GUSTAVO TURQUETO DUARTE

"Avaliação da importância do controle da estabilidade de RNAm na sinalização por glicose e ABA e na interação desses sinais em

Arabidopsis thaliana"

CAMPINAS 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA



GUSTAVO TURQUETO DUARTE

"Avaliação da importância do controle da estabilidade de RNAm na

sinalização por glicose e ABA e na interação desses sinais em

Arabidopsis thaliana"

Este exemplar corresponde à reclação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) 1 sater Dugite Unistano e aproveda pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

CAMPINAS, 2012 FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Duarte, Gustavo Turqueto, 1982-Avaliação da importância do controle da estabilidade de RNAm na sinalização por glicose e ABA e na interação desses sinais em *Arabidopsis thaliana /* Gustavo Turqueto Duarte. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Michel Georges Albert Vincentz. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Regulação pós-transcricional. 2. Glicose. 3. Ácido abscísico. 4. *Arabidopsis thaliana*. 5. RNA mensageiro - Estabilidade. I. Vincentz, Michel Georges Albert, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of the importance of mRNA stability control in glucose and ABA-signaling and in the interaction of these signals in *Arabidopsis thaliana* **Palavras-chave em Inglês**: Post-transcriptional control Glucose Abscisic acid *Arabidopsis thaliana* Messenger RNA - Stability

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Michel Georges Albert Vincentz [Orientador] Anete Pereira de Souza

Camila Caldana

Jörg Kobarg

Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Data da defesa: 29-08-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz (Orientador)

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Dra. Camila Caldana

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo

Assinatura Assinatura

4.1

Assinatura



Assinatura

Assinatura

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Avaliação da importância do controle da estabilidade de RNAm na sinalização por glicose e ABA e na interação desses sinais em *Arabidopsis thaliana*":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(x) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2003/01, Instituição: Instituto de Biologia – Unicamp.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. ______, Instituição:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Aluno: Gustavo Turdueto Duarte

Orientador: Michel Georges Albert Vincentz

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI Presidente da Comissão Interna de Biosseguran Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para minha avó, Da. Apparecida, Exemplo de vida, e sempre à frente de sua época.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Michel Vincentz, pela oportunidade e orientação.

Aos doutores Paulo Mazzafera e Henrique Marques-Souza, pelas sugestões em minha Banca Prévia.

Aos membros titulares e suplentes de minha Banca de Defesa, Dra. Anete Pereira de Souza, Dra. Camila Caldana, Dr. Jörg Kobarg, Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira, Dr. Marcelo Carnier Dornelas, Dra. Maria Helena de Souza Goldman e Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo.

Aos colegas de trabalho do CBMEG e Lab. de Genética Molecular de Plantas. Em especial à Amanda Bortolini, Américo Viana, Cleverson Matiolli, Luiz Eduardo Del Bem, Raphael Ricon e Dr. Renato Vicentini pelas colaborações e discussões (não necessariamente científicas, mas produtivas).

Aos doutores Jean-Pierre Renou e Mark Stitt pelas colaborações e por me acolherem no Genopole em Evry e no Max Planck em Potsdam, respectivamente. Pelo apoio e hospitalidade, aos colegas de trabalho da França, Sandra Pelletier, Delphine Gey, Samuel Mainguet e Richard Berthomé; e da Alemanha, Marina Martins, Maximilian Fünfgeld, Hirofumi Ishihara, Manuela Günther, Prashant Pandey, Umesh Yadav, Regina Feil, Armin Schlereth, Bikram Datt Pant, e John Lunn.

À Sandra Scarano, Tania Zambom, Sandra Martins e ao Eliseu Barbosa pelo apoio técnico/logístico.

Aos meus familiares, meu irmão Rafael, e meus pais, Haydée e Sebastião, que acompanharam toda a trajetória e sempre com apoio incondicional.

À Tamara Aluani, minha companheira, pela força nos momentos mais difíceis.

Aos amigos da Bio-01 e aos amigos da terrinha, Zé Du, Leandro, Victor, Galeoti, Matheus, Maria Clara, Eduardo, Zanini, Thais, Felp's, Nathália, Abreu e Taís.

À Arabidopsis thaliana, Coffea arabica e Hordeum vulgare.

À FAPESP e Unicamp, por tornarem esse trabalho possível.

RESUMO

As plantas, sendo organismos sésseis, desenvolveram um conjunto de mecanismos que possibilitam a adaptação a condições ambientais adversas visando à manutenção da homeostase energética para o desenvolvimento e propagação. Tais respostas valem-se da integração entre a biossíntese de hormônios, ativação de vias gênicas de resposta a estresse e um balanço adequado do uso da energia disponível. Os açúcares, além de serem fontes de carbono e energia, também atuam como moléculas sinalizadoras podendo agir conjuntamente com sinais hormonais na adaptação a estresses bióticos e abióticos e no controle do desenvolvimento. Nesse contexto, diversos estudos apontam para uma importante relação entre o ácido abscísico (ABA), um dos principais hormônios relacionados à resposta a estresses, e a glicose. A sinalização por ABA, além de atuar sobre a regulação da transcrição, é conhecida por envolver fatores de controle de estabilidade do RNAm. Contudo, a participação destes mecanismos em respostas mediadas por glicose ainda é pouco explorada. Num primeiro momento, o presente trabalho visou avaliar o potencial das participações de regulações pós-transcricionais em resposta a ABA e glicose em Arabidopsis thaliana, através da determinação do perfil de expressão de RNAm após a inibição da transcrição. Um modelo experimental com condições de inibição de transcrição otimizadas foi estabelecido e utilizado para análise de transcriptoma por microarranjos CATMA em resposta à glicose e ABA. Um total de 962 genes foi identificado como diferencialmente expresso após os tratamentos, sugerindo uma possível regulação pós-transcricional por glicose sobre 204 transcritos, por ABA sobre 245 e pela combinação dos dois sinais sobre 513 transcritos. Esses genes foram classificados de acordo com o Gene Ontology, sugerindo uma relação importante com respostas adaptativas a condições de estresse. Aparentemente, as respostas mediadas por glicose e ABA seguem estratégias opostas, sendo que as respostas pós-transcricionais por ABA podem também atuar como um mecanismo rápido de retro-regulação negativa sobre a via central de sinalização desse hormônio, uma forma de dessensibilizar e reiniciar as respostas da via. Na segunda parte deste trabalho, levando em consideração as evidências do envolvimento do controle de estabilidade de RNAm na sinalização por glicose, foi avaliada a participação da via de regulação por microRNAs (miRNAs) em respostas mediadas por esses sinal durante os estágios iniciais de desenvolvimento da planta. Os mutantes ago1-25 e hyl1-2, deficientes em atividade e biossíntese de miRNAs, respectivamente, apresentaram hipossensibilidade à glicose

durante um determinado período do desenvolvimento da planta, entre a germinação e o estabelecimento. Tal resultado levanta a possibilidade de que a via dos miRNAs participa do atraso do desenvolvimento mediado por glicose. Visando compreender quais miRNAs poderiam estar envolvidos, análise de expressão em larga escala por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) de 200 precursores de miRNAs (pri-miRs) em resposta a glicose foi conduzida, apontando para uma potencial regulação sobre 38 deles, vários dos quais já são conhecidos por participarem direta ou indiretamente do controle de desenvolvimento da planta. Aparentemente, a deficiência na maquinaria de miRNAs leva a um desbalanço nas regulações de genes responsivos à glicose durante os primeiros estágios de desenvolvimento.

ABSTRACT

Plants, as sessile organisms, have developed a set of mechanisms that allow efficient adaptation to adverse environmental conditions. These processes rely on the integration of hormone biosynthesis, activation of stress-responsive pathways and on a balanced use of the available energy. Sugars, besides their role as carbon and energy sources, may also function as signaling molecules that may act together with hormonal signals to trigger adaptive responses to biotic and abiotic stresses. In this context, several studies have indicated an important relation between abscisic acid (ABA), one of the major hormones related to abiotic stresses responses, and glucose. ABA signaling, besides its function over transcription control, is known to involve factors regulating the stability of mRNAs. However, the importance of glucose-mediated mRNA decay control is essentially unknown. Our work intended to evaluate the potential of the participation of post-transcriptional regulations in response to ABA and glucose in Arabidopsis thaliana, by determining mRNA profile alteration in response to these signals after transcription inhibition. An experimental model which optimizes the conditions for transcription inhibition was established and used for transcriptome profiling with CATMA microarrays. A total of 962 genes were found to be differentially expressed after the treatments, suggesting a possible posttranscriptional control acting upon 204, 245 and 513 transcripts in response to glucose, ABA and the combination glucose + ABA, respectively. The genes were classified by their functions according to Gene Ontology, suggesting a close relation with adaptive response to stress conditions. Apparently, ABA- and glucose-mediated control of mRNA stability follows two opposite strategies, while ABA post-transcriptional responses may also act as a fast negative feedback mechanism over its own core signaling pathway, as a way to desensitize and reset the pathway responses. The second part of this work focused on the participation of microRNAs (miRNAs) pathway in responses mediated by glucose during plant early developmental stages. The mutants ago1-25 and hyl1-2, which are deficient in miRNA activity and biogenesis, respectively, showed hyposensitivity to glucose during a narrow time window of early plant development, between germination and seedling establishment. Such result raises the possibility that miRNA pathway may be involved in the glucose-mediated delay of early seedling development. To obtain further evidences about which miRNAs could be involved, the expression profile of 200 pri-miRs was evaluated by large-scale quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) profiling, indicating that 38 pri-miRNA are potentially regulated by glucose, several of which are known to participate directly or indirectly in plant development. The data indicate that deficiency in miRNA machinery leads to an imbalance on glucose control over gene expression during early seedling development.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO 1	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAIS E MÉTODOS	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	56
PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
MATERIAL SUPLEMENTAR	73
CAPÍTULO 2	119
ABSTRACT	
INTRODUCTION	122
MATERIALS AND METHODS	
RESULTS	126
DISCUSSION	136
ACKNOWLEDGEMENTS	138
REFERENCES	
SUPPLEMENTARY DATA	144
ANEXO 1	156

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico aba: ABA deficient mutant abi: ABA insensitive mutant **CBC:** complexo *cap-binding* Cord: Cordicepina Ctrl: controle sem tratamento **DNA:** ácido desoxirribonucléico FT: fator de transcrição gin: glucose-insensitive mutant Glc: glicose hc-siRNA: heterochromatic siRNA isi: impaired sucrose induction mutant Man: manitol miRNA: microRNA nat-siRNA: natural antisense transcript-derived siRNA **pb:** par de base pre-miRNA: precursor miRNA pri-miR: primary miRNA ra-siRNA: repeat-associated siRNA RDR: RNA-dependent RNA polymerase **RISC:** *RNA-induced silencing complex* RNA: ácido ribonucléico **RNAm:** RNA mensageiro RNApol II: RNA polimerase II siRNA: small-interfering RNA sis: sugar insensitive mutant sun: sucrose uncoupled mutant TAIR: The Arabidopsis Information Resource ta-siRNA: trans-acting siRNA **TE:** Tris-EDTA **UTR:** *untranslated*

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1	. Representação	esquemática	de um	gene	das	etapas	do	controle	transcricion	al da
expressão				•••••	•••••		•••••	•••••		6
Figura 2.	O controle da ex	pressão gênic	a ocorre	de for	ma t	ranscrie	cion	al e pós-t	ranscricional	8
Figura 3.	Biogênese de m	iRNAs em pla	ntas		•••••		•••••			10
Figura 4.	Modelo da via d	e sinalização d	lo ABA	•••••						14

CAPÍTULO 1

Figura 5. A repressão sinérgica de AtbZIP63 por ABA + glicose não pode ser reproduzida pelo
promotor desse gene
Figura 6. Avaliação da eficiência da inibição da transcrição por cordicepina27
Figura 7. Análise comparativa de eficiência da inibição da transcrição por cordicepina e Actinomicina D
Figura 8. Cinética de decaimento dos níveis de RNAm de <i>AtbZIP9</i> , <i>AtbZIP63</i> , <i>MPK3</i> e <i>At5g03430</i> após o tratamento com cordicepina
Figura 9. Inibição da ativação transcricional de <i>AtRd29b</i> por ABA na presença de cordicepina, utilizada para avaliar a eficiência da inibição da transcrição
Figura 10. Representação esquemática das comparações feitas nos experimentos de microarranjos para avaliar regulações pós-transcricionais mediadas por glicose e/ou ABA em escala genômica
Figura 11. Diagrama Venn mostrando o número de genes exclusivos e compartilhados entre (A) o total regulado por cordicepina + glicose (CG), cordicepina + ABA (CA) e cordicepina + glicose

+ ABA (CGA); (B) entre os estabilizados; (C) entre os desestabilizados por esses sinais......33

Figura Suplementar 1. Análise de enriquecimento segundo as três classes de ontologia feita
pelo Classification SuperViewer dos genes com resposta pós-transcricional a (A) Glicose; (B)
ABA; (C) glicose + ABA114
Figura Suplementar 2. Relação evolutiva da família PYR/PYL/RCAR em plantas115
Figura Suplementar 3. Relação evolutiva da subfamília de fosfatases PP2C do grupo A em
plantas116
Figura Suplementar 4. Relação evolutiva do subgrupo A da família SnRK2 em plantas117

CAPÍTULO 2

Figure 1. Glucose-induced delay on early seedling development is dependent on miRNA
machinery activity
Figure 2. Pri-miRs levels in Col-0 and Ler seedlings after 3 days of light exposure grown in
control media, 4% glucose (Glc) media and 4% manitol (Man) media129
Figure 3. Expression of (A) pri-miR159b, (B) MYB33, (C) MYB101 and (D) AB13, (E) AB14 and
(F) ABI5 in Col-0, ago1-25 and hyl1-2 seedlings grown in 4% glucose or control media after
three days of light exposure
Figure 4. Expression of (A-B) pri-miR156d,f, and (C) SPL13 in Col-0, ago1-25 and hyl1-2
seedlings grown in 4% glucose or control media after three days of light exposure. All expression
values are in comparison to untreated Col-0

Supplementary Fig. S1. Phases considered for development monitoring. (A) Germination (*testa* rupture); (B) Post-germination (radicle elongation); (C) Establishment (cotyledons greening)...147

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Número de genes diferencialmente expressos em resposta a glicose e/o	ou ABA após a
inibição da transcrição	
Tabela 2. Níveis de RNAm obtidos por qRT-PCR para transcritos sob	controle pós-
transcricional	

Tabela Suplementar 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão por
qRT-PCR
Tabela Suplementar 2. Níveis de RNAm obtidos por qRT-PCR para genes com respostas dependentes da transcrição
Tabela Suplementar 3. Transcritos que responderam de forma pós-transcricional tanto à glicose
como a ABA76
Tabela Suplementar 4. Transcritos desestabilizados de forma pós-transcricional exclusivamente por glicose + ABA
Tabela Suplementar 5. Transcritos estabilizados de forma pós-transcricional exclusivamente por
glicose + ABA
Tabela Suplementar 6. Validação dos resultados de microarranjos pela análise de genesresponsivos a glicose e ABA por qRT-PCR
Tabela Suplementar 7. Transcritos desestabilizados de forma pós-transcricional por glicose +
ABA e que também foram desestabilizados pelos tratamentos com glicose ou ABA81
Tabela Suplementar 8. Transcritos estabilizados de forma pós-transcricional por glicose + ABA
e que também foram estabilizados pelos tratamentos com glicose ou ABA85

Tabela Suplementar 9. Comparação dos transcritos que apresentaram resposta pós-
transcricional à glicose ou ABA com as respostas observadas em condições de estresses a seca,
frio e alta salinidade
Tabela Suplementar 10. Fatores de transcrição regulados de forma pós-transcricional por glicose.
Tabela Suplementar 11. Fatores de transcrição regulados de forma pós-transcricional por ABA
Tabela Suplementar 12. Fatores de transcrição regulados de forma pós-transcricionalexclusivamente por glicose + ABA
Tabela Suplementar 13. Transcritos que apresentaram regulação pós-transcricional por glicose eque são alvos da regulação por KIN10
Tabela Suplementar 14. Quinases reguladas de forma pós-transcricional por glicose96
Tabela Suplementar 15. Quinases reguladas de forma pós-transcricional por ABA96
Tabela Suplementar 16. Quinases reguladas de forma pós-transcricional exclusivamente por glicose + ABA
Tabela Suplementar 17. Genes responsivos de forma pós-transcricional à glicose e que são descritos como relacionados à síntese, degradação, transdução do sinal ou resposta à ativação por hormônios segundo a análise por ontologia
Tabela Suplementar 18. Genes responsivos de forma pós-transcricional à ABA e que são descritos como relacionados à síntese, degradação, transdução do sinal ou resposta à ativação por hormônios segundo a análise por ontologia
Tabela Suplementar 19 . Genes com regulação pós-transcricional por ABA e que se apresentamdiferencialmente expressos em mutantes relacionados à via de sinalização do ABA102
Tabela Suplementar 20 . Genes com regulação pós-transcricional por ABA e que se apresentam diferencialmente expressos em mutantes de controle da estabilidade de RNAm

CAPÍTULO 2

Table 1. Validation by qRT-PCR of glucose-regulated pri-miRs related to development con	ıtrol
and their expression in <i>ago1-25</i> and <i>hyl1-2</i> mutants	130
Supplementary Table S1. Primers sequences	144
Supplementary Table S2. Glucose-regulated pri-miRs and corresponding miRNAs targets	.145

INTRODUÇÃO

Importância da compreensão das vias de regulação que modulam respostas adaptativas e o crescimento da planta

As plantas, sendo organismos sésseis, desenvolveram um conjunto de mecanismos para se adaptarem a condições ambientais adversas, como variações de temperatura, alta salinidade, seca e também a ataque de patógenos. Estresses abióticos são as principais causas mundiais de perdas em plantações, reduzindo a produção média em mais de 50% (Boyer 1982; Wang *et al.*, 2003; IPCC, 2007). Indícios apontam para um aumento de regiões cultiváveis enfrentando condições de seca e alta salinidade (Wang *et al.*, 2003; Tester & Langrindge, 2010), podendo ainda as perdas de produção aumentarem devido às mudanças climáticas globais (IPCC, 2007; Marris, 2008; Battisti & Naylor, 2009). Esses fatores indicam a necessidade do desenvolvimento de cultivares resistentes às variações climáticas (Tester & Langrindge, 2010).

