

RITA MÁRCIA CARDOSO DE PAIVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA  
FAMÍLIA SnRK E SUA EXPRESSÃO EM RESPOSTA AO  
DÉFICIT HÍDRICO EM *Coffea canephora***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal,  
para obtenção do título *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P149i  
2009

Paiva, Rita Márcia Cardoso de, 1985-

Isolamento e caracterização de genes da família SnRK  
e sua expressão em resposta ao déficit hídrico em  
*Coffea canephora* / Rita Márcia Cardoso de Paiva.

— Viçosa, MG, 2009.

x, 71f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 61-71.

1. *Coffea canephora*.
2. Regulação de expressão gênica.
3. Café - Condições hídricas.
4. Bancos de genes de plantas.
5. Fisiologia vegetal.
6. Reação em cadeia de polimerase.
7. Genes. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

RITA MÁRCIA CARDOSO DE PAIVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA  
FAMÍLIA SnRK E SUA EXPRESSÃO EM RESPOSTA AO  
DÉFICIT HÍDRICO EM *Coffea canephora***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal,  
para obtenção do título *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 14 de setembro de 2009.

---

Prof. Wagner Campos Otoni

---

Prof. Luciano Gomes Fietto

---

Dr. Valdir Diola

---

Dr. André Narvaes da Rocha Campos

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro  
(orientador)

Aos meus pais, Francisco e Isabel

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por iluminar meus passos em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização de uma Pós-graduação gratuita e de excelente qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, professores e funcionários pela boa convivência e ensinamentos.

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, por todo apoio e por sempre acreditarem em mim. Devo a vocês essa conquista. Às minhas irmãs, Aline e Lílian, pelo carinho e incentivo.

Ao meu namorado Thiago, pelo amor, apoio, incentivo e presença constante.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro, pela orientação, confiança e ensinamentos, fundamentais para a execução deste trabalho.

A professora Andréa Miyasaka, pela co-orientação, boa vontade e por toda colaboração dada ao trabalho.

Ao professor Fábio DaMatta, pela disponibilidade de uso do seu laboratório.

Ao Professor Jorge Abdala Dergam, do Departamento de Biologia Animal, pelo empréstimo do freezer.

Aos amigos da Bioquímica 2003, sempre presentes durante todos esses anos. Em especial a Jerusa, por toda ajuda, conselhos e amizade.

Aos colegas do curso de Fisiologia Vegetal e aos colegas do laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, pelo agradável convívio, amizade e colaboração para obtenção dos resultados. Em especial ao Valdir, André, Carla, Camilo, Giselle, Sabrina, Gustavo, Águida e Allan. Ao Werner e Paulo César, muito obrigada pela valiosa ajuda no experimento com folhas destacadas.

A todos os amigos e familiares que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. A todos que eu não tenha citado, mas que contribuíram para o êxito deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Rita Márcia Cardoso de Paiva, filha de Francisco Ney de Paiva e Isabel Cardoso de Paiva, nasceu no dia vinte e um de maio de 1985, em Viçosa, MG.

Em março de 2003, ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como bacharel em Bioquímica em Agosto de 2007.

Em Agosto de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Fisiologia Molecular de Plantas.

Em Setembro de 2009, submeteu-se à sua defesa de dissertação.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMO.....  | vii |
| ABSTRACT.....  | ix  |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 1   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 3   |
| 2.1 Déficit hídrico.....   | 3   |
| 2.2 Ácido abscísico (ABA).....   | 5   |
| 2.3 Proteínas quinases como componentes pivotais na sinalização de ABA.....                        | 7   |
| 2.3.1 SnRKs (Proteínas quinases relacionadas a Snf1 de leveduras).....                             | 9   |
| 2.3.2 SnRK1 (Proteínas quinases relacionadas a Snf1 1).....  | 10  |
| 2.3.3 SnRK2 (Proteínas quinases relacionadas a Snf1 2).....  | 11  |
| 2.3.4 SnRK3 (Proteínas quinases relacionadas a Snf1 3).....  | 13  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 17  |
| 3.1 Busca por genes SnRK no banco do Genoma do café.....   | 17  |
| 3.2 Material vegetal e tratamentos.....  | 17  |
| 3.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....   | 18  |
| 3.4 Clonagem molecular do cDNA completo do gene SnRK2.6.....                                       | 20  |
| 3.4.1 Obtenção dos <i>primers</i> para amplificação e clonagem do gene.....                        | 20  |
| 3.4.2 Sequenciamento do DNA plasmidial.....  | 21  |
| 3.4.3 Obtenção de células eletrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....              | 21  |
| 3.4.4 Eletroporação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                                      | 22  |
| 3.5 Isolamento e caracterização da região promotora de SnRK2.6.....                                | 23  |
| 3.5.1 Extração de DNA de folhas de café.....   | 23  |
| 3.5.1 Clonagem Molecular da região Promotora do Gene SnRK2.6.....                                  | 24  |
| 3.6 PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....   | 25  |
| 3.7 Análise do padrão de expressão de genes SnRK em experimento de folhas destacadas de café.....  | 27  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 28  |
| 4.1 Prospecção de sequências do café e caracterização dos contigs pertencentes à família SnRK..... | 28  |

|   |    |
|---|----|
| 4.2 Isolamento e análises <i>in silico</i> de um novo membro da família SnRK de café.....                     | 31 |
| 4.3 Isolamento e análises <i>in silico</i> da região promotora do gene SnRK2.6.....                           | 41 |
| 4.4 Genes da família SnRK são diferencialmente expressos, em folhas e raízes de café, em resposta à seca..... | 44 |
| 4.5 Expressão de genes da família SnRK2 e SnRK3 em resposta a ABA, estresse osmótico e estresse salino.....   | 51 |
| 5. CONCLUSÕES.....  | 60 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 61 |



## RESUMO

PAIVA, Rita Márcia Cardoso de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Isolamento e caracterização de genes da família SnRK e sua expressão em resposta ao déficit hídrico em *Coffea canephora*.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-orientadores: Andréa Miyasaka de Almeida e Fábio Murilo DaMatta.

A tolerância à seca é o resultado de numerosas características anatômicas, morfológicas e fisiológicas, de natureza constitutiva ou indutiva. Como um dos principais hormônios de plantas, o ácido abscísico (ABA) tem sido extensivamente estudado e vários destes estudos têm demonstrado que o ABA é responsável por diversas respostas adaptativas ao déficit hídrico. Desta forma, o isolamento e estudo da expressão de genes que participam de vias de sinalização em resposta a ABA podem fornecer dados importantes para a compreensão de sua função e de sua importância no mecanismo de tolerância à seca em café. Este trabalho teve como objetivos identificar, a partir do banco do café, genes pertencentes à família SnRK além de verificar a resposta dos mesmos em folhas e raízes de clones de *Coffea canephora*, em condições de déficit hídrico severo e moderado. Mudanças dos clones 120 (genótipo tolerante ao déficit hídrico) e 109A (genótipo sensível) foram cultivadas em vasos de 12 L e o déficit hídrico foi alcançado suspendendo a irrigação até que as plantas atingissem um potencial hídrico de antemanhã de -1,5 MPa e -3,0 MPa. Análises de homologia utilizando o programa Blast, permitiram a identificação de 24 contigs que podem representar possíveis genes da família SnRK em café, sendo 3 contigs da subfamília SnRK1, 5 contigs pertencentes a subfamília SnRK2 e 16 sequências da subfamília SnRK3. Dentre as sequências identificadas, destacam-se 2 contigs, 15120 e 12770, que nesta investigação, demonstrou-se que correspondem a regiões distintas de um mesmo gene, homólogo a SnRK2.6 de *Arabidopsis* e denominado cnSnRK2.6. Desta forma, foi obtida a sequência completa deste gene que foi eficientemente colocado em vetor de transformação de plantas. Neste estudo, identificou-se também uma parte da região promotora deste gene. Análises de

expressão, feitas por RT-PCR em Tempo Real, permitiu verificar que a expressão de alguns genes desta família são alteradas em condições de déficit hídrico, tanto em folhas como em raízes. Em folhas, os genes SnRK2.4, CIPK6 e CIPK9 são induzidos, enquanto os genes SnRK2.3, CIPK3, CIPK8, CIPK10 e CIPK11 são reprimidos pela condição de seca. Já em raízes, observou-se que os genes SnRK2.3, SnRK2.8, CIPK6, CIPK8 e CIPK9 são induzidos, o que demonstra que alguns genes apresentaram comportamento diferenciado nesses dois órgãos. Em adição, foi também verificado a expressão destes genes em resposta à ABA, estresse osmótico e estresse salino. Para isso, foi testado um novo sistema experimental, com uso de folhas destacadas de cafeeiro, que se mostrou uma forma rápida e eficiente para estudos em plantas de café. Os resultados obtidos mostraram uma redução da condutância estomática ( $g_s$ ) que foi acompanhada de reduções nas taxas de assimilação líquida do carbono ( $A$ ) para os tratamentos com ABA e manitol, enquanto no tratamento controle nenhuma alteração foi observada. A análise de expressão gênica, demonstrou que muitos desses genes respondem a ABA, estresse osmótico e estresse salino. SnRK2.6 é induzido por ABA e manitol, mas não por salinidade. Coletivamente, estes resultados sugerem que os genes SnRKs caracterizados constituem proteínas quinases envolvidas na resposta a estresses abióticos.

## ABSTRACT

PAIVA, Rita Márcia Cardoso de, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, September of 2009. **Isolation and characterization of genes SnRK family and his expression in response to the water deficit in *Coffea canephora*.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-advisers: Andréa Myasaka de Almeida and Fábio Murilo da Matta.

Drought tolerance can result from numerous anatomical, morphological and physiological characteristics that can be from constituent or inductive nature. As one of the most important phytohormones known, abscisic acid (ABA) have been studied extensively and several of these studies it has been demonstrating that ABA is responsible for several responses adaptatives in the water deficit. This way, the isolation, characterization and expression studies of genes that participate in signalling pathway in response to ABA, can supply important data for understanding its role and importance in the mechanism of drought tolerance in coffee. The aims of this work was identifies, in the bank of the coffee, genes belonging to the SnRK family besides verifying the responses in leaves and roots of clones of *Coffea canephora*, in conditions of severe and moderate water deficit. Plants of the clones 120 (drought tolerant genotype) and 109A (drought sensitive genotype) were cultivated in vases of 12 L and the water deficit was reached by suspending the irrigation until the plants reached -1,5 MPa and -3,0 MPa predawn hydric potential. Homology analyses, allowed the identification of 24 contigs that can represent possible genes of SnRK family in coffee, being 3 contigs of the subfamily SnRK1, 5 contigs in the subfamily SnRK2 and 16 sequences in the subgroup SnRK3. Among the identified sequences, 2 contigs, 15120 and 12770, in this investigation, we found that the ESTs of 15120 and 12770 correspond to different regions of the same gene, homologous to *Arabidopsis* SnRK2.6 and named cnSnRK2.6. A complete sequence of this gene that was put efficiently in vector of transformation of plants. The promoter sequence of this gene was also identified. Expression analyses, by Real Time quantitative PCR, showed that the expression patterns of some genes of this family are altered in

conditions of water deficit, in leaves and roots of coffee. In leaves, the genes SnRK2.4, CIPK6 and CIPK9 were induced, while the genes SnRK2.3, CIPK3, CIPK8, CIPK10 and CIPK11 were repressed by the water deficit. However, in roots, the genes SnRK2.3, SnRK2.8, CIPK6, CIPK8 and CIPK9 were induced, what demonstrates that some genes presented a different behavior in those two organs. Furthermore, SnRK genes are also involved in the response to other abiotic stresses. In this study, we also verified the expression of these genes in response to the ABA, osmotic stress and saline stress. For that, a new experimental approach was tested, with use of outstanding leaves of coffee, that a fast and efficient form to studies in coffee. The obtained results indicated a reduction in stomatal aperture ( $g_s$ ) that was accompanied of reductions in liquid carbon assimilation ( $A$ ) for the treatments with ABA and mannitol, while in the controls treatment any alteration was observed. Gene expression analyses demonstrated that many SnRKs genes are responsive to ABA, osmotic stress and saline stress. SnRK2.6 was induced by ABA and mannitol, but not by salinity. Collectively, these results indicate that the SnRKs characterized genes consist of kinases proteins involved in response to different abiotic stresses.

## 1-INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas do mundo, sendo produzido por mais de 80 países, dos quais o Brasil é o maior produtor. Nos países produtores de café ocorrem frequentes oscilações na produtividade desta cultura, ocasionadas por limitações climáticas, como ocorrência de períodos de seca. O desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico e tecnologias que auxiliem o cultivo das plantas em períodos prolongados de estiagem, são alternativas para a manutenção da produção agrícola brasileira e mundial. Nesse contexto, a identificação e a compreensão de mecanismos de tolerância a seca passam a ser de suma importância, na medida em que podem fornecer subsídios úteis ao melhoramento visando a tolerância à seca.

A tolerância à seca é o resultado de numerosas características anatômicas, morfológicas e fisiológicas, de natureza constitutiva ou indutiva, que interagem, permitindo assim, a manutenção dos processos de crescimento e de desenvolvimento, sob condições edáficas e climáticas que levam à deficiência hídrica (DaMatta e Rena, 2001). Existe grande variação inter e intra-específica para esta característica em café, havendo maior susceptibilidade a esse estresse em *Coffea arabica*, e maior variabilidade em *Coffea canephora*. O germoplasma tolerante dessa última espécie tem sido identificado em um extensivo programa de melhoramento realizado pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e também por vários anos estudado detalhadamente, em nível fisiológico, por pesquisadores da UFV. Estes trabalhos fazem com que *C. canephora* seja um alvo privilegiado para os estudos moleculares dos mecanismos de tolerância à seca.

Estudos realizados por DaMatta e colaboradores, em 2000, selecionaram clones com respostas contrastantes quanto à tolerância ao déficit hídrico, dentre eles, o clone 120 (genótipo tolerante) e o clone 109A (sensível), com o objetivo de identificar e compreender os mecanismos fisiológicos de tolerância à seca em café. As avaliações fenotípicas desses genótipos têm sugerido que a maior tolerância à seca do clone 120 pode estar associada à uma maior tolerância ao estresse oxidativo, à habilidade para manutenção da exportação de assimilados e

à capacidade de manutenção do status hídrico adequado, obtida mediante a combinação de sistema radicular mais profundo e controle estomático eficiente da transpiração (Da Matta e Ramalho, 2006).

Dentre os mecanismos fisiológicos caracterizados em diversas culturas, há muitas evidências que mostram que o ácido abscísico (ABA) participa no mecanismo de tolerância à seca. A função do ABA na tolerância ao déficit hídrico tem sido evidenciada pela identificação e caracterização de mutantes deficientes em ABA, que apresentam falhas em etapas específicas da via de síntese desse hormônio. Os mutantes deficientes em ABA apresentam maior susceptibilidade ao murchamento, em decorrência do aumento da condutância estomática sob condições de deficiência hídrica.

A fosforilação reversível de proteínas tem sido identificada como um regulador chave na sinalização de ABA e de diversos estresses em plantas. Evidências genéticas claramente demonstram que fosfatases tipo 2C e 2A participam em vias de sinalização de ABA. Em contrapartida, diversas famílias de proteínas quinases como MAPKs e CDPKs são ativadas por ABA em condições ambientais adversas. Recentemente, uma outra família de quinases, proteínas quinases relacionadas a Snf1 de leveduras (SnRKs), tem sido implicada na resposta das plantas a estresses abióticos e a ABA.

O isolamento e estudo da expressão de genes que participam de vias de sinalização em resposta a ABA, podem fornecer dados importantes para a compreensão da função e importância do ABA no mecanismo de tolerância à seca nessa importante cultura agrícola. Existem ainda, relativamente, poucos estudos sobre o mecanismo de tolerância à seca em café. A identificação desses mecanismos possibilitaria a geração de marcadores moleculares para auxiliar o melhoramento para essa característica, bem como a identificação de genes candidatos para obtenção de plantas transgênicas mais tolerantes à seca.

## 2-REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Déficit hídrico

Estresses abióticos estão entre as principais causas da baixa produtividade agrícola a nível mundial, reduzindo-a na maior parte das plantas cultivadas em mais de 50% (Bray et al., 2000). Acarretam numa série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que afetam o crescimento e a produtividade das plantas (Wang et al., 2001). Dentre os diversos estresses abióticos, destaca-se o estresse hídrico, que pode ser resultado de duas condições contrastantes: excesso ou falta de água. O mais comum é o déficit hídrico. A seca também é um dos principais fatores que afetam a produtividade do cafeeiro (Anon et al., 1986; Begazo et al., 1979), e embora a irrigação seja uma solução potencial, ela não é financeiramente e, frequentemente, também não é tecnicamente viável para resolver este problema (DaMatta e Ramalho, 2006).

O déficit hídrico pode causar decréscimo na fotossíntese por meio de uma limitação de CO<sub>2</sub>, resultante do fechamento dos estômatos ou através de um efeito direto sobre a capacidade fotossintética nos cloroplastos (Chaves, 1991; Lawor e Cornic, 2002). O controle estomático da transpiração é considerado o principal processo determinando a resposta a curto prazo de uma planta a condições de seca, e afeta diretamente a taxa de depleção de água no solo, o potencial hídrico da planta e o transporte de solutos no fluxo xilemático (Tardieu e Simonneau, 1998).

A seleção de materiais visando o aumento da produtividade, sem a preocupação de selecionar plantas tolerantes ao déficit hídrico, tem sido o enfoque tradicional do melhoramento genético do cafeeiro (DaMatta e Ramalho, 2006). Contudo, estudos que visem melhorar o desempenho das plantas em ambientes sujeitos à deficiência hídrica devem envolver também a identificação e a seleção de atributos que contribuam para uma maior tolerância à seca (Mullet e Whitsitt, 1997).

Estudos moleculares e fisiológicos têm mostrado que vários mecanismos contribuem para a tolerância ao estresse hídrico (Bohnert et al., 1995; Blum, 1996; Ingram e Bartel, 1996; Bray, 1997; Schroeder et al., 2001; Luan et al., 2002). Em

particular, a seca pode favorecer o fechamento dos estômatos e o aumento da biossíntese do hormônio ácido abscísico (ABA), bem como na indução de genes responsivos à seca e ao ABA. Na última década, estudos moleculares e bioquímicos identificaram muitos desses genes e alguns fatores de transcrição responsáveis pela indução dos mesmos (Ingram e Bartel, 1996; Hasegawa et al., 2000; Thomashow, 2001; Finkelstein et al., 2002; Oztur et al., 2002; Shinozaki et al., 2003; Buchanan et al., 2005; Poroyko et al., 2005).

As plantas desenvolveram mecanismos regulatórios para perceber, transduzir e responder a sinais de estresse em nível fisiológico, celular e molecular (Xiong et al., 2002). Vias de transdução genéricas começam com a percepção do sinal, por receptores presentes nas membranas das células, seguido da produção de mensageiros secundários que podem modular a concentração intracelular de cálcio, frequentemente iniciando cascatas de fosforilação que terminam com ativação de proteínas alvo, diretamente envolvidas no processo, ou fatores de transcrição que controlam genes específicos. Os produtos desses genes, levam a produção de moléculas regulatórias como o ABA, que pode iniciar um segundo ciclo de sinalização (Xiong et al., 2002; Yamaguchi-Shinosaki e Shinosaki, 2006).

No caso específico do estresse hídrico, uma resposta complexa se inicia com a percepção do estresse, ativando vias de transdução de sinal que manifestam mudanças celulares, fisiológicas e de níveis de desenvolvimento. Além disso, a resposta depende da severidade e duração do estresse, genótipo da planta, estágio de desenvolvimento e fatores ambientais que acarretam o estresse (Bray, 1997).

A função do ABA na tolerância ao déficit hídrico tem sido evidenciada pela identificação e caracterização de mutantes deficientes em ABA, que apresentam falhas em etapas específicas da via de síntese desse hormônio. Os mutantes deficientes em ABA apresentam maior sensibilidade ao murchamento e aumento da condutância estomática sob condições de deficiência hídrica. A rápida translocação de ABA via fluxo do xilema e o aumento da concentração de ABA nos órgãos das plantas, são relatados como uma das principais mudanças fisiológicas que ocorrem durante a resposta de plantas à seca (Zeevaart e



Creelman, 1988). Assim, é amplamente aceito que o ABA é responsável por várias respostas adaptativas ao déficit hídrico.

