracterizar estas sequências (<http://sucest-fun.org/index.php/overview/sucest-fun-project>). Um destes projetos é o SUCAST (*Sugarcane Signal Transduction*), criado para anotar e catalogar ESTs envolvidos em vias de transdução de sinal em cana-de-açúcar (Papini-Terzi et al., 2005). Nosso grupo mantém estreitas colaborações com outras equipes para a identificação de genes de cana-de-açúcar que apresentam potencial biotecnológico. Em dois projetos PITE/FAPESP (processos 02/01167-1 e 03/07244-0), atuamos na utilização de cDNA arrays para a identificação e caracterização de genes de cana-de-açúcar envolvidos na síntese e acúmulo de sacarose. Somando-se todos os genes associados ao acúmulo de sacarose, foram identificados 343 alvos. Estes genes foram objetos de um pedido de patente no USPTO (*United States Patent and Trademark Office*) de número 60/780.693, em 2006.

Dentre estes 343 alvos, foi identificado um provável gene codificante para uma proteína quinase (437 aminoácidos) pertencente à família das proteínas SnRKs (*SNF1-related protein kinases*) e nomeada ScCipk8 (*Sugarcane CBL-interacting protein 8*) (Rocha, 2006). Os níveis de mRNA do gene *ScCIPK8* estão associados ao conteúdo de sacarose em folhas de plantas cultivadas em campo por 9 meses, observando-se uma maior expressão em variedades de baixo Brix (Sólidos solúveis) (Felix et al., 2009). Estudos mostraram que o silenciamento do gene *ScCIPK8* gerou plantas com um aumento no acúmulo de açúcar de 20% nas folhas (pedido de patente no United States Patent and Trademark Office número 60/780.693, em 2006). Os resultados são encorajadores indicando um papel para este gene no processo de regulação do fluxo de carbonos na folha.

3. As proteínas SnRKs

As plantas possuem um grande grupo de proteínas quinases relacionadas às clássicas SNF1 de leveduras, embora a maioria destas enzimas em *Arabidopsis thaliana* apresente estruturas primárias diferentes em relação às suas ortólogas de leveduras. Halford e Hardie (1998) propuseram o nome de SnRK (*SNF1-related kinase*) para esse grupo e, baseando-se nas similaridades de suas sequências e dos domínios catalíticos, reconheceram três sub-grupos: SnRK1, SnRK2 e SnRK3 (Figura 1), sendo o primeiro o melhor caracterizado. O subgrupo SnRK1 é o mais próximo à SNF1 de levedura e às *AMP-activated protein kinases* (AMPK) de animais e as suas proteínas apresentam em média um peso molecular de 56,7 a 58,7 kDa. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o complexo SNF1 é ativado em resposta à falta de glicose. Esse complexo é necessário para anular a repressão exercida pela glicose em genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono, respiração e gliconeogênese (Halford *et al.*, 1998). Em plantas tem sido demonstrado o papel das proteínas SnRK1 na regulação do acúmulo de amido e nas respostas à depleção de nutrientes. Enzimas que são reguladas pelas SnRK1s em plantas incluem a sacarose fosfato sintase (SPS), nitrato redutase, HMG-CoA redutase, ADP-Glicose pirofosforilase, 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2-6-bisfosfatase (F2KP) e trealose fosfato sintase (Halford e Hey, 2009).

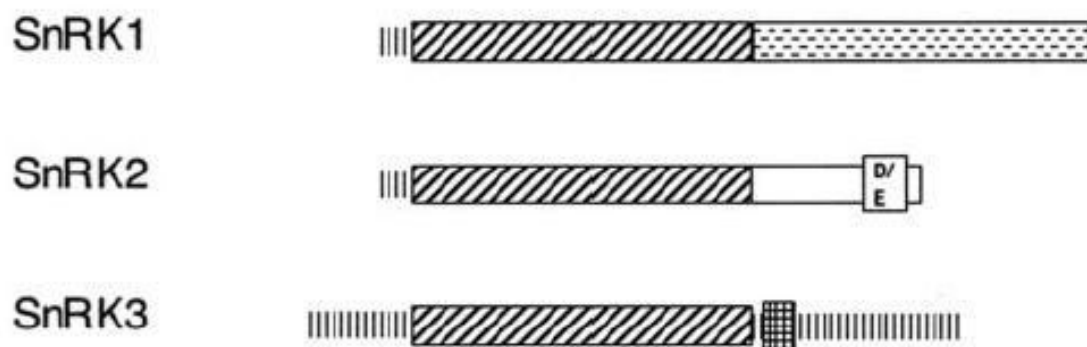


Figura 1. Representação esquemática das estruturas dos domínios das proteínas da família SnRK. A caixa com linhas diagonais representa o domínio quinase conservado. O domínio regulatório C-terminal da SnRK1 está representado pela caixa pontilhada. D/E representa o domínio ácido das SnRK2, enquanto que o domínio NAF das SNRK3 está representado pela caixa quadriculada (Adaptado de Hrabak *et al.*, 2003).

As SnRK2 possuem em média 40 kDa e possuem um domínio característico de aminoácidos ácidos na região C-terminal (Halford *et al.*, 2000). Algumas SnRK2s estão relacionadas a respostas ao ABA (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002). Em cana de açúcar, foram identificados 112 ESTs altamente similares às proteínas SNF1 de leveduras (Carraro *et al.*, 2001). O EST SCEQLB2019B08.g, previamente identificado nesse trabalho, foi posteriormente utilizado para clonar e caracterizar o gene que codifica a proteína SsCIPK8. Esta proteína faz parte do grupo das SnRK3s, também conhecido como CIPKs, o qual será descrito de forma mais detalhada no próximo tópico.

4. As proteínas CIPKs

Estas proteínas formam um grupo de serina/treonina quinases muito similares às SNF1 de leveduras e à AMPK de animais, o que levou alguns a chamarem-no de SnRK3 (Hrabak *et al.*, 2003). Porém este grupo é funcionalmente distinto da SNF1 *kinase* de levedura e apresenta diferentes modos de função e regulação em relação aos outros dois grupos de SnRKs (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Até há pouco tempo, acreditava-se que este grupo de proteínas quinase era restrito às plantas, porém a inspeção de genomas de protozoários identificou prováveis CIPKs nestes organismos (Batistic *et al.*, 2008b).

As proteínas CIPKs estão comumente associadas a respostas a estresses hídrico, salino e de frio e à sinalização por açúcar e ABA, além do transporte de auxinas (Xiang *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002a; Gong *et al.*, 2002b, Tripathi *et al.*, 2009). O domínio catalítico das CIPKs apresenta um laço de ativação característico com um resíduo de tirosina passível de fosforilação por outras proteínas quinases (Figura 2). No domínio C-terminal regulatório característico deste sub-grupo de SnRKs, uma sequência de 24 aminoácidos designada como domínio NAF foi identificada como um módulo de interação suficiente e necessário para mediar a interação com as proteínas CBLs (*calcineurin B-like proteins*) (Albrecht *et al.*, 2001). Ainda no domínio C-terminal, algumas CIPKs podem possuir um domínio de interação de proteínas fosfatases (PPI) (Batistic e Kudla, 2009).

As CBLs são proteínas capazes de perceber assinaturas específicas de cálcio e passar estes sinais adiante em cascatas de fosforilação ou regulação da expressão gênica. Elas possuem quatro motivos EF-hand de ligação ao cálcio e a principal função destas proteínas é interagir e regular a atividade das CIPKs (Kim *et al.*, 2003). Embora os diversos processos nos quais as proteínas CIPKs/CBLs podem participar sejam engatilhados pelos mesmos sinais celulares como o influxo de cálcio, a resposta específica a cada processo pode ser obtida pela enorme possibilidade combinatória das redes de interações formadas pelos diferentes pares CIPK/CBLs, assim como as suas diferentes localizações espaciais, temporais e diferentes padrões de expressão dos genes que as codificam.

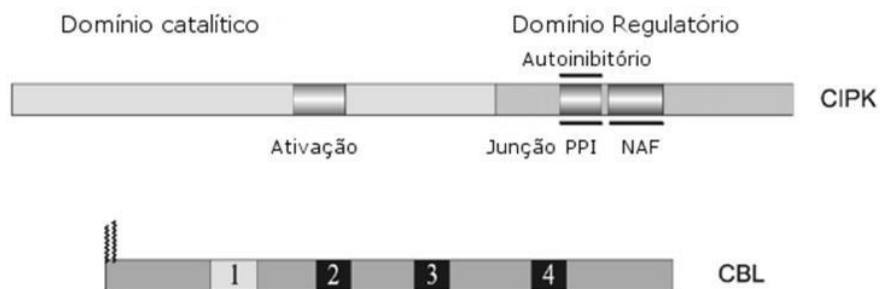


Figura 2. Estrutura geral dos domínios das proteínas CIPK e CBLs. A estrutura geral das CIPKs contém um domínio N-terminal quinase, que possui o sítio de ativação. O domínio C-terminal regulatório é dividido em dois domínios de interação, o domínio NAF, responsável pelas interações CIPK-CBLs, e o domínio de interação com as proteínas fosfatases (PPI). Conectando os domínios C-terminal e N-terminal encontra-se o domínio de junção. A estrutura geral das CBLs é constituída por 4 EF-hands (caixas cinzas contendo números). O espaçamento entre os EF-hands é invariável, enquanto que as extensões N- e C-terminal variam em tamanho. Algumas CBLs podem sofrer modificações lipídicas nos primeiros aminoácidos. Essas modificações são responsáveis por direcioná-las para a membrana plasmática ou tonoplasto. (Modificado de Batistic *et. al*, 2009).

Em *A. thaliana*, a proteína AtCIPK3 regula a resposta ao ABA durante a germinação e a expressão de genes responsivos a estresses e a aplicação ectópica de ABA. A expressão do gene

AtCIPK3 é induzida por ABA, frio, sal, seca e ferimento (Kim et al., 2003). Ainda em *A. thaliana*, foi observada a indução do gene *ATCIPK14* por sacarose, sendo também encontrados elementos responsivos a açúcares no seu promotor (Lee et al., 2005). Em arroz foi mostrado que plantas transgênicas que superexpressavam os genes *OSCIPK3*, *OsCIPK12* e *OsCIPK15* apresentaram respectivamente maior tolerância ao frio, seca e salinidade (Xiang et al., 2007). Tanto as plantas transgênicas superexpressando o gene *OsCIPK3* sob estresse de frio quanto aquelas superexpressando o gene *OsCIPK12* sob estresse de seca apresentaram um maior acúmulo de prolina e açúcares solúveis em comparação às plantas selvagens.

Cheong e colaboradores mostraram que as CBLs 1 e 9 de *A. thaliana* interagem com a proteína *AtCIPK23* *in vivo*, facilitando o seu recrutamento para a membrana plasmática (Cheong et al., 2007). Foi sugerido que os complexos CBLs-CIPK23 associados à membrana plasmática poderiam então fosforilar proteínas aí localizadas, como por exemplo, a proteína formadora do canal de potássio *AKT1* (Li et al., 2006; Xu et al., 2006). Posteriormente foi mostrado que é necessária uma dupla modificação lipídica no início da extremidade N-terminal da proteína *AtCBL1* para que essa possa ser direcionada para membrana plasmática (Batistic et al., 2008a). Ainda em *A. thaliana*, foi mostrado que, nas raízes de plantas sob estresse salino, a proteína *AtCBL4* liga-se à proteína *AtCIPK24* e a direciona para a membrana plasmática onde a *AtCIPK24* pode fosforilar e ativar o canal H^+/Na^+ *SOS1* para eliminar o excesso do Na^+ tóxico à célula (Qiu et al., 2002). Por outro lado, nas folhas, a proteína *AtCBL10* liga-se à proteína *AtCIPK24*, direcionando-a para o vacúolo, onde o excesso de sódio é armazenado (Figura 3). Outros alvos da proteína *AtCIPK24* incluem o canal vacuolar Na^+/H^+ (NHXs), a H^+ -ATPase (V-ATPase), o canal vacuolar H^+/Ca^+ antiporter (CAX1), a proteína Nucleoside Diphosphate Kinase 2 (NDPK2) e as catalases CAT2 e CAT3. Estas descobertas integram o transporte de cálcio, espécies reativas de oxigênio e a geração de força próton-motora e a tolerância à salinidade (Cheng et al., 2004; Qiu et al., 2004; Batelli et al., 2007; Verslues et al., 2007)

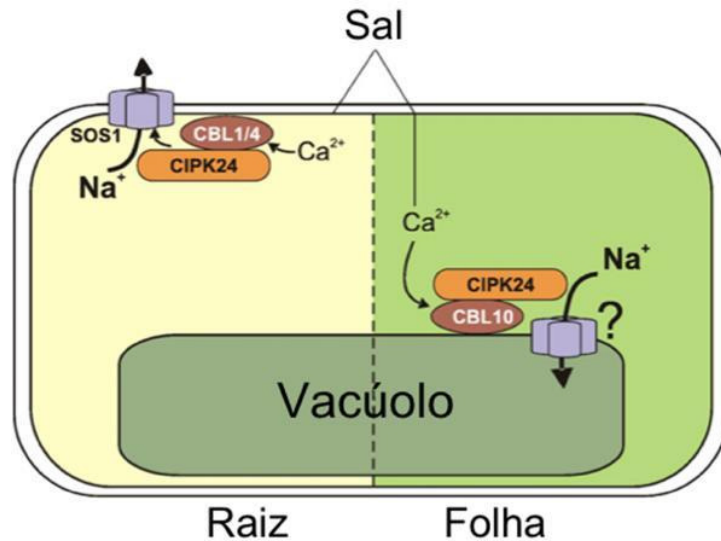


Figura 3. Modelo de uma rede de interação CBL/CIPK em resposta ao estresse salino. Adaptado de Batistic e Kudla 2009.

A base estrutural para a formação preferencial dos complexos CBL/CIPK é ainda incerta. Porém, diferenças na estrutura das CBLs e a alta variabilidade no domínio regulatório das CIPKs sugerem que ambas as proteínas são responsáveis pela especificidade de interação gerada para um determinado par (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Estudos de bioinformática revelaram a existência de 10 CBLs e 25 CIPKs codificadas no genoma de *A. thaliana* e 10 CBLs e 30 kinases no genoma do arroz (Luan *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2001; Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Além destas, um grande número de proteínas tem sido descrito em outras plantas (Hamada *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008).

Em cana-de-açúcar foram identificados 25 *Sugarcane Assembled Sequences* (SAS) anotados como CIPKs (Rocha, 2006), enquanto que nosso grupo identificou 6 genes que codificam para CBLs. Experimentos de microarray indicaram que os genes *ScCIPK14*, *ScCIPK16*, *ScCIPK21*, *ScCIPK3* e *ScCIPK19* são diferencialmente responsivos a seca, ABA ou açúcares. Além disso, eles são diferencialmente expressos entre variedades de cana-de-açúcar de alto e baixo Brix ou entre entrenós maduros e imaturos (Papini-Terzi *et al.*, 2009). Em outro estudo, experimentos de microarray e qPCR revelaram que os genes *ScCIPK18* e *ScCIPK22* são induzidos em resposta à

inoculação de plantas com bactérias fixadoras de N₂, enquanto que os genes *ScCIPK8*, *ScCIPK13* e *ScCPK14* são induzidos por seca (Rocha et al., 2007). Posteriormente foi mostrado que o gene *ScCIPK8* é também induzido em variedade de cana-de-açúcar de baixo Brix e é preferencialmente expresso em folhas e entrenós imaturos, gemas laterais e flores (Felix et al., 2009).