A adaptação a um determinado tipo de estresse é geralmente composta tanto por respostas específicas como generalizadas (Kultz, 2005). Tais respostas se valem da integração entre a biossíntese de hormônios, ativação de programa de expressão gênica de resposta a estresse e um balanco adequado do uso da energia disponível, influenciando diretamente o desenvolvimento da planta. Dessa forma, as respostas têm de ser coordenadas, ocorrendo um ajuste no tempo de uso intensivo de nutrientes para garantir o fornecimento adequado de energia para que os eventos relacionados ao desenvolvimento se completem (Gibson, 2005). Os fitormônios orquestram o desenvolvimento da planta através da modulação do crescimento em resposta a fatores intrínsecos e ambientais (Wolters & Jurgens, 2009; Depuydt & Hardtke, 2011). Contudo, a análise das regulações hormonais é complexa devido à existência de grande redundância entre os membros das famílias gênicas, retro-regulações, além das interações entre as diferentes vias hormonais (Wolters & Jurgens, 2009). Já os carboidratos não só atuam como fontes de carbono e energia, mas também como moléculas sinalizadoras, podendo agir conjuntamente com sinais hormonais na adaptação a estresses e no controle do desenvolvimento (León & Sheen, 2003; Rolland et al., 2006). Genes de resposta a estresse estão sendo usados para aumentar a tolerância de plantas transgênicas (Thomashow, 1999; Hasegawa et al., 2000; Zhang, 2003; Bartels & Sunkar, 2005; Denby & Gehring, 2005; Umezawa et al., 2006; Pennisi, 2008; Wan et al., 2009), sendo uma motivação para o uso de organismos-modelo como *Arabidopsis thaliana* a compreensão das redes de resposta adaptativas, fundamentais para sua aplicação em plantas de interesse econômico (Denby & Gehring, 2005; Valliyodan & Nguyen, 2006; Zeller *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

Adaptação a condições de estresse e a sinalização por ácido abscísico e glicose

Um dos principais hormônios vegetais relacionado às respostas a estresses é o ácido abscísico (ABA), sendo considerado um mensageiro essencial das respostas adaptativas (Umezawa *et al.*, 2006). Através da regulação de sua síntese/degradação, transporte e transdução de seu sinal, o ABA controla um conjunto de genes envolvidos na adaptação e aclimatação a estresse, como atenuação do crescimento vegetativo, transporte de íons e água que resultam no fechamento dos estômatos e evitando a transpiração, e induzindo o ajuste do metabolismo para tolerar seca e baixa temperatura (Ton *et al.*, 2009; Cutler *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Aparentemente a sinalização por ABA também está envolvida na resposta de defesa a patógenos (Asselbergh *et al.*, 2008; Ton *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012), e através da interação com outros dois fitormônios, o ácido jasmônico e o ácido salicílico, essencialmente relacionados a respostas a patógenos, coordenam a otimização da resistência tanto a estresse abiótico como biótico (Kim *et al.*, 2012).

Além das respostas hormonais, vários outros sinais devem estar envolvidos na interação de respostas adaptativas a estresse nas plantas, como fluxo de cálcio, espécies reativas de oxigênio e privação de energia (revisão em Baena-González, 2010). A manutenção da homeostase energética é fundamental para o desenvolvimento e está em constante ajuste devido às flutuações ambientais, as quais têm impacto sobre a absorção de luz, fixação de carbono ou mesmo na disponibilidade de oxigênio, diminuindo dessa forma a eficiência da fotossíntese e respiração e, por consequência, a disponibilidade de energia das células (Baena-González, 2010). Para o reestabelecimento da homeostase energética em resposta a essas perturbações, ocorre uma reprogramação do metabolismo e expressão gênica para desviar as fontes de energia das vias biossintéticas relacionadas ao desenvolvimento para processos de defesa, aclimatação e por fim, adaptação (Baena-González, 2010). As respostas em condições de deficiência energética se baseiam na transdução de sinal envolvendo, pelo menos parcialmente, duas quinases do tipo

SnRK1 (*Sucrose non-fermenting related kinase1*), KIN10 e KIN11, ambas reprimidas por glicose ou trealose 6-fosfato (Baena-González *et al.*, 2007; Baena-González, 2010). Interessantemente, um dos alvos de regulação de SnRK1, o fator de transcrição (FT) *AtbZIP63* aparentemente atua como um nó de integração das sinalizações por glicose e ABA, numa resposta adaptativa a estresse de acordo com a disponibilidade energética (Matiolli *et al.*, 2011 – Anexo 1).

Controle do desenvolvimento mediado por glicose e ácido abscísico

O padrão de desenvolvimento das plantas também é direcionado para a percepção e adequação a estímulos ambientais. A coordenação do desenvolvimento com a disponibilidade de nutrientes, como açúcares solúveis (glicose e sacarose) ou minerais (fosfato ou nitrogênio, por exemplo), é essencial para o organismo otimizar seu ciclo de vida (Gibson, 2005). A embriogênese origina uma plântula que possui células indiferenciadas nos meristemas do caule e da raiz, os quais formam a maioria dos órgãos pós-embrionários de uma forma modular (Depuydt & Hardtke, 2011). Os meristemas apical do caule e laterais dão origem aos órgãos situados acima do chão, como pecíolos, caule, folhas e flores, enquanto o meristema apical da raiz forma o sistema de raízes e suas ramificações (Osmont *et al.*, 2007; Barton, 2010). A vantagem desse desenvolvimento modular pós-embrionário é que possibilita uma resposta apropriada aos estímulos ambientais, essencial para o desenvolvimento de um organismo que, por ser séssil, deve se adaptar ao meio (Depuydt & Hardtke, 2011).

A semente é uma estrutura que geralmente abriga um embrião completamente desenvolvido, e permite que ele sobreviva até o estabelecimento da plântula em condições favoráveis (Koornneef *et al.*, 2002). A transição da germinação para o estabelecimento começa com a absorção da água pela semente, levando a uma progressiva maturação do embrião que resulta na expansão dos cotilédones, que se tornam verdes, ocorrendo mobilização dos estoques de reserva para prover energia e carbono em suporte ao crescimento e desenvolvimento do sistema autotrófico. Dessa forma, a mudança do estado de dormência para a germinação é um passo crucial no ciclo de vida desses organismos (Koornneef *et al.*, 2002). Similarmente, as plântulas também têm a capacidade de evitar o crescimento frente a mudanças repentinas nas condições ambientais (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Dekkers *et al.*, 2004; Finkelstein *et al.*, 2008; Rodriguez-Gacio *et al.*, 2009). Esse controle é feito principalmente através do balanço de dois

fitormônios antagônicos, a giberelina e o ABA, que atuam sobre o controle da maturação do embrião, transição do estado de dormência para a germinação e inibição do crescimento, mas também depende da interação com outros hormônios como brassinosteróides e auxina (revisão em Finkelstein *et al.*, 2008; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009; Raghavendra *et al.*, 2010; Cutler *et al.*, 2010).

Açúcares como sacarose e glicose influenciam a floração de algumas espécies de plantas, fotossíntese, a transição entre fases do desenvolvimento e a senescência, e o desenvolvimento e maturação de órgãos (Paul & Pellny, 2003; Gibson, 2005). Apesar de serem essenciais para o desenvolvimento, açúcares em altas concentrações no meio atuam negativamente sobre o crescimento da planta, envolvendo regulações parcialmente dependentes da sinalização por ABA (Rolland *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, Capítulo 2). Por exemplo, mutantes de *A. thaliana* identificados como deficientes em regulações por açúcares, tais como glucose-insensitive (gin), sucrose uncoupled (sun), impaired sucrose induction (isi), e sugar insensitive (sis), também se mostraram deficientes em biossíntese de ABA (*aba*), como *aba2/isi4/gin1/sis4* e *aba3/gin5*, ou insensíveis ao hormônio (*ABA insensitive – abi*), como *abi4/sun6/isi3/gin6/sis5* (Zhou *et al.*, 1998; Arenas-Huertero *et al.* 2000; Huijser *et al.* 2000; Laby *et al.* 2000; Rook *et al.* 2001; Arroyo *et al.*, 2003. Aparentemente, os FTs *ABI3*, *ABI4* e *ABI5* estão diretamente relacionados com o controle do desenvolvimento tanto por glicose como por ABA (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2003; Reyes & Chua, 2007; Dekkers *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2011).

O controle transcricional da expressão gênica

O crescimento e desenvolvimento de todos os organismos dependem da regulação da expressão gênica. Enquanto os mecanismos básicos relacionados à transcrição e tradução se mantiveram conservados entre procariotos e eucariotos durante a evolução, o aparecimento de organismos mais complexos se deve em parte ao aumento da complexidade de suas redes de regulações. Por exemplo, alterações na expressão de genes que codificam para reguladores da transcrição são consideradas como uma das principais fontes de diversidade e mudança que delineiam a evolução (Carrol, 2000), embora estudos recentes apontem para um impacto significativo de RNAs não-codificantes no processo evolutivo (Ponting *et al.*, 2009).

A expressão de uma proteína ou RNA não-codificante biologicamente ativos em células eucarióticas é controlada em diferentes níveis por diversos processos durante a expressão gênica, através da estrutura da cromatina, início da transcrição, processamento e modificação dos RNAm transcritos, transporte do RNAm para o citoplasma, início e elongação da tradução do RNAm, modificações pós-traducionais, e transporte e degradação da proteína expressa (Adeli, 2011). A regulação da expressão gênica, no entanto, ocorre principalmente através do controle sobre o início da transcrição. Aproximadamente 10% do genoma de *Arabidopsis* apresenta regulação transcricional por ABA (Nemhauser *et al.*, 2006; Cutler *et al.*, 2010), enquanto aproximadamente 7% do genoma é regulado por glicose (Li *et al.*, 2006).

O DNA nos eucariotos encontra-se empacotado no núcleo das células em estruturas de nucleoproteínas, as cromatinas, através do enovelamento do DNA em torno de um complexo proteico formado por histonas, os nucleossomos (revisão em Orphanides & Reinberg, 2002). A cromatina pode ser encontrada numa forma altamente compactada de difícil acesso à informação, a heterocromatina, ou descondensada, a eucromatina (Orphanides & Reinberg, 2002). Dessa forma, um primeiro nível de controle da expressão gênica se dá por alterações na estrutura da cromatina que permitem ou não o acesso às informações contidas no DNA pelos fatores responsáveis pela transcrição. Essas regulações epigenéticas se valem da metilação das citosinas do DNA, modificações pós-traducionais das histonas, ou ainda do envolvimento de complexos *polycomb* (Henderson & Jacobsen, 2007).

Contudo, um gene inserido numa sequência randômica de DNA é inerte, uma vez que depende de sequências específicas e proteínas capazes de direcionar a transcrição para que a informação para a qual ele codifica seja expressa e visível para a seleção (Wray *et al.*, 2003). Todo gene com impacto fenotípico é flanqueado por sequências reguladoras que, em conjunto com a expressão e atividade de várias proteínas codificadas em outras regiões do genoma, regulam sua expressão em resposta a determinadas condições ambientais ou em tipos celulares específicos (Figura 1 – Wray *et al.*, 2003). De uma forma geral, o ponto final de diversas cascatas de transdução de sinal é a ativação de proteínas reguladoras que se ligam a motivos específicos nas regiões promotoras dos genes (Meshi & Iwabuchi, 1995; Beckett, 2001; Orphanides & Reinberg, 2002; Wray *et al.*, 2003).



Figura 1. Representação esquemática de um gene das etapas do controle transcricional da expressão. **A.** Organização de um gene eucariótico, apresentando as posições relativas da unidade transcricional, região promotora, e os sítios de regulação *cis* onde se ligam os fatores de transcrição (barras veticais). **B.** Modelo de um promotor em operação. O início da transcrição requer diversas proteínas que interagem de maneira específica, dentre elas o complexo proteico da RNA polimerase (~15 proteínas); proteína *TATA-binding* (TBP; 1 proteína); fatores associados à TBP (TAFs, ou fatores de transcrição de uma forma geral; ~8 proteínas); fatores e co-fatores de transcrição, cujas composições e números variam; fatores de dobramento da molécula de DNA, que permitem a interação entre as proteínas; e complexos de remodelação da cromatina (~12 proteínas ou mais) (Adaptado de Wray *et al.*, 2003).

Um dos principais grupos de proteínas que controlam a expressão gênica são os FTs (regulador *trans*), geralmente definidos como proteínas que apresentam um domínio de ligação específico ao DNA capaz de se ligar a uma região promotora do genoma com sequência complementar (elemento de regulação *cis*), ativando ou reprimido a transcrição do gene alvo (Figura 1 – Riechmann *et al.*, 2000; Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009). A região promotora possui um promotor central onde a maquinaria de base da transcrição se liga, e diversos sítios de ligação de FTs que podem estar arranjados em módulos, os quais separadamente contribuem para o

aspecto final da taxa de iniciação da transcrição (revisão em Wray *et al.*, 2003). Comparações de análises genômicas de fungos e animais mostram que as famílias de FTs de angiospermas estão sob expansão, possivelmente refletindo a capacidade das angiospermas de se adaptar a diferentes condições ambientais (Corrêa *et al.*, 2008). Por exemplo, entre 5-10% do genoma de *Arabidopsis* codifica para FTs, um valor superior ao encontrado para metazoários com aproximadamente o mesmo tamanho de genoma como a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* (4,7%) e o nematelminto *Caenorhabditis elegans* (3,6%) (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009).

O controle pós-transcricional da expressão gênica

O RNAm dos eucariotos é sintetizado como uma molécula precursora que precisa ser primeiramente processada antes de se tornar ativa. As três principais etapas de processamento são a adição do *cap 5*' (7-metilguanosina), a remoção de sequências através do *splicing*, e a formação da cauda poli-A na porção 3' do RNAm por poliadelinação (Fisher *et al.*, 2011). Uma etapa importante de controle da expressão gênica ocorre através de regulações pós-transcricionais, as quais estão geralmente associadas a respostas adaptativas rápidas de ajuste do crescimento e metabolismo. Tais regulações podem ocorrer durante o processamento do RNAm, mediando a estabilidade do RNAm, ou pelo controle da tradução desta molécula (Figura 2 – revisão em Belototsky & Sieburth, 2009; Houselley & Tollervey 2009; Floris *et al.*, 2009).