## **2.2 Ácido abscísico (ABA)**

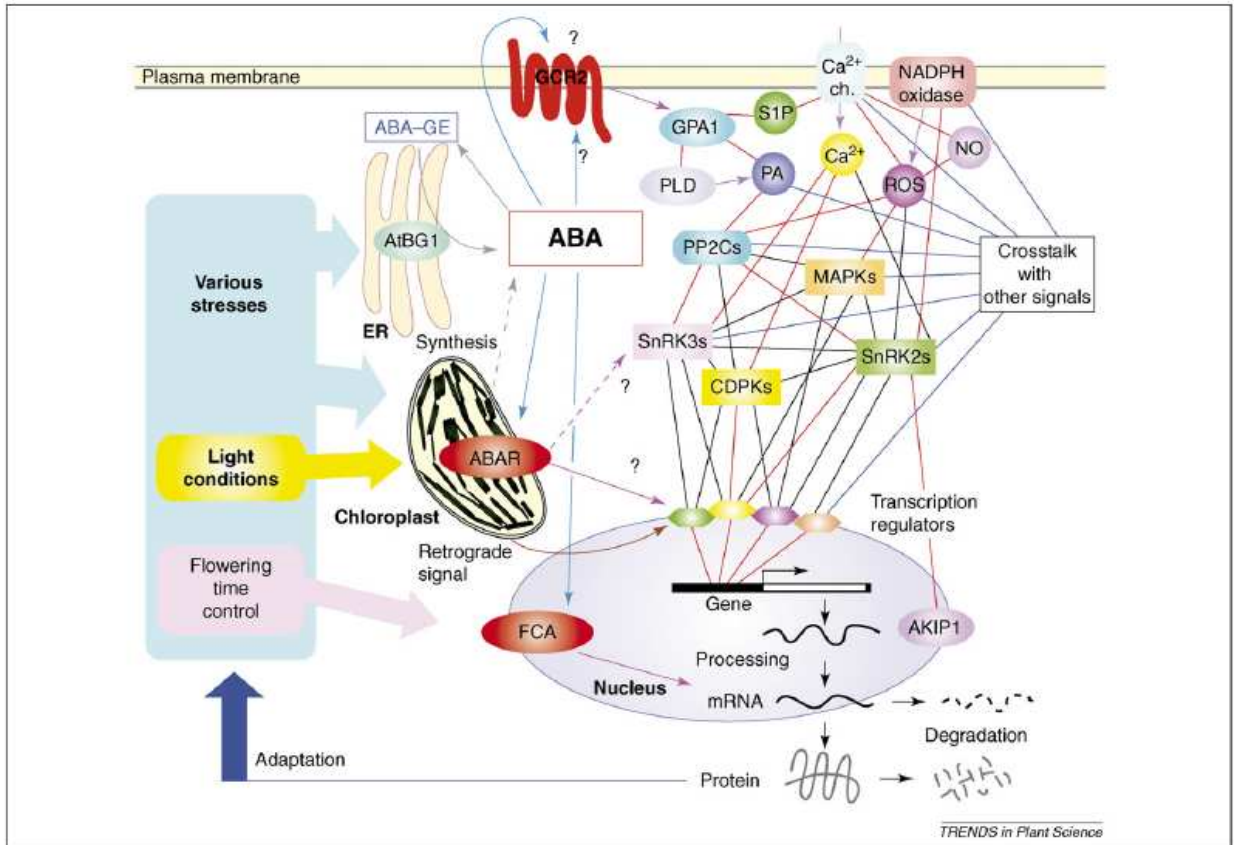
O crescimento e desenvolvimento de plantas é regulado por sinais internos e por condições ambientais externas. O ABA é um hormônio envolvido em vários processos fisiológicos das plantas. No desenvolvimento de sementes, o ABA é necessário para a síntese de proteínas e lipídios de reserva, bem como para quebra da dormência de sementes. ABA também desempenha um importante papel no desenvolvimento vegetativo em resposta a vários estresses ambientais como condições de seca e alta salinidade (Xiong e Zhu, 2003). Em tecidos vegetativos, os níveis de ABA aumentam quando as plantas se encontram em condições ambientais adversas como seca, salinidade, e em menor extensão, baixas temperaturas. Embora um alto nível de ABA exógeno iniba o crescimento de plantas em condições não estressadas, um aumento em seu conteúdo é benéfico para plantas estressadas, visto que as mudanças induzidas por ABA a nível celular e na planta como um todo, aclimatiza ou aumenta a tolerância da planta a estas situações adversas.

O ABA é um sesquiterpenóide (composto de 15 carbonos) sintetizado parcialmente nos cloroplastídios ou outros plastídios (Taiz e Zeiger, 1998). Foi descoberto em meados de 1960, e desde então, vários esforços bioquímicos, citológicos e de genética direta e reversa tem sido feitos para a elucidação de seu processo de síntese, vias de sinalização e degradação. Recentemente, três receptores de ABA foram reportados (Zhang et al., 2002; Razem et al., 2006; Liu et al., 2007). Em adição, avanços têm sido feitos na identificação e entendimento do modo de ação de proteínas quinases/fosfatases, produção de mensageiros secundários, processamento de RNA e mecanismos regulatórios da expressão gênica na resposta a ABA.

O hormônio favorece o fechamento estomático, bem como ativa um grande número de genes que, presumivelmente, servem para proteger as células de danos oxidativos que ocorrem em condições de estresses prolongados. A rede de

sinalização dessas várias respostas é, entretanto, altamente complexa. Estudos relacionados à sinalização de ABA em células-guarda tem permitido a identificação de proteínas de sinalização, como proteínas quinases, fosfatases, proteínas-G e pequenas moléculas mensageiras secundárias ( $\text{Ca}^{2+}$ , cADP-ribose,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e fosfoinositóis) (Munnik et al., 2000; DeWald et al., 2001; Xiong et al., 2002). Tem sido demonstrado que estes componentes não podem ser colocados em uma simples cascata linear de sinalização, e que ao contrário, a sinalização de ABA constitui uma complexa rede que inclui vias paralelas e feedbacks positivos e negativos (Leonhardt et al., 2004), onde um componente pode afetar direta ou indiretamente o outro (Figura 1). Estas características contrastam com a ação de outros hormônios conhecidos de plantas. Por exemplo, os hormônios vegetais etileno e citocininas são transduzidos através de uma via linear de sinalização para modificar a expressão gênica (Kakimoto, 2003; Alonso e Stepanova, 2004). Presumivelmente, essa intrincada rede do sistema de sinalização de ABA é altamente complexa para que as plantas respondam e se adaptem eficientemente à condição de estresse.

Análises genéticas utilizando uma série de mutantes com sensibilidade alterada a ABA, tem ajudado a elucidar as principais moléculas envolvidas na sua sinalização e como estas se relacionam na via (Merlot e Giraudat, 1997; Bonetta e McCourt, 1998). O mutante de *Arabidopsis* insensível a ABA (*abi1*), apresenta várias respostas alteradas a ABA, tanto em nível fisiológico quanto no nível de expressão gênica, e tem sido usado em estudos de sinalização de ABA (Bray, 1997; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Merlot e Giraudat, 1997; Finkelstein et al., 2002). O gene *ABI1* codifica uma proteína fosfatase do tipo 2C (PP2C), que parece estar envolvida upstream da via de sinalização a ABA (Meyer et al., 1994; Leung et al., 1998). Estes resultados, sugerem que a fosforilação de proteínas está envolvida na sinalização de ABA. Outras investigações reforçam esses resultados (Armstrong et al., 1995; Hey et al., 1997).



**Figura 1: Esquema mostrando a complexa rede de transdução de sinal de ácido abscísico (ABA), em células de plantas.** GCR2, ABAR e FCA representam receptores de ABA. Na via de sinalização a ABA, mensageiros secundários, proteínas quinases (MAPK, CDPK, SnRK2 e SnRK3), proteínas fosfatases (PP2Cs) e fatores de transcrição formam uma complexa rede de sinalização. A ligação com outras vias de sinalização, aumenta a complexidade da rede (Hirayama e Shinosaki, 2007).

### 2.3 Proteínas quinases como componentes essenciais na sinalização de ABA

Em eucariotos, proteínas quinases estão envolvidas na regulação de aspectos chave de diversas funções celulares, incluindo divisão celular, metabolismo e respostas a sinais externos. A fosforilação/desfosforilação de proteínas tem sido reconhecida como um dos principais mecanismos da regulação pós-traducional da atividade de proteínas e da transdução de sinais intracelulares em organismos eucarióticos.

O sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis*, permitiu a identificação de todas as proteínas quinases presentes em uma planta modelo. O genoma desta planta codifica para 1085 proteínas quinases típicas (M. Gribskov, dados não publicados), o que representa 4% dos 25500 genes preditos (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Não apenas a proporção de genes que codificam proteínas quinases, é cerca de 2 vezes o encontrado em leveduras (Hunter e Plowman, 1997) ou em *Caenorhabditis elegans* (Plowman et al., 1999), mas também existem muitas diferenças nas quinases identificadas em plantas. Por exemplo, receptores quinases em plantas fosforilam resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr), enquanto em animais, o tipo predominante de receptor quinase fosforila resíduos de tirosina (Tyr). Em adição, os dois principais tipos de quinases que participam da sinalização de cálcio em animais (proteínas quinases dependentes de calmodulina, CaMKs e proteínas quinases C) parecem faltar ou estarem sub-representados em plantas. Da mesma forma, plantas apresentam um número de famílias de proteínas quinases que não são encontradas em animais e leveduras ou são altamente divergentes (Hraback et al., 2003).

A fosforilação reversível de proteínas tem sido implicada como um regulador chave na sinalização de ABA. Em plantas superiores (Li e Assmann, 1996; Hoyos e Zhang, 2000) e algas verdes (Yuasa e Muto, 1996), várias proteínas quinases com relativas massas moleculares de 35 a 50 KDa tem sido identificadas, através de ensaios de quinases *in-gel* como proteínas quinases envolvidas na sinalização a estresses que são especificamente estimuladas por estresse salino, seca e ABA. MAP quinases (MAPK) são ativadas por vários estresses abióticos em plantas (Droillard et al., 200). Em *Arabidopsis*, AtMAPK6 mostrou ser ativada por hiperosmolaridade, sal, frio e seca (Ichimura et al., 2000; Droillard et al., 2002), enquanto, uma AMPK de tabaco (SIPK) foi induzida por estresse hiperosmótico e ABA (Droillard et al., 2000; Hoyos e Zhang, 2000).

Dado a importância do  $Ca^{2+}$  como mensageiro secundário em resposta ao ABA, a função de CDPKs (proteínas quinases dependentes de  $Ca^{2+}$ ) tem sido extensivamente estudada em resposta a ABA (Cheng et al., 2002; Harper et al., 2004). AtCPK32 regula fatores de transcrição AREB (Choi et al., 2005) e os genes CPK3 e CPK6 apresentam um importante papel na resposta a ABA em células-guarda (Mori et al., 2006).

Em adição a MAPKs e CDPKs, recentes estudos bioquímicos e genéticos de proteínas quinases ativadas por estresses, tem revelado que proteínas quinases relacionadas a Snf1 de leveduras (SnRKs), apresentam um papel essencial na sinalização à estresses em plantas (Boudsocq et al., 2005). Assim, estas proteínas quinases podem estar envolvidas na ativação de fatores de transcrição e na expressão gênica responsiva a ABA.

Conexões importantes entre fosfatases (PP2C) e SnRKs, particularmente, SnRK2 e SnRK3, tem sido reportadas nos últimos anos. Estudos genéticos e bioquímicos tem demonstrado o importante papel funcional de SnRK2 em movimentos estomáticos, expressão gênica induzida por ABA e respostas a estresses durante a germinação. Em *Arabidopsis* e arroz foi demonstrado que algumas proteínas da família SnRK2 são ativadas por ABA (Boudsocq et al., 2004).

Como descrito acima, muitas proteínas quinases participam na resposta à ABA. Mas embora estas proteínas tenham sido isoladas, a relevância fisiológica destas proteínas ainda não está clara. Os resultados de extensivos estudos de muitos fatores de transcrição envolvidos na resposta a ABA e a estresses sugerem que a fosforilação de resíduos específicos apresentam um papel crucial na função dos mesmos (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Recentemente, vários estudos tem reportado a conexão entre proteínas de ligação a elementos responsivos a ABA (AREBs/ABFs) e SnRK2s, como SnRK2 interage diretamente com AREB e as fosforilam *in vitro* (Johnson et al., 2002; Fujii et al., 2007).

### **2.3.1 SnRK (Proteínas quinases relacionadas a Snf1 de leveduras)**

Proteínas quinases são classificadas de acordo com suas sequências primárias e o tipo de resíduo envolvido na atividade de fosforilação: serina/treonina (ser/thr), histidina (his) ou tirosina (tyr). A superfamília CDPK-SnRK consiste de sete tipos de proteínas quinases: proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), proteínas quinases relacionadas a CDPKs (CRKs), proteínas quinases fosfoenolpiruvato carboxilases (PPCKs), proteínas quinases relacionadas a PEP carboxilase (PEPRKs), proteínas quinases

dependentes de calmodulina (CaMKs), proteínas quinases dependentes de calmodulina e cálcio (CCaMKs) e proteínas quinases relacionadas à Snf1 de leveduras (SnRKs) (Hrabak et al., 2003).

SnRKs formam um grupo distinto de quinases de plantas que apresentam uma alta similaridade de sequência de aminoácidos com uma clássica proteína de leveduras, Snf1. A primeira proteína Snf1 foi caracterizada em *Saccharomyces cerevisiae* (Carlson et al., 1981; Celenza e Carlson, 1984). Nesse organismo, Snf1 é requerida para respostas a estresses, principalmente relacionados ao carbono. Também regula a transcrição de muitos genes em resposta a limitação de glicose e é requerida para a utilização de fontes alternativas de carbono (Hong et al., 2003).

O genoma de *Arabidopsis* codifica para 38 proteínas SnRKs. Essa família, segundo Hraback e colaboradores (2000), é dividida em três subgrupos baseado na similaridade de sequências e domínio estrutural: SnRK1, SnRK2 e SnRK3. Embora relacionadas a Snf1 de leveduras, genes dos subgrupos SnRK2 e SnRK3 parecem pertencer a uma classe de proteínas quinases específicas de plantas.

### **2.3.2 SnRK1 (Proteínas quinases relacionadas a Snf1 1)**

O subgrupo SnRK1 é o que apresenta maior similaridade com Snf1 de leveduras e proteínas quinases ativadas por AMP (AMPK) de animais. Apenas três membros dessa família foram identificados no genoma de *Arabidopsis* e, em média, estas proteínas apresentam massa molecular variando de 56,6 KDa a 58,7 KDa. Estudos bioquímicos e do papel fisiológico de SnRK1 de plantas sugerem que estas quinases, assim como Snf1 e AMPK, podem regular o metabolismo em resposta a estresse nutricional ou ambiental (Halford e Hardie, 1998; Halford et al., 2003; Hardie, 2000). Diferentemente das AMPK, SnRK1 não são alostericamente reguladas por AMP, entretanto, AMP indiretamente regula a atividade de uma SnNK1 de espinafre, via um mecanismo que envolve regulação da fosforilação/desfosforilação de um resíduo na alça de ativação da enzima (Sugden et al., 1999). Em ensaios de fosforilação *in vitro*, com enzimas purificadas e peptídeos sintéticos, foi demonstrado que SnRK1 apresenta alguns

substratos em comum com CDPKs (Bachmann et al., 1996; Huang e Huber, 2001), sugerindo que alguns substratos como as enzimas envolvidas no metabolismo do carbono, podem ser independentemente regulados por vias de fosforilações distintas (Hardie, 2000).

O primeiro cDNA pertencente à família SnRK1 foi isolado de uma biblioteca de cDNA de centeio, codificando uma proteína de 57,7 KDa com 502 resíduos de aminoácidos (Alderson et al., 1991). Estas proteínas apresentam cerca de 48% de identidade com SnF1 de leveduras e AMPK de mamíferos. Estas quinases regulam o metabolismo de energia (Barker et al., 1996; Halford et al., 2003), similar aos papéis sugeridos de AMPK de mamíferos e Snf1 de leveduras (Hardie et al., 1998, Hardie, 2007). Em cevada, SnRK1 é requerida para a formação funcional do pólen (Zhang et al., 2001), já em batata, foi comprovado que SNRK1 é requerida para aumento da expressão da sacarose sintase (Purcell et al., 1998). Em folhas de espinafre, foi demonstrado que SnRK1 regula a atividade de enzimas metabólicas limitantes, como nitrato redutase e sacarose sintase (Sugden et al., 1999). Homólogos de SnRK1 de várias espécies de plantas podem complementar mutantes *snf1* de leveduras, sugerindo uma conservação evolucionária na função destas proteínas (Rolland et al., 2006).

### **2.3.3 SnRK2 ( Proteínas quinases relacionadas a Snf1 2)**

Proteínas quinases do subgrupo SnRK2 são cerca de 140 a 160 aminoácidos menores que SnRK1, codificando proteínas com aproximadamente 40 KDa e que apresentam aminoácidos acídicos, como poli-aspartato ou poli-glutamato, na região C-terminal (Hardie, 1999; Halford et al., 2000). O domínio catalítico destas quinases, apresenta 42-46% de identidade com SnRK1, Snf1 e AMPK. Entretanto, SnRK1 e SnRK2 são completamente divergentes no domínio regulatório C-terminal (Hrabak et al., 2003).

Os genomas de *Arabidopsis* e arroz codificam para 10 proteínas do subgrupo SnRK2. O primeiro clone de cDNA dessa família foi isolado de uma biblioteca de embriões de trigo tratados com ABA (Anderberg e Walker-Simmons, 1992). Subsequentemente, outro membro desta família, AAPK (proteína quinase

ativada por ABA), foi identificada como um regulador central do fechamento estomático dependente de ABA em *Fava bean* (Li e Assmann, 1996). SnRK2.6, um ortólogo de AAPK em *Arabidopsis*, é expresso em células-guarda e no sistema vascular e mutantes *snrk2.6* são afetados no fechamento estomático em resposta a ABA. A atividade de SnRK2.6 é estimulada por ABA mas não a expressão gênica (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002).

Em soja, a expressão de 2 clones de cDNA, SPK3 e SPK4, aumentaram em resposta à desidratação e a alta salinidade, mas com cinéticas de indução diferentes (Yoon et al., 1997). Kobayashi e colaboradores, em 2004, analisaram as dez proteínas pertencentes à subfamília SnRK2 identificadas em arroz. Com expressão em protoplastos, eles demonstraram que todos os membros foram ativados por estresse hiperosmótico e apenas 3 foram ativados por ABA (SAPK8, SAPK9 e SAPK10). Em outro estudo, os dez genes codificados pelo genoma de *Arabidopsis* foram analisados, dos quais SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6, SnRK2.7 e SnRK2.8 foram ativados por ABA (Boudsocq et al., 2004). Em trigo (*Triticum aestivum*), foi observado que a expressão de PKABA é induzida por ABA (Anderberg e Walker-Simmons, 1992). PKABA1 também tem sido implicada como componente da via pela qual tratamento com ABA antagoniza os efeitos de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) via supressão de genes induzidos por GA<sub>3</sub> (Gomez-Cadenas et al., 1999, 2001; Shen et al., 2001).

Um estudo feito com plantas mutantes de *Arabidopsis* que não apresentavam expressão dos genes SnRK2.2 e SnRK2.3, demonstrou que esses genes são requeridos para mudanças na expressão de genes induzidos por ABA e que controlam respostas a ABA na germinação de sementes. Nesses duplos-mutantes, ao contrário de mutantes *ost1* (*snrk2.6*), a supressão desses dois genes, não afetou o fechamento estomático (Fujii et al., 2007).

Pelo menos três vias de sinalização e diferentes mecanismos de fosforilação estão envolvidos na ativação de proteínas SnRK2 sob condições de estresse (Boudsocq et al., 2007). Parece que proteínas quinases SnRK2 iniciam vias de transdução de sinais variáveis e complexas em resposta à estresses ambientais e que o papel dessas proteínas pode ser diferente. Entretanto, os principais estudos desta família se concentram na sinalização em resposta a estresse hídrico e estresse hiperosmótico (Li et al., 2000; Mikołajczyk et al., 2000;



Boudsocq et al., 2004; Kelner et al., 2004; Kobayashi et al., 2004; Umezawa et al., 2004; Chae et al., 2007).

Estudos recentes, feitos com plantas de *Arabidopsis*, mostraram que as proteínas quinases do subgrupo 2, são parcialmente redutantes, mas juntas, são essenciais durante respostas a ABA, e sugerem que a fosforilação de proteínas mediadas por essas quinases são requeridos durante todos os aspectos da sinalização a ABA.

#### **2.3.4 SnRK3 ( Proteínas quinases relacionadas a Snf1 3 )**

Proteínas SnRK3, também denominadas proteínas quinases que interagem com CBL (CIPKs), são uma família de proteínas serina-treonina quinases específicas de plantas, que são alvos de CBLs (proteínas like-calcinerina B) específicas (Shi et al., 1999; Liu et al., 2000). Recentemente 25 e 30 membros foram identificados em *Arabidopsis* e em arroz, respectivamente. Em ambas as espécies, os genes pertencentes à família CIPK divergem em 2 subgrupos filogenéticos, de genes com e sem íntrons (Kolukisaoglu et al., 2004).

Proteínas dessa família apresentam um domínio quinase N-terminal catalítico altamente conservado e similar à quinase Snf1 de leveduras e proteínas quinases ativadas por AMP (AMPK) de animais. Em *Arabidopsis* e arroz, o domínio catalítico apresenta 51-90% de aminoácidos idênticos. Em comparação, existe um domínio regulatório altamente variável (24-58%) no domínio C-terminal.

O alinhamento das sequências de aminoácidos de todas as CIPKs de *Arabidopsis* demonstrou que o domínio quinase N-terminal contém uma possível alça de ativação, a qual está localizada entre os motivos conservados DEF e APE (Figura 2). Dentro de alça de ativação existem resíduos de aminoácidos altamente conservados de treonina, serina e tirosina. A troca de um desses resíduos para aspartato converte a proteína quinase para uma forma hiperativa que dispensa a ligação de CBL para a atividade quinase (Guo et al., 2001). Esta descoberta aponta para um importante papel de sítios de fosforilação adicionais localizados na alça de ativação de CIPKs. Entretanto, estes 3 resíduos são também os alvos de fosforilação na regulação da atividade de CIPKs *in vivo*.