5. O cross-talk entre metabolismo de açúcar e a resposta ao estresse salino e por seca.

As plantas são organismos sésseis e estão sujeitas a um ambiente hostil e em constante mudança. Dentre os fatores que afetam o desenvolvimento das plantas, o estresse hídrico é o responsável pelas maiores perdas na produtividade, pois causa redução nas taxas de assimilação de CO₂, no tamanho das células foliares, na taxa de transpiração, no potencial hídrico na planta, na taxa de crescimento e na abertura estomática (Taiz e Zeiger, 2004), o que afeta direta e indiretamente a fotossíntese, induzindo alterações fisiológicas que podem levar a planta à morte. Desta forma, as plantas possuem uma diversa gama de respostas, variando de respostas imediatas a respostas metabólicas e fisiológicas de longo prazo que as tornam capazes de manter a aclimação e sobrevivência (Pinheiro e Chaves, 2011). Estas respostas demandam uma coordenação fina de toda a planta.

A fotossíntese é um processo chave do metabolismo primário das plantas e, desta forma, possui um papel central na sobrevivência das plantas sob seca. O declínio observado na captura de carbono nas folhas como resultado do déficit hídrico nas plantas é seguido por alterações no particionamento dos fotoassimilados por toda a planta, acarretando em um aumento na razão peso seco de raiz/peso seco da parte aérea. Esse aumento resulta do declínio do crescimento da parte aérea e da manutenção do crescimento radicular com a diminuição da água no solo (Sharp, 2002). Essa resposta é mediada pelos hormônios ácido abscísico (ABA), etileno e pela interação entre eles (Wilkinson e Davies, 2010). As mudanças na razão raiz/caule, assim como a acumulação temporária de reservas no caule que ocorre em diversas espécies, é acompanhada por alterações no metabolismo de carbono e nitrogênio em diferentes órgãos (Pinheiro e Chaves, 2011). Neste contexto, os açúcares devem exercer um papel importante na integração das respostas celulares a

alterações internas e ambientais. Eles atuam como substratos e moduladores da atividade enzimática em vias relacionadas ao metabolismo de carbonos e controlam a expressão de diferentes genes relacionados ao metabolismo de carbonos, lipídios e nitrogênio (Rolland et al., 2006). Recentemente foi sugerido que o amido é um importante integrador do metabolismo e crescimento da planta em resposta a mudanças no desenvolvimento ou do ambiente, refletindo uma rede regulatória que balanceia o crescimento com o suprimento de carbono (Sulpice et al., 2009).

Os reservatórios de açúcares ajustam-se continuamente como resultado do balanço entre o suprimento e a utilização de carbono em toda a planta e o particionamento da sacarose/amido celular, que está sob controle de vários fatores como a seca. Hoje sabe-se que os açúcares possuem um papel importante nos mecanismos adaptativos aos estresses incluindo por exemplo a indução de defesas de estresse pela sacarose (Hanson e Smeeckens, 2009; Ramel et al., 2009). Os níveis das concentrações intracelulares de açúcares exercem um *feedback* nas taxas de fotossíntese, levando a mudanças significativas na atividade de enzimas e na expressão gênica. De forma geral, atividades como a fotossíntese, a mobilização e a exportação de nutrientes, nos órgão fonte, são induzidos em condições de baixas concentrações de açúcares, enquanto que a acumulação de açúcares tem o efeito contrário (Pego et al., 2000). Por outro lado, atividades de tecido dreno como crescimento e armazenamento de nutrientes são induzidas pela abundância de carboidratos. Foi sugerido que a remodelagem da fotossíntese induzida por altos conteúdos de açúcares deve ter um papel importante na minimização dos efeitos deletérios do excesso de luz sob condições nas quais não é necessária nenhuma produção fotossintética, como por exemplo quando o crescimento da planta é suspenso nos estágios iniciais do déficit hídrico.

Sob condições limitantes de água, o balanço entre a captura e a utilização de fotoassimilados pelos drenos é afetada, levando a alterações nos estoques de carbono em vários compartimentos da planta. A concentração de açúcares solúveis nas folhas deve aumentar (durante a fase inicial do estresse), permanecer constante e decair (sob estresse severo) (Pinheiro et al., 2001). A inibição do crescimento e da exportação de açúcares explica porque sob condições de baixa assimilação de carbonos, os níveis de açúcares aumentam nas folhas. A síntese de amido é geralmente reprimida por seca, porém há indícios de que nos estágios iniciais do estresse hídrico

há um aumento transitório (Pinheiro e Chaves, 2011). A alteração nos estoques de açúcares nas plantas sob estresse hídrico é suportada por mudanças nas atividades de enzimas envolvidas em vias relacionadas a açúcares e amido como α -amilase, sacarose sintase (Susy) ou invertases. As proteínas invertases, além de possuírem um papel na regulação da partição de carbono, no desenvolvimento da planta e em respostas a hormônios, possuem um papel importante nas respostas a estresses como proteínas integradoras e moduladoras centrais de sinais (Roitsch e Gonzalez, 2004). Foi sugerido que a indução dos genes de invertases extracelulares é uma resposta comum a vários estresses bióticos e abióticos como o ataque por patógenos e o estresse salino. Em folhas de milho sob estresse hídrico, a acumulação pronunciada de hexoses foi correlacionada ao aumento da atividade de uma invertase vacuolar (Pelleschi et al., 1999). Ainda em milho, foi observado um aumento na atividade total da enzima invertase ácida, coincidindo com uma rápida acumulação de glicose e frutose em plantas submetidas a seca (Trouverie et al., 2003).

Outro importante componente do metabolismo de carboidratos em folhas fotossinteticamente ativas é a enzima sacarose fosfato sintase (SPS), que promove a síntese de sacarose. Um decréscimo na sua atividade em folhas de plantas submetidas a seca foi descrito (Kim et al., 2000). Mudanças nas atividades da enzima resultaram em níveis maiores de sacarose e na acumulação de carboidratos solúveis o que pode ter sido devido a uma menor taxa de exportação ou a uma redução na demanda dos órgãos dreno sob estresse. Os sinais para estas mudanças podem ter sido induzidos por alterações no balanço entre órgãos fonte e dreno (Gupta e Kaur, 2005).

Em folhas de espinafre, a atividade da proteína SPS pode ser ativada ou reprimida por fosforilações sítio específicas (Toroser e Huber, 1997). Durante o dia, a atividade da SPS é inativada pela fosforilação da serina 158 promovida pela proteína SNF like kinase. Este controle é cancelado pela ação induzida por estresse da enzima proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), que ativa a SPS ao fosforilar a serina 424. Em milho, tanto a enzima SPS quanto a sacarose sintase (Susy) podem ser fosforiladas por uma CDPK (Huber et al., 1996). Neste caso, a fosforilação da Susy ativa seletivamente a reação de clivagem da sacarose.

Em *A. thaliana* foi mostrado que alguns genes de enzimas do metabolismo de carbono como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, SPS, Susy e fosfoenol piruvato carboxilase (PEP carboxilase) são induzidos por seca (Seki et al., 2002). A indução de genes de proteínas regulatórias como quinases, fosfatases e calmodulin-binding proteins que estão relacionadas à regulação de genes em condições de estresse suportam o papel dos açúcares em cascatas de transdução de sinais.

Como mencionado anteriormente, os dados das plantas transgênicas de cana-de-açúcar silenciadas para o gene *ScCIPK8* indicam um papel antagônico deste gene no acúmulo de sacarose. Os níveis de mRNA do gene *ScCIPK8* estão associados inversamente ao conteúdo de sacarose em folhas maduras após 9 meses de plantio, observando-se uma maior expressão em variedades de baixo Brix (Sólidos solúveis) (Felix et al., 2009). Estudos mostraram que o silenciamento do gene *ScCIPK8* gerou plantas com um aumento no acúmulo de açúcar de 20% (pedido de patente no United States Patent and Trademark Office número 60/780.693, em 2006) e que apresentaram uma maior razão sacarose/monossacarídeos.

Por outro lado, os dados de expressão gênica mostram que o gene *ScCIPK8* é induzido por seca (Rocha et al., 2007). Possivelmente as respostas desencadeadas pela *ScCIPK8* devem atuar, além de induzir a ativação de genes e proteínas relacionados à resposta ao estresse, ativando a expressão de genes que codificam para as enzimas invertases ou Susy ou diretamente ativando estas enzimas de forma a favorecer nas folhas um maior acúmulo de monossacarídeos. Esta hipótese poderia explicar em parte o fato das plantas silenciadas para o gene *ScCIPK8* acumularem maiores quantidade de açúcares nas suas folhas e possuírem uma maior relação sacarose/monossacarídeos em comparação às plantas selvagens.

O conjunto de dados de expressão gênica das CIPKs de cana-de-açúcar evidenciam um importante papel destas proteínas no metabolismo de açúcar, bem como nas respostas a estresses. O papel aparentemente antagônico de algumas CIPKs nesses processos indica a alta complexidade do metabolismo de açúcar e das respostas a estresses, de forma que diversas redes de interação proteica devem atuar simultaneamente e as CIPKS devem empenhar um papel central na integração de ambas as vias.

Desta forma, torna-se essencial entender os mecanismos pelos quais a ScCIPK8 atua na interface das respostas ao estresse hídrico e do metabolismo de açúcares em cana-de-açúcar. A identificação de proteínas que interagem com a ScCIPK8 abre perspectivas de obtenção de novos alvos para a produção de plantas mais produtivas e/ou resistentes a diversos estresses.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos gerais a caracterização funcional do gene *ScCIPK8* e da proteína por ele codificado, para ampliar a compreensão do seu papel na acumulação de açúcar e na resposta a estresses abióticos em cana-de-açúcar.

Como objetivos específicos buscamos:

- Identificar a rede de interação da proteína ScCIPK8 através da técnica de duplo-híbrido em leveduras.
- Confirmar as interações identificadas utilizando a técnica Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)
- Avaliar os padrões de expressão do gene *ScCIPK8* e dos seus alvos de interação através de ensaios de PCR em tempo real.
- Caracterizar *in vivo* o papel da proteína ScCIPK8 através da obtenção de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* que superexpressam o gene *ScCIPK8*.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

A caracterização funcional do gene *ScCIPK8* foi dividida em duas etapas. No primeiro capítulo, foi identificada a interação da proteína ScCIPK8 com as proteínas ScCBL1, ScCBL3 e ScCBL6. No segundo capítulo, procuramos identificar novos alvos de interação da proteína ScCIPK8 diferentes das proteínas CBLs e avaliar o papel do gene *ScCIPK8* nas respostas ao estresse hídrico, através de ensaios de PCR em tempo real e da obtenção de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 1. No primeiro capítulo foi identificada a interação da proteína ScCIPK8 com as proteínas ScCBL1, ScCBL3 e ScCBL6 através da técnica de duplo-híbrido em leveduras. Estas interações foram confirmadas *in planta* por meio da técnica BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation Assay). Esse trabalho foi aceito para publicação na revista *Genetics and Molecular Research*.

Capítulo 2. Nesse trabalho procuramos identificar alvos de interação da proteína ScCIPK8 diferentes das proteínas CBLs. Para tanto, foram realizados *screenings* de bibliotecas de cDNA de folha +1 e entrenó 5 de cana-de-açúcar. Além disso, foram realizados ensaios de PCR em tempo real no intuito de avaliar a expressão do gene *ScCIPK8*, bem como a expressão dos genes dos seus alvos de interação sob estresse hídrico. Por fim, foram obtidas plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene *ScCIPK8* sob controle do promotor constitutivo 35S. No intuito de identificar se o gene *ScCIPK8* seria capaz de conferir maior tolerância a seca e a estresse salino, sementes destas plantas foram semeadas em meio contendo diferentes concentrações de manitol e NaCl e a porcentagem de germinação foi avaliada.

CAPÍTULO 1

Characterization of a protein-protein interaction network of the CBL-Interacting Protein Kinase 8 from sugarcane.

T.F. Farani, A. Gentile, R.G. Tavares, C. Ribeiro and M. Menossi

Genetics and Molecular Research. Manuscrito aceito para publicação.

Characterization of a protein-protein interaction network of the CBL-Interacting Protein Kinase 8 from sugarcane.

Running title: CIPK8 interaction with CBL proteins in sugarcane.

T.F. Farani, A. Gentile, R.G. Tavares, C. Ribeiro and M. Menossi

Laboratório de Genoma Funcional, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. São Paulo, Brasil

Corresponding author: M. Menossi

Email: menossi@lgf.ib.unicamp.br

Telephone: 55-19-3521-6236

Fax: 55-29-3521-6234

ABSTRACT

Plants are sessile organisms and have evolved to tolerate a constantly changing environment. After the onset of different stress conditions calcineurin B-like proteins (CBLs) can sense calcium signal and activate CBL-interacting protein kinase (CIPKs) proteins, which can phosphorylate downstream proteins to reestablish plant homeostasis. Previous studies in the bioenergy crop sugarcane showed that the gene *ScCIPK8* is induced by drought stress and is also related to sucrose content. Here we have characterized the protein-protein interactions of *ScCIPK8* with six calcineurin B-like proteins (*ScCBL1*, *ScCBL2*, *ScCBL3*, *ScCBL6*, *ScCBL9* and *ScCBL10*). Yeast-two hybrid assays showed that *ScCIPK8* interacts with *ScCBL1*, *ScCBL3* and *ScCBL6*. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays confirmed *in planta* the interactions observed in yeast cells. These findings give insights on the regulatory networks related to sugar accumulation and drought stress responses in sugarcane.

Key words: *ScCIPK8*; Sugarcane CBL proteins; Yeast-two hybrid; Bimolecular fluorescence complementation; Calcium signaling.

INTRODUCTION

Plants have evolved to tolerate a constantly changing environment and have developed a complex signaling network to perceive and adapt to a wide range of stress conditions. There are evidences suggesting that for each stress condition, specific temporal, spatial and concentration variations in cytosolic free calcium (Ca^{+2}) are generated (Webb et al., 1996). These calcium signatures can be decoded and modulated by calcium binding proteins, which bind calcium through their EF-hands and relay the signal by activating kinases, transcription factor or directly acting at promoters of effector genes (DeFalco et al., 2010; Hassan et al., 2012). One group of plant-specific calcium-binding proteins comprises the CBL proteins (Shi et al., 1999). CBLs have four EF-hands by which they can bind calcium and then activate a group of Ser/Thr protein kinases designated as CIPKs (Kudla et al., 1999). These kinases proteins are known to be composed of a N-terminal catalytic kinase domain and a C-terminal regulatory domain, with a junction domain connecting them. A conserved activation loop, localized between the DFG and APA amino acid residues at the kinase domain, is present in all known CIPKs. It has been shown that a 24 amino acids region named NAF/FISL motif localized in the regulatory domain is responsible for the CIPK/CBL interactions (Albrecht et al., 2001).