Durante a maturação da molécula de RNAm, o mecanismo de *splicing* remove os íntrons do pré-RNAm, podendo um mesmo gene apresentar formas alternativas de *splicing* que são produzidas em determinadas respostas adaptativas (Palusa *et al.*, 2007; Floris *et al.*, 2009). Por outro lado, dois processos essenciais para a maturação do RNAm, a adição do *cap 5* ' e da cauda poli-A, podem também sinalizar para a degradação da molécula. A deadenilação (remoção da cauda poli-A) e a remoção do sinal *cap 5* ' da molécula precedem a degradação do RNAm, que pode ocorrer por um complexo de exonuclease 3'-5' nos exossomos, ou por degradação por exonuclease 5'-3' após a remoção do *cap 5* ' (Belototsky & Sieburth, 2009; Houselley & Tollervey 2009; Floris *et al.*, 2009). Dois fatores aparentemente influenciam o decaimento dos RNAm: a presença de elementos conservados nas regiões não-traduzidas (UTR) do RNAm (3' e 5'-UTR) que se correlacionam com maior ou menor estabilidade do RNAm; e a presença de ao menos um íntron no gene, que garante moléculas de RNAm mais estáveis do que as provenientes

de genes sem íntrons (Gutiérrez *et al.*, 2002; Narsai *et al.*, 2007; Belototsky & Sieburth, 2009; Christie *et al.*, 2011). Um sistema de vigilância citoplasmático também atua sobre os RNAs através do *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD), que identifica RNAm com códons de parada prematuros ou com região 3'-UTR muito longa e direciona para a remoção do *cap 5'*, iniciando seu decaimento (Belototsky & Sieburth, 2009). Finalmente, o controle sobre a tradução do RNAm permite uma modulação fina dos níveis de proteína sintetizados. A resposta adaptativa traducional pode ocorrer através da modulação da associação RNAm-polissomos, ou através do controle direto dos níveis de polissomos, que limitaria o consumo de energia (revisão em Floris *et al.*, 2009).



Figura 2. O controle da expressão gênica ocorre de forma transcricional e pós-transcricional. O controle pós-transcricional é considerado como as regulações que ocorrem entre a maturação do RNAm e a síntese da proteína (processamento do RNAm, controle de estabilidade do RNAm, tradução).

Outro mecanismo de controle da expressão gênica ocorre pelo silenciamento de RNA, o qual envolve pequenas moléculas de RNA de 19-24 nucleotídeos que inibem a expressão gênica através de uma interação sequência-específica, atuando sobre a transcrição, estabilidade do RNAm ou tradução (Floris et al., 2009; Brodersen et al., 2008; Voinnet, 2009). O silenciamento envolve quatro processos bioquímicos básicos: (1) indução por um RNA dupla-fita, (2) processamento do RNA dupla-fita em pequeno RNA, (3) metilação do pequeno RNA, (4) e incorporação do pequeno RNA no complexo-efetor que se associa por complementariedade parcial ou completa com o RNA ou DNA alvo (Voinnet, 2009). RNAs dupla-fita podem derivar diretamente da replicação de vírus, transcrição de genes com sequências repetidas invertidas, ou a partir de *loci* que produzem RNAs que formam estruturas secundárias em forma de alça (Voinnet, 2009). Alternativamente, os RNAs dupla-fita podem ser sintetizados a partir de um RNA simples-fita por uma das seis RNA polimerases dependentes de RNA (RNA-dependent RNA polymerase - RDR1-6). Os pequenos RNAs são classificados de acordo com sua biogênese e função em microRNAs (miRNAs), ou em uma das diversas classes de pequenos RNAs de interferência (small-interfering RNAs - siRNAs), como trans-acting siRNAs (ta-siRNAs), natural antisense transcript-derived siRNAs (nat-siRNAs), heterochromatic siRNAs (hcsiRNAs), e repeat-associated siRNAs (ra-siRNAs) (revisão em Voinnet, 2009). Pequenos RNAs também podem efetuar controle transcricional através da metilação de DNA dirigida por RNA (RNA-directed DNA Methylation), que levam a modificações epigenéticas e subsequente silenciamento dos genes metilados (Aufsatz et al., 2002; Havecker et al., 2010).

Os miRNAs representam um dos principais grupos de pequenos RNAs (Figura 3), com 338 integrantes conhecidos para *A. thaliana* (miRbase - http://www.mirbase.org/; Agosto/2012). Os genes de *MIRNAs* são transcritos principalmente pela RNA polimerase II (RNApol II) gerando transcritos primários (pri-miRs). Os pri-miRs são primeiramente estabilizados pela proteína ligante de RNA DAWDLE (DDL) pela sua conversão em precursores de miRNAs (pré-miRNAs), uma estrutura em *hairpin* auto-complementar (Voinnet, 2009). Em seguida, o pre-miRNA é processado por um complexo formado pela interação com as proteínas SERRATE (SE), HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1), DICER-*like1* (DCL1), e o complexo nuclear *cap-binding* (CBC), sofrendo então um segundo processamento pela DCL1, originando uma estrutura de 21 nucleotídeos em duplex, o miRNA/miRNA*, que é exportado para o citoplasma pela

proteína HASTY e por outros fatores (Voinnet, 2009). Esse fragmento duplex é metilado pela HUA ENHANCER1 (HEN1), mecanismo de proteção contra exonucleases como SDN (*Small RNA Degrading Nuclease*), sendo então reconhecido preferencialmente pela ARGONAUTE1 (AGO1) e integrado no complexo de silenciamento (*RNA-induced silencing complex – RISC*), o qual atua sobre RNAs com sequência parcialmente ou totalmente complementar ao miRNA (Mi *et al.*, 2008; Voinnet, 2009).



Figura 3. Biogênese de miRNAs em plantas. Em plantas, a maioria dos pri-miRs é transcrita pela RNApol II de regiões localizadas entre genes codificantes de proteínas. A interação com a proteína DDL estabiliza o pri-miR através de sua conversão em pre-miRNAs. Essa reação requer a ação conjunta e interação física com as proteínas SE, HYL1, DCL1 e o complexo CBC. Pre-miRNA ou miRNAs maduros são exportados para o citoplasma possivelmente pela ação da exportina HASTY e outros fatores. O duplex miRNA/miRNA* é metilado pela HEN1, reação que protege a molécula da degradação por SDN. A fitaguia do miRNA é incorporada pelas proteínas AGO e encaminhada para as reações de silenciamento, enquanto a fita complementar miRNA* é degradada (adaptado de Voinnet, 2009).

Regulações pós-transcricionais possuem papéis importantes no monitoramento da disponibilidade de nutrientes (Pant *et al.*, 2009), resposta a estresses bióticos e abióticos (Zhang *et al.*, 2008; Floris *et al.*, 2009), e controle sobre o desenvolvimento (revisão em Fornara & Coupland, 2009; Poethig, 2009; Nonogaki, 2010). Por exemplo, deficiência sobre o controle da atividade de *splicing* na proteína STABILIZED1 compromete a maturação da COLD-REGULATED 15A (COR15A), levando à hipersensibilidade ao frio, estresse salino e a respostas mediadas por ABA (Lee *et al.*, 2006). Desregulação na expressão de proteínas relacionadas à atividade de deadenilação, como PARN (*poly-A ribonuclease*) ou complexo de deadenilase CCR4/CAF1, afetam a viabilidade do embrião ou resistência a doenças (Reverdatto *et al.*, 2004; Chiba *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2005; Sarowar *et al.*, 2007). Proteínas envolvidas com o mecanismo de remoção do *cap 5'*, como DCP1, DCP2 ou VCS (VARICOSE) participam do desenvolvimento das plantas como formação dos cotilédones, padrão de venação ou funcionamento dos meristemas do caule e raiz (Goeres *et al.*, 2007; Iwasaki *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007).

Similarmente, regulações envolvendo pequenos RNAs também participam do controle do desenvolvimento e adaptação a estresse. Regulações por nat-siRNAs foram relacionadas à adaptação a estresse salino (Borsani *et al.*, 2005), enquanto que ta-siRNAs, os quais dependem dos miRNAs para sua biossíntese, atuam sobre o desenvolvimento das folhas (revisão em Allen & Howell, 2010). Múltiplos aspectos do controle do desenvolvimento e adaptação a sinais ambientais mostram-se dependentes de regulações por miRNAs, os quais também participam de respostas adaptativas sob o controle do ABA (Pant *et al.*, 2009; Fornara & Coupland, 2009; Poethig, 2009; Nonogaki, 2010; Zhang *et al*, 2008; Laubinger *et al.*, 2010). Deficiência nos fatores de processamento e atividade de miRNAs provocam hipersensibilidade a esse hormônio (Zhang *et al.*, 2008; Earley *et al.*, 2010; Laubinger *et al.*, 2010), apontando para uma possível relação entre a via de regulação por pequenos RNAs e a sinalização por ABA.

Indícios também apontam para a existência de controle de estabilidade de RNAm envolvendo açúcares (Ho *et al.*, 2001), principalmente através de vias traducionais (revisão em Smeekens *et al.*, 2010). Recentemente, encontramos evidências para a existência de regulações pós-transcricionais na repressão sinérgica do FT AtbZIP63 à combinação de ABA e glicose

11

(Matiolli *et al.*, 2011 – Anexo 1). Contudo, a participação destes mecanismos em respostas mediadas por glicose ainda é pouco explorada.

A transdução do sinal na via da glicose

Os açúcares não só apresentam uma função central no metabolismo como fonte de energia e armazenamento, ou como integrante de componentes estruturais das células, mas também podem atuar como moléculas sinalizadoras que controlam a expressão gênica (revisão em Smeekens *et al.*, 2010; Eveland & Jackson, 2012). Além de detectar a falta de nutrientes, as plantas são capazes de identificar a presença de açúcares por diversas vias que direta ou indiretamente reconhecem trealose, frutose, glicose ou sacarose (Rolland *et al.*, 2006). Apesar dos mecanismos envolvidos ainda não serem completamente compreendidos, a proteína HEXOKINASE1 (HXK1) foi identificada como um dos componentes centrais da percepção e sinalização por glicose e fitormônios, uma vez que HXK1 tem papel positivo e negativo sobre os efeitos de auxinas e citocinina, respectivamente (Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006). Além disso, glicose atua como antagonista do etileno por promover a degradação de seu regulador central EIN3 via proteossomo, sendo esse efeito ausente no mutante nulo de HXK1 *gin2* (Moore *et al.*, 2003; Yanagisawa *et al.*, 2003).

O efeito da glicose sobre a expressão gênica pode requerer a atividade sensora da HXK1, de forma independente de sua atividade enzimática, através de um complexo nuclear que regula diretamente os genes alvos (Moore *et al.*, 2003; Smeekens *et al.*, 2010; Eveland & Jackson, 2012). Alternativamente, o controle da expressão gênica por açúcares pode ocorrer por uma via independente da atividade de HXK1, envolvendo ou não o metabolismo da glicose (Rolland *et al.*, 2006; Smeekens *et al.*, 2010). Foi proposto que a transdução de sinais extracelulares de glicose pode envolver a participação de proteínas G (*heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins*) acopladas a receptores (GPCRs) (Chen & Jones, 2004), sendo que em *Arabidopsis* esse complexo ainda estaria associado a outro regulador que reiniciaria o sistema, o RGS1 (*Regulator of G-Protein Signaling 1*) (Temple & Jones, 2007; Chen, 2008).

Via de sinalização do ácido abscísico

A expressão dos genes em resposta a ABA se baseia na regulação direta de FTs que reconhecem e se ligam a elementos *cis* nas regiões promotoras dos genes-alvos, denominados ABREs (*ABA-responsive elements*) (Fujita *et al.*, 2011). Essas proteínas formam o grupo dos AREBs (*ABRE-binding protein*) ou ABFs (*ABA-binding fator*), e codificam para FTs do tipo bZIP (revisão em Umezawa *et al.*, 2010). Além desses FTs, a expressão gênica mediada por ABA é controlada por receptores, mensageiros secundários, cascatas de proteínas quinase/fosfatase, e fatores de remodelação da cromatina, que atuam sobre a atividade de miRNAs, maturação e estabilidade de RNAm, e a degradação de proteínas (Fujita *et al.*, 2011).

Recentemente, a via central de sinalização do ABA foi desvendada, sendo composta pelos receptores PYR/PYL/RCAR, pelas fosfatases do tipo 2C (PP2C) como reguladores negativos, e pelas quinases *SNF1-related protein kinase 2* (SnRK2) como reguladores positivos (Umezawa *et al.*, 2010). Na ausência de ABA, as PP2Cs inativam as quinases SnRK2 por defosforilação direta (Figura 4A). Contudo, em resposta a fatores ambientais ou de desenvolvimento, o ABA liga-se ao receptor e promove a interação dos receptores PYR/PYL/RCAR com PP2C, resultando na inibição da PP2C e consequente ativação da SnRK2, que passa a fosforilar seus alvos, como os FTs, ativando-os (Figura 4A; Umezawa *et al.*, 2010). Essa indução de SnRK2 por ABA, contudo, não ocorre no mutante insensível ao hormônio *abi1-1*, que inativa constitutivamente essas quinases mesmo na presença do receptor PYR1 e ABA (Figura 4B; Umezawa *et al.*, 2009).



Figura 4. Modelo da via de sinalização do ABA (adaptado de Umezawa *et al.*, 2010). **A.** PYR/PYL/RCAR, PP2C e SnRK2 formam um complexo de sinalização no qual, na ausência de ABA, PP2C regula negativamente SnRK2. Na presença do hormônio, PYR/PYL/RCAR liga-se ao ABA e interage com PP2C, inibindo sua atividade de fosfatase, liberando SnRK2 para ativar seus alvos. **B.** No mutante *abi1-1*, que não possui a ligação de PYR/PYL/RCAR, a inativação de SnRK2 é constitutiva mesmo na presença de ABA.

OBJETIVOS

O presente estudo visou avaliar a importância do controle de estabilidade de RNAm mediado por glicose e ABA, compreender e identificar os fatores envolvidos com essas regulações e os possíveis reflexos para o crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*. Especificamente, os seguintes pontos foram abordados:

- Estabelecimento de um protocolo para avaliar a estabilidade do RNAm em resposta à glicose e ABA em condições de inibição de transcrição;
- Identificação de transcritos regulados de forma pós-transcricional por glicose ou ABA através de análise em escala genômica;
- Identificação das possíveis vias de regulação pós-transcricionais relacionadas às sinalizações por glicose ou ABA e compreensão dos mecanismos subjacentes;
- Avaliação do envolvimento da maquinaria de miRNAs no controle da germinação e desenvolvimento da plântula mediado por glicose e ABA;
- Identificação de miRNAs potencialmente regulados por glicose no controle da germinação;
- Avaliação das vias de regulação por miRNAs possivelmente envolvidas no controle de desenvolvimento mediado por glicose.

CAPÍTULO 1

Avaliação da importância do controle da estabilidade de RNAm na sinalização por glicose e ABA e na interação desses sinais em *Arabidopsis thaliana*
INTRODUÇÃO

O estabelecimento do balanço adequado entre demanda e disponibilidade de carboidratos é uma necessidade de todos os organismos para otimizar seu crescimento, desenvolvimento e propagação. As plantas, como organismos fotoautotróficos, são únicas pela sua capacidade de produzir os carboidratos de que necessitam, através da captura da energia da luz e sua transformação em energia química, sendo os açúcares sintetizados nas folhas transportados através do floema até os órgãos drenos como raízes, folhas jovens e zonas meristemáticas. Além de servirem como fonte de energia e carbono, os açúcares são moléculas sinalizadoras que atuam sobre o controle da expressão gênica e, dessa forma, regulam o crescimento e desenvolvimento da planta (Eveland & Jackson, 2012). Análises de mudanças de perfis de RNAm mostraram que variações dos níveis de carboidratos promovem diversas alterações nas funções celulares como síntese reduzida de proteínas e mobilização de fonte alternativas de energia (Price *et al.*, 2004).

Vários aspectos da sinalização por carboidratos são dependentes da interação com hormônios, como etileno (Zhou et al., 1998; Moore et al., 2003; Yanagisawa et al., 2003), auxina e citocinina (Moore et al., 2003; Rolland et al., 2006), e ABA (Arenas-Huertero et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001; Li et al., 2006). Em especial, uma estreita relação entre as sinalizações por ABA e carboidratos foi revelada pela identificação de mutantes deficientes em regulações por açúcares que também se mostraram deficientes em biossíntese ou sensibilidade ao ABA, como aba2/isi4/gin1/sis4, aba3/gin5 ou abi4/sun6/isi3/gin6/sis5. Interessantemente, a interação entre glicose e ABA é responsável pela repressão sinérgica da expressão do FT AtbZIP63, regulação que deve atuar de forma a adequar o uso da energia disponível com o crescimento e a tolerância ao estresse, e que se mostrou parcialmente dependente de fatores póstranscricionais (Matiolli et al., 2011 - Anexo 1). Diversas evidências indicam a importância de mecanismos de controle de estabilidade de RNA envolvendo a sinalização por ABA, como atividade de *splicing*, deadenilação ou atividade de pequenos RNAs (Nishimura *et al.*, 2005; Lee et al., 2006; Zhang et al., 2008; Earley et al., 2010; Laubinger et al., 2010), e embora evidências também apontem para uma importância dos açúcares nas regulações pós-transcricionais (Smeekens et al., 2010), o envolvimento de glicose e a interação desta hexose com ABA no controle de estabilidade de RNAm é ainda um ponto a ser explorado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Para cultura *in vitro* de *A. thaliana*, 10 mg de sementes foram esterilizadas e colocadas para crescer em meio de cultura MS líquido (Murashige & Skoog, 1962) modificado (MS/2), como descrito por Gauer (2004). As amostras foram colocadas no escuro a 4°C por dois dias para quebra de dormência, sendo transferidas para crescimento em luz artificial tênue contínua sob agitação suave (70 RPM) e temperatura de 22°C.