O domínio regulatório C-terminal de todas CIPKs apresenta um motivo FISL altamente conservado (Halfter et al., 2000; Guo et al., 2001), também denominado motivo NAF (Albrecht et al., 2001). Este motivo consiste de 21 resíduos de aminoácidos, onde os resíduos A, F e L são altamente conservados em todas as 25 SnRK3 de *Arabidopsis*. O motivo FISL é responsável pela ligação a CBLs. Em adição, a interação intramolecular entre o motivo FISL e o domínio regulatório exibem uma função inibitória da atividade quinase. A ligação de CBL ao motivo FISL, por sua vez, pode liberar esta auto-inibição (Gong et al., 2002).

Um motivo adjacente ao motivo FISL, denominado motivo de interação com fosfatases (PPI) é responsável pela interação de CIPKs com proteínas fosfatases do tipo 2C (Ohta, 2003). Este motivo, consiste de 37 resíduos de aminoácidos. Sugere-se que, proteínas CIPKs e proteínas fosfatases do tipo 2C possam interagir fisicamente com proteínas alvo levando a modificação de suas atividades por fosforilação e desfosforilação (Lee et al., 2007). A complexa regulação de SnRK3, a interação com CBLs e com fosfatases 2C representam um importante passo na sinalização da via de transdução de sinais dependentes de  $Ca^{2+}$ . Um esquema dos motivos estruturais de proteínas CIPK é mostrado na figura 2.



**Figura 2: Esquema dos motivos estruturais de proteínas CIPKs de *Arabidopsis*.** AtCIPKs apresentam um conservado domínio catalítico N-terminal e um domínio regulatório C-terminal, entre os quais existe uma junção representada pelo quadro branco. Um típico loop de ativação está localizado no domínio catalítico N-terminal; o domínio regulatório C-terminal contém motivo FISL ou NAF (responsável pela interação com CBLs), um motivo PPI (responsável pela interação com fosfatases do tipo 2C) e um motivo desconhecido presente na extremidade C-terminal, indicado por X (Li et al., 2009).

CBLs podem perceber um sinal de  $Ca^{2+}$  em resposta a estresses abióticos e, de maneira específica, se ligam com CIPKs, depois de se ligarem ao  $Ca^{2+}$ . O complexo CBL-CIPK pode, pós-traducionalmente, fosforilar proteínas alvo para regular tolerância a estresses abióticos em células ou tecidos de maneira específica. Em alguns casos, fatores de transcrição são induzidos para ativar

genes de resposta a estresses que controlam reações adaptativas. A sinalização CBL-CIPK exibe alta especificidade, diversidade e complexidade. Recentes progressos têm sido feitos para compreender a rede CBL-CIPK em resposta a diversas condições de estresses, como seca, salinidade e baixa concentração de potássio, o que será útil para aumentar a tolerância de plantas a estresse abióticos (Li et al., 2009).

Muitas funções de CIPKs têm sido caracterizadas nos últimos anos. Estudos de perda de função com CIPK3 mostraram o envolvimento desse gene na resposta a ácido abscísico e na expressão gênica induzida por estresse durante a germinação de sementes. CIPK3 regula a sensibilidade a ABA durante a germinação de sementes, mas não em células-guarda (Kim et al., 2003), enquanto CIPK23 regula sensibilidade a ABA em células-guarda mas não durante a germinação de sementes. Assim, sugere-se que CIPKs participam na sinalização de ABA em diferentes tecidos, mas que a forma de participação nas vias são distintas (Cheong et al., 2007).

CIPK1 de *Arabidopsis* regula distintas vias de resposta a estresses e representa um ponto central da rede que integra vias independentes e dependentes de ABA da sinalização a estresses abióticos. Foi também demonstrado que CIPK1 forma um complexo alternativo com CBL1 ou CBL9, controlando respostas à estresse dependentes de ABA em *Arabidopsis* (D'Angelo et al., 2006).

Em um estudo feito em plantas de *Arabidopsis*, demonstrou-se que o gene CIPK9 é induzido por diferentes condições de estresse, como seca, estresse osmótico e estresse salino. Interessantemente, CIPK9 também foi induzido em condições de crescimento deficientes em potássio. Plantas mutantes *cipk9* se mostraram hipersensíveis em baixas concentrações de potássio, o que demonstra que este gene apresenta papel crítico no crescimento de plantas sujeitas a ambientes com baixas concentrações de potássio (Pandey et al., 2007).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar genes da família SnRK envolvidos no mecanismo de tolerância a seca em café. Sendo assim, os objetivos específicos dessa dissertação foram identificar genes pertencentes à família SnRK, no banco do café e quantificar

precisamente a alteração da expressão destes genes por RT-PCR em tempo real, em folhas e raízes de café, em experimentos controlados de estresse hídrico.

## 3-MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Busca por genes SnRK no banco do Genoma do Café

Para identificar possíveis sequências de genes de café pertencentes à família SnRK, foi feita uma busca detalhada por sequências no Banco “Genoma Café” do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBPDC) e no banco de genes “*Sol Genomics Networks*” (Cornell,USA;[http://www.sgn.cornell.edu /search/library\\_search.pl?term=](http://www.sgn.cornell.edu/search/library_search.pl?term=)). Os possíveis contigs representantes dessa família gênica foram selecionados através de buscas por similaridade e análises de homologia com sequências de genes da família SnRK de outras espécies, já caracterizados, como *Arabidopsis* e arroz, com auxílio do programa BLAST (Altschul et al., 1990).

Os contigs identificados como possíveis genes da família SnRK de café, foram utilizados na construção de um agrupamento hierárquico de sequências. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) e o agrupamento foi construído utilizando o programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), que construiu a árvore pelo método UPGMA.

As sequências de proteínas foram analisadas utilizando o programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), ferramentas contidas no Expasy ( [www.expasy.ch/tools](http://www.expasy.ch/tools)) e no Vector NTI 9.0.

### 3.2 Material vegetal e tratamentos

As mudas de *Coffea canephora* Pierre var. *Conillon*, representadas por um clone tolerante (120) e um clone sensível (109) ao déficit hídrico, foram obtidas no Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper. Ao completarem 4 meses, as mudas foram transplantadas para vasos de 12 L preenchidos com uma mistura composta por solo, areia e esterco bovino na proporção de 3:1:1 (v/v/v). A adubação foi feita de acordo com a análise do solo,

segundo recomendações de Ribeiro et al (1999). Ao atingirem 10 meses, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com laterais que permitiam livre acesso de ar entre o seu interior e exterior. Estas plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingissem um potencial hídrico às 05:00h da manhã ( $Y_{am}$ ) de  $-1,5 \pm 0,20$  MPa, e  $-3,0 \pm 0,20$  MPa, valores que caracterizam uma condição de estresse moderado e severo, respectivamente, para plantas de café (Lima et al., 2002).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente ao acaso, formando um esquema em fatorial 2 x 3. A parcela foi constituída de uma planta por vaso dentro de cada bloco que constituiu o experimento. O potencial hídrico foi determinado por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander, conforme descrito por Da Matta et al (1997). As determinações foram feitas em folhas individualizadas e completamente expandidas do terceiro e quarto ramos plagiotrópicos medianos das plantas. Folhas completamente expandidas e raízes foram coletadas de três plantas de café distintas, e imediatamente, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a utilização das amostras.

### **3.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA**

A extração de RNA total foi feita seguindo as recomendações do reagente *Plant RNA Reagent* (Invitrogen), com algumas modificações feitas pelo Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, da UFV. O material utilizado para a extração foi cuidadosamente preparado a fim de se evitar contaminação e consequente degradação do RNA por RNases.

Um grama de tecido vegetal foi triturado em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo e, em seguida, o pó fino, foi colocado em tubo Falcon (50 mL) e ressuspendido em 5 mL do Plant RNA Reagente (Kit Concert) ou “Concert caseiro” (SDS 2%, EDTA 0,1 mM, mercaptoetanol 38%, Triton 100 1% e azida sódica 0,5%), resfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ . Depois de 5 minutos incubadas à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a  $2,600\times g$ . O sobrenadante foi

transferido para microtubos de 2 mL, adicionando-se 0,16 mL de NaCl 5M e 0,48 mL de clorofórmio, sendo a mistura agitada brevemente por inversão.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12000xg por 10 min, a 4°C, e à fase aquosa obtida foi adicionado um volume igual de isopropanol gelado. Após breve inversão, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 4°C por 10 min a 12000xg, e ao sedimento restante, foi adicionado etanol 70% seguido de nova centrifugação a 12000xg, por 5 min. O pellet obtido, foi ressuscitado em 30 µL de água livre de RNase (tratada com DEPC e autoclavada). As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotômetro, medindo-se a absorvância a 260 nm. A concentração de RNA foi calculada pela fórmula:

$$[ \text{RNA} ] = \frac{A_{260} \times F_c \times F_d}{1000}$$

Onde  $A_{260}$  é a absorvância a 260 nm,  $F_c$  é o fator de conversão, no qual 1 unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg RNA/mL, e  $F_d$  é o fator de diluição da amostra de leitura. O resultado é dividido por 1000 para se obter o valor da concentração em µg/µL.

A qualidade do RNA foi verificada pelo quociente  $A_{260} / A_{280}$ , em que valores entre 1,8 e 2,0 indicam boa qualidade do material. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, livre de RNase. Para evitar qualquer contaminação com DNA, as amostras foram tratadas com 4 unidades de *DNase I* (RQ1 RNase-Free DNase; Promega) a 37°C por 40 minutos.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 4 µg de RNA total, utilizando oligo-dT (18) e Transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen), segundo especificações do fabricante. A inativação da Transcriptase reversa foi feita por incubação a 70°C por 15 min.

### 3.4 Clonagem molecular do cDNA completo do gene SnRK2.6

#### 3.4.1 Obtenção dos *primers* para amplificação e clonagem do gene

Para a clonagem do cDNA completo do gene SnRK2.6 de cafeeiro, *primers* específicos foram desenhados a partir do alinhamento entre as sequências dos contigs 12770 e 15120 com o gene completo SnRK2.6 de *Arabidopsis* (Figura 7), obtido no programa ClustalW. A partir do cDNA obtido de folha em condições de plena irrigação, foi realizada uma amplificação utilizando um *primer* que ancora em uma parte da sequência do contig 12770, que a partir do alinhamento mostrado na figura 7, foi considerado sítio +1 da região codificadora do gene, e um segundo *primer* desenhado na sequência do contig 15120, delimitando o final do gene SnRk2.6 de café. As sequências dos primers específicos utilizados na reação de amplificação foram: **CACCATGGATCGAGCGGCGTTG** (senso) e GCCTCATGCACCCTGATAAATTAC ACTGC (anti-senso). Os nucleotídeos em negrito correspondem à sequência necessária para a clonagem direcional de fragmentos de PCR por recombinação, utilizando o sistema Gateway (Invitrogen).

A reação de amplificação foi composta de dNTP (0,2 mM), iniciador senso (0,2 µM), iniciador anti-senso (0,2 µM), 1µL de cDNA, tampão da enzima (1X), MgSO<sub>4</sub> ( 2,5 mM ) e 1 U de Taq Polimerase Platinum®*Pfx*DNA (Invitrogen). O programa utilizado no termociclador (Mastercycler® Personal– Eppendorf AG, Hamburgo-Alemanha) para a reação de amplificação foi 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 1 min e 30 segundos, 65°C por 1 min e 30 segundos e a 72°C por 2 min, seguido por uma extensão final a 72° C, por 7 min.

O produto obtido foi analisado em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (Tris base 4,45 mM pH 6,0, ácido acético glacial e EDTA 0,1 mM pH 8,0), a uma corrente de 80 mV por 40 min (Sambrook et al., 1989), sendo utilizado um marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen) para obter evidências do tamanho do fragmento amplificado. As bandas foram visualizadas por meio de coloração com brometo de etídio (0,01 ng/mL) sobre luz ultravioleta.

O produto obtido por PCR foi purificado do gel de agarose 1% em tampão TAE utilizando o KIT PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen) e, em seguida, o fragmento foi inserido, por eletroporação, em vetor de entrada pENTR™/



TEV/Directional TOPO® Cloning (Invitrogen), que possui os sítios attL1 e attL2, necessários para permitir a recombinação pelo sistema Gateway de clonagem (Invitrogen). Posteriormente, colônias contendo o inserto foram selecionadas por PCR e o DNA plasmidial foi extraído com uso do KIT Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). O clone resultante foi utilizado para a transferência do respectivo cDNA para vetor de expressão em plantas. A transferência do cDNA do vetor de entrada para o vetor pK7WG2 foi feita por meio de recombinação mediada por LR Clonase (Invitrogen), segundo especificações do fabricante.

### **3.4.2 Sequenciamento do DNA Plasmidial**

O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Sequenciamento do BIOAGRO/UFV utilizando “ABI PRISM 3100 Genetic Analyser”. As amostras de DNA foram desnaturadas a 95°C, por 5 min em termociclador GeneAmp 9700 e mantidas em gelo por 2 min. As amostras foram sequenciadas com o ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Foram utilizados 2 µl de TRRMix, 3,2 pmoles de *primer* e 200 ng de DNA, em um volume final de 20 µl. A reação de seqüenciamento consistiu de 40 ciclos, cada um com os passos de 96°C, por 10 seg, 52°C, por 20 seg e 60°C por 4 min.

As seqüências de DNA obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank por meio do programa BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al., 1997) e alinhadas pelo programa ClustalW.

### **3.4.3 Obtenção de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens*, estirpe LBA-4404, foi plaqueada em meio Rhizo [(extrato de levedura 0,5% (p/v), caseína 0,05% (p/v), manitol 0,8% (p/v), sulfato de amônio 0,2% (p/v), cloreto de sódio 0,5% (p/v), pH 6,6)] (Tepfer e Casse-Delbart, 1987), contendo 100ug/L de estreptomicina e colocada em câmara

incubadora de crescimento a 28°C. Após 16 horas de crescimento, uma colônia isolada foi utilizada como inóculo em 50 mL de meio Rhizo seletivo e incubado a 28°C por 12 horas, sob agitação. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000xg por 10 minutos a 4°C. As células precipitadas foram lavadas quatro vezes em igual volume de água ultra-pura autoclavada e ressuspendidas em 2,0 mL de meio GYT (glicerol 10% (v/v), extrato de levedura 0,125% (p/v), triptona 0,25% (p/v)] e estocadas a -80°C.

#### **3.4.4 Eletroporação de *Agrobacterium tumefaciens***

A construção de DNA, contendo o fragmento do gene completo SnRK2.6 no vetor pK7WG2, foi utilizada para eletroporação de *Agrobacterium*, para posterior transformação de plantas, mediada por *A. tumefaciens*. Para isso, 1µL da diluição 1:5 do DNA mini-prep (com aproximadamente 100 ng de DNA) foi adicionado a 40 µL de células eletrocompetentes de *A. Tumefaciens* estirpe LBA-4404 e eletroporados em cuvetas de 2 mm a 2500 volts, por cerca de quatro a cinco mili-segundos, utilizando o eletroporador “Gene Pulser II” (BIORAD). Em seguida, 1 mL de meio Rhizo, sem antibiótico, foi cuidadosamente adicionado à cuveta. A mistura foi então transferida para tubo de 1,5 mL e incubada por duas horas a 28°C e, posteriormente, concentrada em 100 µL e plaqueada em meio Rhizo seletivo contendo estreptomicina (100 mg/mL) e espectinomicina (gene de resistência presente no vetor de clonagem). As placas foram mantidas a 28°C durante 3 dias. A confirmação do inserto nas colônias crescidas na placa, foi feita por PCR.

### **3.5 Isolamento e caracterização da região promotora de SnRK2.6**

#### **3.5.1 Extração de DNA de folhas de café**

O DNA foi extraído de folhas de café não tratadas, pelo método CTAB, segundo Murray et al (1980), com algumas modificações feitas pelo Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas da UFV.

Assim, 200 mg de tecido fresco foram macerados em cadinho com nitrogênio líquido e em seguida foi adicionado tampão A (Sorbitol 0,35M, tris-base 0,10M, EDTA 5mM, pH 8,0), Tampão B (NaCl 2M, CTAB 2%, tris-base 0,2 M e EDTA 0,05 M e B- mercaptoetanol (1%), 0,1g de carvão ativo, Sarcosyl 5% e metabissulfito de sódio).

As amostras, colocadas em tubos de 2 mL, foram submetidas à 65°C por quarenta minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por oito minutos a 17000xg, e ao sobrenadante coletado, foi acrescentado 1 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) sob agitação, seguido de centrifugação a 17000xg por oito minutos.

Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de isopropanol. Após três horas a -20°C, as amostras foram centrifugadas a 17000xg por oito minutos, os pellets obtidos foram lavados com etanol 75% e em seguida foram ressuspensos em 200 µL de água ultra-pura autoclavada. Após adição de 40 µL de NaCl 5M, as amostras foram incubadas dez minutos à temperatura ambiente, seguido de adição de 1 mL de etanol absoluto. Os pellets formados na interface, foram recolhidos com a pipeta, colocados em novos tubos de 1,5 mL e centrifugados 2 minutos a 13000xg. Em seguida, foram ressuspensos em 50 µL de TE sendo em seguida, tratados com RNase A (80 µg/mL), a 37°C por 30 minutos, para eliminação do RNA.

A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE e as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotômetro, medindo-se a absorvância a 260 nm.

### 3.5.2 Clonagem molecular da região promotora do Gene SnRK2.6

O DNA extraído, foi purificado e utilizado para a obtenção da sequência correspondente à região promotora do gene SnRK2.6 com o uso do kit BD GenomeWalker™ (BD Biosciences Clontech), de acordo com Siebert et al., 1995. Os oligonucleotídeos utilizados na primeira e segunda reação de PCR estão listados na Tabela 2. O *primer* da primeira reação de PCR foi desenhado na região codificadora do gene (contig 15120), enquanto o *primer* da segunda reação de PCR foi desenhado na extremidade 5' do contig 12770, considerada a região 5' UTR do gene SnRK2.6 de café. As sequências dos *primers* utilizados para amplificação das quatro bibliotecas “Genome Walker” foram: ATCGCTGTCGTGCATAATCGGCATATC (GW1) e CTCGTTCTGACGAAGGGGAAATAGGCT (GW2).

Os diversos fragmentos obtidos na segunda reação de PCR, foram clonados em vetor pGEM-T, segundo instruções do pGEM®-T Vector Systems (Promega). Em seguida, os clones obtidos foram utilizados na transformação de células One Shot® TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) quimicamente competentes, com alta eficiência, pelo método de choque térmico (Sambroock et al., 1989). As células, armazenadas a -80°C, foram colocadas em gelo por 5 min, e em seguida foi adicionado 10 µL do vetor recombinante, sendo misturados e deixados em gelo por 30 min. Foi feito então, o tratamento por choque térmico colocando os tubos em banho-maria a 42°C, por 50 seg e retornando ao gelo por 2 min. As células foram incubadas a 37°C durante 1 hora a 150 rpm, com 800 µL de meio SOC e em seguida foram inoculadas em placas contendo meio LB seletivo, acrescido de 100 µg/ml de ampicilina, 100 µM de IPTG e 50 mg/mL de X-Gal. As colônias que possuíam o inserto (brancas) foram visualizadas após 16 horas de incubação a 37° C e confirmadas por PCR, utilizando *primers* específicos. Após extração do DNA plasmidial, as amostras foram submetidas à reação de seqüenciamento. A identificação de prováveis cis-elementos foi conduzida utilizando o software PLACE- Plant Cis-acting Regulatory DNA elements (<http://dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

### 3.6 PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Todo o procedimento de PCR em Tempo Real, incluindo testes, validações e experimentos, foram conduzidos seguindo manuais da Applied Biosystems. As reações de PCR em Tempo Real foram conduzidas no aparelho Step One Plus (Applied Biosystems), com *primers* específicos (Tabela 1), cDNAs dos tratamentos, e um mix de reações preparado separadamente, utilizando SYBR Green. De acordo com o protocolo de reação do Real Time, cada mix de reação é composto de 0,2µM de iniciador (senso e anti senso, 10 µM cada), 50 µM de dNTPs 5mM, 1X Tampão (Invitrogen), 3mM de MgCl<sub>2</sub>, de SYBR green diluído em água (1:10000), 0,25 unidades de Platinum Taq DNA polimerase, 0,6 µL de cDNA (1:5), em um volume total de 20µL. As reações foram incubadas à 95°C por cinco minutos, seguidos de 40 ciclos à 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C durante 30 segundos. A especificidade das reações de amplificação, foi determinada pela curva de dissociação após a reação de amplificação.

Para a quantificação da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). A escolha do controle endógeno, para a normalização dos dados de qRT-PCR foi feita utilizando o programa *geNorm* (Vandesompele et al., 2002). Para isso, três controles endógenos para raiz e 2 controles endógenos para folhas foram testados, baseados em um estudo recente feito em folhas e raízes de *Coffea arabica*, em condições de seca (Cruz et al., 2009). AP47 (*clathrin-associated protein*), UBI 9 (*ubiquitin-like protein*) e o gene S24 (proteína ribossomal) foram testados para raiz e o gene GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e S24, testados para folhas. S24 foi escolhido, para raízes e folhas, pois apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos realizados e um nível similar de expressão com os genes de interesse e desta forma, foi utilizado para as análises em experimento de com folhas e raízes de café submetidas ao déficit hídrico.