Genomic analyses revealed the existence of at least 10 CBLs and 25 CIPKs in *Arabidopsis thaliana* genome and 10 CBLs and 30 CIPKs in rice genome (Guo et al., 2001; Luan et al., 2002; Kolukisaoglu et al., 2004). CIPKs and CBLs are usually involved in abscisic acid signaling, drought, salinity and cold responses, auxin transport and sugar signaling (Guo et al., 2001; Gong et al., 2002; Guo et al., 2002; Lee et al., 2005; Xiang et al., 2007; Tripathi et al., 2009). Although these processes can initially trigger similar cellular responses like calcium influx into the cell, functional specificity can be achieved by the great number of combinatorial possibilities of CIPK/CBL networks as well as by their biochemical and sub-cellular localization, and by their specific spatial, temporal and environmental gene expression patterns.

Although some CIPK/CBL pathways have been described and functionally studied in *A. thaliana*, little is known in sugarcane. Here we describe the cloning and characterization of *ScCIPK8*, *ScCBL1*, *ScCBL2*, *ScCBL3*, *ScCBL6*, *ScCBL9* and *ScCBL10* coding sequences. We also show by

yeast two-hybrid and BiFC assays that ScCIPK8 protein can interact with ScCBL1, ScCBL3 and ScCBL6 but not with ScCBL2, ScCBL9 and ScCBL10 proteins.

MATERIAL AND METHODS

Cloning of full-length ScCIPK8 cDNA

Sugarcane assembled sequence (SAS) SCEQLB2019B08.g identified at the Sucest-Fun database (<http://www.sucest-fun.org/>) was used as template to clone *ScCIPK8* ORF into *pGEM-T-Easy* (Promega, USA). Total RNA from mature sugarcane leaves were used to synthesize first-strand cDNA using an oligo(dT)₂₀ primer with Superscript III RT kit following the manufacturer instructions (Invitrogen, USA). The complete coding sequence of *ScCIPK8* was amplified using this first-strand cDNA as template with specific primers (5'-GAATTCATGAGTACAACCAAGGTGAA-3' and 5'-GGATCCACGAGGTTCTGCTAAGCAG-3') flanked by EcoRI and BamHI restriction enzyme sites.

Cloning of full-length ScCBLs cDNAs

ScCBL ORFs were identified after a survey in the Sucest-Fun database. Ten *A. thaliana* CBL genes and ten rice CBL genes were used as query with Blast algorithm. Six SASs corresponding to putative *ScCBL* genes were identified and named according to their similarities with *A. thaliana* and rice CBL genes: *ScCBL1*, *ScCBL2*, *ScCBL3*, *ScCBL6*, *ScCBL9* and *ScCBL10* (Table 1). Specific primers flanked by restriction enzymes sites were designed to amplify the complete coding sequence of each *ScCBL*: *ScCBL1* (5'-CCCGGGGGGCGATGGGGTGCTTCCA-3': SmaI and 5'-GGATCCTCGGGGAGAGAATCATGGTCACGT-3': BamHI), *ScCBL2* (5'-GAATTCATATCATGGGTGCAGTGC-3': EcoRI and 5'-GGATCCTCAGTTATCATCGACTTGAGA-3': BamHI), *ScCBL3* (5'-CATATGATGTTGCAGTGCCTGGAT-3': NdeI and 5'-CTCGAGCAGAAGTTCAGGTATCATCGAC-3': XhoI), *ScCBL6* (5'-CATATGATGGTGGACTTTGTTCG-3': NdeI and 5'-CCCGGGTACGCATCCTCTACTTG-3': SmaI), *ScCBL9* (5'-GAATTCGAATGCCACGAGCCAC-3': EcoRI and 5'-GGATCCTTAATCTTCCACTGCCGTGTTG-3': BamHI), *ScCBL10* (5'-

GGATCCCCATGGACTCCTGCCGCTG-3': BamHI and 5'-CTCGAGATCGCCCTAGTCTTCGACTTG-3': XhoI). The plasmid clones containing the *ScCBL* SASs were used as template to amplify each *ScCBL* ORF, which were then cloned into *pGEM-T-Easy* vector (Promega).

PCR conditions included: 1X High Fidelity PCR Buffer with MgCl₂ (Fermentas, EUA), 0.2 mM dNTPs mix, 0.2 uM of each primer, 10-1000 ng of template DNA, 1,2% DMSO, 3 units of High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas, EUA). Thermo-cycling conditions included: an initial cycle at 94°C for 3 minutes, followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 2 minutes, followed by a final extension of 72°C for 7 minutes.

Sequence alignment and domain identification.

Theoretical molecular mass and isoelectric point of the deduced amino acid sequences of ScCIPK8 and ScCBLs proteins were calculated using ExPASy ProtParam Tool (Gasteiger et al., 2005). Multiple alignments with several ScCIPK proteins from diverse plants were conducted using ClustalW2 algorithm (Larkin et al., 2007; Goujon et al., 2010). Myristoylation and palmitoylation site prediction were carried using the ExPASy Myristoylator Tool (Bologna et al., 2004) and the CSS-Palm algorithm (Ren et al., 2008).

Yeast two-hybrid assays.

Yeast two-hybrid assays were conducted using the BD Matchmaker™ *Library Construction and Screening Kit* (Clontech, USA) following the manufacturer instructions. The *ScCIPK8* coding sequence was digested from *pGEM-T-Easy* vector, purified and cloned into the *pGBKT7* vector to generate the bait construct *pGBKT7::ScCIPK8*. *ScCBL* coding sequences were digested from *pGEM-T-Easy*, purified and cloned into *pGADT7* vector, generating the corresponding *pGADT7::ScCBL* prey constructs. Each prey construct was individually co-transformed with the bait construct into *Saccharomyces cerevisiae* AH109 cells. Control constructs given by the BD Matchmaker™ *Library Construction and Screening Kit* included the Murine *p53* gene cloned into *pGBKT7* vector (*pGBKT7::53*) as the bait construct and Human *lamin C* gene cloned into

pGADT7 vector (*pGADT7::Lam*) and *SV40 Large T-antigen* gene cloned into *pGADT7* vector (*pGADT7::T*) as prey constructs. The negative control consisted of yeast AH109 cells co-transformed with *pGBKT7::53* and *pGADT7::Lam*, while the positive control consisted of yeast AH109 cells co-transformed with *pGBKT7::53* and *pGADT7::T*. Transformed yeast cells were first streaked onto selective synthetic defined medium (SD) without Trp and Leu amino acids and grown for four days at 30°C. Positive colonies were then streaked onto SD medium without Trp, Leu and His amino acids, containing 3-AT 2.5 mM, and grown for four days at 30°C. Finally, positive colonies were streaked onto SD medium without Trp, Leu, His and Ade, containing 0.8 mg X- α -Gal and grown for four days at 30°C. After four days of incubation, positive blue colonies were selected and re-streaked on SD medium without Trp, Leu, His and Ade, containing 0.8 mg X- α -Gal and grown for four days at 30°C to assure the positive phenotype.

BiFC assays.

The complete coding sequences of *ScCIPK8*, *ScCBL1*, *ScCBL3* and *ScCBL6* were first PCR-amplified to allow their cloning without the stop codons into *pGEM-T-Easy* vector. The primers used and the restriction enzyme sites added were: *ScCIPK8* (5'-TCTAGAATGAGTACAACCAAGGTGAA-3': XbaI and 5'-GGTACCAGCAGCATATTGCGTTTGAAGA-3': KpnI), *ScCBL1* (5'-TCTAGAGCGGCGATGGGGTGCTTCC-3': XbaI and 5'-GGTACCCGTGACGAGATCATCGACTTCGG-3': KpnI), *ScCBL3* (5'-TCTAGACGTCGATGCTTGGTTAGCAG-3': XbaI and 5'-CTCGAGGGTATCATCGACCTGAGAATG-3') and *ScCBL6* (5'-TCTAGATGTGCAATGGTGGACTTTGT: XbaI and 5'-GGTACCCGCATCCTCTACTTGAGAGTTGA-3': KpnI). *ScCIPK8* coding sequence was digested, purified and cloned into the *pSPYCE35S* vector (Walter et al., 2004) generating the construct *pSPYCE35S::ScCIPK8*, used to express ScCIPK8 protein fused to the C-terminal fragment of yellow fluorescent protein (YFP). *ScCBL1*, *ScCBL3* and *ScCBL6* genes were digested, purified and cloned into *pSPYNE35S* vectors to produce ScCBL proteins fused to the N-terminal fragment of YFP. Each BiFC construct was transformed individually into

Agrobacterium tumefaciens by the freeze-thaw method (Holsters et al., 1978). *A. tumefaciens* transformed with the *pSPYCE35S::ScCIPK8* construct was co-infiltrated in three weeks-old *A. thaliana* leaves along with *A. tumefaciens* transformed with *ScCBL1*, *ScCBL3* or *ScCBL6* cloned into *pSPYNE35S* according to Lee and Yang (2006). As a negative control, *A. tumefaciens* transformed with *pSPYCE35S* empty vector was co-infiltrated in three weeks old *A. thaliana* leaves along with *A. tumefaciens* transformed with the *pSPYNE35S* empty vector. Fluorescence of lower epidermis of *A. thaliana* leaves were observed 16 hours after infiltration on a Zeiss LSM780-NLO confocal laser scanning system. YFP fluorescence was detected by excitation with an argon laser (488 nm) and emission at 492 to 593 nm.

RESULTS

Cloning and molecular characterization of ScCIPK8

Previous studies showed that the SAS SCEQLB2019B08.g is induced by drought stress and is also related to sucrose content (Rocha et al., 2007; Felix et al., 2009). This SAS was first annotated from the SUCAST catalog as caneCIPK-8 as it was the eighth sugarcane CIPK SAS to be annotated (Rocha et al., 2007). Here we renamed the gene to *ScCIPK8*. The complete coding sequence of *ScCIPK8* was identified and it comprises 1314 nucleotides, encoding a putative 437 amino acids protein (Table 1). Theoretical molecular mass and isoelectric point were estimated to be 50 kD and 6.82 respectively. The deduced amino acid sequence is very similar to the kinase proteins AtCIPK3 from *A. thaliana* (76.3% identity and 88.3% amino acid similarity). Multiple alignments with several ScCIPK proteins from diverse plants were conducted (data not shown) and allowed us to produce a schematic view of the distinct putative domains of ScCIPK8 protein (Figure 1). The N-terminal kinase domain of ScCIPK8 protein is delimited by amino acids 1 and 265 and harbors an activation loop between amino acids 151 and 180. The auto inhibitory C-terminal domain is delimited by amino acids 305 and 437. A junction domain delimited by amino acids 266 and 304 connects the N-terminal and C-terminal domains of ScCIPK8. The NAF domain is located at the C-terminal regulatory domain, between amino acids 305 and 327. A putative protein phosphatase interaction (PPI) domain was also identified at the C-terminal region, located between amino acids 331 and 367.

Table 1.

Figure 1.

Cloning and molecular characterization of ScCBLs

Six SASs corresponding to putative *ScCBL* genes were identified and named according to their similarities with *A. thaliana* and rice CBL genes: *ScCBL1*, *ScCBL2*, *ScCBL3*, *ScCBL6*, *ScCBL9*

and *ScCBL10* (Table 1). Our results show that Sugarcane CBL protein family is quite conserved in size and structure, with identities and similarities in amino acid sequences ranging from 53% and 67.8% between ScCBL2 and ScCBL9 and 93.3% and 99.1% between ScCBL2 and ScCBL3. Similarly, high levels of conservation is observed in *A. thaliana* and in rice (Kolukisaoglu et al., 2004). The complete coding sequences of the distinct sugarcane *CBL* genes vary from 642 (*ScCBL6*) to 1053 (*ScCBL9*) nucleotides (Table 1) and the predicted amino acid sequences vary from 213 (*ScCBL6*) to 350 (*ScCBL9*) amino acids. Theoretical molecular mass ranges from 24.5 kD (*ScCBL1*) to 39.5 kD (*ScCBL9*) and the estimated isoelectric point from 4.69 (*ScCBL1*) to 5.55 (*ScCBL9*) (Table 1). As observed with other CBL proteins from other plants, sugarcane CBLs have a conserved core comprised by their EF-hands and less conserved N- and C-terminal regions (Batistic and Kudla, 2004). In all ScCBL identified, their first EF-hand consists of 14 amino acids, while the next three ones consists of 12 amino acids (Figure 1). Also, the spacing regions connecting the different EF-hands have a constant number of amino acids. EF-hands 1 and 2 are spaced by 23 amino acids residues, EF-hands 2 and 3 are spaced by 25 amino acids and EF-hands 3 and 4 are spaced by 32 amino acids. The only exception is the spacing region connecting EF-hand 2 and EF-hand 3 from ScCBL9, which has 57 amino acids residues and not 25 as usual. This region in ScCBL9 seems to have an insertion of 32 amino acids making it different from all other CBL described so far. Interestingly, ScCBL1 has a predicted myristoylation and palmitoylation site at its N-terminus, which was supported by *in silico* analysis.

ScCIPK8 protein-protein interaction network identification

In order to verify if ScCIPK8 could interact with any of the ScCBL identified, yeast two-hybrid assays were conducted. Among all the six ScCBL protein tested, ScCIPK8 protein could interact with ScCBL1, ScCBL3 and ScCBL10 proteins in yeast cells (Figure 2A). The interactions identified in yeast two-hybrid assays were confirmed by BiFC assays in *A. thaliana* leaf cells. Although it was not possible to observe the precise localization of these interactions, our data suggests that the interaction between ScCIPK8 and ScCBL1 may occur either at the plasma membrane or at the cytoplasm (Figure 2B.ii), the interaction between ScCIPK8 and ScCBL3 may

occur at the cytoplasm (Figure 2B.iii) and ScCIPK8 and ScCBL6 at a membrane compartment like endoplasmic reticulum, tonoplast or at the plasma membrane (Figure 2B.iv).

Figure 2.

DISCUSSION

CIPKs and CBLs are usually involved in stress responses as well as sugar signaling in plants. At different stress conditions, CBLs can sense cellular calcium signals and activate CIPK proteins, which can phosphorylate downstream proteins. Although some CIPKs and CBLs have been described and functionally studied in other plants (Guo et al., 2001; Gong et al., 2002; Guo et al., 2002; Luan et al., 2002; Kolukisaoglu et al., 2004; Lee et al., 2005; Xiang et al., 2007; Tripathi et al., 2009), little is known in sugarcane. It has been shown that *ScCIPK8* gene is induced by drought stress (Rocha et al., 2007) and the expression levels are negatively correlated with sucrose content (Felix et al., 2009).

In order to better understand the role of ScCIPK8 in stress signaling and sugar responses we show at the present work the cloning and characterization of *ScCIPK8* gene and describe its protein-protein interaction network with sugarcane CBL proteins. *ScCIPK8* ORF has 1314 bp, encoding a 437 amino acids sequence. Similar to other CIPK proteins, ScCIPK8 deduced amino acids sequence shows a N-terminal kinase domain and a regulatory auto inhibitory C-terminal domain, which harbors the NAF domain, responsible for CBL interaction, and a putative (PPI) domain. In *A. thaliana*, a PPI domain present at the SOS2 protein (AtCIPK24) has been described as responsible for the interaction with the protein phosphatase 2C ABI2 (Ohta et al., 2003). The PPI interaction domain could act along with NAF domain to fine tune ScCIPK8 activation state by modulating its phosphorylation/dephosphorylation in response to different environmental stimuli.

