

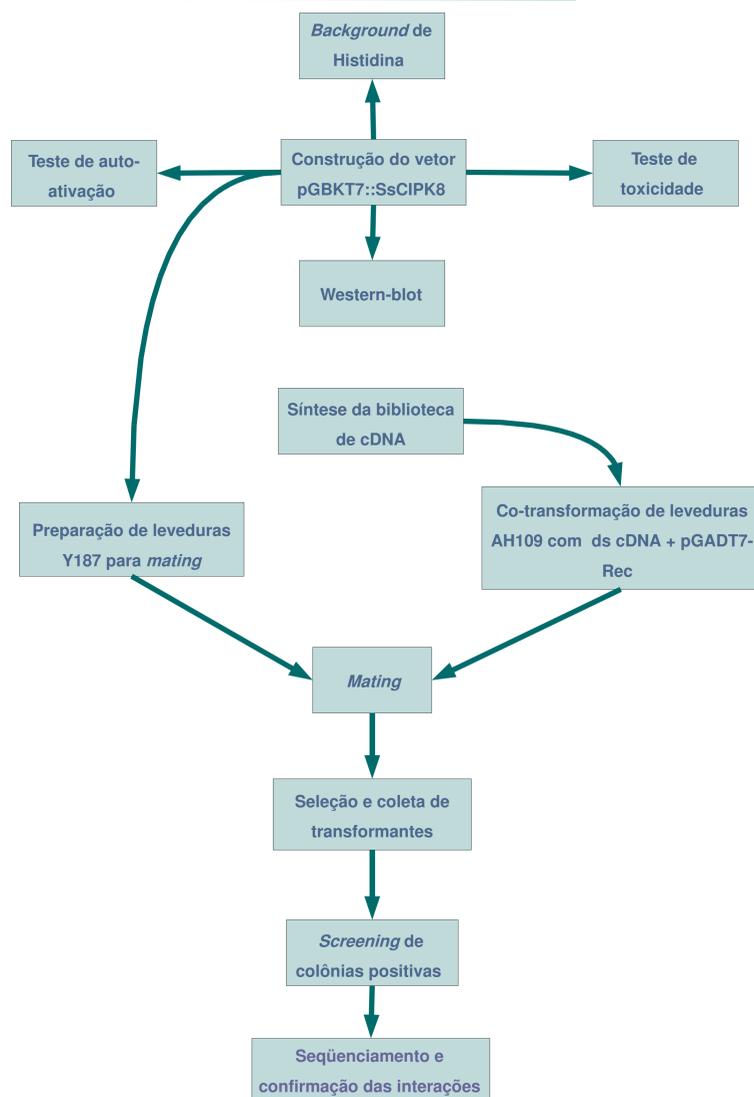
Introdução

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies vegetais cultiváveis do mundo, sendo o Brasil o principal produtor. A importância mundial desta planta tem aumentado e tem sido investido muito na obtenção de variedades de cana-de-açúcar com maiores teores de sacarose.

O presente trabalho visou identificar novos alvos de interação da proteína SsCIPK8 de cana-de-açúcar, pertencente à família das proteínas relacionadas às clássicas SNF1 de leveduras envolvidas no metabolismo de carboidratos (1). O gene que codifica para a SsCIPK8 é mais expresso em folhas de plantas com baixo teor de açúcar e é induzido pela aplicação exógena de ácido abscísico (ABA). Este gene possui grande similaridade ao AtCIPK3 de *Arabidopsis*, o qual regula a resposta ao ABA durante a germinação e modula a expressão gênica induzida por estresse causado por frio, sal e ABA exógeno, sendo também induzida por fermento e seca (2).

Na tentativa de identificar o papel da proteína SsCIPK8 no metabolismo de carboidratos e na regulação por ABA tentamos identificar novos alvos de interação desta proteína utilizando a técnica do duplo-híbrido em leveduras. Para tal, foi utilizada uma biblioteca de cDNA sintetizada a partir de folhas maduras de plantas F1 de alto teor de sacarose. A identificação de alvos de interação está em andamento.