Tabela 1: Lista dos *primers* específicos utilizados para qRT-PCR.

| <i>Primer</i> | Sequência (5'- 3')       | Gene alvo      | Posição de anelamento |
|---------------|--------------------------|----------------|-----------------------|
| 7715 FW       | GTCTCGTCTTTTGGACACCAATC  | 7715(CIPK11)*  | 1017 a 1039           |
| 7715 VER      | GGTCTCGCTTGATCTCCTCAA    |                | 1058 a 1078           |
| 6278 FW       | TGCAGATCTGATGGACGAAAAT   | 6278 (SnRK2.3) | 1508 a 1079           |
| 6278 VER      | TTGGCTGGTCAGGCTCTACA     |                | 1097 a 1116           |
| 15120 FW      | GCAAGTGTGCCACCGTGAT      | 15120(SnRK2.6) | 233 a 251             |
| 15120REV      | CTGGGAGCAGGGCTACCAT      |                | 277 a 295             |
| 15442 FW      | AGGGCTCAAGATCGATGAGAAC   | 15442(SnRK2.4) | 821 a 842             |
| 15442REV      | TTTGGATGCCTAAGAGATCTGTGA |                | 863 a 886             |
| 7417 FW       | CACCCTTGTTCTTGCAAAAC     | 7417 (SnRK2.8) | 501 a 521             |
| 7417 VER      | CATTGCTTTGCAAGCTTCCA     |                | 545 a 564             |
| 13763 FW      | TGATGGTGCTGTAGCAGATGTCT  | 13763 (CIPK10) | 335 a 357             |
| 13763 VER     | AACCCGCCATCAGGACATAA     |                | 377 a 396             |
| 9045 FW       | TCGTTGGTTTAGCTGGCAA      | 9045 (CIPK6)   | 30 a 49               |
| 9045 VER      | GCAGTAGAGGAAGGCAAAGAAACA |                | 66 a 89               |
| 18578 FW      | AAGGATCTCCCTGGCAAGAAG    | 18578 (CIPK8)  | 459 a 479             |
| 18578 VER     | GACTTGGTTGCTTTCGGGATAC   |                | 502 a 523             |
| 5567 FW       | TGGATGACGTTGAAGCTGTTTT   | 5567 (CIPK3)   | 307 a 329             |
| 5567 VER      | GCTCTTCCGTTTTTCTCGTGACA  |                | 351 a 373             |
| 15146 FW      | GCAGTAGCAACAGAGGTTTTTGAG | 15146 (CIPK9)  | 810 a 833             |
| 15146 VER     | TTTGCGGAGCTCCACCATA      |                | 851 a 869             |

\*Os genes alvos entre parênteses representam os genes homólogos em *Arabidopsis*.

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems).

### **3.7 Análise do padrão de expressão de genes SnRK em experimento de folhas destacadas de café**

A expressão de alguns genes da família SnRK foi analisada em folhas de café sob diferentes tratamentos, através de RT-PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos (Tabela 1). Para isso, foi realizado um experimento em casa de vegetação, com folhas destacadas de café. As folhas de *Coffea canephora* foram cortadas dentro de béquer contendo água e logo após, foram colocadas em béquer de 50 mL, contendo 25 mL das soluções de interesse. Assim, foram feitos os seguintes tratamentos, em um arranjo fatorial, a saber:

- 1- Tampão MES-KOH 2mM (controle)
- 2- ABA 50  $\mu$ M
- 3- Manitol 300 mM
- 4- NaCl 150 mM

Os parâmetros fisiológicos, como condutância estomática, fotossíntese e transpiração foram avaliados em 3 réplicas biológicas, em intervalos de 1 hora, com o Analisador de Gases no Infravermelho, IRGA (Modelo LCPro+, ADC Bioscientific, Herts, UK), durante quatro horas. A extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR em tempo real, foram realizados como descrito nos itens 3.3 e 3.6, apenas em folhas do clone 120, para todos os tratamentos realizados. Foram testados 4 controles endógenos para normalizar os dados de expressão gênica: Ubiquitina 9, Ubiquitina 10, AP47 e S24 e os resultados foram avaliados pelo programa *geNorm* (Vandesompele et al., 2002). Para todos os tratamentos realizados, o melhor controle endógeno observado foi Ubiquitina 9, que apresentou nível de expressão próximo aos genes de interesse e baixa variação de expressão entre os tratamentos realizados. Os resultados foram normalizados com o tratamento controle.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Prospecção de sequências do café e caracterização dos Contigs pertencentes à família SnRK

Para identificar genes pertencentes à família SnRK em café, foi feita uma minuciosa busca de sequências no Banco “Genoma Café” do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBPDC), onde mais de 200 mil sequências já foram depositadas e uma busca nas aproximadamente 60 mil sequências de *Coffea canephora* pertencentes ao banco de genes “Sol Genomics Networks”(Cornell,USA; [http://www.sgn.cornell.edu/search/library\\_search.pl?term=](http://www.sgn.cornell.edu/search/library_search.pl?term=)). A busca foi feita através do programa BLAST utilizando como “iscas”, sequências de genes já caracterizados pertencentes à família SnRK de outras espécies, como *Arabidopsis* e arroz. Desta forma, contigs que apresentaram alta identidade com estas sequências, foram selecionados como possíveis membros desta família em café.

Com intuito de separar os contigs identificados e classificá-los dentro de um dos três subgrupos da família SnRK, foi feita uma comparação entre as sequências de aminoácidos dos contigs de café identificados no banco e sequências de genes SnRK de outras espécies já caracterizados e, em seguida, foi realizado um agrupamento hierárquico entre estas sequências (Figura 3). Desta forma, foram identificados 24 contigs que podem representar possíveis genes pertencentes à família SnRK em café.

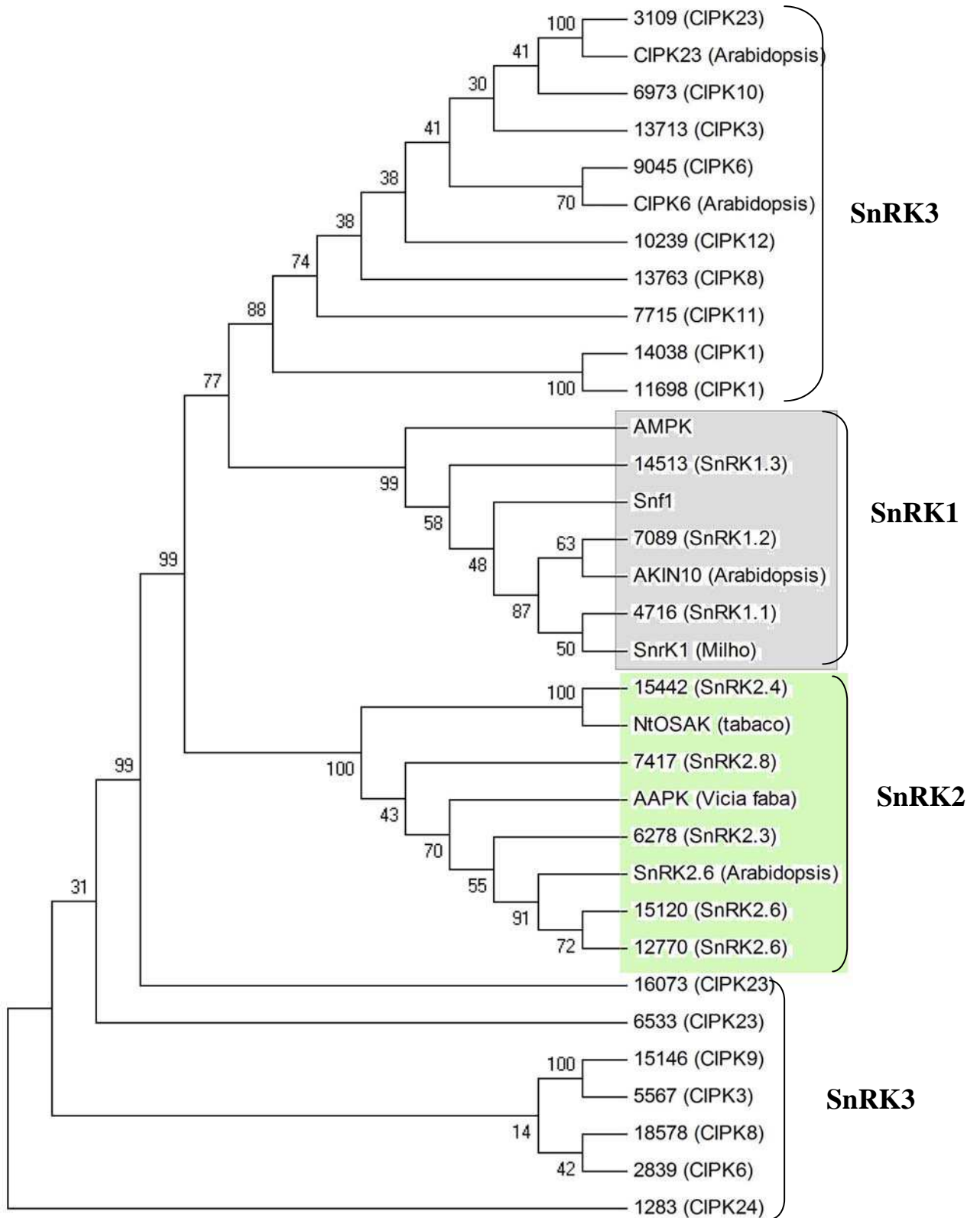
Observa-se na relação filogenética das seqüências de aminoácidos, que dos 24 contigs identificados, 3 (contigs 14513,7089 e 4716) destacados pela cor cinza, alinharam-se próximos com o gene SnRK1 de milho e com a proteína AKIN 10 (SnRK1.1) de *Arabidopsis thaliana* (Figura 3). Estão mais próximos também da proteína Snf1 de leveduras e AMPK de mamíferos, que segundo Halford e Hardie (1998), são homólogos funcionais e estruturais de SnRK1. Desta forma, estes 3 contigs foram classificados na família SnRK1. No genoma de *Arabidopsis thaliana*, apenas três membros dessa família foram identificados (Hraback et al., 2003).



Os 5 contigs, 15120, 12770, 6278, 15442 e 7417, mostraram alta identidade e similaridade com os genes pertencentes à família SnRK2 de outras espécies, como, por exemplo, o gene NtOSAK (proteína quinase ativada por ABA) de tabaco, pertencente à família SnRK2, que está envolvida em vias de sinalização em resposta à estresses (Kelner et al., 2004), o gene AAPK de *Vicia faba* e o gene SnRK2.6 de *Arabidopsis*.

Os 16 contigs restantes, foram incluídos na família SnRK3. Ao contrário do esperado, e observado em outras espécies, alguns genes da família SnRK3 apresentaram maior homologia com genes da família SnRK1 enquanto outros apresentaram maior similaridade com genes da família SnRK2. Uma possível explicação, seria o fato da maior parte das sequências dos genes incluídos na família SnRK3 não estarem com suas sequências completas. Assim, o domínio quinase, altamente conservado e presente em todas as subfamílias, e os domínios divergentes presentes ou ausentes nessas sequências devido à falta de sequência completa, poderiam contribuir para este posicionamento na árvore filogenética.

De acordo com as análises feitas, pode-se inferir que a partir da comparação de similaridade entre as sequências, foram identificados 3 contigs pertencentes a subfamília 1, 5 possíveis genes pertencentes à subfamília SnRK2 e 16 genes da subfamília SnRK3. Estudos anteriores, revelaram que o genoma de *Arabidopsis* codifica para 3 membros da família SnRK1, 10 da família SnRK2 e 25 membros da família SnRK3 (Hraback et al., 2003). De forma similar, em arroz, foram identificados 10 genes da família SnRK2 e 30 genes da família SnRK3 (Kolukisaoglu et al. 2004). Desta forma, de acordo com a árvore filogenética obtida (Figura 3), observa-se que os 3 genes da família SnRK1 foram identificados e, aproximadamente, metade dos genes da família SnRK2 e 3 foram identificados.



**Figura 3: Agrupamento hierárquico da família SnRK.** Dendograma resultante do alinhamento entre as sequências de proteínas dos contigs identificados no banco de dados do café, como pertencentes à família SnRK e genes SnRK de outras espécies já caracterizados. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa ClustalW e o agrupamento foi construído utilizando-se o programa MEGA4, que construiu a árvore pelo método UPGMA. Os valores nos nós da árvore indicam os valores de *bootstrap*. Os genes em parênteses indicam os genes correspondentes em *Arabidopsis*, que apresentaram maior similaridade com as respectivas sequências de café. Número de acesso das sequências utilizadas no agrupamento: NtOSAK: AAL89456 (*Nicotiniana tabacum*), AAPK: AAF27340 (*Vicia faba*), SnRK1: AAS59400 (*Zea mays*), AKIN10: CAA56146 (*Arabidopsis thaliana*), SnRK2.6: NP\_001119111 (*Arabidopsis thaliana*), CIPK6: AAF86505 (*Arabidopsis thaliana*), CIPK23: NP\_564353 (*Arabidopsis thaliana*), SnF1: AAB64904.1 (*Saccharomyces cerevisiae*) e AMPK: AAB32732 (*Homo sapiens*).

A nomenclatura adotada para os genes da família SnRK varia amplamente entre as espécies e autores. Para permitir uma melhor identificação destes genes em café, foi adotada a nomenclatura utilizada em genes de *Arabidopsis* (espécie que apresenta esta família gênica melhor caracterizada), segundo Hraback et al., 2003. Assim, os contigs identificados em café, neste trabalho, foram chamados pelo mesmo nome dos genes correspondentes de *Arabidopsis* com o qual apresentaram maior identidade.

#### **4.2 Isolamento e análises *in silico* de um novo membro da família SnRK de café**

Análises feitas no programa BLAST, mostraram que o contig 12770 apresenta 89% de identidade com SnRK2.6 de *Arabidopsis* e que o contig 15120 também apresenta alta identidade com este mesmo gene (88%). O alinhamento feito entre esses dois contigs e o gene SnRK2.6 de *Arabidopsis* mostrou que o contig 12770 alinha na região 5', enquanto o contig 15120 se alinha na região 3' e que existe uma extensa região de sobreposição, altamente similar, entre os dois contigs (com apenas 23 nucleotídeos divergentes) e o gene atSnRK2.6 (Figura 4). Desta forma, estes dois contigs, ambos incompletos, e caracterizados como sequências diferentes no banco do café, podem se referir ao mesmo gene.

(433) 433 440 450 460 470 486  
 12770 (433) TTTGATTTTATTGTGCTTAGGGTTCTTGTTTGGATGAAGTTTGAGGCACGTTT  
 15120 (1) -----  
 OST1 ath (1) -----  
 Consensus (433)

Section 10

(487) 487 500 510 520 530 540  
 12770 (487) AGCTGCTTG T TGT GG ATT GATGA T TATG AAC T TATGATAA TGT TGT TTG GGGTT  
 15120 (1) -----  
 OST1 ath (1) ----- T TGT TC ATT TCCTC T G ATG TCT T GG TG TCGT TAGATA TTG TCTCC  
 Consensus (487) T TGT ATT T ATG T TG T G TTG

Section 11

(541) 541 550 560 570 580 594  
 12770 (541) TGAA TTT GGG AT - TGAAGA AAT CAG GG T TCG GGC TTTT TGG G TTTG AG TT G G TT  
 15120 (1) -----  
 OST1 ath (46) CAAAAA A GAA AT C T TCTT G ACA CAG A G AT T GAAG T CGCAA G AGAC AG A - GG AA  
 Consensus (541) AA G AT T A CAG G T G T G T G AG GG

Section 12

(595) 595 600 610 620 630 648  
 12770 (594) TTCTTT GGG C AAATGGATCGA G CG GG GT TGA CTG TGGGGCCGGG AAATGGAT AT  
 15120 (1) -----  
 OST1 ath (99) AGAGGG GGA GA AAATGGATCGA C CAG C AG TGA GTG GTCC ----- AAATGGAT TT  
 Consensus (595) GG G AAATGGATCGA C GC TGA TG AAATGGAT T

Section 13

(649) 649 660 670 680 690 702  
 12770 (648) GCCGATTATGCACGA CAGCGAT CGC TA C GA G CT GGT GCGGGA CAT C GG T TCCGG  
 15120 (1) -----  
 OST1 ath (147) GCCGATTATGCACGA TAGT GATAG G TA TGA A CT CT CAAGGA TAT T GG C TCCGG  
 Consensus (649) GCCGATTATGCACGA AG GAT G TA GA CT GT GGA AT GG TCCGG

Section 14

(703) 703 710 720 730 740 756  
 12770 (702) GAA TTT TGGAGT G GCT AG GC T C ATGA A GA T A G G C A G A C G A A C GAGCTTGT GGC  
 15120 (1) -----  
 OST1 ath (201) TAA TTT TGGAGT T C C G A G A T T G A T G A G A G A C A G C A A A G T A A T G A G C T T G T T G C  
 Consensus (703) AATTTTGGAGT GC AG T ATGA AGA A GCA A AA GAGCTTGT GC

Section 15

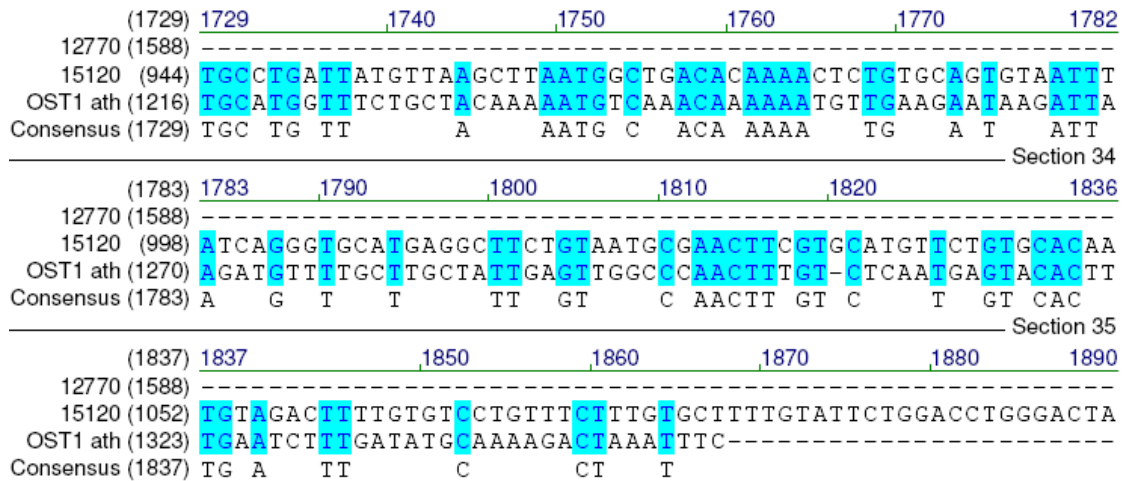
(757) 757 770 780 790 800 810  
 12770 (756) C G T TAA G T A T A T T C A G A G A G G C G A T A A G A T T G A T G A G A A T G T G C A A A G A G A A A T  
 15120 (1) ----- A G A T T G A T G A G A A T G T G C A A A G A G A A A T  
 OST1 ath (255) T G T TAA A T A T A T C A G A G A G G T G A G A A G A T A G A T G A A A A T G T A A A A A G G G A G A T  
 Consensus (757) G TAA TATAT GAGAGAGG GA AAGATTGATGAGAATGTGCAAAGAGAAAT