We have identified and cloned six *ScCBL* cDNAs. Sequence analysis of their deduced amino acids sequence shows that all ScCBLs identified have 4 EF-Hands and that sugarcane CBL proteins constitute an evolutionary highly conserved family of proteins. It was shown that ScCIPK8 protein could interact with ScCBL1, ScCBL3 and ScCBL6 proteins but not with ScCBL2, ScCBL9 and ScCBL10 in yeast as well as in *A. thaliana* leaf cells.

Interaction between ScCIPK8 and ScCBL1 may occur either at the plasma membrane or at the cytoplasm. This is in agreement with *in silico* analysis indicating that ScCBL1 is probably myristoylated and palmitoylated. ScCBL1 shows 77.5% identity and 91.1% amino acid similarity with *A. thaliana* AtCBL1 protein, which is known to be myristoylated and then

palmitoylated at its N-terminus (Batistic et al., 2008). This dual lipid modification at AtCBL1 is responsible to direct the AtCIPK23-AtCBL1 complex to the plasma membrane where AtCIPK23 can phosphorylate and activate the potassium (K^+) channel protein AKT1 (Lee et al., 2007).

In vivo assays of the interaction between ScCIPK8 and ScCBL3, which is very similar to *A. thaliana* AtCBL3 (86,6% and 94,2% identity and amino acids similarity), suggest these proteins interact at the cytoplasm. This pattern differs from the subcellular localization of *A. thaliana* AtCBL3 protein, which is localized at the tonoplast (Batistic et al., 2010). On the other hand, the interaction between ScCIPK8 and ScCBL6, which is also very similar to *A. thaliana* AtCBL3 (82.4 and 92.8% identity and amino acids similarity), may occur at a membrane compartment like endoplasmic reticulum, tonoplast or at the plasma membrane.

In summary, the identification of the ScCIPK8/ScCBLs protein-protein interaction network indicates that ScCIPK8 activation in sugarcane involves at least three CBL proteins. Considering that ScCIPK8 is induced by drought stress and has a negative relationship with sucrose accumulation, our data indicate these CBLs can also play a role in regulating these responses in sugarcane.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the Doctoral scholarship for T. F. Farani. This work was funded by grants 2008/5798-6 (São Paulo Research Foundation - FAPESP) and 574002/2008-1 (CNPq).

REFERENCES

- Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K and Kudla J (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺ regulated kinases. *EMBO J.* 20: 1051-1063.
- Batistic O and Kudla J (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta.* 219: 915-924.
- Batistic O, Sorek N, Schultke S, Yalovsky S and Kudla J (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 20: 1346-1362.
- Batistic O, Waadt R, Steinhorst L, Held K and Kudla J (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J.* 61: 211-222.
- Bologna G, Yvon C, Duvaud S and Veuthey AL (2004). N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics.* 4: 1626-1632.
- DeFalco TA, Bender KW and Snedden WA (2010). Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochemical Journal.* 425: 27-40.
- Felix JDM, Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vêncio RZN, Vicentini R, Nishiyama MY, Ulian EC, Souza GM and Menossi M (2009). Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregating for Sugar Content. *Tropical Plant Biology.* 2: 98-109.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD and Bairoch A (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: The Proteomics Protocols Handbook. (Walker JM, ed.). Humana Press, New York, 571-607.
- Gong D, Gong Z, Guo Y, Chen X and Zhu JK (2002). Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel Arabidopsis protein kinase. *J Biol Chem.* 277: 28340-28350.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J and Lopez R (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 38: 695-699.
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M and Zhu J-K (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant cell.* 13: 1383-1399.

- Guo Y, Xiong L, Song CP, Gong D, Halfter U and Zhu JK (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*. 3: 233-244.
- Hassan A, Okuta T, Kato M, Hatsugai N, Sano Y, Ishimori T, Okazaki K, Doullah MA and Shah MM (2012). Alternaric acid stimulates phosphorylation of His-tagged RiCDPK2, a calcium-dependent protein kinase in potato plants. *Genet Mol Res*. 11: 2381-2389.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M and Schell J (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet*. 163: 181-187.
- Kolukisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, Batistic O and Kudla J (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant physiology*. 134: 43-58.
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W and Luan S (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 4718-4723.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
- Lee EJ, Iai H, Sano H and Koizumi N (2005). Sugar responsible and tissue specific expression of a gene encoding AtCIPK14, an Arabidopsis CBL-interacting protein kinase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 69: 242-245.
- Lee MW and Yang Y (2006). Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. *Methods Mol Biol*. 323: 225-229.
- Lee SC, Lan WZ, Kim BG, Li L, Cheong YH, Pandey GK, Lu G, Buchanan BB and Luan S (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 15959-15964.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S and Gruissem W (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*. 14 Suppl: S389-400.

Ohta M, Guo Y, Halfter U and Zhu JK (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 11771-11776.

Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y and Yao X (2008). CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel*. 21: 639-644.

Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Jr., Vencio RZ, Vicentini R, Duarte RD, de Rosa VE, Jr., Vinagre F, Barsalobres C, Medeiros AH, Rodrigues FA, Ulian EC, Zingaretti SM, Galbiatti JA, Almeida RS, Figueira AV, Hemerly AS, Silva-Filho MC, Menossi M and Souza GM (2007). Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics*. 8: 71.

Shi J, Kim KN, Ritz O, Albrecht V, Gupta R, Harter K, Luan S and Kudla J (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. *Plant Cell*. 11: 2393-2405.

Tripathi V, Parasuraman B, Laxmi A and Chattopadhyay D (2009). CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. *The Plant journal*. 58: 778-790.

Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K and Kudla J (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*. 40: 428-438.

Webb AAR, McAinsh MR, Taylor JE and Hetherington AM (1996). Calcium Ions as Intracellular Second Messengers in Higher Plants. In: *Advances in Botanical Research*. (Callow JA, ed.). Academic Press, New York, 45-96.

Xiang Y, Huang Y and Xiong L (2007). Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*. 144: 1416-1428.

Table 1. Sugarcane CIPK8 and CBL proteins.					
Name	SUCEST SAS id. ^a	cDNA ^b	Amino acid ^c	Mr ^d	pI ^e
ScCIPK8	SCEQLB2019B08.g	1314	437	50	6,82
ScCBL1	SCRLLR1131D03.g	645	214	24,5	4,69
ScCBL2	SCEZRT2022G03.g	678	225	25,9	4,8
ScCBL3	SCJFRZ1007A06.g	678	225	25,8	4,82
ScCBL6	SCUTFL1058G06.g	642	213	25,7	4,82
ScCBL9	SCCCRZ2004D09.g	1053	350	39,5	5,55
ScCBL10	SCJFRZ2013C05.g	798	265	30,1	4,87

^a SUCEST database SAS accession number. ^b cDNA length in base pairs. ^c Amino acid length of predicted protein. ^d Theoretical molecular mass (Mr) of the predicted protein calculated by ProParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam>). ^e Estimated isoelectric point of the predicted protein estimated by ProParam tool (<http://web.expasy.org/protparam>).

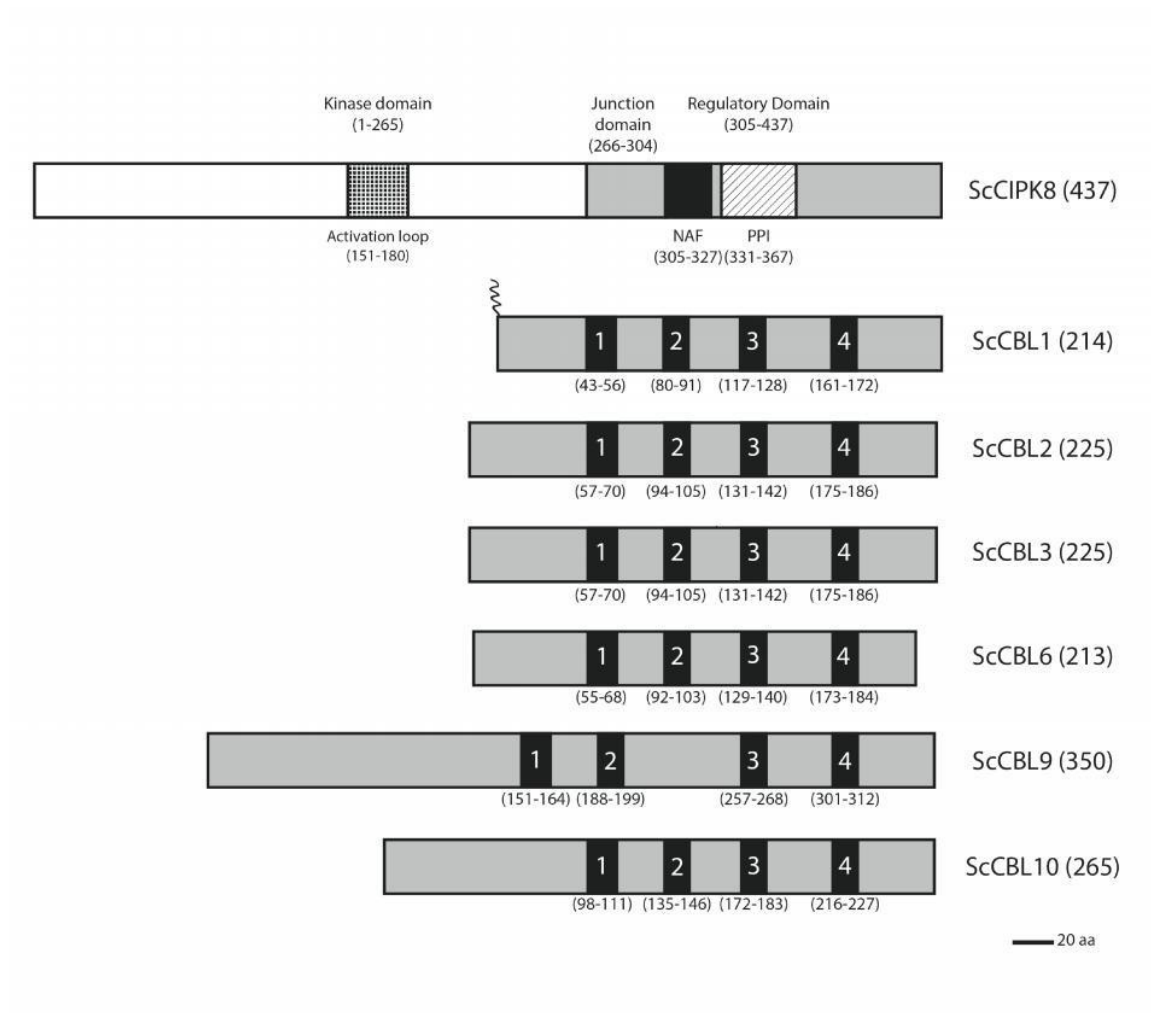


Figure 1. Schematic view of ScCIPK8 and the six ScCBLs predicted amino acid sequences. Start and ending points of the corresponding predicted domains are shown below each domain. The EF-hands in each ScCBL are indicated (numbers 1-4). The coil at the beginning of the N-terminus of ScCBL1 indicates the predicted myristoylation and palmitoylation site.

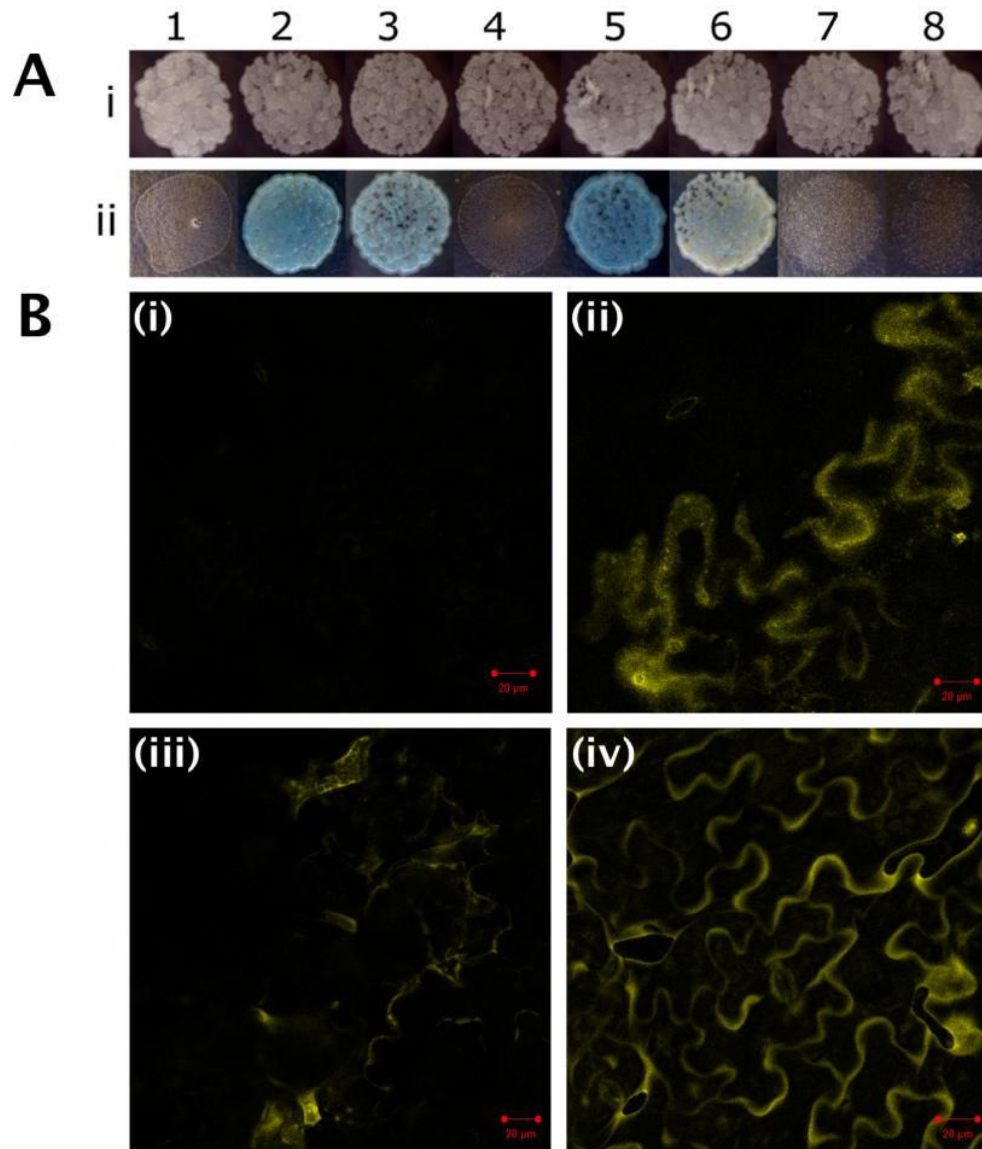


Figure 2. ScCIPK8 interaction with ScCBL proteins **A.** Yeast two-hybrid assays. **i:** SD medium lacking Leu and Trp amino acids; **ii:** SD medium lacking Leu, Trp, His and Ade. 1, *pGBKT7::53* + *pGADT7::Lam* (negative control). 2, *pGBKT7::53* + *pGADT7::T* (positive control). 3, *ScCBL1* + *ScCIPK8*. 4, *ScCBL2* + *ScCIPK8*. 5, *ScCBL3* + *ScCIPK8*. 6, *ScCBL6* + *ScCIPK8*. 7, *ScCBL9* + *ScCIPK8*. 8, *ScCBL10* + *ScCIPK8*. **B.** BiFC assays. Leaves of three weeks-old *A. thaliana* were transiently transformed with *A. tumefaciens*. **i:** *pSPYCE* + *pSPYNE* (negative control); **ii:** *pSPYCE::ScCIPK8* + *pSPYNE::ScCBL1*; **iii:** *pSPYCE::ScCIPK8* + *pSPYNE::ScCBL3*; **iv:** *pSPYCE::ScCIPK8* + *pSPYNE::ScCBL6*.