Inibição da transcrição

Tratamentos com cordicepina (Sigma – Número de catálogo C3394) foram conduzidos com o seguinte ensaio: 10 mg de sementes de *A. thaliana* foram germinadas em 10 mL de meio líquido MS/2 suplementado com 0,3% de glicose sob luz contínua tênue, a 22°C e agitação constante a 70 RPM. No quinto dia, as plântulas foram lavadas em 25 mL de MS/2 sem glicose e transferidas para 10 mL de MS/2 sem glicose, e foram em seguida crescidas por mais 24h sob as mesmas condições. No sexto dia, as plântulas receberam o tratamento de 50 µg/mL, 100 µg/mL ou 200 µg/mL de cordicepina (concentrações finais) a partir de solução estoque de 1 mg/mL, sendo expostas ao composto por diferentes tempos e tendo como controle plântulas que não receberam o tratamento. Alternativamente, Actinomicina D (Sigma – Número de catálogo A1410) também foi usada para comparação com cordicepina na avaliação da eficiência dos inibidores de transcrição.

Tratamentos com glicose, ABA e ABA + glicose

As plântulas de seis dias crescidas nas condições descritas acima receberam tratamentos com glicose, ABA e ABA + glicose em dois ensaios diferentes, a partir de soluções-estoque esterilizadas por filtração de glicose 20%, e ABA 100 mM dissolvido em metanol (Merck). No primeiro deles, conduzido para avaliar a resposta pós-transcricional a esses sinais, as plantas cultivadas que tiveram sua transcrição inibida por cordicepina, foram em seguida submetidas a 2h de tratamento com as seguintes concentrações finais de cada reagente: glicose 2%, ABA 100 μ M, ou glicose 2% + ABA 100 μ M. No segundo ensaio, as mesmas condições de crescimento acima

descritas foram utilizadas, mas não houve tratamento prévio com cordicepina, sendo as plantas submetidas diretamente a 2h de tratamento com glicose 2%, ABA 100 μ M, ou glicose 2% + ABA 100 μ M.

Extração de RNA

As extrações de RNA total para as análises por qRT-PCR foram realizadas a partir de aproximadamente 400 mg de plântulas de *A. thaliana*. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de tampão de extração (Guanidina HCL 8 M, Tris HCL pH 8 50 mM, EDTA pH 8 20 mM e β -mercaptoetanol 50 mM). Em seguida, foram realizadas duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo o RNA precipitado por 2h ou *overnight* a -20°C com 0,2 volumes de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 1 volume de etanol absoluto gelado. Após lavagem com etanol 70% seguida por etanol absoluto gelados, o *pellet* foi ressuspendido em 20 µL de água milli-Q tratada com DEPC. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) contendo 5% de formaldeído, de acordo com Logemann *et al.* (1987).

Síntese de DNA complementar

RNA foi tratado com TURBO DNA-*free* (Ambion), segundo as recomendações do fabricante, antes da síntese do DNA complementar (cDNA) para análise por qRT-PCR com oligonucleotídeos que não abrangiam junção éxon-éxon. Para síntese de cDNA, a reação de transcrição reversa foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: a 3 µg de RNA foram adicionados 1,5 µL de oligo dT(18) 10 mM e água tratada com DEPC para um volume de 13,5 µL, sendo incubados a 70°C por 10 min para desnaturação do RNA. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo, sendo 10,5 µL da seguinte proporção de reagentes adicionados: 2 µL água tratada com DEPC, 3 µL de *ImPromII 5x buffer* (Promega), 3 µL de *ImPromII* MgCl₂ (25 mM, Promega), 1,25 µL de uma mistura de dNTPs 10 mM cada (Invitrogen) e 1,25 µL de *RNAseOUT RNase Inhibitor* (40 U/µL Invitrogen). Após incubação a 42°C por 2 min, foi adicionado 1,0 µL de *ImPromII reverse transcriptase* (Promega). A reação foi incubada a 42°C por 40 min para a transcrição reversa e, em seguida, a 70°C por 15 min para inativação da enzima.

RT-PCR e PCR quantitativa em tempo real

Utilizando as anotações disponíveis no TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* – http://www.arabidopsis.org), os oligonucleotídeos para a realização de qRT-PCR foram desenhados seguindo os seguintes critérios: entre 19 e 22 pb de extensão, T_M de aproximadamente 60°C, *amplicon* com aproximadamente 100 pares de base (pb), conteúdo de guanina-citosina entre 35-55%, posicionamento próximo a região 3' do gene e contendo quando possível ao menos uma junção éxon-éxon para eliminar a amplificação de DNA genômico contaminante e a necessidade do tratamento com DNAse. Em seguida, suas sequências foram analisadas no *Primer-BLAST* (Ye *et al.*, 2012 – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) afim de avaliar a especificidade, sendo confirmada pela análise dos *amplicons* provenientes de RT-PCR em gel de agarose e pela curva de dissociação da reação de qRT-PCR.

As análises de expressão por qRT-PCR foram conduzidas conforme descrito por Czechowski *et al.* (2005) e Udvardi *et al.* (2008). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc), sob as seguintes condições: 94°C por 5 min; 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 s, finalizando com uma extensão prolongada de 72°C por 10 min. Todas as reações foram feitas com a seguinte concentração final de reagentes: 1x *Taq buffer* (Fermentas), MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas), 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen), 400 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,5 U de enzima *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) e aproximadamente 120 ng cDNA.

As reações de qRT-PCR foram realizadas com o sistema de detecção ABI PRISM 7500 HT (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green (Invitrogen) como detector. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems), sendo conduzidas com 6,25 µL de Master Mix SYBR Green (Invitrogen), 0,25 µL de ROX (referência passiva), 200 nM de cada oligonucleotídeo, e 1 µL cDNA, totalizando 12,5 µL de reação. As condições para as reações foram as seguintes: passo inicial de 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min, ocorrendo a leitura da fluorescência a cada ciclo. Curvas de dissociação foram obtidas ao término de cada reação, através do aquecimento de 60°C para 95°C, subindo 1°C por min. A linha de base foi coletada entre os ciclos 3 e 15, sendo o *threshold* ajustado para a fase exponencial de amplificação de cada gene para a obtenção dos valores de Ct.

A eficiência das reações para a análise por qRT-PCR foi obtida através de curvas padrão de amplificação compostas por diluições seriadas de 6 pontos: 1, 1/3, 1/9, 1/27, 1/81 e 1/243, correspondendo a 120 ng, 40 ng, 13,33 ng, 4,44 ng, 1,48 ng, e 0,49 ng de RNA, respectivamente. A determinação da eficiência é um pré-requisito para a utilização do método de quantificação $\Delta\Delta$ Ct, devendo apresentar valores entre 90% e 110%. O nível de expressão de cada gene foi quantificado em relação ao controle não tratado, utilizando como padronização o gene controle endógeno *Pdf2/PP2AA3* ou *Actin2* (Czechowski *et al.*, 2005) e a equação 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, onde Δ Ct = Ct_{gene de interesse} - Ct_{controle endógeno} e $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct_{tratamento}- Δ Ct_{referência} (Livak & Schmittgen, 2001). Teste t de Student foi realizado para confirmação de diferenças significativas entre os níveis de expressão dos genes. Na Tabela Suplementar 1 encontra-se a descrição dos oligonucleotídeos utilizados.

Microarranjos CATMA e análise dos dados

O RNA das amostras utilizadas para os microarranjos CATMA foi extraído com o *QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade das amostras de RNA foi verificada através do *Agilent 2100 Bioanalyzer* com o *RNA 6000 Nano Assay Kit*, de acordo com as indicações do fabricante (Agilent Technologies).

A quantidade precisa de RNA foi determinada através do *RiboGreen*® *Quantitation Reagent* (Turner Bioscience) em um leitor *BMG FluoStar Galaxy* (BMG Labtechnologies). As amostras purificadas de RNA foram diluídas em tampão Tris-EDTA (TE) 1x para uma concentração de 50 ng/µL, tendo como valor inicial de referência a quantificação feita pela análise com o *Bioanalyzer*. Em placas de 96 poços, 49µL de TE 1x foram aliquotados e foi adicionado 1 µL de cada amostra diluída. Para a calibração foi utilizado oito pontos de diluição do padrão 0,24 - 5Kb ladder, com concentrações variando entre 2,5 ng/µL e 100 ng/µL. Em seguida, 50 µL de *Ribogreen* diluído 1/200 vezes foi adicionado a cada um dos poços. A placa foi coberta para proteger da luz e agitada por 5 min, sendo as amostras quantificadas em seguida.

Após essa etapa, as amostras de RNAm foram purificadas com colunas *QIAGEN RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) e amplificadas com *MessageAmpII aRNA Amplification* (Ambion), segundo as instruções do fabricante. 5 µg de RNA amplificado (aRNA) foram marcados com dCTP-Cy3 ou dCTP-Cy5 por transcrição reversa utilizando-se oligonucleotídeos randômicos. Cada amostra foi marcada duas vezes (*dye swap*), uma vez com Cy3 e uma com Cy5. As sondas resultantes foram purificadas com o *Qiaquick PCR Purification kit* (QIAGEN) e eluídas em 42 µL de TE. A quantidade de sondas marcadas foi determinada através do espectrofotômetro *Nanodrop* (NanoDrop Tecknologies).

Para a precipitação, foram misturados 30 pmol de cada alvo marcado com Cy3 e Cy5, sendo o volume ajustado para 200µL, para em seguida serem adicionados 20 µL de acetato de sódio 3M, 2 µL de acrilamida a 5 µg/µL e 500 µL de etanol 96%. As amostras foram incubadas por uma hora a -20°C e centrifugadas por 30 min a 14000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 70%, sendo centrifugadas por 10 min a 14000 g e 4°C. O sobrenadante foi removido e os tubos foram deixados abertos por 15 min para secar as amostras, sendo ressuspendidas em 35 µL de água Milli-Q.

As lâminas de microarranjos foram aquecidas por 10 min a 65°C e preparadas numa préhibridização em 50 mL de solução contendo 12,5 mL de SSC 20x, 5 mL de BSA 10% e 0,5 mL de SDS 10% e 32 mL de água milli-Q. As lâminas foram depositadas em recipientes *Coplin* e deixadas a 42°C por 45 min. Em seguida, foram lavadas com água milli-Q e isopropanol, sendo secas com um *spray* de nitrogênio. Para a hibridização das amostras, uma solução contendo 40 μ L de SSC 20x, 40 μ L de formamida e 1,6 μ L de SDS 10% pré-aquecido a 42°C foi preparada, enquanto as amostras marcadas foram desnaturadas a 95°C por 10 min. As lâminas foram colocadas em câmaras de hibridização *Corning* e, após isso, 35 μ L da solução de hibridização foram adicionados às amostras marcadas, sendo essa mistura aplicada às laminas, as quais foram deixadas a 42°C *overnight*. Antes da leitura, as lâminas foram lavadas consecutivamente em quatro soluções contendo, respectivamente, 2x SSC + 0,2% SDS (pré-aquecida a 42°C), 1x SSC, 0,2x SSC e 0,05x SSC por 7 min em cada. As lâminas foram secas com o *spray* de nitrogênio e foi feita a leitura, realizada com o *Genepix 4200A* (Axon instruments, USA). As análises estatísticas para correção de viés e ruídos nos dados foram realizadas de acordo com o descrito por Lurin *et al.* (2004).

Os genes diferencialmente expressos foram classificados segundo os critérios do *Gene Ontology* (GO) através do *Classification SuperViewer* (Provart & Zhu, 2003), disponível no *The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics* (BAR - http://www.bar.utoronto.ca), e através do *MapMan* versão 3.5 (Thimm *et al.*, 2004), ambos se baseando no banco de dados do TAIR de Janeiro de 2010. O *Genevestigator* (www.genevestigator.com; Zimmerman *et al.*, 2006) foi utilizado para avaliar o comportamento de genes selecionados em resposta a diferentes sinais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento das condições de inibição da transcrição para análise da estabilidade de transcritos

Análise prévia de expressão transiente (2h / 4h) do gene do FT AtbZIP63 em resposta a 2% de glicose mostraram que a repressão da expressão desse gene pelo açúcar ocorre por uma via independente da atividade sensora de HXK1, e evidências indicam que essa regulação não envolve mudanças nos níveis de ABA (Matiolli *et al.*, 2011 – Anexo 1). A combinação de glicose com ABA promove uma repressão sinérgica de *AtbZIP63* e de seu homólogo, *AtbZIP3*, indicando um mecanismo de regulação compartilhado que consiste da modulação da sensibilidade de glicose por ABA. Contudo, a repressão sinérgica de *AtbZIP63* em resposta à combinação dos sinais glicose e ABA resulta parcialmente de um controle pós-transcricional da estabilidade de RNAm. Esta conclusão deriva da observação de que linhagens transgênicas homozigotas de *A. thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) para um lócus do gene marcador *Gus* sob o controle do promotor de *AtbZIP63* por ABA e glicose (Figura 5).



Figura 5. A repressão sinérgica de *AtbZIP63* por ABA + glicose não pode ser reproduzida pelo promotor desse gene. Plântulas transgênicas das linhagens homozigotas PH3.13.4 e PH3.35.8 contendo o gene repórter *GUS* sob controle do promotor de *AtbZIP63*, de sua região 5'UTR e de 36 pb da sequência codificante foram crescidas por 6 dias em MS/2 líquido sob luz constante à 22°C e tratadas em seguida com 100 μ M ABA, glicose 2% (Glc) e manitol 2% (Man) por 4h. Os valores de expressão são dados em relação ao controle não-tratado (Ctrl) da linhagem. Os níveis dos transcritos foram normalizados em relação aos de *PP2AA3*. As barras acima de cada coluna representam os desvios padrões médios de três experimentos independentes. Abaixo estão indicados os valores de expressão. Adaptado de Matiolli *et al.* (2011 – Anexo 1).

A cordicepina (3'-deoxiadenosina) é uma molécula análoga à adenina que quando incorporada interrompe a polimerização da cadeia de RNAm por não permitir a formação da ligação fosfodiéster. Ela atua, portanto, como um inibidor da elongação da transcrição (Seeley *et al.*, 1992; Holtorf *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2002; Palusa *et al.*, 2007). Com o objetivo de estabelecer e otimizar as condições de inibição da transcrição, uma curva de resposta a doses crescentes de cordicepina (50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL) foi conduzida com uma cinética de tratamentos de 1h, 2h e 4h acompanhando o decaimento dos níveis de RNAm dos transcritos classificados como instáveis *At5g03430* e *MPK3* (Gutiérrez *et al.*, 2002) por qRT-PCR. Os níveis

foram normalizados em relação aos níveis de transcritos de *Actin2* ou *PP2AA3*, ambos estáveis. Tratamentos com 100 μ g/mL e 200 μ g/mL de cordicepina permitiram evidenciar o decaimento de *At5g03430* e *MPK3*, enquanto 50 μ g/mL foi aparentemente ineficiente para inibir a transcrição de todos os genes analisados (Figura 6) e, portanto, essa concentração foi excluída dos experimentos subsequentes.



Figura 6. Avaliação da eficiência da inibição da transcrição por cordicepina. O decaimento dos níveis de RNAm dos transcritos At5g03430 e *MPK3* após tratamento de 2 horas com 50 µg/mL, 100 µg/mL ou 200 µg/mL de cordicepina em relação ao controle não-tratado. Os níveis dos transcritos foram normalizados em relação aos de *PP2AA3*. As barras verticais sobre cada coluna indicam o desvio padrão de duas réplicas biológicas. Os números abaixo de cada barra representam a variação dos níveis de transcrito em resposta a cada tratamento, em relação à amostra não tratada (Ctrl).