Section 16

(811) 811 820 830 840 850 864  
 12770 (810) AATCAACCACAGATCACTAAGGCATCCCAA CATTGTCCGATT TAAAGAGGTCAT  
 15120 (29) AATCAACCACAGATCACTGAGGCATCCCAA CATTGTCCGATT TAAAGAGGTCAT  
 OST1 ath (309) AATCAACCACAGGTCCTTAAAGACATCCCAA TATCGTTAGATTCAAAGAGGTTAT  
 Consensus (811) AATCAACCACAGATCACTAAGGCATCCCAA CATTGTCCGATT TAAAGAGGTCAT

|           |        |   |                |      |      |      |            |
|-----------|--------|---|----------------|------|------|------|------------|
|           | (865)  | 865   | 870            | 880  | 890  | 900  | 918        |
| 12770     | (864)  | ATTGACTCCAACCCACCTGGCTATTGTGATGGAATATGCC                  | TCAGGAGGAGAGCT |      |      |      |            |
| 15120     | (83)   | ATTGACTCCAACCCACCTGGCTATTGTGATGGAATATGCC                  | TCAGGAGGAGAGCT |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (363)  | ATTAAACCCAACCCATTAGGCATTGTTATGGAATATGCATCT                | GGAGGAGAACT    |      |      |      |            |
| Consensus | (865)  | ATTGACTCCAACCCACCTGGCTATTGTGATGGAATATGCC                  | TCAGGAGAGCT    |      |      |      |            |
|           |        |   |                |      |      |      | Section 18 |
|           | (919)  | 919   | 930            | 940  | 950  | 960  | 972        |
| 12770     | (918)  | CTTTGAGCGAATCTGCAATGCTGGCCGATTCAGCGAGGATGAGGCACGATTTTT    |                |      |      |      |            |
| 15120     | (137)  | CTTTGAGCGAATCTGCAATGCTGGCCGATTCAGCGAGGATGAGGCACGATTTTT    |                |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (417)  | TTTCGAGCGAATCTGCAATGCAAGGCCGCTTCAGCGAAGACGAGGC            | GAGGTTTTT      |      |      |      |            |
| Consensus | (919)  | CTTTGAGCGAATCTGCAATGCTGGCCGATTCAGCGAGGATGAGGCACGATTTTT    |                |      |      |      |            |
|           |        |   |                |      |      |      | Section 19 |
|           | (973)  | 973   | 980            | 990  | 1000 | 1010 | 1026       |
| 12770     | (972)  | CTTCCAACAGCTTATATCAGGAGTCAGTTACTGTCATGCTATGCAAGTGTGCCA    |                |      |      |      |            |
| 15120     | (191)  | CTTCCAACAGCTTATATCAGGAGTCAGTTACTGTCATGCAATGCAAGTGTGCCA    |                |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (471)  | CTTCCAGCAACTCATTCAGGAGTTAGTTACTGTCATGCTATGCAAGTATGTC      |                |      |      |      |            |
| Consensus | (973)  | CTTCCAACAGCTTATATCAGGAGTCAGTTACTGTCATGCTATGCAAGTGTGCCA    |                |      |      |      |            |
|           |        |   |                |      |      |      | Section 20 |
|           | (1027) | 1027  | 1040           | 1050 | 1060 | 1070 | 1080       |
| 12770     | (1026) | CCGTGATTTGAAGTTAGAGAACACATTATTGGATGGTAGTCCCTGCTCCAGGCT    |                |      |      |      |            |
| 15120     | (245)  | CCGTGATTTGAAGTTAGAGAACACATTATTGGATGGTAGTCCCTGCTCCAGGCT    |                |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (525)  | CCGAGACTTAAAGCTCAGAAATACGTTATTAGATGGTAGCCCGCCCTCCT        |                |      |      |      |            |
| Consensus | (1027) | CCGTGATTTGAAGTTAGAGAACACATTATTGGATGGTAGCCCTGCTCCAGGCT     |                |      |      |      |            |
|           |        |   |                |      |      |      | Section 21 |
|           | (1081) | 1081  | 1090           | 1100 | 1110 | 1120 | 1134       |
| 12770     | (1080) | AAAAATTTGTGATTTTGGCTATTCCAAGTCTTCGGTGCTGCATTCACAACCAAA    |                |      |      |      |            |
| 15120     | (299)  | AAAAATTTGTGATTTTGGCTATTCCAAGTCTTCGGTGCTGCATTCACAACCAAA    |                |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (579)  | AAAGATATGTGATTTTGGATATTCCAAGTCTTCGGTGCTGCATTCACAACCAAA    |                |      |      |      |            |
| Consensus | (1081) | AAAAATTTGTGATTTTGGCTATTCCAAGTCTTCGGTGCTGCATTCACAACCAAA    |                |      |      |      |            |
|           |        |   |                |      |      |      | Section 22 |
|           | (1135) | 1135  | 1140           | 1150 | 1160 | 1170 | 1188       |
| 12770     | (1134) | GTCAACTGTTGGTACACCAAGCATATATTGGCCCGAAGTTTTGCTCAAGAAAGA    |                |      |      |      |            |
| 15120     | (353)  | GTCAACTGTTGGTACACCAAGCATATATTGCACCTGAAGTTTTGCTCAAGAAAGA   |                |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (633)  | GTCAACTGTTGGTACACTCCTGGCTTACATCGCTCCTGAGGTTTTACTAAAGAAAGA |                |      |      |      |            |
| Consensus | (1135) | GTCAACTGTTGGTACACCAAGCATATATTGGCCCGAAGTTTTGCTCAAGAAAGA    |                |      |      |      |            |
|           |        |   |                |      |      |      | Section 23 |
|           | (1189) | 1189  | 1200           | 1210 | 1220 | 1230 | 1242       |
| 12770     | (1188) | ATATGATGGAAAGATTGCTGATGTGTGGTCTTGTGGAATTACTTTGTATGTCAT    |                |      |      |      |            |
| 15120     | (407)  | ATATGATGGAAAGATTGCTGATGTGTGGTCTTGTGGAATTACTTTGTATGTCAT    |                |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (687)  | ATATGATGGAAAGTTGCAAGATGTTGGTCTTGTGGAATTACTTTGTATGTCAT     |                |      |      |      |            |
| Consensus | (1189) | ATATGATGGAAAGATTGCTGATGTGTGGTCTTGTGGAATTACTTTGTATGTCAT    |                |      |      |      |            |
|           |        |   |                |      |      |      | Section 24 |
|           | (1243) | 1243  | 1250           | 1260 | 1270 | 1280 | 1296       |
| 12770     | (1242) | GCTTGTGGGGGCATATCCTTTTGGAGACCCAGAGGAGCCCAAAAAC TTCAGGAA   |                |      |      |      |            |
| 15120     | (461)  | GCTTGTGGGGGCATATCCTTTTGGAGACCCAGAGGAGCCCAAAAAC TTCAGGAA   |                |      |      |      |            |
| OST1 ath  | (741)  | GCTGGTGGAGGCATATCCTTTTGAAGATCCCGAGGAAACCAAGAAAT TTCAGGAA  |                |      |      |      |            |
| Consensus | (1243) | GCTTGTGGGGGCATATCCTTTTGGAGACCCAGAGGAGCCCAAAAAC TTCAGGAA   |                |      |      |      |            |





**Figura 4:** Alinhamento entre seqüências de nucleotídeos dos contigs 12770 e 15120 identificados no banco do genoma do café e o gene correspondente a SRK2.6 (OST1) de *Arabidopsis*. O alinhamento foi feito no programa *Vector NTI 9.0*.

Para comprovar essa hipótese, *primers* específicos foram desenhados, baseados no alinhamento mostrado na figura 4, e o produto de amplificação obtido por PCR e posteriormente sequenciado, confirmou que esses 2 contigs se referem ao mesmo gene, que foi denominado cnSnRK2.6 (Figura 5). O gene apresenta 1089 pares de bases, codificando uma proteína de 363 aminoácidos, com um peso molecular estimado de 41,25 KDa e um *pl* 4,81. Na figura 6, são mostrados os domínios identificados nesta proteína. Análises em banco de dados utilizando o programa BLASTP, demonstrou que esta proteína apresenta alta identidade ( $E\_value = 0$ ) com a proteína SAPK10 de *Ricinus communis*, com SnRK2.6 de *Arabidopsis* ( $E\_value = 1e-180$ ) e com SAPK3 ( $E\_value = 7e-173$ ) de arroz. O produto de amplificação obtido, foi eficientemente clonado em vetor de expressão de plantas (pK7WG2) e inserido em *Agrobacterium tumefaciens*. Desta forma, será feita uma expressão heteróloga em plantas de *Arabidopsis* mutantes *ost1* (que não apresentam expressão de SnRK2.6), com a finalidade de caracterizar funcionalmente o gene cnSnRK2.6 de café.

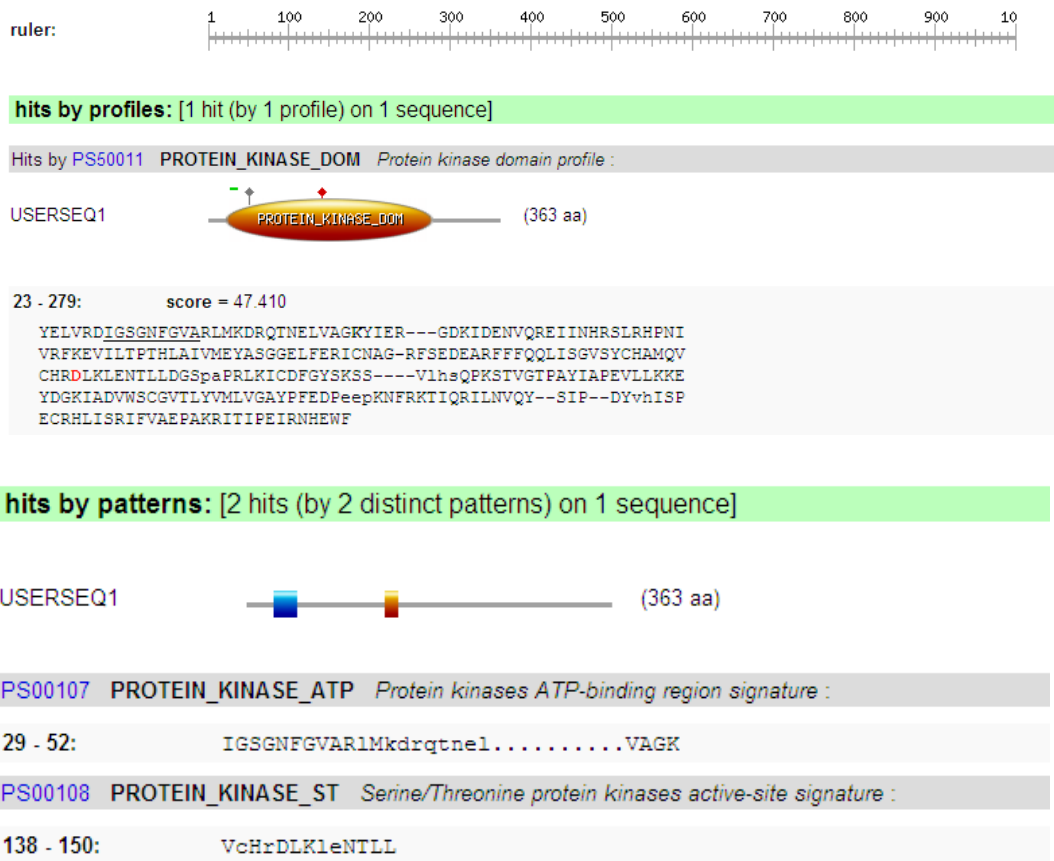
```

atggatcgagcggcgttgactgtggggccgggaatggatatgccgattatgcacgacagc
M D R A A L T V G P G M D M P I M H D S
gatcgctacgagctggtgcgggacatcggttccgggaatTTTGGAGTGGCTAGGCTCATG
D R Y E L V R D I G S G N F G V A R L M
aaagataggcagacgaacgagccttgtggccggttaagtatatTTGAGAGAGGCGATAAGATT
K D R Q T N E L V A G K Y I E R G D K I
gatgagaatgtgcaaagagaaataatcaaccacagatcactgagggcatcccaacattgtc
D E N V Q R E I I N H R S L R H P N I V
cgatttaaagaggtcatattgactccaaccacctggctattgtgatggaatatgcctcg
R F K E V I L T P T H L A I V M E Y A S
ggaggagagctctttgagcgaatctgcaatgctggccgattcagcgaggatgagcgacga
G G E L F E R I C N A G R F S E D E A R
TTTTTCTTCCAACAGCTTATATCAGGAGTCAGTTACTGTCATGCAATGCAAGTGTGCCAC
F F F Q Q L I S G V S Y C H A M Q V C H
cgtgatttgaagttagagaacacattattggatggttagccctgctcccaggctaaaaatt
R D L K L E N T L L D G S P A P R L K I
tgtgattttggctattccaagtcttctgtgctgcattcacaaccaagtcaactgttgggt
C D F G Y S K S S V L H S Q P K S T V G
acaccagcatatattgcacctgaagttttgctcaagaaagaatatgacggaaagattgct
T P A Y I A P E V L L K K E Y D G K I A
gatgtgtggctcttgtggagttactttgtatgtcatgcttgtgggggcatacccttttgag
D V W S C G V T L Y V M L V G A Y P F E
gaccagaggagcccaaaaacttcaggaagacaatacagcgaattctgaacgtccaatac
D P E E P K N F R K T I Q R I L N V Q Y
tcaattcccgattatgttcatatatctccagaatgccgtcatctgatctcaaggattttt
S I P D Y V H I S P E C R H L I S R I F
gtagctgaacctgcaaagaggataaccattcctgagatcagaaaccatgagtggtttctc
V A E P A K R I T I P E I R N H E W F L
aagaaccttctgcggtatcttatggacgacaacatggcaaataaccattttgaggagcca
K N L P A D L M D D N M A N N H F E E P

```

**Figura 5:** Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos correspondentes ao gene SnRK2.6 de café, obtida por sequenciamento. A sequência se encontra no sentido 5'- 3', frame +1.





**Figura 6: Domínios encontrados na proteína referente à SnRK2.6 de café.** Os domínios em destaque foram identificados por meio de análises da sequência de aminoácidos realizada com PROSITE retirando filtros de baixa complexidade.

A partir do agrupamento hierárquico (Figura 3), observa-se também que dois contigs (11698 e 14038) apresentam alta homologia com o gene CIPK1 de *Arabidopsis*. Uma hipótese sugerida seria a de que estes contigs possam representar um mesmo gene em café e não genes diferentes como mostrado no banco, de forma semelhante ao demonstrado para o gene *cnSnRK2.6*. Um alinhamento feito entre esses 2 contigs e o gene CIPK1 de *Arabidopsis* (dados não mostrados) indicou que o contig 11698 se alinha na região 5', enquanto o contig 14038 se alinha na região 3' do gene de *Arabidopsis*. Ambos apresentam uma região de sobreposição à sequência de CIPK1 de *Arabidopsis*, altamente similar. Desta forma, pode-se agora desenhar *primers* específicos para amplificar o gene CIPK1 completo em café, e comprovar se referem ou não ao mesmo gene, contribuindo assim para uma melhor anotação do banco do café.

Para verificar se os contigs identificados no banco do café, apresentavam sequências completas, foi feito um alinhamento entre os contigs e os genes de *Arabidopsis*, espécie que possui a família de genes SnRK melhor caracterizada, de maior homologia. Todos os 3 contigs classificados na família SnRK1 provavelmente apresentam sequência completa, uma vez que a parte inicial e final dos genes se alinharam com as sequências correspondentes em *Arabidopsis* (dados não mostrados).

De acordo com o alinhamento feito entre as sequências de proteínas identificadas da família SnRK2 em café e sequências dos genes homólogos em *Arabidopsis* (Figura 7), observa-se que os genes correspondentes a SnRK2.3 e SnRK2.4, provavelmente, apresentam sequência completa, uma vez que a parte inicial e final do gene se alinham com os respectivos genes de *Arabidopsis*. Por outro lado, o gene SnRK2.8 parece estar incompleto, faltando uma parte da região correspondente à extremidade 5'. Como observado por Halford e Hardie (1998), a sequência de aminoácidos de proteínas da família SnRK2 pode ser dividida em duas partes: um domínio catalítico N-terminal altamente conservado e mais próximo a Snf1/MAPK e um domínio C-terminal divergente contendo regiões ricas em aminoácidos acídicos, como visto no alinhamento mostrado na figura 7.

```

CnSnRK2.4      -----MDKYELVKDIGSGNFGVARLMRNKETKELVAMKYIERG
atSnRK2.4      -----MDKYELVKDIGAGNFGVARLMKVKNSKELVAMKYIERG
CnSnRK2.6      ---MDRAALTVGPGMDMPIMHSDRYELVRDIGSGNFGVARLMKDRQTNELVAGKYIERG
atSnRK2.6      ---MDRPAVS-GP-MDLPIMHSDRYELVKDIGSGNFGVARLMRDKQSNELVAVKYIERG
CnSnRK2.3      MSKMDRAAVTVGPAVDMPIMHSDRYDLVRDIGSGNFGIARLMRDKQTKELVAVKYIERG
atSnRK2.3      ---MDRAPVTTGP-LDMPIMHSDRYDFVKDIGSGNFGVARLMRDKLTKELVAVKYIERG
atSnRK2.8      -----MERYEIVKDIGSGNFGVAKLVRDKFSELFAVKFIERG
CnSnRK2.8      -----

CnSnRK2.4      LKIDENVAREIINHRSLRHPNIIRFKEVVLTPTHLAIVMKYAAGGELFERICNAGRFSED
atSnRK2.4      PKIDENVAREIINHRSLRHPNIIRFKEVVLTPTHLAIAMEYAAGGELFERICSAGRFSED
CnSnRK2.6      DKIDENVQREIINHRSLRHPNIVRFKEVILTPTHLAIVMEYASGGELFERICNAGRFSED
atSnRK2.6      EKIDENVKREIINHRSLRHPNIVRFKEVILTPTHLAIVMEYASGGELFERICNAGRFSED
CnSnRK2.3      DKIDENVKREIINHRSLKHPNIVRFKEVILTPTHLAIVMEYASGGELFERICNAGRFSED
atSnRK2.3      DKIDENVQREIINHRSLRHPNIVRFKEVILTPTHLAIIMEYASGGELYERICNAGRFSED
atSnRK2.8      QKIDENVQREIIMNHRSLIHPNIIRFKEVLLTATHLALVMEYAAGGELFGRICNAGRFSED
CnSnRK2.8      -----NAGRFNED
                                     .****. **

CnSnRK2.4      EARYFFQQLISGVNYCHFMQICHRLDKLENTLLDGSAPAPRLKICDFGYSKSSLLHSRPKS
atSnRK2.4      EARYFFQQLISGVSYCHAMQICHRLDKLENTLLDGSAPAPRLKICDFGYSKSSLLHSRPKS
CnSnRK2.6      EARFFFQQLISGVSYCHAMQVCHRDLKLENTLLDGSAPAPRLKICDFGYSKSSVLHSQPKS
atSnRK2.6      EARFFFQQLISGVSYCHAMQVCHRDLKLENTLLDGSAPAPRLKICDFGYSKSSVLHSQPKS
CnSnRK2.3      EARFFFQQLISGVSYCHSMQVCHRDLKLENTLLDGSAPAPRLKICDFGYSKSSLLHSQPKS
atSnRK2.3      EARFFFQQLISGVSYCHSMQICHRLDKLENTLLDGSAPAPRLKICDFGYSKSSVLHSQPKS
atSnRK2.8      EARFFFQQLISGVNYCHSLQICHRLDKLENTLLDGSAPAPRVKICDFGYSKSGVLHSQPKT
CnSnRK2.8      EARFFFQQLISRVSYCHSMQICHIDLKLENTLLDGSAPAPRVKICDFGYSKSAVFNHSQPKS
***:*****:* * .*** :*:** ***** ***** :*:*****:

```

```

CnSnRK2.4 TVGTPAYIAPEVLSRREYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDQEDPKNFRKTIQRIMA
atSnRK2.4 TVGTPAYIAPEVLSRREYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDQEDPKNFRKTIQKIMA
CnSnRK2.6 TVGTPAYIAPEVLLKKEYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEEPKNFRKTIQRILN
atSnRK2.6 TVGTPAYIAPEVLLRQYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEPRDFRKTINKILK
CnSnRK2.3 TVGTPAYIAPEVLLRQYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEPRDYRKTIQIRILS
atSnRK2.3 TVGTPAYIAPEVLLRQYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEPRDYRKTIQIRILS
atSnRK2.8 TVGTPAYIAPEVLSRREYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDPSPDKDFRKTIGRILK
CnSnRK2.8 TVGTPAYIAPEVLSRREYDGLKADVWVSCGVTLYVMLVGAYPFEDPSPDKDFRKTIGRILK
***** :*****:*****:*****:***** :*::***** :*:

CnSnRK2.4 VQYKVPDYVHISQECRHLISRIFVANPARRITIKDIKTHPWFLKKNLPRELTDAAQAAYR
atSnRK2.4 VQYKIPDYVHISQDCKNLSRIFVANSLKRITIAEIKKHSWFLKKNLPRELTETAQAAYFK
CnSnRK2.6 VQYSIPDYVHISPECRHLISRIFVAEPAKRITIPERIRNHEWFLKKNLPADLMDDNMANNHF
atSnRK2.6 VQYAIIPDYVHISPECRHLISRIFVADPAKRISIPEIRNHEWFLKKNLPADLMNDNTMTTQF
CnSnRK2.3 VQYTIPDHVQISEDCHRLISRIFVADPAQRITIPERIKNHVWFLKKNLPADLMNDNTMTTQF
atSnRK2.3 VKYSIPDDIRISPECHRLISRIFVADPATRISIPEIKTHSWFLKKNLPADLMNESNTGSQF
atSnRK2.8 AQYAIIPDYVRSDECRHLISRIFVANPEKRITIEEIKNHSWFLKKNLPVEMYEGSLMMN--
CnSnRK2.8 VHYSIPDYVRSVDECRHLISRIFVANPEKRINIAEIKRHPWFLQNLPEVMEAGSLQSN
.:* :** :::* :* :*:*****: . **.* :*: * ***:*** : : :

CnSnRK2.4 KENPTFSLQSAEEITKIVAEAKAPPVRSRISGGFGWGGEED----EEKEEDVEGEVD--E
atSnRK2.4 KENPTFSLQTVVEEIMKIVADAKTPPPVRSRISGGFGWGGNGDADGKEEDAEDVEEEEEVEE
CnSnRK2.6 EE-PDQPMQSDDEIMQIITEATIPTAGMNSLNQY-----LTGSLDVEE
atSnRK2.6 DE-SDQPGQSIIEEIMQIIAEATVPPAGTQNLNHY-----LTGSLDIDD
CnSnRK2.3 VE-PDQPMQSLDVIMQIISEATIPVPG-LCNLDI-----MDDDMDDL
atSnRK2.3 QE-PEQPMQSLDTIMQIISEATIPAVRNRLDDF-----MTDNLD-LD
atSnRK2.8 ---GPSTQTVVEIIVWIIIEARKPIITVATGLAGAG-----GSGGSSNGAIG
CnSnRK2.8 IN---TPAQSIIEVLAITQEARKLEVAKAGLLSLG-----SMDLDDDDAD
. * : : * : *

CnSnRK2.4 EEDEEED- - - - -YDKQVKEAQASGEFQLS-GLFSCIRIVLVKSMNCGCFHDRV
atSnRK2.4 EEDEDEDE- - - - -YDKTVKEVHASGEVRIS- - - - -
CnSnRK2.6 DMEEDME- - - - -SDPD-LDIDSSGEIVYAI- - - - -
atSnRK2.6 DMEEDLE- - - - -SDLDDLIDSSGEIVYAM- - - - -
CnSnRK2.3 SDDLDD- - - - -LDPD-LDIDSSGEIVYAI- - - - -
atSnRK2.3 DDMDDFD- - - - -SESE-IDIDSSGEIVYAL- - - - -
atSnRK2.8 SSSMDLDD- - - - -LDTDFDDIDTADLLSPL- - - - -
CnSnRK2.8 LEEDTEASGDFVCSI- - - - -