CAPÍTULO 2

Caracterização funcional do gene *ScCIPK8*

INTRODUÇÃO

No capítulo anterior, foi descrita a interação da proteína ScCIPK8 com as proteínas ScCBL1, ScCBL3 e ScCBL6. Redes de interação entre as proteínas CIPKs e CBLs têm sido amplamente descritas, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos como respostas a estresses hídrico, salino e de frio e à sinalização por açúcar e ABA, além do transporte de auxinas (Guo et al., 2001; Gong et al., 2002a; Gong et al., 2002b; Guo et al., 2002; Xiang et al., 2007; Tripathi et al., 2009). Entretanto, até o presente momento, foram descritos poucos alvos de interação das CIPKs que sejam diferentes de proteínas CBLs.

Em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado que a proteína AtCIPK24 pode interagir com o canal vacuolar Na^+/H^+ (NHXs), com a H^+ -ATPase (V-ATPase), com o canal vacuolar H^+/Ca^+ antiporter (CAX1), com a proteína nucleoside diphosphate kinase 2 (NDPK2) e com as catalases CAT2 e CAT3 (Cheng et al., 2004; Qiu et al., 2004; Batelli et al., 2007; Verslues et al., 2007).

Desta forma, buscamos identificar novos alvos de interação da proteína ScCIPK8 de cana-de-açúcar por meio de ensaios de duplo-híbrido em leveduras utilizando o *screening* de uma biblioteca de cDNA de folha +1 e de uma biblioteca de cDNA de entrenó 5 de cana-de-açúcar. No intuito de caracterizar a expressão do gene *ScCIPK8* e os genes que codificam os alvos de interação da proteína ScCIPK8 identificados, ensaios de PCR em tempo real foram conduzidos utilizando plantas de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes a seca submetidas a estresse hídrico.

Finalmente, buscamos identificar se o gene *ScCIPK8* seria capaz de conferir maior tolerância ao estresse hídrico e ao estresse salino. Plantas de mutantes de *A. thaliana* transformadas com o gene *ScCIPK8* foram obtidas e as suas sementes foram submetidas a estresse hídrico (manitol) e salino (NaCl). A taxa de germinação das sementes foi avaliada diariamente durante 8 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Clonagem do gene *ScCIPK8* no vetor pGBKT7 para ensaios de duplo-híbrido em levedura:.

A sequência codificante do gene *ScCIPK8* foi inicialmente clonada no vetor pGEM-T-Easy (Promega, EUA) utilizando como molde a sequência do *Sugarcane assembled sequence* (SAS) SCEQLB2019B08.g identificada no banco de dados Sucest-Fun (<http://www.sucest-fun.org/>). Foi utilizado RNA total de folhas maduras de cana-de-açúcar para sintetizar a primeira fita de cDNA utilizando o primer oligo(dt)₂₀ com o kit Superscript III RT de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, EUA). A sequência codificante completa do gene *ScCIPK8* foi amplificada utilizando como molde a primeira fita do cDNA gerado e utilizando primers específicos flanqueados por sítios de clivagem de enzimas de restrição (EcoRI/5'-GAATTCATGAGTACAACCAAGGTGAA-3' e BamHI/5'-GGATCCACGAGGTTCTGCTAAGCAG-3') flanqueados pelos sítios de restrição. A sequência codificante do gene *ScCIPK8* foi digerida do vetor pGEM-T-Easy (Promega, EUA), purificada e clonada no vetor pGBKT7 para gerar a construção pGBKT7::ScCIPK8. Os controles fornecidos pelo BD Matchmaker™ *Library Construction and Screening Kit* incluíram o gene *p53* murino clonado no vetor pGBKT7 (pGBKT7::53), o gene *lamin C* humano clonado no vetor pGADT7 (pGADT7::Lam) e o gene *SV40 Large T-antigen* clonado no vetor pGADT7 (pGADT7::T). O controle negativo consistiu em leveduras AH109 co-transformadas com as construções pGBKT7::53 e pGADT7::Lam e o controle positivo consistiu em leveduras AH109 co-transformadas com as construções pGBKT7::53 e pGADT7::T.

Screening de novos alvos de interação da proteína ScCIPK8 empregando ensaio de duplo híbrido em levedura

Para o *screening* de novos alvos de interação da proteína ScCIPK8 foi utilizado o sistema Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech, EUA). A construção ScCIPK8::pGBKT7 foi transformada em leveduras Y2H-Gold segundo instruções do fabricante (Clontech, EUA). Duas bibliotecas de cDNA (folhas +1 e entrenó 5) de plantas de cana-de-açúcar de uma variedade tardia e de alta produtividade (RB 935744) foram sintetizadas e, após clonagem

no vetor pGADT7 segundo instruções do fabricante (Clontech, 2010), foram transformadas em leveduras da cepa Y187.

Leveduras da linhagem Y2H-Gold transformadas com a construção ScCIPK8::pGBKT7 foram unidas a leveduras da linhagem Y187 transformadas com as diferentes bibliotecas de cDNA para poderem realizar o *mating* e produzirem leveduras diploides. Os diploides foram selecionados inicialmente em meio restritivo sólido SD deficiente nos aminoácidos adenina, histidina, triptofano e leucina (SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu) e incubados à 30°C durante 5 dias. As colônias selecionadas foram passadas para meio restritivo sólido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu contendo 0,8 mg de x- α -gal e foram incubadas a 30°C por 7 dias. Por fim, as colônias selecionadas foram estriadas em meio SD sólido SD/-Ade/-His/-Trp/-His contendo 0,8 mg de x- α -gal e adicionado do antibiótico Aureobasidina (125 ng/ml). Os controles positivo e negativo foram os mesmos utilizados nos experimentos de duplo-híbrido descrito no capítulo 1.

Para as fotos, uma colônia isolada de cada diploide foi estriada em meio sólido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu e incubado a 30°C por 5 dias. Uma colônia isolada de cada diploide foi então inoculada em 5 ml de meio líquido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu. Os inóculos foram diluídos para uma OD₆₀₀ final de 0,5 e então foi aplicado 5 μ l de cada inóculo em meio sólido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu contendo 0,8 mg de X- α -Gal e incubados a 30°C por 5 dias.

Clonagem das sequências codificantes completas dos clones positivos do duplo-híbrido em pGADT7

Os clones positivos F1 e F7 identificados nos ensaios de duplo-híbrido foram amplificados através de cDNA de folhas de cana-de-açúcar e subclonados em pGEM-T-Easy (Promega, EUA). Os primers utilizados para a amplificação do clone F1, bem como as sequências das enzimas de restrição adicionadas foram: *forward* (BamHI/ 5'- GGATCCATGTCTTGCACGGTGGC-3') e *reverso* (XhoI/ 5'- CTCGAGTTAGGAAGTTGAAAATTTCTGCA-3'). Os primers utilizados para a amplificação do clone F7, bem como as sequências das enzimas de restrição adicionadas foram: *forward* (BamHI/ 5'- GGATCCATGAACCTGTGGACGGACG-3') e *reverso* (XhoI/ 5'- CTCGAGTTACCTGCCCATGGCAGA-3'). As reações de PCR incluíram 5,0 μ l 10X High Fidelity PCR Buffer with MgCl₂ (Fermentas, EUA), 1,0 μ l dNTPs mix (0,2 mM cada), 1,0 μ l de cada primer, 1,0 μ l de cDNA de folhas de cana-de-açúcar, 0,6 μ l DMSO, 0,6 μ l de High Fidelity

PCR Enzyme Mix (Fermentas, EUA). As condições das reações de PCR foram as seguintes: um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, seguido de um passo de extensão final de 72°C por 7 minutos. Os insertos foram então digeridos, purificados e clonados no vetor pGADT7 (Clontech, EUA).

Teste de interação das proteínas completas dos clones F1 e F7 com a proteína ScCIPK8

As construções contendo as sequências completas dos clones F1 e F7 clonadas no vetor pGADT7 (Clontech, EUA) foram transformadas em leveduras da linhagem Y187, segundo instruções do fabricante (Clontech, EUA). Posteriormente foi realizado o *mating* destes clones com leveduras da linhagem Y2H-Gold transformadas com a construção pGBKT7::ScCIPK8 como descrito anteriormente. As células diploides foram plaqueadas em meio sólido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu contendo 0,8 mg de x- α -gal e Aureobasidina (125 ng/ml) e incubados a 30°C por 5 dias. Para as fotos, uma colônia isolada de cada diploide foi estriada em meio sólido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu e incubado a 30°C por 5 dias. Uma colônia isolada de cada diploide foi então inoculada em 5 ml de meio líquido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu. Os inóculos foram diluídos para uma OD₆₀₀ final de 0,5 e então foi aplicado 5 μ l de cada inóculo em meio sólido SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu contendo 0,8 mg de x- α -gal e Aureobasidina (125 ng/ml) e incubados a 30°C por 5 dias.

Amostras biológicas de cana-de-açúcar para ensaios de PCR em tempo real

Os cultivares RB92579 (mais tolerante à seca) e RB72454 (menos tolerante à seca) foram obtidos da RIDESA (Rede Universitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob irrigação normal por 3 meses na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Brasil). Para o estresse hídrico, as plantas tiveram a irrigação interrompida por 2 ou 4 dias. Os tecidos das folhas +1 (primeiras folhas visíveis da haste) de plantas irrigadas e estressadas por 2 e 4 dias foram coletados. As plantas controle receberam irrigação normal durante todo o experimento. As amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até a extração de RNA. Foram utilizadas 4 réplicas biológicas de cada tratamento para os ensaios de PCR em tempo real.

Extração de RNA total de folhas de cana

O RNA total foi extraído utilizando-se o miRVana™ miRNA isolation kit (Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Para cada tecido de folha macerada foram adicionados 10 volumes de Lysis/Binding Buffer. Um volume de miRNA homogenate additive foi adicionado a cada amostra de tecido lisado e vortexado. Após 10 minutos em gelo foram adicionados 10 volumes de fenol-ácido:clorofórmio a cada amostra e misturadas brevemente. As amostras foram centrifugadas por 7 minutos a 10.000 g a temperatura ambiente para separar as fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi removida cuidadosamente e transferida para um novo tubo. Foi adicionado então 1,25 volume de etanol absoluto à fase aquosa e esta mistura foi posta no *filter cartridge*. As amostras foram centrifugadas por 20 segundos a 10.000 g para que o líquido passasse pelo *filter cartridge*. Os *filter cartridges* foram sucessivamente lavados e então transferidos para um novo tubo. Os RNAs foram então eluídos em 80 µL de água pré-aquecida e livre de RNase. O RNA total foi quantificado (Nanodrop, Thermo Scientific, EUA) e armazenado a -80°C para uso posterior.

Plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

A sequência codificante do gene *ScCIPK8* foi clonada no vetor PFP101-HA-VP16 (Parcy et al., 2004) sob controle de duas cópias do promotor 35S. Os primers, assim como as enzimas utilizadas para a clonagem foram os seguintes: Cipk_ATG_XbaI (5'-TCTAGAATGAGTACAACCAAGGTGAA-3') e Cipk_STOP_PFP_BamHI (5'-GGATCCTCCGAGGTTCTGCTAAGCAG-3'). A construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8 foi transformada em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pelo método *freeze-thaw* (Holsters et al., 1978). As plantas de *A. thaliana* (ecótipo Columbia) foram crescidas em câmara de crescimento sob condições de dia longo (16 horas de luz/8 horas de escuro) a 23°C. As plantas selvagens foram transformadas com a construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8 ou com o vetor vazio PFP101-HA-VP16 através do método da inoculação floral (Narusaka et al., 2010).

As sementes transgênicas foram selecionadas utilizando-se um estereomicroscópio Leica MZFLIII equipado com um filtro GFP1 (425 nm/505 nm). Sementes transgênicas fluorescentes

foram coletadas, germinadas em solo e autofecundadas até a obtenção de plantas transgênicas homozigotas T2.

Extração de RNA total de *Arabidopsis thaliana*

O RNA total das plantas transgênicas de *A. thaliana* foi extraído utilizando-se o Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen, EUA) com algumas modificações. Em um tubo de 2 ml foram adicionados 100 mg de folhas de *A. thaliana*, 450 µl de Buffer RLT, 4,5 µl de β-Mercaptoetanol e 250 µl de contas de vidro de 1 mm de diâmetro. Os tubos foram agitados por 15 segundos no aparelho Mini-Beadbeater-96 (Biospec, EUA). O homogenizado formado foi então transferido para uma coluna *QIAshredder spin column* posta sobre um novo tubo de 2 ml e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante do líquido passado pela coluna foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml. Foi adicionado 0,5 volume de etanol absoluto ao lisado e misturado por pipetagem. O líquido foi então transferido para uma *Rneasy spin column* posta sobre um tubo de 2 ml e esta foi centrifugada por 15 segundos a 14.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado. Foi então adicionado 750 µl de Buffer RW1 à coluna e esta foi centrifugada por 15 segundos a 14.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado. Foi adicionado 500 µl de Buffer RPE à coluna e esta foi centrifugada por 15 segundos a 14.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado. Este passo foi repetido mais uma vez. A coluna foi então posta em um novo tubo de 2 ml e centrifugada por 1 minuto a 14.000 rpm. A *Rneasy spin column* foi então posta em um tubo de 1,5 ml novo e foi adicionado 50 µl de água pré-aquecida e livre de Rnase. O tubo foi então centrifugado por 1 minuto a 14.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi então pipetado e reintroduzido na mesma *Rnasy spin column*, posta no mesmo tubo de 1,5 ml e este foi novamente centrifugado por 1 minuto a 14.000 rpm. As amostras foram guardadas a -80°C para serem utilizadas posteriormente.