Uma análise de decaimento foi conduzida com outro inibidor de transcrição, a Actinomicina D, um antibiótico que forma um complexo com o DNA bloqueando o movimento da RNA polimerase (Seeley *et al.*, 1992; Holtorf *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000). Os tratamentos foram realizados nas mesmas condições utilizadas para os ensaios com cordicepina. Contudo, a cordicepina mostrou-se mais eficiente que a actinomicina na inibição da transcrição de *AtbZIP63* (Figura 7), possivelmente devido a uma melhor penetração da cordicepina em tecidos foliares (Johnson *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2002). Além disso, o tratamento com

actinomicina induziu a expressão de *MPK3* (Figura 7), transcrito considerado de meia-vida curta por Gutiérrez *et al.* (2002).



Figura 7. Análise comparativa de eficiência da inibição da transcrição por cordicepina e Actinomicina D. Os níveis de RNAm de *AtbZIP63* e *MPK3* foram avaliados em plântulas de *Arabidopsis* de 6 dias após tratamento com 100 μ g/mL de cordicepina ou 100 μ g/mL de actinomicina D por 3h em relação ao controle sem tratamento (Ctrl). Os níveis dos transcritos foram normalizados em relação aos de *PP2AA3*. As barras verticais sobre cada coluna indicam o desvio padrão de três réplicas biológicas. Os números abaixo de cada barra representam a variação dos níveis de transcrito em resposta a cada tratamento, em relação à amostra não tratada (Ctrl).

Para uma análise mais robusta do tempo de tratamento necessário para poder avaliar o envolvimento de um controle da estabilidade do RNAm, ampliamos a análise para *AtbZIP9*, outro gene de fator de transcrição bZIP homólogo próximo a *AtbZIP63*. O padrão das respostas apresentado tanto por *AtbZIP9* como por *AtbZIP63* após os tratamentos com cordicepina foi similar ao obtido para os transcritos instáveis *At5g03430* e *MPK3*, usados como controles de RNAm de meia-vida conhecida (Figura 8). Nota-se um decaimento mais acentuado dos níveis dos transcritos na primeira hora de tratamento, seguido de uma fase de estabilização (Figura 8). A diminuição do decaimento de transcritos pode ser considerada uma consequência do comprometimento das funções celulares devido à inibição da transcrição, como por exemplo, a

degradação dos próprios efetores do processo de decaimento de RNAm (Seeley *et al.*, 1992; Holtorf *et al.*, 1999). Dessa forma, as medidas de meia-vida são mais adequadamente obtidas a partir de tempos curtos de tratamento e, por isso, definimos o período de inibição de transcrição para 1h para os experimentos.



Figura 8. Cinética de decaimento dos níveis de RNAm de *AtbZIP9*, *AtbZIP63*, *MPK3* e *At5g03430* após o tratamento com cordicepina. Os níveis dos transcritos foram normalizados em relação aos de *PP2AA3*. As barras verticais em cada ponto indicam o desvio padrão médio de ao menos três réplicas biológicas.

Para ser confirmada a eficácia da inibição da transcrição, a forte ativação transcricional do gene *Rd29b* por ABA (Uno *et al.*, 2000) foi avaliada após o tratamento com cordicepina (Figura 9). O protocolo estabelecido permitiu inibir quase completamente (97%) a indução transcricional desse gene pelo hormônio (Figura 9).



Figura 9. Inibição da ativação transcricional de *AtRd29b* por ABA na presença de cordicepina, utilizada para avaliar a eficiência da inibição da transcrição. Expressão em relação ao controle sem tratamento (Ctrl) de plântulas tratadas por 2h com 100 μ M ABA (ABA); plântulas expostas a 100 μ g/mL de cordicepina por 3h (Cord); e plântulas expostas a 100 μ g/mL de cordicepina por 1h seguido de 2h com 100 μ g/mL de cordicepina e 100 μ M ABA (Cord + ABA). Os níveis dos transcritos foram normalizados em relação aos de *Actin2*. As barras verticais sobre cada coluna indicam o desvio padrão de três réplicas biológicas. Os resultados de qRT-PCR de amostras tratadas com cordicepina que se mostraram significativos pelo teste t de Student estão marcados com **a.** Adaptado de Matiolli *et al.* (2011 – Anexo 1).

Outros genes com respostas fortes à glicose ou ABA identificados por Li *et al.* (2006) também foram avaliados em condições de inibição de transcrição. Apesar de não ser conhecido se suas vias de respostas são essencialmente transcricionais como no caso de AtRd29b, eficiência de pelo menos 97% na inibição da transcrição também foi observada para os genes At5g51440 e COR15A, fortemente induzidos por glicose e ABA, respectivamente (Tabela Suplementar 2). No caso de genes cuja indução em resposta ao sinal é mais tênue, os 3% residuais de atividade transcricional não foram suficientes para que a resposta ao sinal após a inibição da transcrição fosse significativa, como exemplificado para At2g35300 em resposta ao ABA, e para *FLA16*, *GPT2* e At5g26220 em resposta à glicose (Tabela Suplementar 2). A eficiência da inibição da

transcrição também pôde ser verificada para genes reprimidos por glicose ou ABA, como por exemplo, *At1g23390* e *At5g48430*, respectivamente. Para ambos não há diferença significativa nas respostas apresentadas pelas amostras tratadas com cordicepina + sinal em relação às tratadas somente com cordicepina, ao passo que na ausência do inibidor os níveis desses transcritos são reduzidos em relação ao controle sem tratamento, revelando se tratar de regulações essencialmente transcricionais (Tabela Suplementar 2). O fato de haver decaimento dos níveis desses transcritos instáveis.

Esses dados confirmam que a dose de 100 µg/mL de cordicepina por um período de 1h para as análises de regulação pós-transcricional em resposta a glicose e/ou ABA é eficiente. Usando esse protocolo de inibição da transcrição, mostramos que a meia-vida do RNAm de AtbZIP63 é de 95 minutos, inferida pelo decaimento dos níveis de RNAm pela comparação entre o controle não-tratado e amostras tratadas somente com cordicepina. Isso implica que aproximadamente 83% da repressão sinérgica desse gene após 4h de tratamento com a combinação de glicose + ABA pode ser resultado de um controle pós-transcricional (Matiolli et al., 2001 - Anexo 1). Isso se deve ao fato de a combinação glicose + ABA promover uma redução nos níveis de AtbZIP63 em 33 vezes após 4h, enquanto o esperado pela meia-vida seria de apenas 5,6 vezes (Matiolli *et al.*, 2011). Esse último dado levanta a pergunta de qual seria a importância das regulações pós-transcricionais na sinalização de glicose e ABA. Para abordar essa pergunta numa escala genômica, os perfis de resposta a glicose ou ABA em condições de inibição da transcrição foram analisados através da plataforma de microarranjos CATMA (Sclep et al., 2007 – http://www.catma.org/), em colaboração com o Dr. Jean-Pierre Renou, do Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – Unité de Recherche em Genomique Végétale (URGV), França.

Regulação pós-transcricional na sinalização por glicose e ácido abscísico: uma avaliação em escala genômica em A. thaliana

Para se evidenciar o possível envolvimento de regulações pós-transcricionais nas respostas mediadas por glicose e/ou ABA através dos microarranjos CATMA, as comparações foram feitas em relação a amostras tratadas somente com cordicepina, como representado na Figura 10.



Figura 10. Representação esquemática das comparações feitas nos experimentos de microarranjos para avaliar regulações pós-transcricionais mediadas por glicose e/ou ABA em escala genômica. Plântulas de seis dias tiveram a transcrição inibida por 1h com 100 μ g/mL de cordicepina, seguindo tratamento com glicose 2% e/ou ABA 100 μ M, ou manitol 2% (controle osmótico) por 2h. Cada par de setas indica a comparação de uma réplica biológica entre dois tratamentos e o "*dye swap*", realizado para corrigir viés nos resultados causados pela marcação com Cy3 (verde) e Cy5 (vermelho), como detalhado nos Materiais e Métodos. Cord: cordicepina; Glc: glicose; Man: manitol.

Considerando-se que a transcrição foi eficientemente inibida (Figura 9), a "repressão" de um gene deve refletir uma perda de estabilidade do RNAm promovida pelo sinal. Ou seja, o decaimento dos níveis do transcrito é mais rápido na amostra tratada com cordicepina + sinal em relação à amostra tratada somente com cordicepina. Por sua vez, a "indução" resultaria da estabilização do RNAm promovida pelo sinal, uma vez que não há transcrição. Ou seja, o decaimento dos níveis do transcrito é mais lento na amostra tratada com cordicepina + sinal. Os transcritos que apresentaram alguma resposta osmótica (resposta a manitol) foram excluídos da análise, resultando ao final da análise na identificação de um total de 962 genes (p < 0,05) diferencialmente expressos após os tratamentos, dos quais 204 em resposta à glicose, 245 a ABA e 513 a ABA + glicose (Tabela 1). Na Figura 11 está representado o número de genes exclusivos e compartilhados entre cada tratamento.

Tratamento	Estabilizados	Desestabilizados	Total 204 245	
Cordicepina + Glicose	28	176		
Cordicepina + ABA	207	38		
Cordicepina + Glicose + ABA	246	267	513	

Tabela 1. Número de genes diferencialmente expressos em resposta a glicose e/ou ABA após a inibição da transcrição.



Figura 11. Diagrama Venn mostrando o número de genes exclusivos e compartilhados entre (**A**) o total regulado por cordicepina + glicose (CG), cordicepina + ABA (CA) e cordicepina + glicose + ABA (CGA); (**B**) entre os estabilizados; (**C**) entre os desestabilizados por esses sinais.

Os dados da Tabela 1 e Figura 11 mostram uma clara distinção no sentido das regulações pós-transcricionais por glicose e ABA. Enquanto a maioria dos transcritos regulados por ABA foi estabilizada (84,5%), a glicose atuou no sentido oposto, desestabilizando 86,3% dos transcritos que responderam a esse sinal. No total, somente 16 genes apresentaram regulação pós-transcricional comum em resposta à glicose ou ABA (Figura 11A), dos quais oito foram estabilizados tanto por ABA como glicose (Figura 11B), enquanto cinco foram desestabilizados por ambos os tratamentos. (Figura 11C). Três transcritos responderam de forma oposta aos dois tratamentos, sendo estabilizados por ABA e desestabilizados por glicose (Tabela Suplementar 3). Portanto, as regulações pós-transcricionais induzidas por glicose e ABA aparentemente agem essencialmente sobre fatores distintos.

Surpreendentemente, apenas 68% dos genes regulados por glicose e 64% dos regulados por ABA responderam de maneira similar à combinação glicose + ABA (Figura 11A), ao passo

que 44% do total de genes regulados por glicose + ABA não apresentou resposta significativa aos tratamentos por glicose ou ABA separadamente. Esses dados sugerem a existência de regulações antagônicas por glicose e ABA e que esses dois sinais podem atuar de forma aditiva (Tabelas Suplementares 4 e 5).

Com o intuito de dar maior suporte aos resultados obtidos, estes foram comparados com os dados de Li et al. (2006) e Price et al. (2004). Ambos os trabalhos analisaram mudanças de perfis de RNAs em escala genômica em resposta à glicose ou ABA usando condições experimentais similares às nossas, exceto por não haver inibição da transcrição. Dos genes que responderam de forma pós-transcricional à glicose, 51,8% e 62,4% também foram identificados por esses trabalhos, respectivamente (desconsiderando as sondas exclusivas da plataforma CATMA, ausentes na plataforma Affymetrix usada por esses autores). Com relação à resposta pós-transcricional a ABA, 57,4% dos genes também foram identificados por Li et al. (2006). A diferença no número de genes sobrepostos deve-se provavelmente ao critério mais restritivo adotado por esses autores para classificar um gene como diferencialmente expresso. Por exemplo, adotando-se um corte de expressão mais restritivo de $\log_2 \ge |1|$ para nossos resultados, a sobreposição com os dados de Li et al. (2006) das respostas à glicose e ABA aumentam para 67% e 78%, respectivamente. Por outro lado, uma resposta pós-transcricional fraca pode ser mascarada pela transcrição e, dessa forma, ela só seria detectada em condições de inibição de transcrição, caracterizando os genes identificados exclusivamente por nossos experimentos. De uma forma geral, considerando o total de genes identificados por Li et al. (2006) e Price et al. (2004) como responsivos à glicose ou ABA, as comparações sugerem que ao menos 9,7% e 24,2% dos genes regulados por glicose ou ABA, respectivamente, respondem ao menos de forma parcial a esses sinais através de regulações pós-transcricionais.

Para corroborar os resultados obtidos pelos microarranjos, procuramos validar os dados por qRT-PCR. Por serem técnicas diferentes, os valores absolutos dos resultados de microarranjos e de qRT-PCR não são diretamente comparáveis. Dessa forma, foram apenas considerados os sentidos (estabilização ou desestabilização) das regulações. Utilizando amostras de novos experimentos conduzidos nas mesmas condições usadas para as análises em larga escala, foi avaliado um conjunto de 34 genes representativos de eventos de estabilização ou desestabilização por glicose ou ABA. Destes 34 genes, 31 tiveram o sentido de sua regulação reproduzido (91%), dos quais 29 (85%) apresentaram suporte estatístico significativo pelo teste t de Student (p < 0,05; Tabela Suplementar 6), apontando para uma alta confiabilidade dos resultados obtidos.

Para compreender de que forma as regulações transcricionais e pós-transcricionais podem atuar sobre o controle dos níveis de um transcrito, um conjunto de genes potencialmente relevante para essa abordagem foi selecionado a partir da comparação entre nossos dados de regulações pós-transcricionais com dados da literatura descrevendo genes regulados por glicose ou ABA (Li *et al.*, 2006), para uma análise comparativa detalhada (Tabela 2). A comparação entre os níveis do transcrito após o tratamento com o inibidor de transcrição em relação ao controle não-tratado é um indicativo de sua meia-vida. Por essa relação, é possível notar a existência de transcritos que sofrem um decaimento mais lento, como *At1g23200, SPS2F* e *NDL1*, transcritos com um decaimento mais acelerado, como *PYL7* e *CIPK6*, e transcritos instáveis, como *MYB3, PYL4* e *BT2* (Tabela 2). Além disso, os transcritos *DREB1C* e *ERD10* apresentaram estabilização após a inibição da transcrição (Tabela 2), mais provavelmente refletindo o envolvimento de repressores instáveis no controle desses RNAm (Figura 12A).

A análise comparativa da amplitude de variação dos níveis dos transcritos em resposta à glicose ou ABA na presença ou ausência de cordicepina revelou a existência de regulações que podem ser explicadas por um controle essencialmente pós-transcricional, e regulações que também dependem de fatores transcricionais. No primeiro caso, a amplitude da resposta (número de vezes) ao sinal sem e com cordicepina são similares (por exemplo, *ANAC032* ou *At1g23200*, transcritos estabilizados, e *NDL1* ou *BT5*, desestabilizados – Tabela 2). Já nas regulações que além do controle pós-transcricional também depende da atividade transcricional, a amplitude da resposta ao sinal não é totalmente reproduzida após a inibição da transcrição, contudo é significativamente diferente da resposta observada somente à cordicepina (por exemplo, At2g17880 e AKINBETA1 – Tabela 2). Esta última categoria provavelmente requer fatores instáveis cuja manutenção depende da transcrição (Figura 12B). Alguns casos, contudo, apresentaram aumento dos níveis de transcrito após a inibição da transcrição em uma ordem que excede os 3% esperados segundo a eficiência prevista pela análise de expressão de *Rd29b* (Figura 9). Foram eles *DREB1C*, *DREB2A*, *SPS2F* e At5g50360 (Tabela 2). Embora isso sugira a participação de fatores transcricionais e pós-transcricionais, nenhum cenário satisfatório para

explicar essas observações pôde ser elaborado. Novas análises considerando a possibilidade do envolvimento de mecanismos de controle de estabilidade de RNAm serão realizadas.

Outro processo mais complexo foi detectado no caso de *MYB3* e *PYL7*, para os quais uma regulação dos transcritos é evidenciada apenas em condições de inibição de transcrição (Tabela 2). Uma possível explanação para esse padrão é uma regulação por *feed-foward* ou retro-regulação negativa (Figuras 12C e 12D, respectivamente).