```

**Figura 7:** Alinhamento entre as sequências de genes SnRK2 de café e as sequências similares em *Arabidopsis*. Número de acesso das sequências utilizadas no alinhamento: atSnRK2.4: NP\_172563, atSnRK2.3: NP\_201489, atSnRK2.6: NP\_001119111. As letras iniciais at e Cn significam *Arabidopsis thaliana* e *Coffea canephora*, respectivamente. A área em verde indica regiões ricas em aminoácidos acídicos (D- aspartato e E- Glutamato)

Como previamente reportado por Halford e colaboradores (1998), a subfamília SnRK2 pode ainda ser dividida em 2 subgrupos. O grupo SnRK2a apresenta, na região C-terminal, regiões ricas em aspartato (D) enquanto o grupo SnRK2b, apresenta regiões ricas em glutamato (E). De acordo com a figura 7, observa-se que os genes cnSnRK2.3, cnSnRK2.6 e cnSnRK2.8 pertencem ao subgrupo SnRK2a, enquanto cnSnRK2.4 pertence ao subgrupo SnRK2b. Em



### **4.3 Isolamento e análises *in silico* da região promotora do gene SnRK2.6**

Informações sobre cis-elementos são importantes para o entendimento de mecanismos regulatórios da expressão gênica. Em café, ainda nenhuma região promotora de genes SnRKs foi identificada. Neste trabalho, foram identificados 700 pb da região promotora do gene SnRK2.6 (Figura 9). A análise desta região foi realizada com auxílio do programa computacional PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

### > Promotor SnRK2.6

AGTGAAAAGAGGGCACCGGGTGTGTAATACGAATCACTATAGGGCGAATTGGTCAC  
GAGTCGCATGCTCCCGGCGCATGGCGGATACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGAC  
CGGGCTGGTCATAAAGCATTGCATTCAAATTGGTTTCATAATCATTGGAATTGAG  
TCTGAACGAGCTTTAATCAAAGTTAGACTTAACTTAAATGCATGTAAATTTATTAT  
TTTTAAATCAGGAATAAAGAGTAAGGGTCAACCAAAAAATAATTATTCTCNAGTT  
ATAATAGAGTGAGATTTGAAATGTTATTCAANACCATNGATTTACGACAATTTTT  
TTTCCCGTCCCCTTCATCCCCCGCTCAATAACTAGTTGGCCAAATATGTACCTC  
CATATTTTGGGANGATACACAACCTACCGGATTCAACATACAACACCACCAGGGAT  
ACCACAAAGAAATTTCTCCACAGGCTTACCAAAGTTTTCTTGTA AAAACATAAGC  
TTGATTGGGACTTATTAATTTTATAACTAAAATTAGACTTGTGAGAAACCCATTN  
TGGTAGGGAGTTCCAACGTTGGTCCAAAAAATATATNATACAAACACAGAAGAAG  
TAAAGTAAGGTAGCACATTGGTATATGATAAACCATAACTTGCTAATTTTTTTTA  
CACCCCCTTATAATTCGCAAACGGCCATTTGAAGCAGCAACTCGAGTAATTTACC  
CAAAAAGCCTATTTCCCCTTCGTCAGAACGAGTTAACGAACCTCCTACCAAACACA  
CAGAAAATGCAGAATAAGCTACAGCTAAAAGGTGAAAGCAGCAAAAAGCACTAAACT  
TCACGAGCTTACACTCTCTATATAGATGTACACATGTATATATAGCTATACAGCTT  
CGTGTGAATTGATGATGACGACGACGATCATGAAATTGATGTACTAAAAGAACCTA  
GAAACAAGAAAAGTGAACCTCGGTAGTAGAGTTGTGGTGGTAAGTAAAACCTTCA  
CGGGCTTGCGGCCTTGCTTTGAGCTCATCAACCATCCTTTTTTAAGGTCTCTATCTT  
CGAACAACATACAAACAATTATTTACTTGGATTCTGTGATCGACAGCTTGCCAGTT  
GCCACTTTGGCTTGCGGGGTTTTTGATTTTTTATTGTGCTTAGGGTTCTTGTTTGG  
TGAAGTTTGAGGCACGTTTAGCTGCTTGTGTGGATTGATGATTATGAACTTATGA  
TAATGGTGTGTTGGGGTTTGAATTTGGGATTGAAGAAATCAGGGTTCGGGCTTTTTG  
GTTTTGAGTTGGTTTTCTTTGGGGCAAATGGATCGAGCGGCGTTG

**Figura 9: Sequência de nucleotídeos do promotor de SnRK2.6.** A região promotora de SnRK2.6 está representada com vários cis-elementos em destaque: DOF (vermelho), GATA Box (azul), TATA Box (negrito sublinhado), MYB1AT (verde), CAAT Box (amarelo). A base G (em negrito e sublinhado), indica o provável sítio de início da transcrição.

Observa-se que a região promotora identificada contém sequências conservadas características de promotores gerais de plantas como as sequências dos elementos “TATA Box” e “CAAT Box”, além de outras sequências mais específicas (Figura 9). O elemento TATA Box está localizado a 22 pb do sítio de início da transcrição. Observa-se também que o gene SnRK2.6 apresenta uma extensa região 5' não traduzida.

Diversos sítios, possivelmente envolvidos na regulação tecido-específica, foram identificados na sequência. Dentre eles, destaca-se o elemento GATA Box, envolvido no controle de expressão tecido-específica e à regulação por luz, que foi localizado em diversas posições no promotor (Figura 9).

Foram identificados vários sítios relacionados com a proteína regulatória DOF. As proteínas DOF são uma família de fatores de transcrição, identificadas em associação com diversos promotores de genes específicos de plantas, envolvidas em diferentes funções no controle da expressão gênica (Yanagisawa e Schmidt, 1999). Adicionalmente, foram identificados no promotor quatro motivos TAAAGSTKST1, os quais podem ser sítios de ligação de proteínas DOF, tendo sido identificadas como responsáveis pela expressão tecido-específica em células-guarda (Plesch et al., 2001). Em *Arabidopsis*, o gene SnRK2.6 apresenta um importante papel na regulação estomática dependente de ABA e é expresso especificamente em células-guarda (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002).

Uma sequência também identificada no promotor consiste no elemento do tipo MYB1AT. Em *Arabidopsis*, foi demonstrado que este cis-elemento funciona como ativador transcricional na sinalização de ABA (Abe et al., 2003). Adicionalmente, foi identificado o cis-elemento PYRIMIDINEBOXHVEPB1, relacionado com a expressão gênica regulada por ABA e GA<sub>3</sub> simultaneamente (Cercos et al., 1999).

Desta forma, o padrão de expressão do gene SnRK2.6 parece ser regulado por um grande número de fatores de transcrição acessórios, indicando um sistema complexo e cooperativo no controle da expressão gênica.

#### **4.4 Genes da família SnRK são diferencialmente expressos, em folhas e raízes de café, em resposta à seca**

Para elucidar a regulação dos genes da família SnRK em resposta à seca, a expressão relativa de alguns genes pertencentes a família SnRK2 e SnRK3 foi investigada através da técnica de RT-PCR em Tempo Real, com iniciadores específicos para cada um dos genes de interesse. Todos os tratamentos foram feitos em um pool 3 de réplicas biológicas e com três réplicas manuais. O controle endógeno utilizado foi o gene constitutivo S24 e os dados normalizados com o tratamento controle do clone 120.

Os quatro genes identificados no banco de dados do café e classificados na família SnRK2 (SnRK2.3, SnRK2.4, SnRK2.6 e SnRK2.8) foram avaliados. Observou-se que o gene SnRK2.4 foi induzido por seca, nos clones 120 e 109, mas em potenciais hídricos distintos (Figura 10). No clone 120, o gene SnRK2.4 foi induzido no potencial de -1,5 MPa, com uma redução de expressão no potencial de -3,0MPa, enquanto no clone 109, o pico de expressão foi observado no potencial hídrico mais severo (-3,0 MPa). Desta forma, observou-se que o gene SnRK2.4 apresentou uma resposta mais rápida no clone 120 quando comparado ao clone 109. Yoon et al (1997), mostraram que em soja, o gene SPK3 (similar a SnRK2.4 de *Arabidopsis*) também foi induzido por seca. Resultados similares, também foram encontrados em arroz. Em um experimento de Northern blot, Chae e colaboradores (2007) detectaram um aumento significativo na expressão de SAPK6 (similar a SnRK2.4) em condições de desidratação.

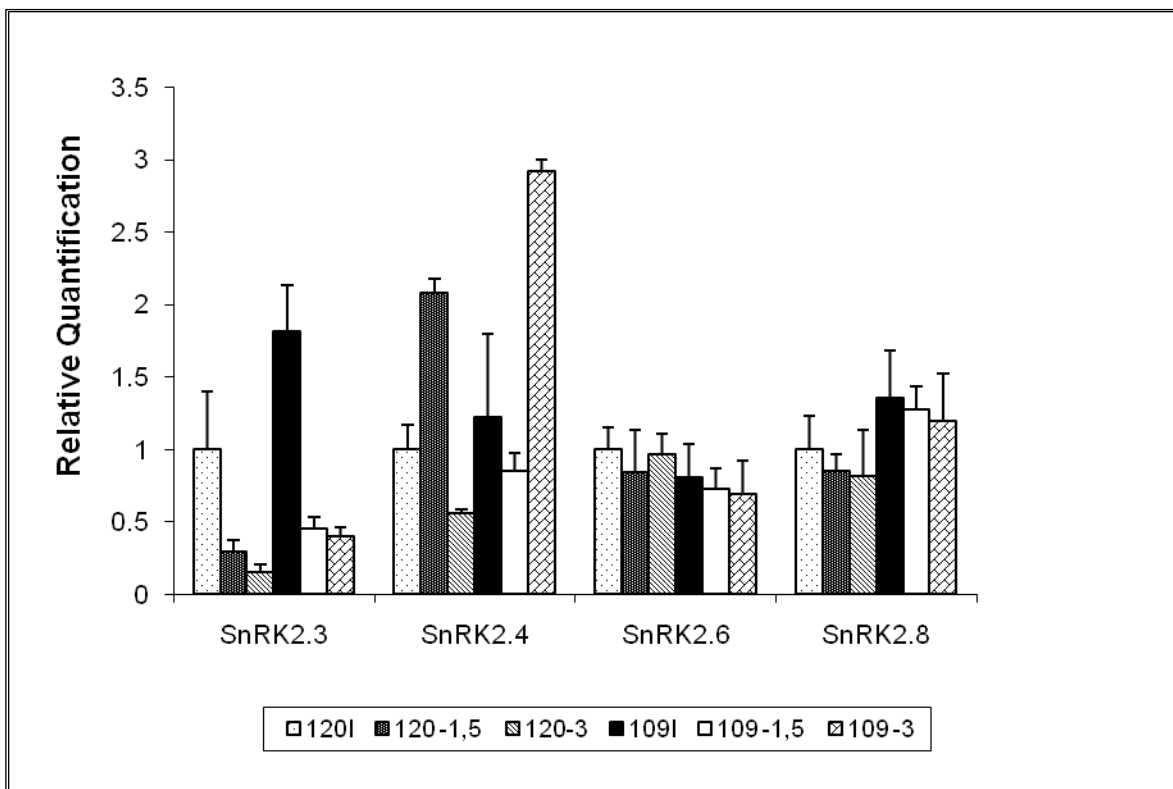
O gene SnRK2.3 apresentou uma diminuição dos níveis de transcritos a medida em que o estresse aumentava, tanto no clone 120 quanto no clone 109. Observou-se também uma maior expressão deste gene no clone 109 do que no clone 120, em condições de plena irrigação. Por outro lado, não observou-se alteração nos níveis de transcritos dos genes SnRK2.6 e SnRK2.8, em nenhum dos clones analisados (Figura 10).

Em 2004, Umezawa e colaboradores, demonstraram que a super-expressão de SnRK2.8 aumentou a tolerância à seca de plantas de *Arabidopsis* e que apenas a expressão de proteínas SnRK2.8 foi alterada em resposta à seca,



sendo a expressão do gene inalterada por esta condição de estresse. De forma semelhante, análises semi-quantitativas da expressão do gene SISnRK2C de tomate (gene homólogo a SnRK2.8 de *Arabidopsis*) em condições de seca, mostraram que a expressão deste gene não foi alterada (Yuasa et al., 2007).

Alguns estudos feitos com genes homólogos a cnSnRK2.6 em diversas espécies, mostraram que o comportamento deste gene, em condições de seca, varia dependendo da espécie. Em plantas de *Arabidopsis* submetidas a déficit hídrico, não houve alteração dos níveis de expressão do gene SnRK2.6. Por outro lado, W55a, uma proteína homóloga a SnRK2.6 de *Arabidopsis*, mostrou ser transcricionalmente induzida em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a déficit hídrico e sua super-expressão aumentou a tolerância a seca em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (Xu et al., 2009). O gene PKABA, de cevada (Gomez-Cadenas., 1999) também foi induzido em resposta à seca, enquanto seu homólogo, TaPK3 (*Triticum aestivum*), não foi induzido (Holappa et al., 1997). Estes contrastes em genes semelhantes podem indicar que, apesar de possuírem alta identidade na sequência, podem ser regulados, dependendo da espécie de planta, de forma diferente, possuindo então diferente função.



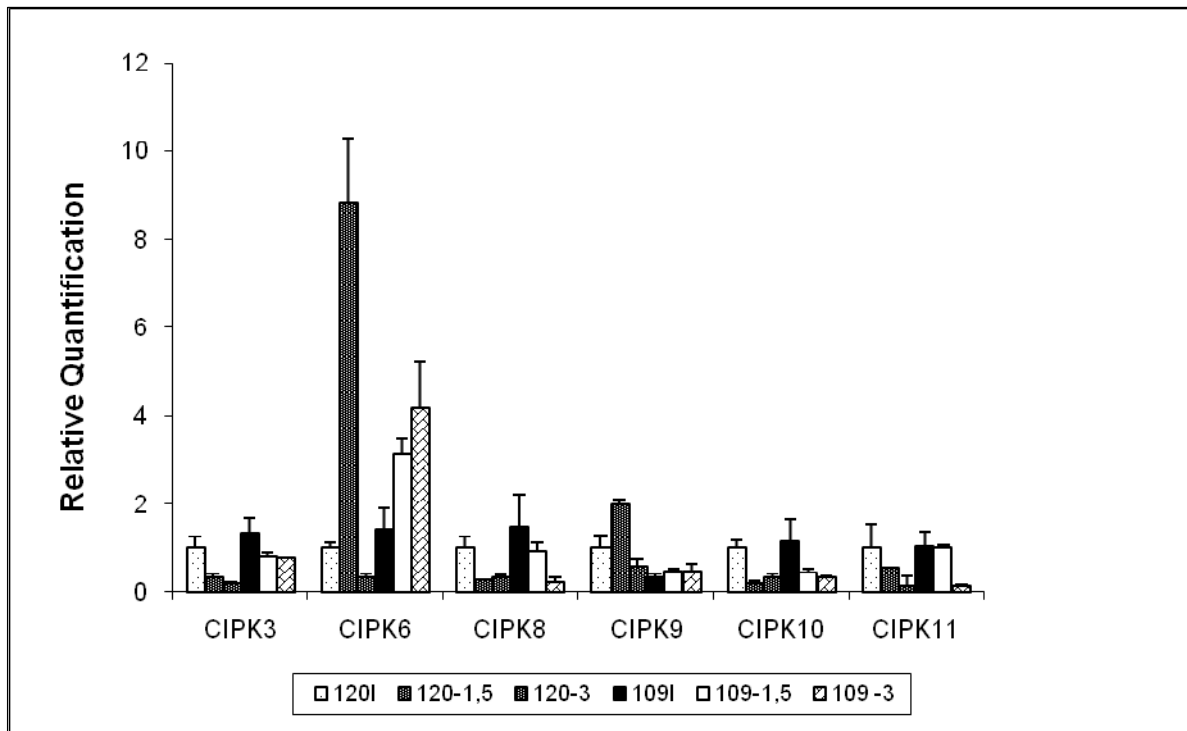
**Figura 10: Padrão de expressão dos genes pertencentes à família SnRK2, em folhas de café, em condições de seca.** O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando como controle endógeno o gene S24, e normalizado com o tratamento controle do clone 120 (sem déficit hídrico). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente e 3 réplicas manuais.

Seis genes da família SnRK3 também foram avaliados. Os genes CIPK3, CIPK8, CIPK10 e CIPK11 apresentaram uma pequena redução de expressão com o aumento dos níveis de estresse (Figura 11). Por outro lado, um significativo aumento nos níveis de transcritos foi observado no gene CIPK6 (valor de *Fold variation* de quase 10), no clone 120 (potencial de -1,5MPa) enquanto no potencial de -3,0 MPa a expressão voltou a níveis basais. No clone 109, entretanto, essa diminuição não foi observada, e o nível de expressão de CIPK6 aumentou, nos dois potenciais. Um estudo recente em plantas de grão-de-bico, demonstrou que transcritos de CIPK6 são induzidos 3 horas após desidratação e que esta indução foi mantida 24 horas após o tratamento (Tripathi et al., 2009).

Um comportamento semelhante a CIPK8 de café foi encontrado em outras espécies. Um estudo feito com CIPK8 de *Arabidopsis*, demonstrou que o mesmo

não sofreu indução nem repressão em resposta à seca (Gong et al., 2002). Um gene da família CIPK de ervilha (*Pisum sativum*), homólogo a CIPK8 de *Arabidopsis*, não sofreu alteração de expressão em resposta a desidratação (Mahajan e Tuteja., 2006). Entretanto, ao contrário do resultado obtido para o gene CIPK3 em folhas de café, Kim e colaboradores (2003), demonstraram que os níveis de transcritos de CIPK3, em plantas de *Arabidopsis*, foram fortemente induzidos em resposta à seca.

Interessantemente, o gene CIPK9 mostrou um comportamento diferente entre os clones. Este gene apresentou uma indução no potencial -1,5 MPa no clone 120 (valor de *Fold variation* de 2), enquanto no clone 109, nenhuma alteração foi observada. Desta forma, o gene CIPK9 pode contribuir para uma maior tolerância à seca observada em plantas do clone 120 quando comparadas ao 109. Um estudo feito com CIPK9 de *Arabidopsis*, demonstrou que a expressão gênica de CIPK9, apesar de afetada por outros estresses abióticos, não foi afetada quando plantas de *Arabidopsis* foram submetidas ao déficit hídrico (Pandey et al., 2007).

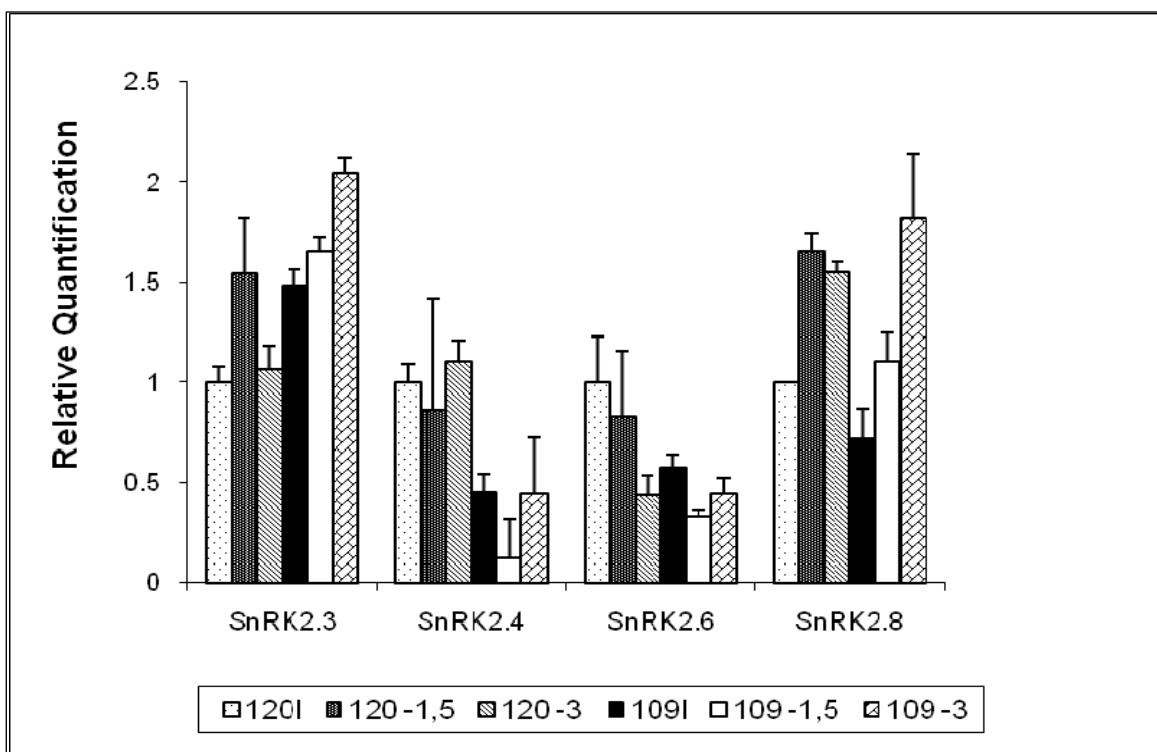


**Figura 11: Ativação de genes da família SnRK3, em folhas de café, em resposta à seca.** A expressão dos genes foi avaliada por RT-PCR em tempo real em folhas, de plantas de café submetidas a diferentes potenciais hídricos, indicados na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando como controle endógeno o gene S24, e normalizado com o tratamento controle (sem déficit hídrico). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas e 3 réplicas manuais.