Transcrição reversa e ensaios de PCR em tempo real

Para a avaliação da expressão dos genes *ScCIPK8*, *ScCBL1*, *ScCBL3*, *ScCBL6* e *ScPP2C-1* sob estresse hídrico foram utilizados os seguintes primers: *ScCIPK8* F (5'-TCCGCATATACGAGGTGATG-3'), *ScCIPK8* R (5'-AAAGAGCTCGCCACCAGTAG-3'),

ScCBL1 Fwd (5'-GCAGCACCTGGCTACGA-3'), ScCBL1 Rev (CGAACCACTTATGCTCTTGA-3'), ScCBL3 Fwd (5'-TGGATGGAGTGAAGCACCTA-3'), ScCBL3 Rev (5'-GAGCACCTCCGGATCCTCTA-3'), ScCBL6 Fwd (5'-ATACCCAATCGGCCAAAGG-3'), ScCBL6 Rev (5'-CAGAGCCTCGATTTTCATTCA-3'), PP2C_qPCR_F (5'-GACGGCCTATGGGACAAGGT-3') e PP2C_qPCR_R (5'-TCGTCGCTCATCGCCGATAA-3'). Para a confirmação da expressão do gene *ScCIPK8* nas plantas transgênicas de *A. thaliana*, foram utilizados os mesmos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real descritos acima. A reação de transcrição reversa foi realizada como descrito por Varkonyi-Gasic et al. (2007). Cada reação contém 2,5 µg de RNA total livre de DNA, 1 µL do primer oligo d(T)₁₇VN (50 µM) e 1 µL dNTPs mix (10 µM). A reação foi incubada por 10 minutos a 65°C e após 2 minutos no gelo, foram adicionados 5X First Strand Buffer, DTT, RNaseOut e a enzima Superscript III (Life Technologies, EUA). Essa reação foi incubada no termociclador Verity™ (Life Technologies, EUA) por 50 minutos a 42°C seguido por 15 minutos a 70°C, segundo o indicado pelo fabricante. Os cDNAs resultantes foram utilizados nos ensaios de PCR em tempo real para analisar a expressão dos genes de cana-de-açúcar. As reações foram feitas utilizando SYBRGreen PCR Master Mix (Life Technologies, EUA) no equipamento 7500 Real Time PCR System (Life Technologies, EUA). Cada reação de PCR de 18 µL incluiu: 2 µL de cDNA, 10 µL SYBRGreen Master Mix (1X), 1 µL do *primer forward* específico (10 µM), 1 µL do *primer* reverso universal (10 µM) e água. O gene da poliubiquitina foi utilizado como controle endógeno para o experimento de cana-de-açúcar sob estresse hídrico e os primers utilizados foram os seguintes: PUB-FW (5'-CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT-3') e PUB-RV (5'-CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG-3'). O gene *Actin2* (At3g18780) de *A. thaliana* foi utilizado como controle endógeno para a avaliação da expressão do gene *ScCIPK8* nas plantas transgênicas de *A. thaliana* e os primers utilizados foram os seguintes: Actin2_qPCR_F (5'-CGTACAACCGGTATTGTGCTGG-3') e Actin2_qPCR_R (5'-CTCTCTCTGTAAGGATCTTCATG-3'). As reações foram feitas a 95°C por 10 minutos, seguidas por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram amplificadas em triplicata técnica e com quatro réplicas biológicas. O *fold-change* de cada experimento foi calculado levando-se em consideração as eficiências de cada reação individual

de PCR em tempo real utilizando-se a ferramenta web *qPCR real-time PCR data management and analysis tool* (Pabinger et al., 2009).

Ensaio de germinação de sementes transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

A figura 1 mostra de forma esquemática o delineamento do ensaio de germinação. Para o tratamento com manitol, sementes de *A. thaliana* selvagens Col-0 e sementes dos eventos transgênicos (1.6, 5.3 e 6.7) de *A. thaliana* transformadas com a construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8 foram esterilizadas superficialmente e plaqueadas em meio MS/2 suplementado com manitol (0, 250 e 350 mM). Em cada placa foram semeadas 30 sementes de plantas selvagens e 30 sementes de cada evento transgênico. Foram utilizadas 3 placas para cada concentração de manitol testada. Como controle, sementes de *A. thaliana* selvagens Col-0 e sementes das três linhagens (2.3, 3.8 e 4.8) de *A. thaliana* transformadas com o vetor vazio PFP101-HA-VP16 foram esterilizadas superficialmente e plaqueadas em meio MS/2 suplementado com manitol (0, 250 e 350 mM). Em cada placa foram semeadas 30 sementes de plantas selvagens e 30 sementes de cada evento transgênico. Foram utilizadas 3 placas para cada concentração de manitol testada. As sementes foram incubadas a 4°C por 3 dias para quebrar a dormência e então incubadas a 23°C sob condições de dia longo (16 horas de luz/8 horas de escuro). A cada dia foi anotado o número de sementes germinadas.

Para os ensaios de germinação em NaCl, sementes de *A. thaliana* selvagens Col-0 e sementes das três linhagens (1.6, 5.3 e 6.7) de *A. thaliana* transformadas com a construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8 foram esterilizadas superficialmente e plaqueadas em meio MS/2 suplementado com NaCl (0, 100 e 200 mM). Em cada placa foram semeadas 25 sementes de plantas selvagens e 25 sementes de cada evento transgênico. Foram utilizadas 3 placas para cada concentração de NaCl testada. Como controle, sementes de *A. thaliana* selvagens Col-0 e sementes das três linhagens (2.3, 3.8 e 4.8) de *A. thaliana* transformadas com o vetor vazio PFP101-HA-VP16 foram esterilizadas superficialmente e plaqueadas em meio MS/2 suplementado com NaCl (0, 100 e 200 mM). Em cada placa foram semeadas 25 sementes de plantas selvagens e 25 sementes de cada evento transgênico. Foram utilizadas 3 placas para cada concentração de NaCl testada. As sementes foram incubadas a 4°C por 3 dias para quebrar a dormência e então incubadas a

23°C sob condições de dia longo (16 horas de luz/8 horas de escuro). A cada dia foi anotado o número de sementes germinadas.

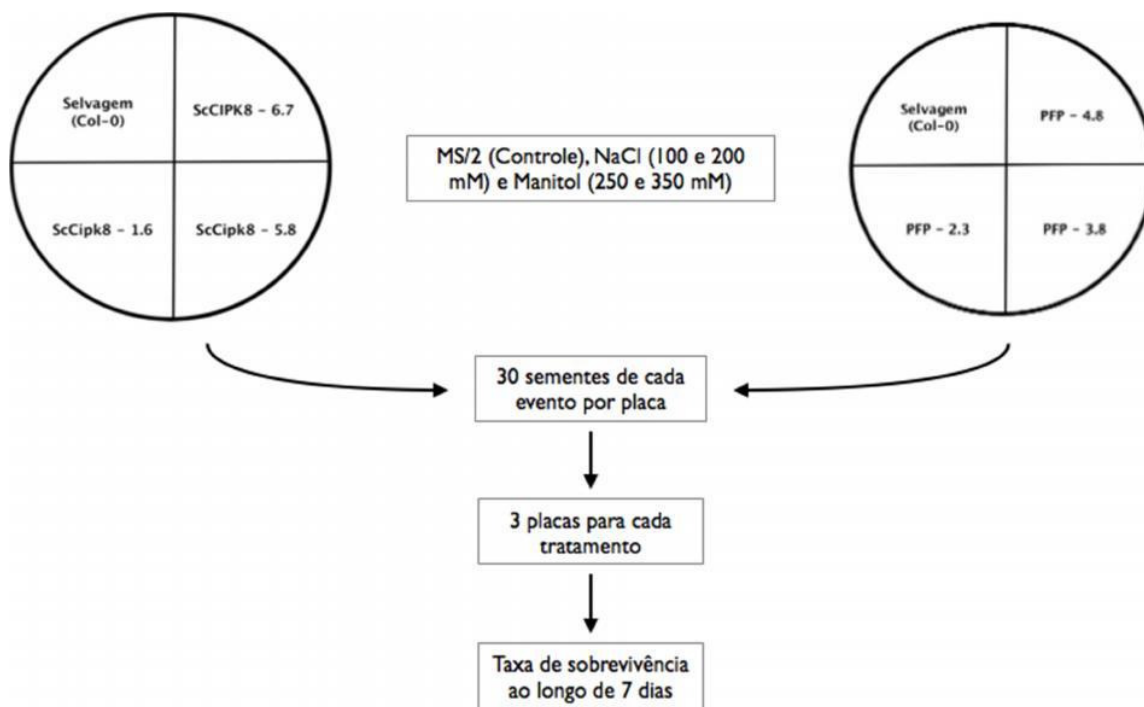


Figura 1. Diagrama do ensaio de germinação de sementes selvagens e transgênicas de *Arabidopsis thaliana*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duplo-Híbrido

Para a identificação de novos alvos de interação da proteína ScCIPK8, foi utilizado o sistema Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech, EUA). Após o *mating* das leveduras da linhagem Y2H-Gold transformadas com a construção ScCIPK8::pGBKT7 com as leveduras da linhagem Y187 transformadas com as bibliotecas cDNA (folha +1 e entrenó 5), foram identificados 19 clones positivos para a biblioteca de folha +1 e 8 para a biblioteca de entrenó 5.

A eficiência do *mating* da biblioteca foi calculada de acordo com instruções do fabricante (Clontech, EUA), sendo de 12,5 % para a biblioteca de folha +1 e de 20 % para biblioteca de entrenó 5. Para confirmar o resultado os clones positivos identificados foram reestriados em meio SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His adicionado de 0,8 mg de x- α -gal. Neste novo meio, mais restritivo, 18 dos 19 clones positivos identificados na biblioteca de folha +1 e todos os 8 clones positivos da biblioteca de entrenó 5 apresentaram crescimento. Esses clones foram posteriormente inoculados em placas contendo meio seletivo SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His, ainda mais restritivo, contendo 0,8 mg de x- α -gal e adicionado de Aureobasidina (125 ng/ml). Ao final, foram obtidos 14 clones positivos para a biblioteca de folhas +1 e 7 clones positivos para a biblioteca de entrenó 5. Destes clones, 8 foram anotados como fatores de transcrição, 2 como proteínas fosfatase do tipo PP2C (Tabela 1) e 11 não puderam ter suas funções identificadas devido à baixa qualidade do sequenciamento.

As sequências codificantes dos genes de todos os clones positivos identificados apresentaram-se incompletas. A interação observada entre a proteína ScCIPK8 e as proteínas codificadas pelos clones incompletos podem representar falsos positivos, pois pode ocorrer de, na forma completa, estas proteínas apresentarem domínios que impedem tal interação. Desta forma, os clones F1 e F7, foram escolhidos para obtermos suas sequências completas e clonadas no vetor pGADT7 para então confirmarmos se as sequências das proteínas completas codificadas por estes genes seriam capazes de interagir com a proteína ScCIPK8.

Tabela 1. Clones positivos identificados nos ensaios de duplo-híbrido em leveduras e similares a proteínas de função conhecida.

Clone	Anotação	Read SUCEST
F1	PP2C	SCCCCL4006H07.g (Início), SCVPRZ2039D09.g (Fim)
F7	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F8	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F9	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F11	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F12	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F13	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F15	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F17	MYC2	SCJLLR2006A02.g (Início) e SCSBSD1058A09.g (Fim)
F19	PP2C	SCCCCL4006H07.g (Início), SCVPRZ2039D09.g (Fim)

Para o desenho dos primers para a clonagem do clone F1 fizemos um Blastx desta sequência contra o banco de dados de sorgo. Como resultado foi obtida a sequência do gene de sorgo 01g038410. Esta sequência foi utilizada para fazermos um Blastn contra o banco de dados do SUCEST. Como resultado foram obtidos as sequências SCCCL4006H07.g e SCEZAM2061C09.g as quais foram utilizadas como molde para o desenho dos primers direto e reverso respectivamente.

Para o desenho dos primers para a clonagem do clone F7 fizemos o mesmo procedimento descrito para o clone F1. A sequência do gene de sorgo 01g028230 foi utilizada para fazermos um Blastn contra o banco de dados do SUCEST. Como resultado as sequências SCJLLR2006A02.g e SCSBSD1058A09.g foram utilizadas como molde para o desenho dos primers direto e reverso respectivamente.

Após a clonagem da sequência completa do gene amplificado a partir das sequências SCCCL4006H07.g e SCVPRZ2039D09.g do SUCEST-FUN verificamos que ela não correspondeu de forma idêntica à sequência do clone F1. Desta forma, obtivemos um gene

clonado correspondente a uma proteína PP2C diferente daquela proteína PP2C incompleta com a qual a proteína ScCIPK8 interagiu nos ensaios de duplo-híbrido. Dessa forma nomeamos o gene clonado incompleto contido no clone F1 de *ScPP2C-1* e o gene completo clonado posteriormente de *ScPP2C-2*.

Para o clone F7, a sequência clonada completa do gene amplificado a partir das sequências SCJLLR2006A02.g e SCSBSD1058A09.g foi idêntica à sequência incompleta obtida nos ensaios de duplo-híbrido e este gene foi nomeado *ScMYC2*. Desta forma, testamos a interação das sequências completas das proteínas codificadas pelos genes *ScPP2C-2* e *ScMYC2* com a proteína ScCIPK8.

A figura 2 mostra que a proteína ScCIPK8 não é capaz de interagir com as proteínas ScPP2C-2 e ScMYC2 completas.

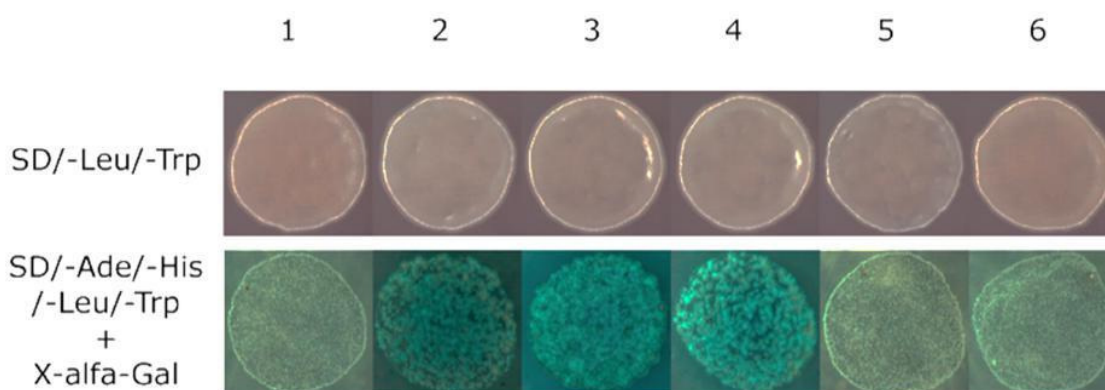


Figura 2. Interação da proteína ScCIPK8 com os clones F1 e F7. 1 pGBKT7::53 + pGADT7::Lam (Controle negativo). 2 pGBKT7::53 + pGADT7::T (Controle positivo). 3 ScMYC2 (Incompleto) + ScCIPK8. 4 ScPP2C-1 (Incompleto) + ScCIPK8. 5 ScMYC2 (Completo) + ScCIPK8. 6 ScPP2C-2 + ScCIPK8.

Embora a ScCIPK8 não tenha sido capaz de interagir com a proteína ScPP2C-2, não é possível descartar a possibilidade da proteína ScCIPK8 interagir com a proteína ScPP2C-1, codificada pelo gene identificado no clone F1 no *screening* das bibliotecas de cDNA, uma vez que não foi possível clonar posteriormente a sua sequência completa no vetor pGADT7. Para

avaliar essa possibilidade será necessário obtermos a sequência completa que codifica a proteína ScPP2C-1.