Figura 12. Possíveis interações entre resposta transcricional e pós-transcricional sobre o controle dos níveis de um transcrito. A intensidade das regulações está representada pela espessura das setas. Aumento dos níveis de um transcrito está representado por setas em vermelho ([↑]), e diminuição por setas em verde ([↓]) **A.** Estabilização de um transcrito após a inibição da transcrição em relação ao controle não tratado. **B.** Envolvimento de fatores transcricionais e pós-transcricionais no controle dos níveis de um transcrito. **C.** Regulação por *feed-foward*, pela qual um mesmo sinal ativa um regulador positivo e um negativo de um gene e que dependem diferencialmente da atividade transcricional. Neste caso, na ausência do inibidor de transcrição, não é notada alteração nos níveis do transcrito em resposta ao sinal. **D.** Retro-regulação negativa envolvendo um fator dependente da transcrição, revelando uma regulação somente na presença do inibidor da transcrição.

		Expressão Relativa							
	Identificação	Controle	ABA	Glc	Cord	Cord + ABA	Cord + Glc		
Caso 1	ANAC032	1,00	-	6,34 ^a	-2,0 ^b	-	3,83° (7,65)		
	At1g23200	1,00	-	2,63 ^a	-1,46	-	1,84 ^c (2,67)		
	At1g26500	1,00	-	2,43 ^a	-9,37 ^b	-	-2,98 ^c (3,14)		
	PYL7	1,00	3,27 ^a	-	-5,13 ^b	-1,42 ^c (3,61)	-		
	PYL4	1,02	-42,8 ^a	-	-16,53 ^b	-50,25 ^c (-3,1)	-		
	NDL1	1,00	-	-2,21 ^a	-1,41	-	-3,77 ^c (-2,67)		
	BT5	1,00	-	-28,24 ^a	-14,86 ^b	-	-41,31 ^c (-2,78)		
	TSP8	1,00	-	-9,5ª	-9,71 ^b	-	-24,64 ^c (-2,54)		
	DREB1C	1,04	20,08 ^a	-	1,06	6,55 ^c (6,17)	-		
	ERD10	1,05	-	39,32 ^a	2,37	-	13,08° (5,51)		
	SPS2F	1,05	50,79 ^a	-	-1,25	6,73 ^c (8,42)	-		
	At5g50360	1,03	732,2 ^a	-	-7,68 ^b	52,58 ^c (403,8)	-		
	AtbZIP60	1,00	3,80 ^a	-	-5,48 ^b	-2,43 ^c (2,26)	-		
	СІРКб	1,01	7,22 ^a	-	-3,96 ^b	-1,73 ^c (2,29)	-		
	DREB2A	1,01	17,63 ^a	-	-2,73 ^b	2,71 ^c (7,4)	-		
	AT5G64510	1,00	3,68 ^a	-	-1,92	1,38 ^c (2,65)	-		
so 2	NF-YB2	1,02	11,32 ^a	-	-6,94 ^b	-1,45 ^c (6,06)	-		
Ca	P5CS1	1,00	68,84 ^a	-	-2,06 ^b	2,29 ^c (4,72)	-		
	PYL6	1,02	-124,6 ^a	-	-19,28 ^b	-74,7 ^c (-3,87)	-		
	BT2	1,00	-	-9,33ª	-66,3 ^b	-	-293,1° (-4,42)		
	NFU3	1,00	-	-2,67 ^a	-2,27 ^b	-	-19,47 ^c (-8,58)		
	PYL5	1,01	-8,83 ^a	-	-15,5 ^b	-31,0 ^c (-2,0)	-		
	CRK30	1,01	-79,9 ^a	-	-22,7 ^b	-45,4 ^c (-2,0)	-		
	At2g17880	1,00	-	-32,2ª	-6,99 ^b	-	-19,79 ^c (-2,83)		
	AKINBETA1	1,01	-	-13,41 ^a	-5,35 ^b	-	-11,31 ^c (-2,11)		
Caso 3	МҮВЗ	1,00	-	1,08	-15,65 ^b	-	-7,65 ^c (2,05)		
	PYL7	1,00	-	1,05	-4,62 ^b	-	-2,15 ^c (2,15)		

Tabela 2. Níveis de RNAm obtidos por qRT-PCR para transcritos sob controle pós-transcricional.

Nota. Os valores representam o número de vezes que os níveis de um transcrito é maior (valores positivos) ou menor (valores negativos) que o encontrado no controle sem tratamento em relação às amostras tratadas com ABA, glicose (Glc), cordicepina (cord), cordicepina + ABA (Cord + ABA), ou cordicepina + glicose (Cord + Glc). Entre parênteses está indicado a resposta pós-transcricional pela comparação Cord *vs* Cord + sinal. Teste t de Student (p < 0,05) e *fold* \geq |2,0| foram considerados para uma diferença significativa entre as comparações de **a**. Controle *vs* Glc ou ABA; **b**. Controle *vs* Cord; **c**. Cord *vs* Cord + ABA.

Regulação pós-transcricional em resposta à combinação de Glicose e ABA

A avaliação do efeito combinado de glicose e ABA na presença de cordicepina foi realizada para identificar possíveis regulações sinérgicas pós-transcricionais. O efeito sinérgico seria considerado caso o sinal da resposta apresentada ao tratamento com glicose + ABA fosse superior à soma das respostas aos tratamentos com glicose e ABA separadamente.

Considerando essa definição, nenhum caso de efeito sinérgico foi encontrado (Tabela Suplementares 3, 7 e 8). Contudo, glicose e ABA aparentemente podem exercer um efeito aditivo sobre a resposta dos transcritos (Tabelas Suplementares 3 a 5, 7 e 8). Sugerimos que a repressão sinérgica por glicose e ABA requer a presença de um fator dependente da transcrição, como observado para *AtbZIP63* (Matiolli *et al.*, 2011 – Anexo 1).

Classificação e análise dos genes por ontologia

Para compreender melhor o sentido fisiológico das regulações pós-transcricionais em resposta ao ABA e à glicose, classificamos os transcritos diferencialmente expressos segundo suas possíveis funções de acordo com o *Gene Ontology*, utilizando a ferramenta *Classification SuperViewer* do servidor BAR, e pelo software *MapMan* (Thimm *et al.*, 2004), tendo como banco de dados o TAIR. Para essas análises, foram utilizados os transcritos que apresentaram resposta pós-transcricional significativa aos tratamentos com ABA, glicose, e os que responderam exclusivamente à combinação desses sinais.

O mapeamento realizado pelo *MapMan* (Figura 13) permite evidenciar que as regulações pós-transcricionais por glicose e ABA atuam basicamente sobre as mesmas categorias de ontologia, embora através de regulações opostas e envolvendo fatores distintos, como destacado previamente pela Tabela 1 e Figura 11. Ressalta-se um envolvimento relevante do controle pós-transcricional mediado por esses sinais com transcritos relacionados à resposta a estresse, controle da transcrição, desenvolvimento, respostas a hormônios e modificação e degradação de proteínas (Figura 12). Similarmente, as análises de enriquecimento pelo *Classification SuperViewer* (Figura Suplementar 1) indicam que as respostas pós-transcricionais à glicose ou ABA atuam principalmente sobre quatro processos biológicos correspondentes a resposta a estímulo biótico ou abiótico e desenvolvimento.





Figura 13. Mapeamento dos transcritos com resposta pós-transcricional (A) à glicose; (B) ao ABA; (C) de forma exclusiva à combinação glicose + ABA de acordo com suas funções, feita utilizando o software *MapMan* (banco de dados do TAIR de Janeiro de 2010). Os transcritos estão representados como quadrados associados às funções descritas. Estabilização está representada por vermelho, desestabilização por verde. Os dados também indicam uma estreita relação da regulação pós-transcricional modulada por glicose e ABA com fatores de controle da transcrição (78 FTs) e quinases (22). De uma forma geral, atuação da regulação pós-transcricional sobre um número relevante de genes com funções centrais em vias de sinalização, como exemplo os FTs e quinases, sugere a necessidade de haver respostas adaptativas rápidas aos estímulos ambientais.

Fatores de transcrição e quinases: regulação pós-transcricional por ABA e glicose como mecanismo de ação rápida em pontos centrais da resposta a estresses e controle do desenvolvimento

Como a análise de ontologia apontou para uma relação significativa dos transcritos sob controle pós-transcricional por glicose ou ABA e resposta a estresse abiótico (Figura 13), comparamos nossos dados com os obtidos por Matsui et al. (2008), no qual foi avaliada a alteração do transcriptoma de A. thaliana em resposta à 2h e 10h de tratamento de seca, frio e alta salinidade (Tabela Suplementar 9). As análises confirmam uma grande correlação entre os transcritos sob controle pós-transcricional por glicose e principalmente por ABA e genes responsivos a estresses. Do total de transcritos regulados de forma pós-transcricional por ABA, até 21%, 61% e 62% também são responsivos a condições de frio, seca e alta salinidade, respectivamente (Tabela Suplementar 9), valores que correspondem à importância do ABA nas respostas adaptativas a estresse. Com relação à glicose há uma menor sobreposição, uma vez que 14%, 32% e 51% do total de transcritos sob controle pós-transcricional ao açúcar também participam de respostas a frio, seca e alta salinidade, respectivamente (Tabela Suplementar 9). Nota-se ainda uma maior sobreposição dos transcritos sob controle pós-transcricional com as respostas após 10h de estresse, o que pode representar uma resposta adaptativa em duas fases: uma emergencial iniciada em curto prazo que ocorreria de forma pós-transcricional, seguida de uma fase dependente da ativação transcricional de adaptação de longo prazo.

Outra categoria enriquecida pelas análises de ontologia é a que envolve os FTs. No total, identificamos 78 genes de fatores de regulação da transcrição sob controle pós-transcricional por ABA e/ou glicose (Tabelas Suplementares 10 a 12), sugerindo um impacto significativo do controle da degradação de RNAm sobre a rede de regulação transcricional relacionadas a esses sinais. Foram 23 FTs regulados de forma pós-transcricional por glicose, 38 por ABA e 16

exclusivamente pela combinação glicose + ABA. Três famílias de FTs aparecem enriquecidas, com um número significativo de representantes: AP2-EREBP, com 18 FTs, bZIP, com 10 FTs, e Myb, com 8 FTs (Tabelas Suplementares 10 a 12).

Interessantemente, a regulação pós-transcricional por ABA incluiu membros de famílias de FTs que estão envolvidos nas cascatas transcricionais da resposta à seca. Podemos citar a presença de cinco <u>ABA responsive element binding protein/ABRE binding factor</u> (AREB/ABF), que são reguladores do tipo bZIP; oito DREB/CBF (<u>DRE binding protein/CRT binding factor</u>), FTs do tipo AP2/EREBP; quatro FTs NF-Y (*nuclear factor Y*) do tipo *CCAAT-binding*; três FTs *C2H2 zinc finger protein* (ZFP); e cinco NAC/SNAC (<u>Stress-inducible NAM, ATAF, e CUC</u>) (Zhu, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2010). A Figura 14 exemplifica essa integração de sinais na resposta adaptativa a estresse.



Figura 14. Representação esquemática das sinalizações em resposta à seca, calor e frio, envolvendo a participação de classes de fatores de transcrição que também apresentaram regulação pós-transcricional em resposta a ABA e/ou glicose. Adaptado de Yang *et al.* (2010). Regulações pós-transcricionais foram encontradas para FTs dos seguintes grupos: NF-YA, NF-YB, AREB, CBF/DREB, SNAC (marcados pelas estrelas – Tabelas Suplementares 10 a 12).

Essa relação dos FTs sob controle pós-transcricional em resposta ao ABA com respostas adaptativas a condições de estresse foi confirmada pelas regulações (indução ou repressão) desses FTs em resposta a condições de seca (30/38 FTs – Figura 15), estresse osmótico (35/38 FTs – Figura 15) e salino (34/35 FTs – Figura 15). O padrão observado para as respostas pós-transcricionais a ABA se assemelha ao das respostas de curto prazo ao hormônio (*ABA Study 6* – Figura 15). Glicose, por outro lado, atuou de forma a desestabilizar transcritos de FTs envolvidos com resposta à seca (Figura 16), uma vez que dos 23 transcritos de FTs sob controle pós-transcricional por glicose, 16 estão relacionados à resposta adaptativa à seca (Figura 16).

As comparações pelo *Genevestigator* também apontaram para uma co-regulação significativa de FTs sob regulação pós-transcricional por glicose e respostas a condições de estresse energético (Figuras 16). Baixa concentração de CO_2 , extensão da noite e seca limitam a fotossíntese, levando à baixa produção de açúcares. Dessa forma, genes induzidos nessas situações de estresse estariam envolvidos com resposta adaptativa a estresse energético. Portanto, seria esperado que fossem reprimidos na presença de reposição energética, como por exemplo tratamento com glicose. De fato, dos 23 transcritos de FTs que se mostraram responsivos de forma pós-transcricional à glicose, 21 apresentam resposta no sentido oposto durante a privação de CO_2 , 19 à extensão da noite e 16 à seca (Figura 16), sugerindo um envolvimento da regulação pós-transcricional na adequação a estresse de privação energética.

A desestabilização dos RNAm desses FTs pela glicose (Figura 16) provavelmente reflete um processo visando acelerar a transição de um programa catabólico induzido pela carência energética para um programa anabólico, desativando a via catabólica na qual esses FTs podem estar envolvidos. Tal suposição está de acordo com o fato de que 53 transcritos dos 204 regulados pós-transcicionalmente por glicose (26%) também são alvos de KIN10 (Tabela Suplementar 13), quinase que controla a reprogramação da expressão gênica em resposta a condições que promovem deficiência energética, como escuridão, açúcar e condições de estresse (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007).



Figura 15. Padrão de expressão dos FTs regulados de forma pós-transcricional por ABA em resposta à seca, estresse osmótico, estresse salino e ácido abscísico em condições normais de transcrição, segundo dados públicos de microarranjos disponíveis no *Genevestigator*, ferramenta que permite a comparação entre dados públicos de microarranjos. O padrão de resposta pós-transcricional de cada transcrito, denotado pelo seu AGI, está representado pela barra horizontal vermelha (estabilização) ou verde (desestabilização) na parte superior. Cada linha representa as condições experimentais usadas nos microarranjos, com vermelho indicando indução, e verde, repressão.



Figura 16. Padrão de expressão dos FTs regulados de forma pós-transcricional por glicose em resposta à baixa concentração de CO_2 , extensão da noite, seca, e glicose em condições normais de transcrição, segundo dados públicos de microarranjos disponíveis no *Genevestigator*, ferramenta que permite a comparação entre dados públicos de microarranjos. O padrão de resposta pós-transcricional de cada transcrito, denotado pelo seu AGI, está representado pela barra horizontal vermelha (estabilização) ou verde (desestabilização) na parte superior. Cada linha representa as condições experimentais usadas nos microarranjos, com vermelho indicando indução, e verde, repressão.

Além dos FTs, as proteínas do grupo das quinases são centrais no processo de percepção e transdução de sinais para a adaptação a estresses. Dentre as quinases descritas em plantas, <u>Mitogen-activated protein kinases</u> (MAPKs), <u>calcium-dependent protein kinases</u> (CDPKs), <u>calcineurin B-like</u> (CBL) e CBL-<u>interacting protein kinase</u> (CIPK), <u>sucrose-non-fermenting</u> protein (SNF1) e SNF1-<u>related kinase</u> 2 e 3 (SnRK2 e SnRK3) estão associadas a resposta a estímulos ambientais e adaptação osmótica (Yang *et al.*, 2010). No total, identificamos 22 quinases do conjunto dessas famílias reguladas de forma pós-transcricional por glicose ou ABA e pela combinação dos sinais (Tabelas Suplementares 14 a 16).

Em *A. thaliana*, uma das principais superfamílias de quinases é a CDPK-SnRK (Hrabak *et al.*, 2003), sendo também a que apresentou maior número de transcritos com regulação póstranscricional por glicose e/ou ABA (Tabelas Suplementares 14 a 16). As quinases SnRK foram divididas em três classes: SnRK1, SnRK2 e SnRK3 (Halford *et al.*, 2003). O genoma de *A. thaliana* contém dez genes SnRK2 e 29 genes SnRK3, enquanto há somente duas formas ativas de SnRK1, SnRK1.1 e SnRK1.2, também conhecidas como KIN10 e KIN11 (Hrabak *et al.*, 2003). No total, nove quinases pertencentes a essa superfamília foram reguladas de forma póstranscricional (Tabelas Suplementares 14 a 16): SnRK3.16 e SnRK2.8, desestabilizadas por glicose; SnRK3.14, SnRK3.22, SnRK3.9 e SnRK2.7 estabilizadas por ABA; e SnRK3.24, SnRK3.10 e SnRK3.15 estabilizadas exclusivamente por glicose + ABA.