A influência do sistema radicular em retardar o estabelecimento de déficits hídricos internos, pode ocorrer em função das características morfológicas do sistema radicular ou por meio de sinais bioquímicos (Wikinson e Davis, 1997). Muito pouco se sabe a respeito do comportamento de genes da família SnRK em raízes. Grande parte dos estudos feitos até o momento apenas avalia se estes genes são ou não expressos nesse órgão. De maneira geral, o comportamento dos genes SnRK observado em raízes (Figuras 12 e 13) em condições de deficiência hídrica, foi diferente daquele observado em folhas.

Diferentemente do resultado encontrado em folhas, a expressão do gene SnRK2.4 em raízes, apresentou uma diminuição de expressão no potencial de 1,5 MPa, nos 2 clones, voltando aos níveis iniciais no potencial de -3,0 MPa. O gene SnRK2.3, que teve sua expressão reduzida em folhas, apresentou um aumento

de expressão em raízes submetidas à seca. O mesmo comportamento foi observado para o gene SnRK2.8. O gene SnRK2.6 mostrou uma diminuição de expressão em raízes. O comportamento diferente entre genes da família SnRK2 em folhas e raízes de café, sugere que estes genes apresentam funções diferentes nesses dois órgãos.



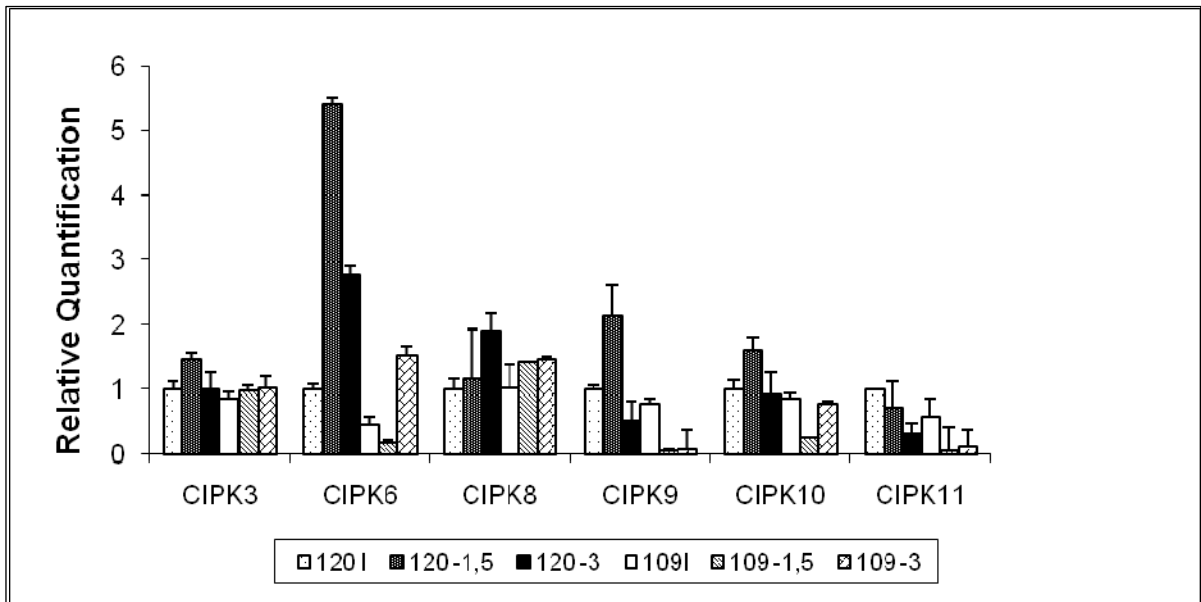
**Figura 12: Regulação da expressão de genes da família SnRK2 por estresse hídrico em raízes.** A expressão dos genes foi medida por RT-PCR em tempo real, pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando como controle endógeno o gene S24, e normalizado com o tratamento controle (sem déficit hídrico). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas e 3 réplicas manuais.

O gene CIPK6 também foi induzido em raízes (*Fold variation* de 6), com uma indução um pouco inferior ao observado em folhas (Figura 13). Observou-se também uma diferença entre os dois clones. No clone 109, em condições de plena irrigação, quase não houve detecção de transcritos de CIPK6, sendo estes níveis aumentados em condições de déficit hídrico severo, da mesma forma que

observada em folhas. Estes dados podem indicar um potencial do gene CIPK9 no mecanismo de tolerância a seca apresentado somente no clone 120. Em plantas de grão-de-bico, a expressão de CIPK6 quase não foi detectada em raízes em condições normais. Entretanto, um significativo aumento foi observado em condições de estresse hídrico, indicando uma função específica desse gene em raízes durante o estresse (Tripathi et al., 2009).

Os genes CIPK10 e CIPK8 não apresentaram alterações significativas em resposta à seca. O gene CIPK9 apresentou um aumento de expressão no clone 120 (potencial -1,5MPa). Por outro lado, a expressão quase não foi detectada em plantas submetidas à seca no clone 109. Desta forma, o gene CIPK9 pode também estar envolvido em alguma resposta de tolerância à seca em clones 120, ausente em clones 109. O gene CIPK11, também apresentou um menor nível de expressão em raízes de plantas do clone 109, embora não tenham respondido ao tratamento no clone 120. O gene CIPK3 apresentou em raízes, um comportamento semelhante ao observado em folhas.

É importante ressaltar que todos os genes SnRKs analisados neste estudo, apresentaram níveis basais de expressão sob condições normais de crescimento, em folhas e raízes, o que demonstra que estes genes são requeridos em processos normais de desenvolvimento das plantas de café.



**Figura 13: Expressão de genes SnRK3, em raízes de café submetidas à déficit hídrico.** A expressão dos genes foi medida por RT-PCR em tempo real, pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando como controle endógeno o gene S24, e normalizado com o tratamento controle (sem déficit hídrico) do clone 120. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente e 3 réplicas manuais.

Em geral, pode-se concluir que genes de maior identidade entre espécies diferentes podem ser regulados diferentemente, possuindo diferentes funções. Da mesma forma podemos observar que a maior parte dos genes apresentou um padrão de expressão diferente entre raízes e folhas. Entretanto, os genes CIPK6 e CIPK9 se destacaram, pois apresentaram aumento significativo tanto em folhas como em raízes, e de forma especial no clone tolerante, indicando seu potencial envolvimento no papel de tolerância à seca neste estresse.

#### 4.5 Expressão de genes da família SnRK2 e SnRK3 em resposta a ABA, estresse osmótico e estresse salino

Para avaliar o efeito de ABA, estresse osmótico e estresse salino na indução de genes da família SnRK2 e SnRK3, foi realizado um experimento com folhas destacadas de plantas do clone 120 e 109, e a expressão dos genes avaliadas por RT-PCR em tempo real. Os parâmetros fisiológicos como

fotossíntese ( $A$ ), transpiração ( $E$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ), foram medidos em intervalos de 1 hora, durante quatro horas, para avaliar o efeito dos tratamentos nesses parâmetros e a eficácia do experimento.

Analisando-se  $g_s$  foi possível observar uma redução significativa em folhas tratadas com ABA e manitol (Tabela 2). A resposta ao tratamento com ABA, porém, foi mais rápida em relação ao tratamento com manitol. Em folhas destacadas colocadas em solução salina, entretanto, não observou-se alteração de  $g_s$ . O tratamento controle, como esperado, manteve a condutância inalterada após 4 horas.

As taxas transpiratórias ( $E$ ) seguiram padrão semelhante aos observados para  $g_s$  (Tabela 3). Visto que o fechamento estomático acarreta decréscimos proporcionalmente maiores à transpiração que à fotossíntese, a redução na taxa fotossintética observada foi um pouco menor do que a observada para a transpiração (Tabela 4). Como se tratou de um experimento rápido, a inibição fotossintética deve ter sido ocasionada principalmente devido ao fechamento dos estômatos, mais do que por uma inibição não-estomática da fotossíntese, determinada possivelmente pelo comprometimento da regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato e também por um decréscimo na atividade de carboxilação dessa enzima (Da Matta et al., 2002), uma vez que estas respostas são observadas e se intensificam com um período maior de estresse.

Desta forma, o experimento feito com folhas destacadas se mostrou um sistema experimental rápido e eficiente para estudos em plantas de café.



Tabela 2: Determinação da Condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em folhas destacadas de café ao longo do tempo, tratadas com ABA, NaCl e manitol, em triplicata biológica.

| Tratamentos  | 1 hora                    | 2 horas                    | 3 horas                    | 4 horas                    |
|--------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Controle 120 | 0,074±0,0150 <sup>B</sup> | 0,087±0,0305 <sup>AB</sup> | 0,090±0,0233 <sup>A</sup>  | 0,082±0,0051 <sup>B</sup>  |
| Controle 109 | 0,101±0,0150 <sup>A</sup> | 0,091±0,0462 <sup>B</sup>  | 0,077±0,0057 <sup>B</sup>  | 0,076±0,0189 <sup>B</sup>  |
| Manitol 120  | 0,076±0,0214 <sup>B</sup> | 0,098±0,0287 <sup>A</sup>  | 0,070±0,0264 <sup>B</sup>  | 0,013±0,0152 <sup>C</sup>  |
| Manitol 109  | 0,101±0,0145 <sup>A</sup> | 0,087±0,0497 <sup>B</sup>  | 0,071±0,0529 <sup>C</sup>  | 0,020±0,0173 <sup>D</sup>  |
| NaCl 120     | 0,101±0,0394 <sup>B</sup> | 0,116±0,0252 <sup>A</sup>  | 0,107±0,0145 <sup>AB</sup> | 0,088±0,0203 <sup>B</sup>  |
| NaCl109      | 0,078±0,0353 <sup>C</sup> | 0,108±0,0327 <sup>AB</sup> | 0,120±0,0233 <sup>A</sup>  | 0,103±0,0100 <sup>AB</sup> |
| ABA 120      | 0,099±0,0164 <sup>B</sup> | 0,114±0,0050 <sup>A</sup>  | 0,008±0,0069 <sup>C</sup>  | 0,010±0,0100 <sup>C</sup>  |
| ABA 109      | 0,072±0,0077 <sup>B</sup> | 0,101±0,0342 <sup>A</sup>  | 0,010±0,0121 <sup>C</sup>  | 0,001±0,0019 <sup>D</sup>  |

Valores representam média ± desvio padrão. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas significativas ao longo do tempo ao longo do tempo, de acordo com ANOVA simples com separação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3: Determinação da taxa transpiratória ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em folhas destacadas de café ao longo do tempo, tratadas com ABA, NaCl e manitol. As medições foram feitas em 3 folhas de 3 plantas distintas.

| Tratamentos  | 1 hora                     | 2 horas                   | 3 horas                   | 4 horas                    |
|--------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Controle 120 | 0,893±0,1854 <sup>C</sup>  | 0,981±0,1560 <sup>B</sup> | 1,056±0,2262 <sup>B</sup> | 1,199±0,1335 <sup>A</sup>  |
| Controle 109 | 1,102±0,0356 <sup>A</sup>  | 0,908±0,3920 <sup>B</sup> | 0,904±0,0667 <sup>B</sup> | 0,808±0,4150 <sup>BC</sup> |
| Manitol 120  | 0,951±0,1650 <sup>AB</sup> | 1,111±0,0365 <sup>A</sup> | 0,888±0,1783 <sup>B</sup> | 0,280±0,2469 <sup>C</sup>  |
| Manitol 109  | 0,862±0,1253 <sup>AB</sup> | 1,151±0,0442 <sup>A</sup> | 0,800±0,2357 <sup>B</sup> | 0,354±0,0047 <sup>C</sup>  |
| NaCl 120     | 1,004±0,2902 <sup>B</sup>  | 1,250±0,0173 <sup>A</sup> | 1,217±0,1357 <sup>A</sup> | 1,048±0,4104 <sup>B</sup>  |
| NaCl109      | 1,030±0,4330 <sup>B</sup>  | 1,001±0,2234 <sup>B</sup> | 1,257±0,2043 <sup>A</sup> | 1,314±0,0474 <sup>A</sup>  |
| ABA 120      | 1,086±0,1494 <sup>A</sup>  | 1,092±0,0397 <sup>A</sup> | 0,140±0,0568 <sup>C</sup> | 0,202±0,1266 <sup>B</sup>  |
| ABA 109      | 0,893±0,1186 <sup>AB</sup> | 0,963±0,2861 <sup>A</sup> | 0,152±0,0832 <sup>C</sup> | 0,044±0,0625 <sup>D</sup>  |

Valores representam média ± desvio padrão. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas significativas ao longo do tempo ao longo do tempo, de acordo com ANOVA simples com separação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4: Determinação da Fotossíntese líquida ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em folhas destacadas de café ao longo do tempo, tratadas com ABA, NaCl e manitol (M), do clone 120 e 109.

| Tratamentos  | 1 hora                     | 2 horas                    | 3 horas                    | 4 horas                    |
|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Controle 120 | 6,036±2,4160 <sup>C</sup>  | 8,316±0,8976 <sup>BC</sup> | 9,107±0,4932 <sup>A</sup>  | 8,417±0,3748 <sup>B</sup>  |
| Controle 109 | 7,612±0,9273 <sup>A</sup>  | 6,929±3,7186 <sup>B</sup>  | 6,609±2,3473 <sup>C</sup>  | 6,704±3,3291 <sup>BC</sup> |
| Manitol 120  | 5,483±1,6508 <sup>C</sup>  | 6,356±1,9466 <sup>B</sup>  | 7,493±1,5820 <sup>A</sup>  | 2,742±2,3164 <sup>D</sup>  |
| Manitol 109  | 3,936±0,8698 <sup>C</sup>  | 5,921±3,4537 <sup>B</sup>  | 6,900±3,6304 <sup>A</sup>  | 3,370±2,1544 <sup>C</sup>  |
| NaCl 120     | 7,011±1,5742 <sup>BC</sup> | 7,856±1,7248 <sup>B</sup>  | 8,406±2,2533 <sup>A</sup>  | 6,674±2,7873 <sup>C</sup>  |
| NaCl109      | 5,397±2,3367 <sup>D</sup>  | 6,647±1,9403 <sup>C</sup>  | 10,004±0,8498 <sup>A</sup> | 8,046±1,4030 <sup>B</sup>  |
| ABA 120      | 8,682±0,6511 <sup>A</sup>  | 7,264±0,8461 <sup>B</sup>  | 1,951±0,6104 <sup>C</sup>  | 1,720±1,0974 <sup>C</sup>  |
| ABA 109      | 6,179±1,9737 <sup>A</sup>  | 6,523±1,7819 <sup>A</sup>  | 1,404±0,6565 <sup>B</sup>  | 1,006±0,5267 <sup>BC</sup> |

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas significativas ao longo do tempo ao longo do tempo, de acordo com ANOVA simples com separação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estresses ambientais como seca, frio e salinidade acabam gerando estresse osmótico nas plantas, levando a uma alteração da homeostase iônica, promovendo danos oxidativos e inibição do crescimento. O entendimento de como as plantas respondem a esses estresses é crítico para aumentar a resistência das mesmas. Recentes estudos bioquímicos e genéticos demonstraram que genes da família SnRK apresentam um importante papel na sinalização a estresse osmótico em plantas superiores (Boudsocq e Lauriere., 2005). Assim, com a finalidade de avaliar se os genes da família SnRK são induzidos por estresse osmótico em café, folhas destacadas de plantas do clone 120 foram colocadas em solução de manitol, por quatro horas e a expressão dos genes avaliadas por RT-PCR em Tempo Real (Figuras 14 e 15). O tratamento com manitol induziu fortemente a expressão dos genes SnRK2.3, SnRK2.4, SnRK2.6 e SnRK2.8 (valores de *Fold Variation* de 13, 24, 10 e 6, respectivamente). Como observado na figura 15, alguns genes da família SnRK3 também responderam ao tratamento com manitol. Os genes CIPK3, CIPK11 e CIPK6 foram fortemente induzidos (valores de *Fold variation* de 7, 50 e 6, respectivamente). Em contraste, alguns genes da família SnRK3, como CIPK8, CIPK9 e CIPK10, foram fracamente ou não foram

induzidos, mostrando que estes genes, provavelmente, não estão envolvidos na resposta a estresse osmótico. Observa-se que alguns genes analisados não são induzidos por estresse hídrico e são induzidos por estresse osmótico. Talvez, em condições de seca, os genes apresentem uma expressão transitória que seria visualizada apenas nos períodos iniciais do estresse.

Uma vez que alguns genes da família SnRK são induzidos por estresse osmótico e hídrico, foi de interesse avaliar se essa regulação é dependente de vias de sinalização dependentes do hormônio ácido abscísico (ABA), que está envolvido na resposta das plantas a diversos estresses abióticos. O tratamento em folhas destacadas com ABA, assim como o tratamento com manitol, induziu os quatro genes da família SnRK2 analisados neste estudo, sugerindo que a resposta desses genes a estresse osmótico, é dependente de ABA (Figura 14). Uma resposta a ABA também foi verificada em genes da família SnRK3 (Figura 15). O gene CIPK11 que apresentou uma forte indução na presença de manitol, também apresentou uma resposta de mesma magnitude em resposta a ABA, o que demonstra que, possivelmente, a resposta a estresse osmótico deste gene também é dependente de ABA. O mesmo pode ser verificado para o gene CIPK3. O gene CIPK6, que foi fortemente induzido por estresse hídrico e manitol, também foi induzido por ABA, o que sugere que sua resposta a estresses abióticos também é dependente de ABA. Por outro lado, o gene CIPK10 não sofreu alteração a nenhum dos tratamentos aplicados.

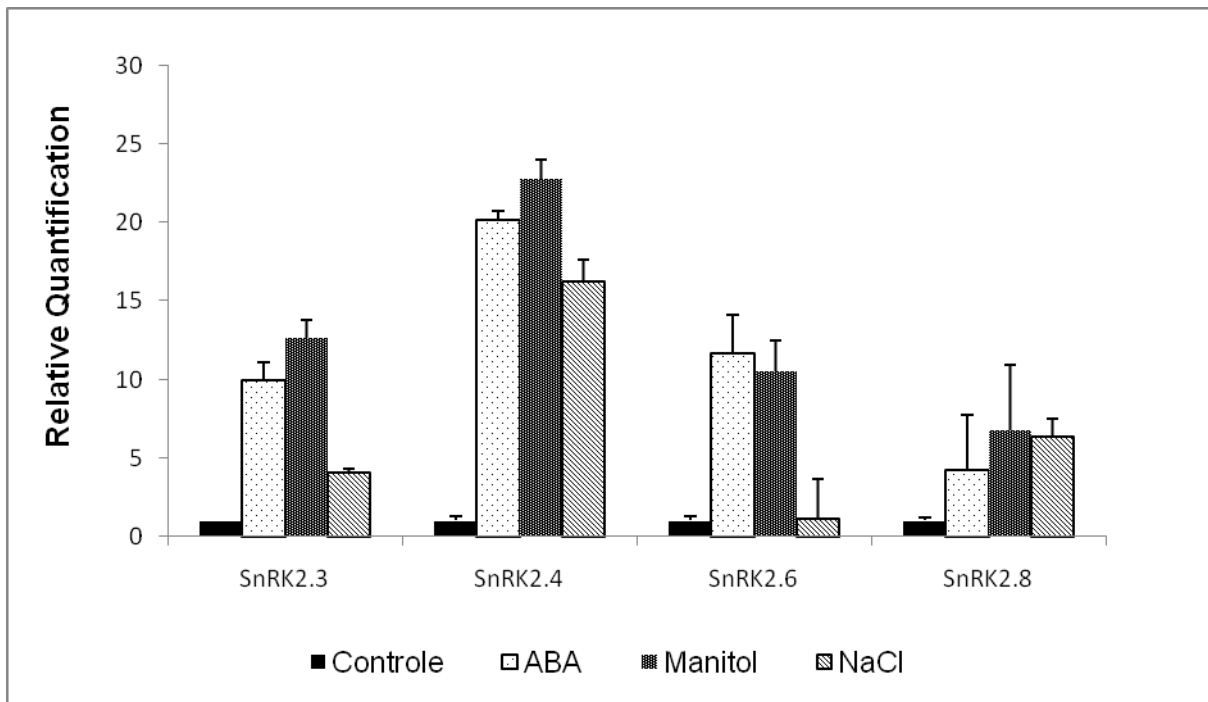
Também foi verificada a indução de alguns genes dessa família por estresse salino, onde as folhas destacadas foram colocadas por 4 horas em solução de NaCl 150 mM. A análise de expressão por RT-PCR em Tempo Real revelou que os genes SnRK2.3, SnRK2.4 e SnRK2.8 foram fortemente induzidos por estresse salino (Figura 14). O gene SnRK2.6, por outro lado, não foi induzido por este tratamento. Observou-se que dos genes avaliados pertencentes à família SnRK3, o gene CIPK6 e CIPK10 não responderam ao tratamento com NaCl, e o gene CIPK8 e CIPK9 foram levemente induzidos por esta condição. Os genes CIPK3 e CIPK11, por outro lado, sofreram uma forte indução em resposta ao estresse salino aplicado em folhas de café (Figura 15).