Por outro lado, podemos afirmar que a proteína MYC2 codificada pelo gene identificado no clone F7 no *screening* das bibliotecas de cDNA não interage com a proteína ScCIPK8, pois foi possível a clonagem da sua sequência codificante completa no vetor pGADT7, porém não pudemos observar a sua interação com a proteína ScCIPK8 em leveduras.

Padrão de expressão dos genes *ScCIPK8* e dos seus alvos de interação

Os perfis de expressão dos genes *ScCIPK8*, *ScCBL1*, *ScCBL3*, *ScCBL6* e *ScPP2C-1* foram avaliados em uma variedade de cana-de-açúcar com maior sensibilidade à seca (RB72454) e em uma variedade de cana-de-açúcar com maior tolerância à seca (RB92579) sob 2 e 4 dias de estresse hídrico (Figura 3). Observa-se que o gene *ScCIPK8* é induzido na variedade tolerante após 2 dias de estresse hídrico. Após 4 dias de estresse hídrico, o gene *ScCIPK8* é induzido tanto na variedade sensível quanto na tolerante à seca. Por outro lado, o gene *ScPP2C-1* é induzido apenas na variedade tolerante à seca no estágio inicial (2 dias), voltando aos níveis não induzidos após 4 dias de estresse. Podemos especular que a indução dos genes *ScCIPK8* e *ScPP2C-1* após 2 dias de estresse, numa fase mais precoce da resposta à seca, poderia ser um dos fatores que levam à maior tolerância da variedade RB92579 à seca.

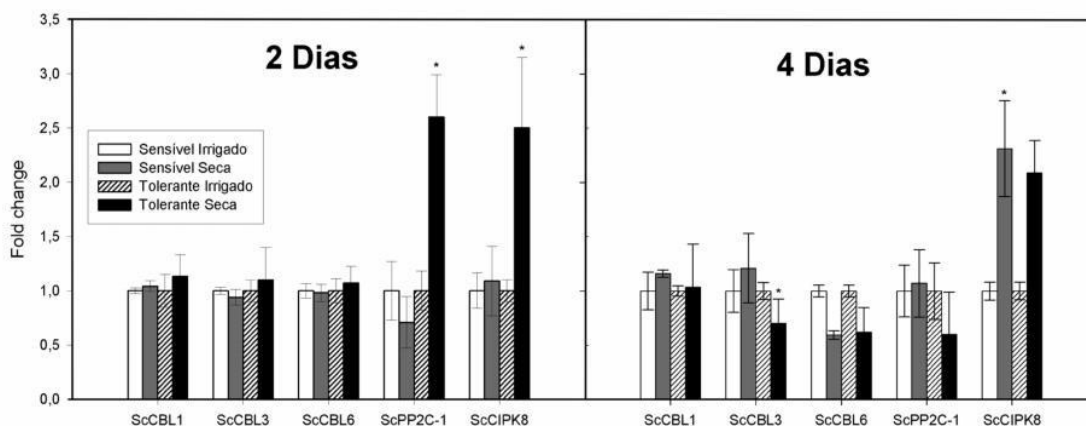


Figura 3. Padrão de expressão dos genes *ScCIPK8*, *ScCBL1*, *ScCBL3*, *ScCBL6* e *ScPP2C-1* sob seca em uma variedade sensível (RB72454) e uma variedade tolerante (RB92579) de cana-de-açúcar sob estresse hídrico. Os asteriscos indicam p-value < 0,1.

As expressões dos genes *ScCBL1* e *ScCBL6* não foram alteradas de forma significativa nas plantas de cana-de-açúcar testadas sob 2 e 4 dias de estresse hídrico. Por outro lado, a expressão do gene *ScCBL3* foi reprimida nas plantas da variedade tolerante sob 4 dias de seca e manteve-se inalterada em todas as outras condições testadas. As proteínas ScCBLs são sensoras de cálcio e devem atuar num momento mais inicial das respostas das plantas ao estresse hídrico, diferentemente das proteínas ScCIPKs, que são efetoras da respostas ao estresse e devem atuar num momento posterior da resposta.

Desta forma, a indução dos genes *ScCBL1*, *ScCBL3* e *ScCBL6* deve ocorrer mais precocemente após o início do estabelecimento do estresse, o que pode explicar o fato do padrão de expressão deles terem diferido do padrão de expressão do gene *ScCIPK8*. Para confirmar esta hipótese um novo ensaio de PCR em tempo real utilizando um tempo de estresse mais curto poderia ser realizado.

Ensaio de germinação de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* que superexpressam o gene *ScCIPK8*

Plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando o gene *ScCIPK8* clonado no vetor PFP101-HA-VP16 foram obtidas e autofecundadas até a geração T2 para a obtenção de eventos

transgênicos homozigotos. A figura 4 mostra o mapa da construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8. Este vetor permite a seleção visual das sementes transgênicas pois permite que elas sintetizem a proteína GFP sob controle do promotor de tegumento At2s3. Desta forma, a obtenção dos eventos transgênicos homozigotos é mais rápida do que a seleção convencional com antibióticos.

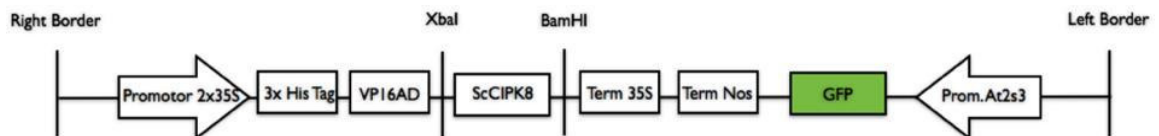


Figura 4. Mapa da construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8 utilizada para a obtenção das plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*.

As sementes das plantas transgênicas foram avaliadas quanto à porcentagem de germinação das suas sementes em meios contendo diferentes concentrações de manitol (Figura 5) e NaCl (Figura 6). Como controle negativo, plantas de *A. thaliana* transformadas com o vetor PFP101-HA-VP16 foram obtidas e avaliadas igualmente.

Observa-se que a porcentagem de germinação das plantas transformadas com o gene *ScCIPK8* tendem a ser maiores em relação às plantas selvagens, tanto em manitol quanto em NaCl. Porém esta diferença não é estatisticamente significativa. Da mesma forma as plantas transformadas com o vetor PFP101-HA-VP16 tendem a ter uma maior porcentagem de sementes germinadas em relação as plantas selvagens. Esses dados indicam que o gene *ScCIPK8* não atua na proteção da germinação em condições de seca (manitol) e salinidade (NaCl).

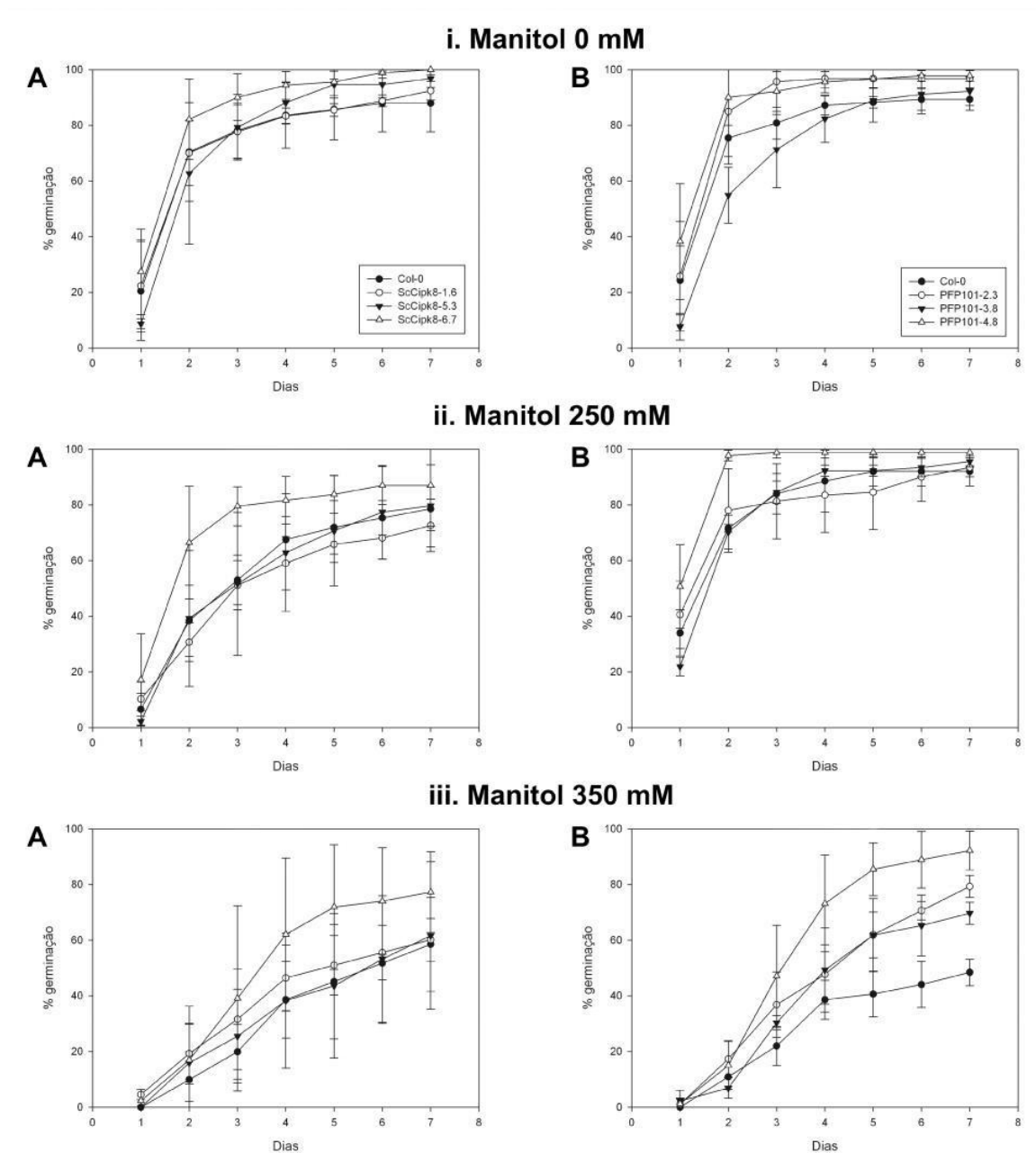


Figura 5. Ensaio de germinação de sementes de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* em meios contendo diferentes concentrações de manitol. **A.** Plantas transgênicas transformadas com a construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8. **B.** Plantas transgênicas transformadas com o vetor PFP-101-HA-VP16.

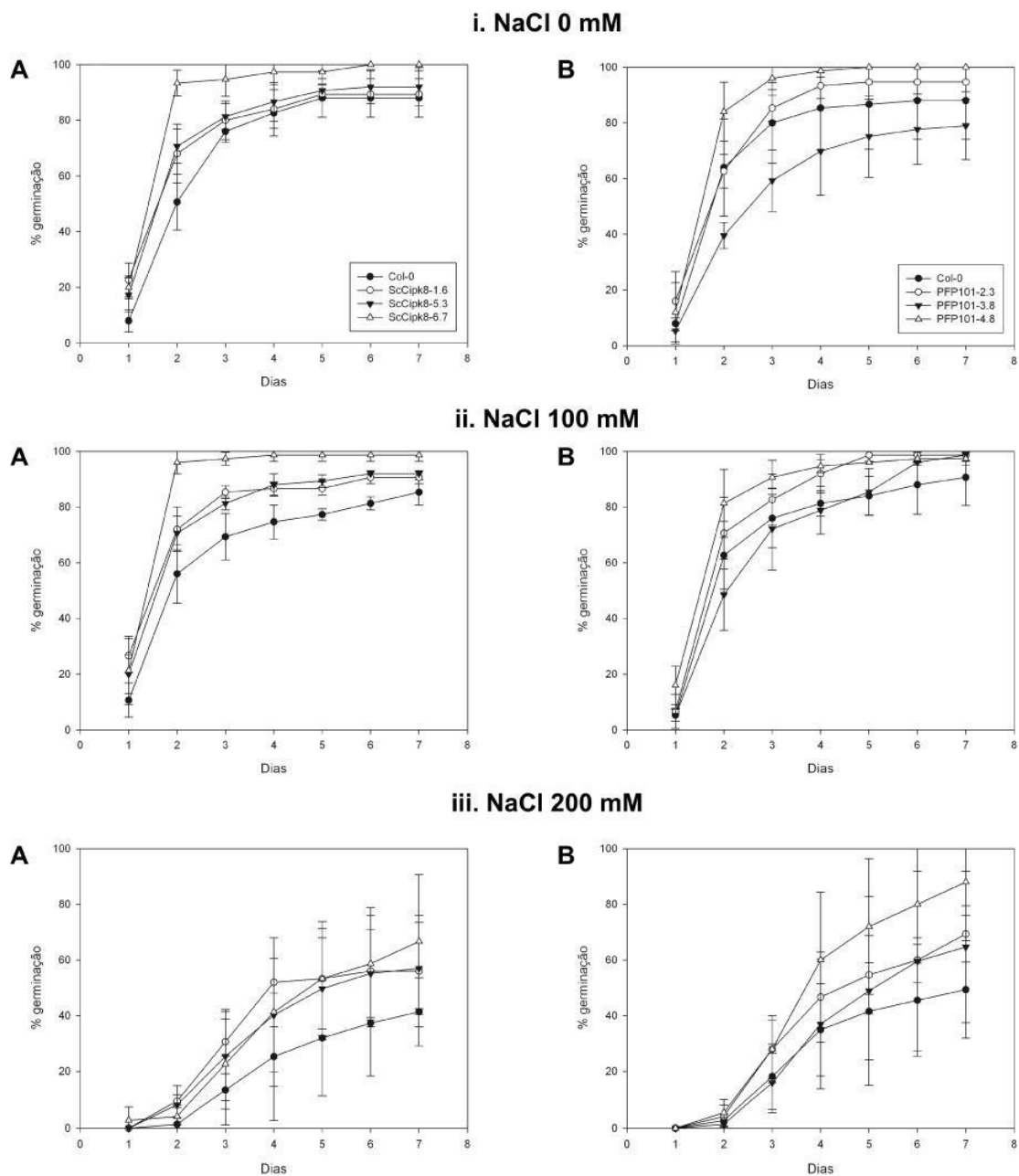


Figura 6. Ensaio de germinação de sementes de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* em meios contendo diferentes concentrações de NaCl. **A.** Plantas transgênicas transformadas com a construção PFP101-HA-VP16::ScCIPK8. **B.** Plantas transgênicas transformadas com o vetor PFP-101-HA-VP16.

Ensaaios de PCR em tempo real indicaram que as plantas transgênicas realmente superexpressam o gene *ScCIPK8* (Figura 7). Observa-se que os eventos transgênicos ScCIPK8-1.6, ScCIPK8-5.3 e ScCIPK8-6.7 possuem, respectivamente, uma indução de aproximadamente 19.5, 24.5 e 11 vezes em relação às plantas selvagens. Estes dados reforçam a conclusão de que não é possível afirmar que o gene *ScCIPK8* confere tolerância à seca e salinidade durante a germinação em *A. thaliana*.