Como as quinases SnRK2 e SnRK3 podem ativar reguladores da transcrição do tipo AREBP (como os FTs do tipo bZIP) para desencadear programas de adequação ao estresse abiótico (Figura 17), os dados apresentados sobre a regulação pós-transcricional envolvendo AREBs (Tabelas Suplementares 10 a 12) e quinases (Tabelas Suplementares 14 a 16), principalmente em resposta ao ABA, possivelmente reflete um duplo controle visando coordenar uma resposta rápida e eficiente ao estresse.



Figura 17. Convergência das respostas adaptativas a estresse envolvendo quinases e fatores de transcrição. *ABA response element binding proteins* (AREBPs) atuam como nó na ligação entre as redes de sinalização metabólica e de estresse, sendo potenciais alvos de fosforilação pelos três tipos de *SNF-related protein kinases* (SnRKs), apresentando múltiplas funções na resposta a estresses, germinação e desenvolvimento. Destacados em azul estão os grupos de quinases que apresentaram regulação pós-transcricional por glicose e ABA em nossos estudos (Tabelas Suplementares 14 a 16); em amarelo, o grupo de fatores de transcrição da família bZIP que também apresentou regulação pós-transcricional por esses sinais (Tabelas Suplementares 10 a 12). SnAKs (*SnRK1-activating kinases*). Adaptado de Hey *et al.* (2010).

A participação do controle da estabilidade de transcritos associada à fatores envolvidos com outros hormônios

A análise por ontologia mostrou que a regulação pós-transcricional por glicose ou ABA envolveu também transcritos relacionados a outros hormônios, seja por síntese/degradação, transdução do sinal ou resposta à ativação promovida pelo hormônio (Tabelas Suplementares 17 e 18). Trata-se de um dado interessante, uma vez que através de uma análise utilizando dados públicos de microarranjos, Nemhauser *et al.* (2006) sugeriram que são poucos os genes que são

alvos em comum de ABA, ácido giberélico, auxina, etileno, citocinina, brassinosteróides e jasmonato no controle do crescimento.

A regulação pós-transcricional por glicose, por exemplo, atuou de forma a desestabilizar transcritos relacionados à transdução de sinais hormonais através do controle sobre diferentes FTs, como *AT5G61590, ERF104* ou *ERF2*, (sinalização por etileno) ou *BT1* e *RVE1* (auxina; Tabela Suplementar 17). Além disso, com relação à auxina, a glicose também atuou de forma a desestabilizar um transcrito relacionado ao seu transporte polar (*AT1G20925*). O controle pós-transcricional por glicose também envolveu transcritos de importância para a sinalização por ABA, como a quinase *SnRK3.16* e o receptor de ABA *PYL8* (Tabela Suplementar 17), ambos associados ao nó central de sinalização desse hormônio (Umezawa *et al.*, 2010; Figura 4). Além de *SNRK3.16* e *PYL8*, outro fator desestabilizado por glicose e que pode estar relacionado às regulações por ABA é *GPA1* (Tabela Suplementar 17), proteína G que faz parte da cascata de sinalização celular, atuando como intermediário na transdução do sinal captado por um receptor, e que foi associada à sensibilidade a ABA (Ullah *et al.*, 2002; Lapik & Kaufman, 2003; Pandey *et al.*, 2006; Tuteja, 2009). Nesse contexto, as desestabilizações por glicose de *PYL8* e *SnRK3.16* poderiam promover uma diminuição da sensibilidade ao ABA amenizando, desta forma, a amplitude de pelo menos certos aspectos da resposta a estresse abióticos.

Já as regulações pós-transcricionais por ABA atuaram principalmente de forma a estabilizar transcritos envolvidos com a sinalização por outros hormônios (Tabela Suplementar 18), como os FTs *BIM1* (brassinosteróides), *MYB3* (ácido salicílico) e *MBF1C* (etileno). Além disso, ABA também estabilizou *MIPS2* (Tabela Suplementar 18), transcrito que participa da síntese do *myo*-inositol, molécula que além de atuar na regulação de genes relacionados à tolerância a estresse, síntese de oligossacarídeos e regulação da morte celular (Donahue *et al.*, 2010), também é co-fator do receptor de auxina TIR1 (Tan *et al.*, 2007). Por outro lado, o controle pós-transcricional por ABA atuou de forma a desestabilizar *NIT2* (Tabela Suplementar 18), uma de três nitrilases relacionadas à conversão de indol-3-acetonitrila em ácido indolilacético (AIA), auxina envolvida com o crescimento da planta (Kutz *et al.*, 2002). A auxina é um hormônio vegetal com funções fundamentais no controle do crescimento e desenvolvimento da planta, através da modulação da expressão gênica que levam a mudanças na divisão celular, elongação e diferenciação (Teale *et al.*, 2006). A estabilização do transcrito *MIPS2* por ABA

representa possivelmente um mecanismo para aumentar rapidamente a sensibilidade à auxina em resposta a ABA, resultando desta forma em alterações no desenvolvimento e crescimento auxinadependentes. Em contrapartida, a desestabilização de *NIT2* pode ser um mecanismo de controle para atenuar essa resposta.

Nossos dados providenciam fortes evidências de que a regulação do decaimento de RNAm por ABA e glicose constitui um mecanismo envolvido nos processos de interação entre as sinalizações por esses dois sinais e outros hormônios. Além do controle pós-transcricional por glicose ou ABA atuar sobre reguladores da transcrição responsivos a outros hormônios, merece destaque a desestabilização promovida por glicose em fatores relacionados ao transporte de auxina e ao nó central de sinalização do ABA, além do possível efeito das regulações póstranscricionais por ABA também sobre a sensibilidade e sinalização por auxina. Tais interações podem influenciar diretamente o padrão de crescimento e desenvolvimento da planta, sendo que a regulação pós-transcricional pode ser uma maneira mecanística de integrar sinais hormonais.

Genes do nó central de percepção e sinalização de ABA apresentam resposta póstranscricional ao próprio hormônio: uma possível retro-regulação negativa através do controle de estabilidade do RNAm

A análise detalhada dos dados de ontologia revelou que a expressão de diversos genes descritos como participantes do nó central de sinalização do ABA (Figura 4) são regulados póstranscricionalmente pelo próprio hormônio. Este resultado sugere a existência do envolvimento de fatores pós-transcricionais na retro-regulação negativa pelo próprio ABA, possivelmente visando amenizar a intensidade da sinalização ou de reiniciar o sistema de maneira rápida, representando um novo aspecto da sinalização por ABA. Dessa forma, focamos o estudo na compreensão desse novo mecanismo.

O nó central de regulação é composto por quatro níveis: receptores de ABA (PYR/PYL/RCAR), fosfatases (PP2C), quinases (SnRK2) e, finalmente, seus alvos, que são essencialmente FTs (Figura 4; Umezawa *et al.*, 2010). As proteínas PP2Cs interagem com o domínio II da região C-terminal de quinases SnRK2 de forma constante e independente de ABA (Yoshida *et al.*, 2006). Dessa forma, na ausência desse hormônio, PP2Cs reprimem a via de sinalização do ABA através da defosforilação e inativação das SnRK2s. Contudo, o aumento da

quantidade de ABA em resposta a sinais de desenvolvimento ou ambientais, e sua ligação ao receptor PYR/PYL/RCAR, promovem a interação do receptor com a PP2C (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), liberando as SnRK2s da regulação negativa das fosfatases. Isso permite que as quinases SnRK2s fosforilem seus substratos como, por exemplo, fatores de transcrição do tipo AREB/ABFs ou proteínas de membrana, ativando assim o programa de expressão gênica relacionado à adequação ao sinal hormonal (Figura 4).

Receptores solúveis de ABA: as proteínas PYR/PYL/RCAR

Os receptores de ABA do tipo PYR/PYL/RCAR foram descobertos recentemente, através de *screening* de biblioteca química que permitiu o isolamento do gene *PYRABACTIN RESISTANCE1* (*PYR1*; Park *et al.*, 2009), e através do sistema de duplo-híbrido, que identificou uma proteína que interagia com ABI1, *REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR1* (RCAR1; Ma *et al.*, 2009). Tanto *PYR1* como *RCAR1* codificam proteínas com domínio *START/Bet V allergen* e pertencem a uma família com 14 membros em *Arabidopsis*, conhecidos por *PYR1* e *PYR1-like* (*PYL*) *1-13* ou *RCAR1-RCAR14* (Figura Suplementar 2; Umezawa *et al.*, 2010).

As proteínas PYR/PYL/RCAR, além de poderem se ligar ao ABA, interagem com as fosfatases PP2Cs do subgrupo A de forma dependente de ABA (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), inibindo a atividade de fosfatase das PP2Cs. Dessa forma, PYR/PYL/RCAR atuam como uma subunidade reguladora negativa de PP2C, podendo mudar o status da sinalização de ABA para "ativo" (Figura 4; Umezawa *et al.*, 2010). Quatro transcritos desse grupo apresentaram regulação pós-transcricional por ABA: *PYL4-6*, desestabilizados, e *PYL7*, estabilizado (Figura Suplementar 2). Dessa forma, a regulação pós-transcricional sobre os receptores atuaria principalmente de forma desestabilizá-los, tendo como possível reflexo uma dessensibilização da via.

Proteínas fosfatases tipo 2C (PP2Cs)

Um dos principais mecanismos de transdução de sinal é a fosforilação reversível de proteínas, mediadas por quinases e fosfatases. As fosfatases PP2Cs são enzimas monoméricas que formam a maior família de fosfatases em *Arabidopsis*, com 76 membros, divididos em dez

grupos (Schweighofer *et al.*, 2004). O subgrupo A é formado por nove genes, contendo a maioria dos genes envolvidos com a transdução de sinal de ABA, os quais foram primeiramente associados com a sinalização desse hormônio através da identificação de mutantes insensíveis ao ABA, *abi1-1* e *abi1-2* (Koornneef *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1997). Além de *ABI1* e *ABI2*, o subgrupo A da família das PP2Cs também abrange reguladores de ABA, como *HYPERSENSITIVE TO ABA1* (*HAB1*) e *HOMOLOGY TO ABI2* (*HAB2* – Figura Suplementar 3), identificado por similaridade de sequência com *ABI2* (Saez *et al.*, 2004), e *HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1* (*HAI1*) e *HAI2*. Enquanto as mutações dominantes em *abi1-1* e *abi2-1* conferem insensibilidade ao ABA por ocorrerem no sítio catalítico das PP2Cs, impedindo a ligação dos receptores PYR/PYL/RCAR (Figura 4B), os mutantes nulos das PP2Cs *ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION 1* (*AHG1*), *AHG3*, *HAB1* e *HAB2* apresentam hipersensibilidade ao ABA. Dessa forma, as PP2Cs devem ser reguladores negativos da via de sinalização do ABA (Hirayama & Shinozaki, 2007), fato corroborado pela hipersensibilidade de mutantes *knockout* PP2C duplos (*ahg1-1/ahg3-1*) e triplos (*hab1-1/abi1-2/abi2-2 e hab1-1/abi1-2/pp2ca-1*; Nishimura *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2009).

Os resultados dos microarranjos indicam que pode haver controle pós-transcricional por ABA da expressão de quatro genes de PP2C (Figura Suplementar 3): *HAB1, ARABIDOPSIS THALIANA PROTEIN PHOSPHATASE 2CA (AHG3/PP2CA), HAI1 e HAI2.* O controle póstranscricional por ABA se deu de forma a estabilizar esses transcritos (Figura Suplementar 3). O subgrupo A de PP2Cs, apesar de ser funcionalmente redundante, apresenta expressão diferenciada em tecidos e órgãos. Por exemplo, enquanto ABI1 está localizada no citosol e núcleo, com função de regulação de diferentes tecidos, desde células-guarda a sementes, AHG1 e AHG3 localizam-se no núcleo e atuam principalmente nas sementes (Umezawa *et al.*, 2010). HAI1, ABI1 e ABI2 foram descritas por ligarem-se à SnRK2s na sinalização por ABA (Umezawa *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2009). Além disso, análise de expressão no mutante triplo SRK2D/E/I (SnRK2.2/2.6/2.3) mostrou que os nove genes PP2Cs do grupo A estão regulados positivamente por essas quinases (Fujita *et al.*, 2009). Dessa forma, a existência de controle pós-transcricional em quatro das nove PP2Cs do subgrupo A é um indício de que há uma necessidade de um controle fino sobre a sinalização do ABA nos diversos tecidos e estágios de desenvolvimento da planta. Além disso, o controle pós-transcricional, através da estabilização dos transcritos de PP2C, atuaria no sentido de diminuir a atividade das SnRK2s, interrompendo a transdução do sinal da via do ABA.

SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2)

A família SnRK2, identificada como proteínas quinases ativadas por ABA (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002), possui 10 membros em *Arabidopsis*, designados SnRK2A-J (Yoshida *et al.*, 2002) ou SnRK2.1-2.10 (Hrabak *et al.*, 2003), os quais estão divididos em três subclasses (Kobayashi *et al.*, 2004). Uma característica dessas proteínas é sua alta conservação entre as plantas superiores (Figura Suplementar 4). As proteínas SnRK2s apresentam o domínio catalítico de quinase conservado, enquanto a porção C-terminal é relativamente diversa (Yoshida *et al.*, 2002; Hrabak *et al.*, 2003).

Além da relação com resposta a ABA, proteínas SnRK2s também atuam na resposta a estresse osmótico, como SRK2C/SnRK2.8 (Mikolajczyk *et al.*, 2000; Umezawa *et al.*, 2004). Além disso, cada subclasse de SnRK2 apresenta um modo de resposta diferente a ABA ou estresse osmótico (Boudsocq *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004). A subclasse I é rapidamente ativada por estresse osmótico em um minuto, mas não é ativada por ABA. Em contrapartida, as subclasses II e III são ativadas tanto por ABA como por estresse osmótico, sendo que a ativação por ABA da subclasse III é muito forte em relação à II. As três quinases da subclasse III, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/OST1/SnRK2.6 e SRK2I/SnRK2.3, são fortemente ativadas por ABA como reguladores positivos globais da sinalização de ABA, a subclasse III atua desde o controle da abertura de estômatos através da SRK2E/OST1/SnRK2.6 (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002), como em tecidos separados das células-guarda, como sementes e tecidos vegetativos (Fujii *et al.*, 2007).

Nossos microarranjos identificaram apenas um transcrito de SnRK2 sob controle póstranscricional em resposta a ABA: SnRK2.7, o qual foi estabilizado pelo hormônio após a inibição da transcrição (Figura Suplementar 4). Tanto SnRK2.7 como SnRK2.8 são principalmente expressas em folhas, flores e raízes – mais especificamente células-guarda, tecidos vasculares e meristemas apicais – localizando-se no citoplasma e núcleo, similarmente às SnRKs da subclasse III (Mizoguchi *et al.*, 2010). Além disso, em comparação feita entre os

50

mutantes Srk2d/e/i (SnRK2.2/SnRK2.3/SnRK2.6) e Srk2c/f (SnRK2.7/SnRK2.8), Mizoguchi *et al.* (2010) verificaram que as subclasses II e III compartilham parte dos alvos de regulação via os FTs AREB/ABFs. Nesse contexto, é possível que SnRK2.7 desempenhe um papel na sinalização do ABA sob a forma de uma resposta pós-transcricional. Sua estabilização pelo controle pós-transcricional pode ocorrer de forma a manter um nível mínimo de quinases na via de sinalização do ABA, para contrabalancear a desestabilização dos receptores (Figura Suplementar 2) e estabilização das fosfatases PP2C (Figura Suplementar 3).

Fatores de transcrição e a resposta a ABA

Uma das principais formas de modulação da expressão gênica é através da regulação da expressão e/ou atividade de FTs (Beckett 2001; Wray et al., 2003; Corrêa et al., 2008), sendo a participação de FTs na resposta adaptativa a condições de estresse amplamente estudada (Yang et al., 2010). A análise de promotores de genes induzidos por ABA levou a identificação de elementos cis designados ABA-responsive elements (ABREs – Zhang et al., 2005; Gómez-Porras et al., 2007), os quais podem ser alvos de ligação de proteínas do tipo ABRE-binding (AREBs) ou ABRE-binding factors (ABFs - Choi et al., 2000; Uno et al., 2000; Umezawa et al., 2010). Os genes AREB/ABFs codificam FTs do tipo bZIP pertencentes ao grupo A (Corrêa et al., 2008), o qual é composto por 13 genes em Arabidopsis, dos quais três apresentaram regulação póstranscricional da expressão em resposta a ABA. Adicionalmente, além dos FTs do tipo AREB/ABFs, a regulação pós-transcricional por ABA incluiu transcritos de 33 membros de outras famílias de FTs (Tabela Suplementar 11). Embora a localização destes FTs na via de sinalização pelo ABA não seja conhecida, eles devem ter um papel na elaboração das respostas ao hormônio. Da mesma forma que o observado para o transcrito de SnRK2.7 (Figura Suplementar 4), a estabilização desses FTs de forma pós-transcricional por ABA pode ocorrer de forma a manter os níveis dos fatores responsáveis pela transdução do sinal para quando a via for reiniciada.