Kobayashi e colaboradores (2004), avaliaram, em arroz, o efeito de todos os genes da família SnRK2 em resposta a ABA, NaCl e manitol. O gene SAPK1

(homólogo a SnRK2.8) mostrou ser induzido por todos os tratamentos, sendo que dos 3 tratamentos o ABA foi o menos eficiente. O gene SAPK3 (homólogo a SnRK2.6) foi induzido apenas por ABA e não pelos outros tratamentos. SAPK4, homólogo a SnRK2.4, foi induzido por ABA e NaCl, enquanto SAPK8, homólogo a SnRK2.3, sofreu uma diminuição dos níveis de transcritos em resposta a manitol.

Em 2002, foi demonstrado que a atividade de SnRK2.6 de *Arabidopsis* é estimulada por ABA mas sua expressão gênica não é regulada por este hormônio (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). Outras SnRK2s, homólogas a SnRK2.6, como PKABA de trigo (*Triticum aestivum*; Anderberg e Walker-Simmons, 1992) e REK de arroz (Hotta et al., 1998), ao contrário de SnRK2.6 de *Arabidopsis*, foram transcricionalmente induzidas por ABA. Assim, foi demonstrado neste trabalho, que SnRK2.6 de café, não apresenta indução, nos momentos em que foram avaliados, em condições de seca, mas é transcricionalmente induzida por ABA e manitol. Este contraste pode sugerir que este gene possa também ser importante na resposta, e que as alterações sejam precoces e transitórias.

Efeitos de vários estresses ambientais nos níveis dos transcritos de SISRK2C de tomate (homólogo a cnSnRK2.8) foram analisados. Nenhuma, ou pouca alteração foi observada quando as plantas foram submetidas a tratamento com ABA, NaCl e seca. Assim, parece que o gene SISRK2C é constitutivamente expresso sob estes tratamentos (Yuasa et al., 2007). Em soja, SPK3 e SPK4 foram transcricionalmente induzidas por seca e estresse salino, enquanto apenas SPK1 e SPK2 foram ativadas por estresse salino em leveduras. De forma semelhante ao encontrado em café, a expressão do gene ZmSPK1, homólogo ao gene SnRK2.4 de *Arabidopsis*, foi induzida por ABA, NaCl e manitol (Zou et al., 2006).



**Figura 14: Ativação de genes SnRK2 em resposta a ABA, estresse osmótico e estresse salino.** Foi medida a expressão de genes SnRK2 por RT-PCR em tempo real, em folhas destacadas tratadas com ABA, Manitol e NaCl, por 4 horas. O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando como controle endógeno a Ubiquitina 9, e os dados foram normalizados com o tratamento controle (Tampão MES-KOH). Os cDNAs foram obtidos a partir de um pool de 6 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente e 3 réplicas manuais.

A indução do gene CIPK6, em plantas de grão-de-bico foi detectada dentro de 30 min após o tratamento com NaCl e ABA, alcançando um nível máximo em 1 hora e declinando a níveis basais depois de 24h. Experimentos feitos de super-expressão deste gene e de mutantes que não expressavam este gene, sugerem que o gene CIPK6 apresenta um importante papel na tolerância à estresses abióticos, e em adição, CIPK6 tem participação no transporte de auxinas e no desenvolvimento de raízes (Tripathi et al., 2009).

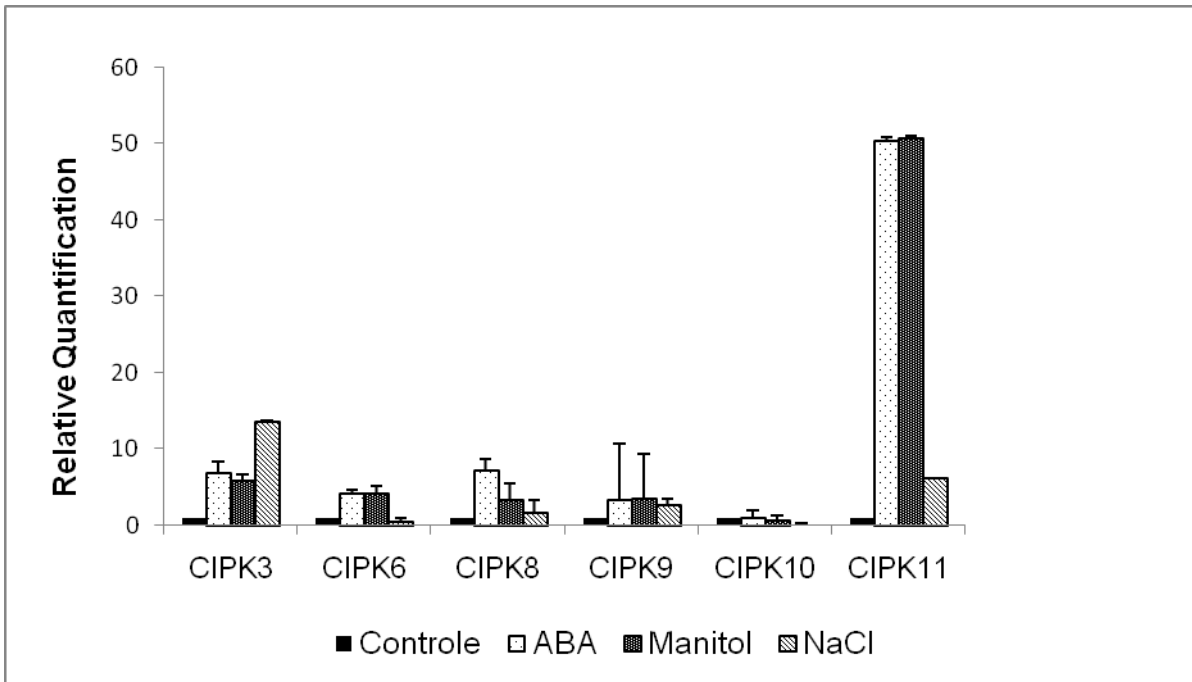
Em 2002, um estudo feito com o gene CIPK8 (também chamado de PKS11) de *Arabidopsis*, demonstrou que o nível de expressão desse gene não foi afetado quando plantas de *Arabidopsis* foram tratadas com ABA, sal e seca. Em contrapartida, plantas transgênicas super-expressando CIPK8 foram mais resistentes a altos níveis de glicose sugerindo o papel dessas proteínas quinases na sinalização de açúcares em plantas (Gong et al., 2002). De forma similar ao

observado neste trabalho, o gene CIPK3 foi fortemente induzido por ABA e NaCl em plantas de *Arabidopsis* ( Kim et al., 2003).

Pandey e colaboradores (2007), demonstraram que o gene CIPK9 foi transientemente expresso em resposta a NaCl e manitol, em plantas de *Arabidopsis*. No tratamento com NaCl, os níveis de mRNA de CIPK9 aumentaram rapidamente após 1h, alcançando um pico máximo de expressão em 3h e declinando após este período. Desta forma, uma expressão maior de CIPK9 de cafeeiro poderia ser encontrada em folhas tratadas por um período menor de tempo com NaCl. Sob estresse osmótico, os níveis de transcritos de CIPK9 aumentaram rapidamente (cerca de 1h), sendo reduzidos após 24h.

A indução de alguns genes da família SnRK por estresse osmótico, ABA e estresse salino sugere que eles estejam envolvidos em respostas gerais a estresses abióticos, sendo potenciais alvos em estratégias de resistência engenheirada em plantas. Interessantemente, os genes CIPK6 e SnRK2.6 são induzidos por estresse osmótico e não por estresse salino (Figuras 14 e 15).

Quinases são importantes elementos da sinalização controlando a respostas das plantas a estresses. Genes SnRKs induzidos por estresses identificados nesse trabalho podem conferir maior tolerância a estresses em plantas de café. Estas descobertas são importantes e podem ajudar a dissecar mecanismos de resposta a estresses e as funções de genes SnRKs em cafeeiro. Entretanto, mais estudos são necessários para dissecar estes mecanismos regulatórios. O estudo da regulação de genes da família SnRK auxiliará a compreender as funções desses genes em respostas a condições adversas e poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos que podem aumentar a tolerância a estresses em cafeeiro.



**Figura 15: Ativação de genes SnRK3 em resposta a ABA, estresse osmótico e estresse salino.** Foi medida a expressão de genes SnRK3 por RT-PCR em tempo real, em folhas destacadas tratadas com ABA, Manitol e NaCl, por 4 horas. O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando como controle endógeno a Ubiquitina 9, e os dados foram normalizados com o tratamento controle (Tampão MES-KOH, 2mM). Os cDNAs foram obtidos a partir de um pool de 6 réplicas biológicas e 3 réplicas manuais.

## 5. CONCLUSÕES

- Foram identificadas sequências de genes da família SnRK no banco do café, as quais foram classificadas nas respectivas subfamílias. A partir dessas análises foi identificado o cDNA completo do gene SnRK2.6 e uma parte de sua região promotora.

- Foi possível observar uma maior expressão dos genes CIPK6 e CIPK9, no clone 120, colocando-os como candidatos a mediar a sinalização da tolerância sobre níveis mais intensos de estresse hídrico.

- Os experimentos utilizando folhas destacadas na presença de estresse salino, osmótico e ABA, demonstrou que vários genes da família SnRK2 e SnRK3 respondem a um ou mais destes estresses. Estes resultados sugerem que vários genes da família SnRK2 e 3 do café possuem importante função na sinalização ao estresse abiótico.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinosaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* 15:63-78.
- Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J** (2001) The NAF domain defines a novel Protein-protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup> regulated kinases. *The EMBO Journal* 20:1051-1063.
- Alonso J, Stepanova A** (2004) The ethylene signaling pathway. *Science* 306:1513–1515.
- Anderberg RJ, Walker-Simmons MK** (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to proteins kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:10183-10187.
- Ballester DG, Pollock SV, Pootakham W, Grossman AR** (2008) The Central Role of a SNRK2 Kinase in Sulfur Deprivation Responses. *Plant Physiology* 147:216-227.
- Belin C, Franco P, Bourbousse C, Chaignepain S, Schmitter J, Vavasseur A, Giraudat J, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2006) Identification of Features Regulating OST1 Kinase Activity and OST1 Function in Guard Cells. *Plant Physiology* 141:1316–1327.
- Blum A** (1996) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Journal of Plant Growth Regulation* 20:135–148.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG** (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099–1111.
- Bonetta D, McCourt P** (1998) Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Science* 3:231–235.

- Boudsocq M, Brygoo H, Lauriere C** (2004) Identification of Nine Sucrose Nonfermenting 1-related Protein Kinases 2 Activated by Hyperosmotic and Saline Stresses in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* 279:41758–41766.
- Bradford KJ, Downie AB, Gee OH, Alvarado V, Yang H, Dahal P** (2003) Abscisic Acid and Gibberellin Differentially Regulate Expression of Genes of the SNF1-Related Kinase Complex in Tomato Seeds. *Plant Physiology* 132:1560–1576.
- Bray EA** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Science*. 2:48–54.
- Bray E, Bailey-Serres J, Weretilnyk E** (2000) Responses to abiotic stresses in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists 1158-1203.
- Buchanan CD, Lim S, Salzman RA, Kagiampakis I, Morishige DT, Weers BD, Klein RR, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Klein PE** (2005) Sorghum bicolor's transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. *Plant Molecular Biology* 58:699–720.
- Carlson M, Osmond BC and Botstein D** (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 98:25-40.
- Celenza JL, Carlson M** (1984) Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 4:49-53.
- Chae MJ, Lee JS, Nam MH, Cho K, Hong JY, Yi SA, Suh SC, Yoon I** (2007) A rice dehydration-inducible SNF1-related protein kinase 2 phosphorylates an abscisic acid responsive element-binding factor and associates with ABA signaling. *Plant Molecular Biology* 63:151–169.
- Chaves MM** (2002) Effects of water deficits on carbon assimilation, *Journal Experimental Botany* 42:1–16.
- Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic OB, Li L, Kim B, Lee S, Kudla J, Luan S** (2007) Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 52:223–239.

- Cheng SH, Willmann MR, Chen H, Sheen J** (2002) Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiology* 129:469-485.
- Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, Colombo C, Almeida J, Barros LMG, Romano E, Grossi MF, Vaslin M, Ferreira MA** (2009) Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding* 23:607-616.
- DaMatta FM, Ramalho, JDC** (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:55-81.
- DaMatta FM, Rena AB** (2000) Tolerância do café à seca. Tecnologias de produção de café com qualidade. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 65-100.
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE** (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed Arabidopsis. *Plant Physiology* 126:759–769.
- Droillard MJ, Thibivilliers S, Cazale AC, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2000) Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: Two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Letters* 474:217–222.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14:15–S45.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK** (2007) Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19:485–494.
- Fujii H, Zhu J** (2009) Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *PNAS* 106: 8380-8385.

- Gomez-Cadenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho T-HD, Walker-Simmons MK** (1999) An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:1767-1772.
- Gong Z, Guo Y, Chen X, Zhu JK** (2002) Biochemical and Functional Characterization of PKS11, a Novel Arabidopsis Protein Kinase. *The Journal of biological chemistry* 277:28340-28350.
- Guo Y, Xiong L, Song C, Gong D, Halfter U, Zhu J** (2002) A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell* 3: 233–244.
- Halford NG, Hey SJ** (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemistry Journal* 419:247–259.
- Harper JF, Breton G, Harmon A** (2004) Decoding Ca<sup>2+</sup> signals through plant protein kinase, *Annual Review Plant Biology* 55:263–288.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review Plant Physiology* 51:463–499.
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E** (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6:470–479.
- Hirayama T, Shinozaki K** (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science* 12:343-351.
- Hong S-P, Leiper FC, Woods A, Carling D and Carlson M** (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100:8839-8843.
- Hoyos ME, Zhang S** (2000) Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiology* 122:1355–1363.

- Hrabak E, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Jung H, Halford C, Kudla J, Luan J, Nimmo HG, Sussman M, Thomas M, Zhu J, Harmon A** (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant Physiology* 132:666–680.
- Hunter T, Plowman GD** (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochemistry Science* 22:18-26.
- Ingram J, Bartel D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:377–403.
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK** (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiology* 130: 837–846.
- Kakimoto T** (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review Plant Biology* 54:605–627.
- Kelner A, Kala IP, Kaczanowski S, Muszynska G, Hardie DG, Dobrowolska G** (2004) Biochemical Characterization of the Tobacco 42-kD Protein Kinase Activated by Osmotic Stress. *Plant Physiology* 136:1–11.
- Kim K, Cheong YH, Grant J, Pandey GK, 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.
- Kobayashi Y, Murata M, Minami H, Yamamoto S, Kagaya Y, Hobo T, Akiko Yamamoto A, Hattori T** (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal* 44: 939–949.
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T** (2004) Differential Activation of the Rice Sucrose Nonfermenting1–Related Protein Kinase2 Family by Hyperosmotic Stress and Abscisic Acid. *The Plant Cell* 16:1163–1177.

- Lawlor DW, Cornic G** (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants, *Plant Cell Environment* 275–294.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004) Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16:596-615.
- Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:199–222.
- Li J, Assmann SM** (1996) An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *The Plant Cell* 8:2359-2368.
- Li J, Wang XQ, Watson, MB, Assmann SM** (2000) Regulation of Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure and Anion Channels by Guard Cell AAPK Kinase. *Science*, 287.
- Li R, Zhang J, Wei J, Wang H, Wang Y, Ma R** (2009) Functions and mechanisms of the CBL–CIPK signaling system in plant response to abiotic stress. *Progress in Natural Science* 19:667-676.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu W, Ma L** (2007) A G Protein-Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid. *Science* 315:1712-1716.
- Luan S** (2002) Signaling drought in guard cells. *Plant Cell Environment* 25:229–237.
- Mahajan S, Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139–158.
- Merlot S, Giraudat J** (1997) Genetic Analysis of Abscisic Acid Signal Transduction. *Plant Physiology* 114:751-757.

- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriác H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, Schroeder JI** (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell s-type anion- and Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and stomatal closure. *PLOS Biology* 4:1749–1762.
- Mullet JE, Whitsitt MS** (1997) Plant cellular responses to water deficit. Belhassen E. Drought tolerance in higher plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 41-46.
- Munnik T, Meijer H, Ter Riet B, Hirt H, Frank W, Bartels D** (2000) Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Journal* 49:172–178.
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J** (2002) Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *The Plant Cell* 14: 3089–3099.
- Oztur ZN, Talame V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Gozukirmizi N, Tuberosa R, Bohnert HJ** (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48:551–573.
- Pandey GK, Cheong Y, Kim B, Grant J, Li L, Luan S** (2007) CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in Arabidopsis. *Cell Research* 17:411-421.
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B** (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant Journal* 28:455-464.
- Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D, Hunter T** (1999) The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. *PNAS* 96.
- Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Nguyen HT, Sharp RE, Bohnert HJ** (2005) The maize root transcriptome by serial analysis of gene expression. *Plant Physiology* 138:1700–1710.

- Purcell PC, Smith AM, Halford NG** (1998) Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant Journal* 14:195-202.
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439:290-294.
- Rolland F, Gonzalez-Baena E and Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review Plant Biology* 57:675-709.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6:410–417.
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ** (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410:327–330.
- Shukla V, Mattoo, AK** (2008) Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (SnRK2): a family of protein kinases involved in hyperosmotic stress signaling. *Physiology Molecular Biology Plants* 14.
- Sugden C, Crawford RM, Halford NG and Hardie DG** (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5-AMP. *Plant Journal* 19:433-439.
- Taiz L, Zeiger E** (1998) *Plant physiology*. 2.ed. Sunderland, Sinauer Associates.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tardieu F, Lafarge T, Simonneau T** (1996) Stomatal control by fed or endogenous xylem ABA in sunflower: interpretation of correlations between leaf water potential and stomatal conductance in anisohydric species. *Plant, Cell and Environment* 19:75–84.



- Thomashow MF** (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* 125:89–93.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Tripathi V, Parasuraman B, Laxmi A, Chattopadhyay D** (2009) CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. *The Plant Journal* 58:778-790.
- Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2004) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 101: 17306–17311.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal controlgenes. *Genome Biology* 3.
- Wasilewsk A, Via F, Sirichandr C, Redko Y, Valon C, Frey dit Frey N, Leung J** (2008) An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More . . . *Molecular Plant* 198–217.
- Xiong L, Zhu J** (2003) Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* 133:29–36.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK** (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14:165–183.
- Yanagisawa S, Schmidt RJ** (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of DOF transcription factors. *Plant Journal* 17:209-214.
- Yoon HW, Kim MC, Shin PG, Kim JS, Kim CY, Lee SY, Hwang I, Bahk JD, Hong JC, Han C, Cho MJ** (1997) Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Molecular Genetics and Genomics* 255:359-371.

- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K** (2002) ABA-Activated SnRK2 Protein Kinase is Required for Dehydration Stress Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* 43:1473–1483.
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K** (2005) The Regulatory Domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 Interacts with ABI1 and Integrates Abscisic Acid (ABA) and Osmotic Stress Signals Controlling Stomatal Closure in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* 281:5310–5318.
- Yuasa T, Tomikubo Y, Yamauchi T, Inoue A, Iwaya-Inoue M** (2007) Environmental stresses activate a tomato SNF1-related protein kinase 2 homolog, SISnRK2C. *Plant Biotechnology* 24: 401–408.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review Plant Biology* 57:781–803.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10:88–94.
- Zeevaart JD, Creelman RA** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 39:439–473.
- Zhang DP, Wu Z, Li X, Zhao Z** (2002) Purification and Identification of a 42-Kilodalton Abscisic Acid-Specific-Binding Protein from Epidermis of Broad Bean Leaves. *Plant Physiology* 128:714–725.
- Zhao J, Sun Z, Zheng J, Guo X, Dong Z, Huai J, Gou M, He J, Jin Y, Wang J, Wang G** (2009) Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize. *Plant Molecular Biology* 69:661–674.
- Zhizhong DG, Guo Y, Chen X, Zhu JK** (2002) Biochemical and Functional Characterization of PKS11, a Novel Arabidopsis Protein Kinase. *The journal of biological chemistry* 277:28340–28350.

**Zou H, Zhang X, Zhao J, Yang Q, Wu Z, Wang F, Huang C** (2006) Cloning and characterization of maize ZmSPK1, a homologue to nonfermenting1-related protein kinase 2. *African Journal of Biotechnology* 5:490-496.