Material e Métodos



Resultados e Discussão

1. Teste de auto-ativação

Tabela 1. Teste de auto-ativação das leveduras das linhagens AH109 e Y187. Controle positivo: Leveduras diplóides contendo o gene da proteína p53 fusionada ao pGBKT7 e leveduras da linhagem Y187 contendo o gene da proteína SV40 large T-antigen fusionada ao plasmídeo pGADT7-Rec.

Placa	Plasmídeo	AH109	Y109	Controle Positivo
SD/-His	pGBKT7	Ausentes	Ausentes	-
SD/-His	pGBKT7::SsCIPK8	Ausentes	Ausentes	-
SD/-Trp	pGBKT7	Presentes/Branças	Presentes/Branças	-
SD/-Trp	pGBKT7::SsCIPK8	Presentes/Branças	Presentes/Branças	-
SD/-Trp/-His	pGBKT7	Ausentes	Ausentes	Presentes/Azuis
SD/-Trp/-His	pGBKT7::SsCIPK8	Ausentes	Ausentes	-
SD/-Trp/-Ade	pGBKT7	Ausentes	Ausentes	Presentes/Azuis
SD/-Trp/-Ade	pGBKT7::SsCIPK8	Ausentes	Ausentes	-

2. Teste de toxicidade

Tabela 2. Densidade ótica após 48 horas de crescimento a 30°C em meio SD/-Trp contendo 1g de Kanamicina.

Meio- construção	OD
Y187 - pGBKT7	0,975
Y187 - pGBKT7::SsCIPK8	0,656

3. Background de Histidina

Tabela 3. Determinação da menor concentração de 3AT a ser utilizada nas placas deficientes em histidina.

Concentração de 3AT	Número de colônias
0 mM	2 colônias
2,5 mM	0
5,0 mM	0
7,5 mM	0
10,0 mM	0
12,5 mM	0
15,0 mM	0

4. Western-blot

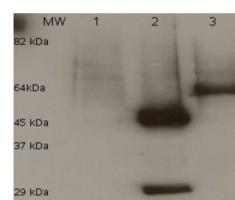


Figura 1. Detecção da expressão da proteína SsCIPK8 por Western-blot usando anticorpo anti c-Myc. (1) controle negativo, (2) controle positivo e (3) Leveduras Y187 transformadas com o plasmídeo SsCipk8::pGBKT7.

5. Síntese da biblioteca de cDNA

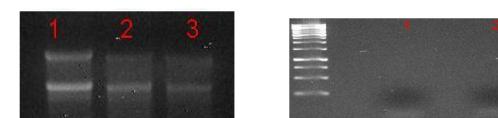


Figura 2. Integridade do RNA utilizado para a síntese da biblioteca de cDNA. (1) Entrenó 7, (2) entrenó 9 e (3) entrenó 11.

Figura 3. Síntese da biblioteca de cDNA. A falta de um smear indica erro na síntese da primeira fita.

Inicialmente verificamos que a proteína SsCipk8 não ativa por si só os genes repórteres do sistema, não é tóxica e determinamos a menor concentração de 3 AT capaz de eliminar algum vazamento na expressão da proteína HIS3.

Não conseguimos sintetizar a biblioteca de cDNA a partir dos entrenós de cana. A razão não foi degradação do RNA, como mostra a figura 2. Uma razão poderia ser que os altos níveis de polissacarídeos deste tecido possam ter atrapalhado a reação da síntese da biblioteca. Para evitar isso, tentaremos adicionar uma etapa de purificação do RNA ao final da sua extração. Uma alternativa empregada foi utilização de uma biblioteca de folhas previamente sintetizada. Porém não conseguimos identificar nenhum alvo de interação. Uma explicação pode ter sido a baixa eficiência do *mating*, o que pode acarretar em uma baixa amostragem de genes testados para a interação. Novos estudos estão em andamento.

Referências Bibliográficas

- Halford NG, Hardie DG. 1998. *Plant Molecular Biology* 37(5): 735-748.
- Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S. 2003. *The Plant Cell* 15:411-423.

Apoio