O vetor escolhido para a clonagem do gene *ScCIPK8* não foi o mais adequado, já que o vetor PFP101-HA-VP16 produz a proteína do gene inserido fusionada ao domínio de ativação do fator de transcrição VP16 (Pabinger et al., 2009). Este fator de transcrição pode levar a proteína ScCIPK8 para o núcleo, onde esta pode não ter função biológica. Isso pode ser a explicação de não termos observado uma maior resistência das plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando o gene *ScCIPK8* em relação às plantas selvagens e em relação às plantas transformadas com o vetor vazio PFP101-HA-VP16. Além disso, o fator de transcrição VP16 pode ter sido o responsável pelo fato das plantas transformadas com o vetor vazio *PFP101-HA-VP16* terem tido uma tendência a uma maior resistência ao manitol e ao NaCl, uma vez que este fator de transcrição pode ter ativado de forma inespecífica diversos outros genes, incluindo genes de resistência a estes estresses.

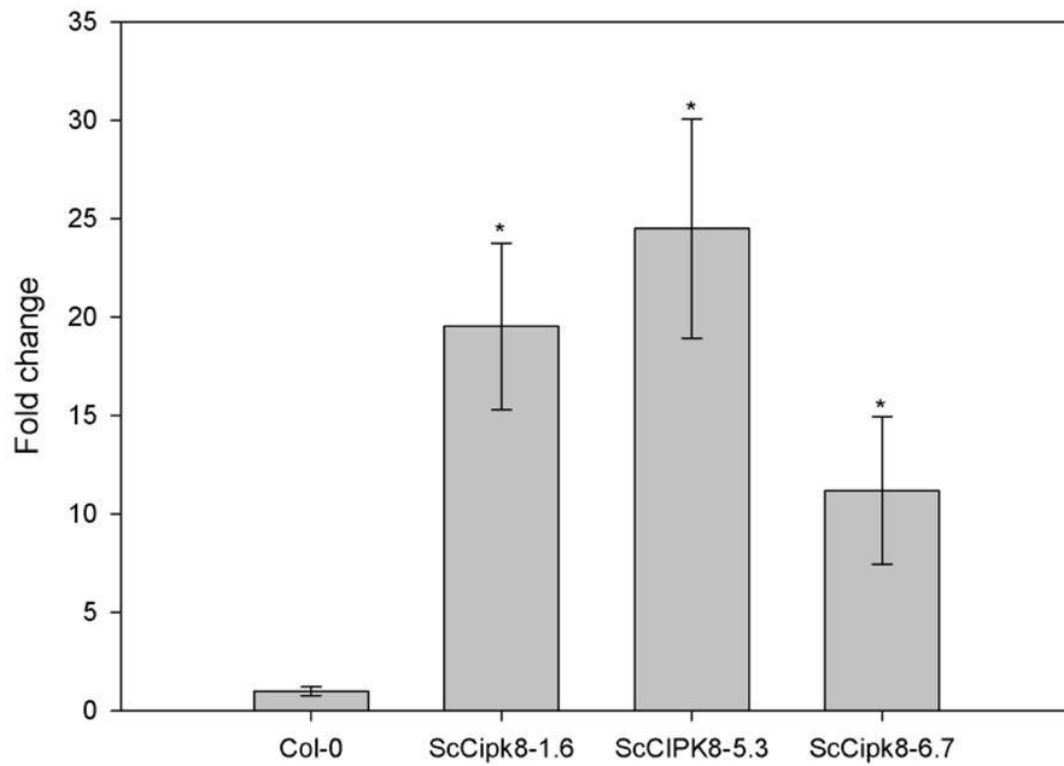


Figura 7. Expressão do gene *ScCIPK8* em plantas transgênicas transformadas com a construção *ScCIPK8::PFP101-HA-VP16*. Foram analisadas três linhagens homozigotas independentes (*ScCIPK8-1.6*, *ScCIPK8-5.3* e *ScCIPK8-6.7*). Para cada uma das linhagens analisadas foram utilizadas 4 réplicas biológicas. O asterisco indica um p-value < 0,5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S and Zhu J-K (2007). SOS2 Promotes Salt Tolerance in Part by Interacting with the Vacuolar H⁺-ATPase and Upregulating Its Transport Activity. *Molecular and Cellular Biology*. 27: 7781-7790.
- Cheng N-H, Pittman JK, Zhu J-K and Hirschi KD (2004). The Protein Kinase SOS2 Activates the Arabidopsis H⁺/Ca²⁺ Antiporter CAX1 to Integrate Calcium Transport and Salt Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 2922-2926.
- Clontech (2010). Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual. Clontech.
- Gong D, Gong Z, Guo Y, Chen X and Zhu JK (2002a). Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel Arabidopsis protein kinase. *J Biol Chem*. 277: 28340-28350.
- Gong D, Zhang C, Chen X, Gong Z and Zhu JK (2002b). Constitutive activation and transgenic evaluation of the function of an arabidopsis PKS protein kinase. *J Biol Chem*. 277: 42088-42096.
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M and Zhu JK (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*. 13: 1383-1400.
- Guo Y, Xiong L, Song CP, Gong D, Halfter U and Zhu JK (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*. 3: 233-244.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M and Schell J (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet*. 163: 181-187.
- Narusaka M, Shiraishi T, Iwabuchi M and Narusaka Y (2010). The floral inoculating protocol: a simplified Arabidopsis thaliana transformation method modified from floral dipping. *Plant Biotechnology*. 27: 349-351.
- Pabinger S, Thallinger GG, Snajder R, Eichhorn H, Rader R and Trajanoski Z (2009). QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis. *BMC Bioinformatics*. 10: 268.
- Parcy F, Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T and Giraudat J (2004). Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *Febs Letters*. 561: 127-131.
- Qiu Q-S, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS and Zhu J-K (2004). Regulation of Vacuolar Na⁺/H⁺ Exchange in Arabidopsis thaliana by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 207-215.
- Tripathi V, Parasuraman B, Laxmi A and Chattopadhyay D (2009). CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. *The Plant journal*. 58: 778-790.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF and Hellens RP (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. 3: 12.
- Verslues PE, Batelli G, Grillo S, Agius F, Kim YS, Zhu J, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S and Zhu JK (2007). Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Biol*. 27: 7771-7780.
- Xiang Y, Huang Y and Xiong L (2007). Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*. 144: 1416-1428.

CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar funcionalmente o gene *ScCIPK8*. Para tanto, ensaios de duplo híbrido, BiFC e PCR em tempo real foram realizados. Adicionalmente, plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene *ScCIPK8* foram obtidas e testadas quanto à resistência a estresses hídrico e salino. Os resultados obtidos nos permitiram concluir que:

I. A proteína ScCIPK8 é capaz de interagir com as proteínas ScCBL1, ScCBL3 e ScCBL6 em leveduras e em folhas de *Arabidopsis thaliana*, mas não interage com as proteínas ScCBL2, ScCBL9 e ScCBL10.

II. Os resultados dos ensaios de BiFC sugerem que a interação da proteína ScCIPK8 com a proteína ScCBL1 devem ocorrer na membrana plasmática ou no citoplasma, enquanto que a interação com a proteína ScCBL3 ocorre no citoplasma e a interação com a proteína ScCBL6 deve ocorrer na membrana plasmática ou no vacúolo.

III. A proteína ScCIPK8 interage com a porção C-terminal da proteína ScMYC2 mas não com a proteína ScMYC2 completa.

IV. A proteína ScCIPK8 interage com a porção C-terminal da proteína ScPP2C-1 e não interage com a proteína ScPP2C-2. Como não foi possível clonar a sequência codificante completa da proteína ScPP2C-1, não foi possível descartar a interação da proteína ScCIPK8 com a proteína ScPP2C-1.

V. Os ensaios de PCR em tempo real confirmaram que o gene *ScCIPK8* é induzido por seca em cana-de-açúcar, embora não tenha sido possível observar o mesmo padrão de expressão para os genes ScCBL1, ScCBL3 e ScCBL6.

VI. A indução dos genes *ScCIPK8* e *ScPP2C-1* numa fase mais precoce da resposta à seca pode ser um dos fatores que contribuem para a maior tolerância da variedade RB92579 à seca.

VII. Plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene *ScCIPK8* foram obtidas, porém não foi observada maior tolerância à seca. Devido a problemas na escolha do vetor para a transformação, não podemos descartar que o gene *ScCIPK8* possa atuar nos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANFAVEA (2013). "Carta da ANFAVEA. Agosto de 2013." from <http://www.anfavea.com.br/cartas/Carta327.pdf>.
- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S and Zhu J-K (2007). SOS2 Promotes Salt Tolerance in Part by Interacting with the Vacuolar H⁺-ATPase and Upregulating Its Transport Activity. *Molecular and Cellular Biology*. 27: 7781-7790.
- Batistic O and Kudla J (2009). Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1793: 985-992.
- Carraro DM, Lambais MR and Carrer H. (2001). In silico characterization and expression analyses of sugarcane putative sucrose non-fermenting-1 (SNF1) related kinases. *Genetics and Molecular Biology*. 24(1-4): 35-41.
- Cheng N-H, Pittman JK, Zhu J-K and Hirschi KD (2004). The Protein Kinase SOS2 Activates the Arabidopsis H⁺/Ca²⁺ Antiporter CAX1 to Integrate Calcium Transport and Salt Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 2922-2926.
- Clontech (2010). Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual. Clontech.
- Conab (2013). Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. Safra 2013/2014.
- Felix JDM, Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vêncio RZN, Vicentini R, Nishiyama MY, Ulian EC, Souza GM and Menossi M (2009). Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregating for Sugar Content. *Tropical Plant Biology*. 2: 98-109.
- Goldemberg J (2008). The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol Biofuels*. 1: 6.
- Gong D, Gong Z, Guo Y, Chen X and Zhu JK (2002a). Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel Arabidopsis protein kinase. *J Biol Chem*. 277: 28340-28350.
- Gong D, Zhang C, Chen X, Gong Z and Zhu JK (2002b). Constitutive activation and transgenic evaluation of the function of an arabidopsis PKS protein kinase. *J Biol Chem*. 277: 42088-42096.
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M and Zhu JK (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*. 13: 1383-1400.
- Guo Y, Xiong L, Song CP, Gong D, Halfter U and Zhu JK (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*. 3: 233-244.
- Gupta AK and Kaur N (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*. 30: 761-776.
- Halford NG and Hey SJ (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*. 419: 247-259.
- Hanson J and Smeekens S (2009). Sugar perception and signaling--an update. *Curr Opin Plant Biol*. 12: 562-567.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M and Schell J (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet*. 163: 181-187.
- Huber C, Huber JL, Liao PC, Gage DA, McMichael RW, Chourey PS, Hannah LC and Koch K (1996). Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase - Occurrence in vivo and possible regulatory significance. *Plant Physiology*. 112: 793-802.
- Kim JY, Mahe A, Brangeon J and Prioul JL (2000). A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology*. 124: 71-84.

- Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK and Luan S (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 15: 411-423.
- Lee EJ, Iai H, Sano H and Koizumi N (2005). Sugar responsible and tissue specific expression of a gene encoding AtCIPK14, an Arabidopsis CBL-interacting protein kinase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 69: 242-245.
- Narusaka M, Shiraishi T, Iwabuchi M and Narusaka Y (2010). The floral inoculating protocol: a simplified Arabidopsis thaliana transformation method modified from floral dipping. *Plant Biotechnology*. 27: 349-351.
- Pabinger S, Thallinger GG, Snajder R, Eichhorn H, Rader R and Trajanoski Z (2009). QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis. *BMC Bioinformatics*. 10: 268.
- Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vencio RZ, Felix JM, Branco DS, Waclawovsky AJ, Del Bem LE, Lembke CG, Costa MD, Nishiyama MY, Jr., Vicentini R, Vincentz MG, Ulian EC, Menossi M and Souza GM (2009). Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics*. 10: 120.
- Parcy F, Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T and Giraudat J (2004). Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *Febs Letters*. 561: 127-131.
- Pego JV, Kortstee AJ, Huijser G and Smeekens SGM (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*. 51: 407-416.
- Pelleschi S, Guy S, Kim JY, Pointe C, Mahe A, Barthes L, Leonardi A and Prioul JL (1999). Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Molecular Biology*. 39: 373-380.
- Pinheiro C and Chaves MM (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*. 62: 869-882.
- Pinheiro C, Chaves MM and Ricardo CP (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1063-1070.
- Qiu Q-S, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS and Zhu J-K (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 8436-8441.
- Qiu Q-S, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS and Zhu J-K (2004). Regulation of Vacuolar Na⁺/H⁺ Exchange in Arabidopsis thaliana by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 207-215.
- Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G and Couee I (2009). Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in Arabidopsis thaliana. *Ann Bot*. 104: 1323-1337.
- Rocha, F. R. (2006). Identificação e análise funcional de genes relacionados à transdução de sinais na cana-de- açúcar. Chemistry Institute. São Paulo, University of São Paulo. PhD: 181.
- Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Jr., Vencio RZ, Vicentini R, Duarte RD, de Rosa VE, Jr., Vinagre F, Barsalobres C, Medeiros AH, Rodrigues FA, Ulian EC, Zingaretti SM, Galbiatti JA, Almeida RS, Figueira AV, Hemerly AS, Silva-Filho MC, Menossi M and Souza GM (2007). Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics*. 8: 71.
- Roitsch T and Gonzalez MC (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*. 9: 606-613.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E and Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology*. 57: 675-709.
- Saha S and Ramachandran S (2013). Genetic improvement of plants for enhanced bio-ethanol production. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 7: 36-44.

- Salameh M (2012) Brazil's Pre-Salt Oil Potential: The Hype and the Reality. USAEE / IAEE Working Paper Series, (01428)
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y and Shinozaki K (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*. 31: 279-292.
- Sharp RE (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell and Environment*. 25: 211-222.
- Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Von Korff M, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T and Stitt M (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 10348-10353.
- Taiz L and Zeiger E (2004). *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre, Artmed.
- Teixeira SR, Pena AF and Miguel AG (2010). Briquetting of charcoal from sugar-cane bagasse fly ash (scbfa) as an alternative fuel. *Waste Manag*. 30: 804-807.
- Tollefson J (2008). Energy: not your father's biofuels. *Nature*. 451: 880-883.
- Toroser D and Huber SC (1997). Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiology*. 114: 947-955.
- Tripathi V, Parasuraman B, Laxmi A and Chattopadhyay D (2009). CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. *The Plant journal*. 58: 778-790.
- Trouverie J, Thevenot C, Rocher JP, Sotta B and Prioul JL (2003). The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany*. 54: 2177-2186.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF and Hellens RP (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. 3: 12.
- Verslues PE, Batelli G, Grillo S, Agius F, Kim YS, Zhu J, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S and Zhu JK (2007). Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Biol*. 27: 7771-7780.
- Vettore AL, da Silva FR, Kemper EL and Arruda P (2001). The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology*. 24: 1-7.
- Wilkinson S and Davies WJ (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell and Environment*. 33: 510-525.
- Xiang Y, Huang Y and Xiong L (2007). Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*. 144: 1416-1428.