De acordo com nossos dados, aparentemente ocorre uma modulação do fluxo da sinalização desencadeada pelo ABA que pode ocorrer em duas fases (Figura 18). O hormônio ativa a via através da interação com os receptores PYR/PYL/RCAR, levando à inibição da atividade das PP2Cs, e liberando as SnRK2s para atuarem sobre seus alvos (Figura 4 – Umezawa

et al., 2010). Em um modelo possível que envolve as regulações pós-transcricionais, o sinal desencadeado pelo ABA leva à estabilização dos efetores de sua resposta, as quinases e os FTs, que podem assegurar uma resposta inicial ao hormônio. Em decorrência dessa resposta inicial, os transcritos dos receptores e fosfatase seriam, respectivamente, desestabilizados e estabilizados por regulações pós-transcricionais diretas ou indiretas, refletindo provavelmente um processo de retro-regulação negativa. Essa retro-regulação, que atuaria no sentido de mudar o *status* da via para desligado, deve dessensibilizar a resposta ao ABA, enquanto a estabilização das quinases e FTs devem garantir um *pool* de transcritos mínimo responsáveis pela ativação rápida dos demais genes da via do ABA quando ela for reiniciada (Figura 18).



Figura 18. Possível modelo do envolvimento de regulações pós-transcricionais na retro-regulação negativa do nó central de sinalização do ABA. Linhas pretas representam controles dependentes da transcrição, sendo as linhas contínuas uma regulação ativa, e linhas pontilhadas a ausência da regulação. Linhas em verde ou vermelho representam desestabilização e estabilização pós-transcricionais, respectivamente. **A.** Na ausência de ABA, as fosfatases PP2C inativam as quinases SnRK2, e a via encontra-se desligada. **B.** Na presença de ABA, os receptores PYR/PYL se ligam ao hormônio e inibem a atividade das PP2Cs, permitindo que as quinases SnRK2 ativem seus alvos. Através de regulações pós-transcricionais decorrentes dessa sinal inicial, ocorreria desestabilização de receptores e estabilização de PP2Cs no sentido de dessensibilizar resposta ao ABA, enquanto há estabilização de SnRK2 e de FTs, provavelmente para manter os níveis basais destes transcritos para quando a via for ativada novamente.

Avaliação da importância das regulações pós-transcricionais por ABA sobre transcritos do nó central de sinalização desse hormônio através da comparação com dados públicos e evidências de mecanismos de controle de estabilidade de RNAm envolvidos

Dados de mudanças de expressão gênica em larga escala promovidas por mutações em genes do nó central da sinalização por ABA foram explorados para avaliar o envolvimento do controle pós-transcricional da expressão gênica mediada pelo ABA com o nó central. Dessa forma, o conjunto de transcritos regulados pós-transcricionalmente por ABA foi comparado com dados de microarranjos feitos com os seguintes mutantes de componentes do nó central de sinalização do ABA: mutante duplo (*Srk2c/f*) e triplo (*Srk2d/e/i*) de quinases SnRK2s (Figura 4 e Figura Suplementar 4 – Fujita *et al.* 2009; Nakashima *et al.* 2009; Mizoguchi *et al.* 2010); mutantes de fosfatases PP2Cs *ahg1-1, ahg3-1* (Nishimura *et al.,* 2007) e *abi1-1* (*Genevestigator*; Figura 4 e Figura Suplementar 3), além de mutante triplo (*areb1/areb2/abf3*) e *abi4-102* (*Genevestigator*) de FTs AREB/ABF (Figuras 4 e 17 – Yoshida *et al.,* 2010).

De um total de 245 transcritos regulados pós-transcricionalmente por ABA (Tabela 1), 171 apresentaram sua regulação alterada em pelo menos um dos mutantes analisados (Tabela Suplementar 19). Esta análise comparativa indica que a regulação de 70% dos genes sob controle pós-transcricional mediado por ABA depende ao menos parcialmente dos reguladores do nó central de sinalização do ABA, incluindo os receptores PYR/PYL/RCAR, as fosfatases PP2Cs e a SnRK2 mencionados anteriormente (Figuras 4 e 18). Esses dados apontam para uma estreita relação entre a regulação pós-transcricional por ABA e a ativação das respostas promovidas por esse hormônio através do nó central. Nesse sentido, o controle pós-transcricional representa um mecanismo de adequação rápido da sensibilidade e resposta ao ABA e, além disso, a retroregulação possivelmente resultaria na amenização da resposta ao ABA, gerando uma homeostase de resposta ao hormônio e reiniciando o sistema (Figura 18).

Para compreender quais mecanismos de regulação de estabilidade de RNAm poderiam estar envolvidos na retro-regulação pós-transcricional dos elementos do nó central de sinalização do ABA, analisamos dados de expressão disponíveis no *Genevestigator* e na literatura para mutantes envolvidos com diferentes vias de controle de estabilidade de RNAs. O controle pós-transcricional da estabilidade de RNAm pode ocorrer por diferentes vias como, por exemplo, durante o processamento do RNAm através do controle de *splicing*, remoção do *cap 5*' ou da
cauda poli-A, envolvendo complexo de exonuclease 3'-5' ou degradação 5'-3', através do sistema de vigilância por NMD, por miRNAs, ou ainda por uma das diferentes classes de siRNAs (Belototsky & Sieburth, 2009; Houselley & Tollervey, 2009; Floris et al., 2009; Voinnet, 2009). Dessa forma, o envolvimento da atividade de *splicing* foi avaliado pelo mutante do gene ABH1 (ABA HYPERSENSITIVE 1), que codifica a cap binding protein CBP80 envolvida no complexo de *splicing*, e que também é conhecido por apresentar hipersensibilidade ao ABA (Hugouvieux *et* al., 2001; Kuhn et al., 2008; Christie et al., 2011). Participação de miRNAs foi inferida pela alterações de expressão em mutantes de DCL1, SE, e HYL1, envolvidos na formação do complexo de processamento dos miRNAs (Figura 3 - Kurihara & Watanabe, 2004; Kurihara et al., 2006; Lobbes et al., 2006; Dong et al., 2008). Além disso, transcritos que são potenciais alvos de degradação por miRNA segundo análise de degradoma (identificação das extremidades 5' dos fragmentos gerados pela degradação dos RNAm), foram inferidos pela comparação com os dados de German et al. (2008). O envolvimento de nat-siRNAs foi avaliado a partir do transcriptoma do mutante do gene DCL2, (Genevestigator), enquanto o de NMD foi avaliado a partir do perfil de RNA nos mutantes dos genes UPF1 (UP-FRAMESHIFT 1) e UPF3 (Yoine et al., 2006; Kurihara et al., 2009). A participação de deadenilação por poli(A)-ribonuclease (PARN) em resposta a ABA foi avaliada pelos genes desregulados no mutante do gene AHG2 (Nishimura *et al.*, 2005), e a atuação de exossomos no processamento e degradação de RNA 3'-5' foi avaliada pelos dados de Chekanova et al. (2007), que identificaram possíveis alvos nos mutantes de RRP4 (RIBOSOMAL RNA PROCESSING 4), RRP41 e CSL4.

O resultado dessas comparações (Tabela Suplementar 20) indica que dos nove genes relacionados à via central de sinalização do ABA e que apresentaram resposta pós-transcricional ao hormônio, há evidências para controle de estabilidade de RNAm para cinco deles: *PYL4-6*, *HAB1* e *HAI1*, havendo indícios de controle da atividade de *splicing* para *PYL5*; regulação por siRNAs sobre *HAI1* enquanto atividade de miRNAs poderia atuar sobre *PYL4*, *PYL6*, *HAB1* e *HAI1* (Tabela Suplementar 20). Expandindo essa análise para os 171 transcritos que apresentaram resposta pós-transcricional a ABA e que dependem do nó central de sinalização desse hormônio (Tabela Suplementar 20), há indícios para o envolvimento de ao menos um dos mecanismos de regulação de estabilidade de RNAm para 130 deles. Mais especificamente, o controle da atividade de *splicing* (ABH1) abrangeu 47 genes, enquanto 20 genes são possíveis alvos de

atuação de exossomos (RRP4, RRP41 e CSL4), 23 de regulação por siRNA (DCL2), e seis podem ser alvos de deadenilação (PARN), sendo apenas três os potenciais alvos de NMD. O mecanismo de controle pós-transcricional com maior número de alvos foi a regulação da estabilidade por miRNAs, havendo indícios de sua atuação para 95 genes (Tabela Suplementar 20).

O levantamento desses dados indica que há diversas evidências de mecanismos de controle de estabilidade de RNAm para os transcritos identificados como regulados póstranscricionalmente por ABA, dando suporte à nossa análise experimental, e permite que o foco de estudos futuros seja voltado à confirmação da possível retro-regulação negativa da sinalização do ABA através de mecanismos pós-transcricionais. Para essa avaliação, um conjunto representativo de genes devem ser analisados em mutantes deficientes em vias de controle de estabilidade do RNAm. Uma abordagem complementar para elucidar quais são os mecanismos associados ao controle da estabilidade do RNAm em resposta ao ABA e também à glicose, consiste em identificar as extremidades 5' dos fragmentos gerados pela degradação dos RNAm através da análise de degradoma (Addo-Quaye *et al.*, 2008; German *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

- Um modelo experimental otimizado das condições de inibição da transcrição foi estabelecido, permitindo análise de respostas pós-transcricionais mediadas pelos sinais glicose e ABA;
- Análise em larga escala das mudanças dos perfis de transcritos através de microarranjos indica que glicose e ABA seguem estratégias opostas de regulação: enquanto ABA majoritariamente estabiliza os RNAms, a glicose, de maneira contrastante, promove a degradação de seus alvos. Aparentemente, glicose e ABA agem sobre fatores distintos através das regulações pós-transcricionais;
- Respostas sinérgicas mediadas pela combinação de glicose e ABA mostraram-se dependentes de fatores transcricionais, como observado para *AtbZIP63*;
- As análises detalhadas das regulações pós-transcricionais por qRT-PCR indicam a existência de transcritos com diferentes meias-vidas, variando de um decaimento lento à transcritos instáveis. Além disso, as análises apontam para regulações que ocorrem essencialmente por vias pós-transcricionais, e regulações que também dependem de fatores transcricionais. Essas regulações podem ocorrer por vias não lineares, havendo uma interação entre fatores estáveis e instáveis para o controle da expressão gênica, através de retro-regulações ou regulações por *feed-foward*.
- A atuação da regulação pós-transcricional mediada por glicose e ABA sobre um número relevante de genes com funções centrais em vias de sinalização, como FTs e quinases, sugere a necessidade de haver respostas adaptativas rápidas aos estímulos;
- Uma relação relevante entre a regulação pós-transcricional modulada por esses dois sinais
 e genes de resposta a estresses abióticos e energéticos foi abordada. ABA aparentemente
 atua no sentido de estabilização dos transcritos para adaptação às condições de estresse,
 enquanto glicose age no sentido contrário, possivelmente contrabalanceando o estresse
 energético decorrente dos estresses abióticos;
- A regulação pós-transcricional também se mostrou como uma via mecanística de integrar os sinais hormonais. Em especial, há indícios para a existência de retro-regulação negativa sobre a via de sinalização do ABA, uma provável de forma de dessensibilizar e

reiniciar as respostas da via. A comparação com dados disponíveis na literatura apontam para um potencial envolvimento de diversos mecanismos de controle de estabilidade de RNA.

PERPECTIVAS

- Determinar os alvos de regulações por miRNAs e siRNAs em resposta à glicose ou ABA através da análise por degradoma;
- Utilizar bibliotecas de pequenos RNAs e sequenciamento de nova geração para identificação dos fatores envolvidos nas regulações pós-transcricionais por glicose ou ABA;
- Avaliar as vias de regulação pós-transcricionais envolvidas com o possível mecanismo de retro-regulação negativa da via de sinalização do ABA, através da análise de expressão do conjunto selecionado de genes em mutantes deficientes em componentes relacionados a controle de estabilidade de RNAm;
- Avaliar a possível retro-regulação negativa por fatores pós-transcricionais sobre o nó central de sinalização do ABA através de uma cinética;
- Identificar motivos conservados relacionados ao controle de estabilidade do RNAm;
- Avaliar o grau de conservação evolutivo do controle de estabilidade de RNAm mediado por glicose e ABA;
- Elucidar a inter-dependência das respostas sinérgicas a ABA e glicose em regulações transcricionais e pós-transcricionais;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ (2008) Endogenous siRNA and microRNA targets identified by sequencing of *Arabidopsis* degradome. *Curr. Biol.* 18: 758-762.
- Adeli K (2011) Translational control mechanisms in metabolic regulation: critical role of RNA binding proteins, microRNAs, and cytoplasmic RNA granules. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 301: E1051-E1064.
- Allen E, Howell MD (2010) miRNAs in the biogenesis of *trans*-acting siRNAs in higher plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21: 798-804.
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar Genes Dev. 14: 2085-2096.
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, León P (2003) Three Genes That Affect Sugar Sensing (*Abscisic Acid Insensitive 4*, *Abscisic Acid Insensitive 5*, and *Constitutive Triple Response 1*) Are Differentially Regulated by Glucose in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133: 231-242.
- Asselbergh B, De Vleesschauwer D, Höfte M (2008) Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 709-719.
- Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M (2002) RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16499-16506.
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448: 938-942.
- Baena-González E (2010) Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Mol. Plant* 3: 300-313.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 24: 23-58.
- Barton MK (2010) Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev. Biol.* 341: 95-113.
- Battisti DS, Naylor RL (2009) Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science* 323: 240-244.

- Beckett D (2001) Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J. Mol. Biol.* 314: 335-352.
- Belostotsky DA, Sieburth LE (2009) Kill the messenger: mRNA decay and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 96-102.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123: 1279-1291.
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 279: 41758-41766.
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. Science 218: 443-448.
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320: 1185-1190.
- Cao FY, Yoshioka K, Desveaux D (2011) The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *J. Plant Res.* 124: 489-499.
- Carrol SB (2000) Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* 101: 577-580.
- Chekanova JA, Gregory BD, Reverdatto SV, Chen H, Kumar R, Hooker T, Yazaki J, Li P, Skiba N, Peng Q, Alonso J, Brukhin V, Grossniklaus U, Ecker JR, Belostotsky DA (2007) Genome-wide highresolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the *Arabidopsis* transcriptome. *Cell* 131: 1340-1353.
- Chen JG, Jones AM (2004) AtRGS1 function in Arabidopsis thaliana. Methods Enzymol. 389: 338-350.
- Chen JG (2008) Heterotrimeric G-protein signaling in Arabidopsis. Plant Signal. Behav. 3: 1042-1045.
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14: 2723-2743.
- Chiba Y, Johnson MA, Lidder P, Vogel JT, van Erp H, Green PJ (2004) AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis. Gene* 328: 95-102.

- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275: 1723-1730.
- Christie M, Croft LJ, Carroll BJ (2011) Intron splicing suppresses RNA silencing in Arabidopsis. *Plant J*. 68: 159-167.
- Corrêa LG, Riaño-Pachón DM, Schrago CG, dos Santos RV, Mueller-Roeber B, Vincentz M (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptative features emerging from four founder genes. *Plos One* 3: e2944.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 651-679.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 5-17.
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM (2004) Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 579-588.
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM (2008) Interaction between sugar and abscisic acid signaling during early seedling development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 67: 151-167.
- Denby K, Gehring C (2005) Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genomewide expression profiling in Arabidopsis. *Trends Biotechnol.* 23: 547-552.
- Depuydt S, Hardtke CS (2011) Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21: R365-373.
- Donahue JL, Alford SR, Torabinejad J, Kerwin RE, Nourbakhsh A, Ray WK, Hernick M, Huang X, Lyons BM, Hein PP, Gillaspy GE (2010) The Arabidopsis thaliana myo-inositol 1 phosphate synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *Plant Cell* 22: 888-903.
- Dong Z, Han MH, Fedoroff N (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9970-9975.
- Earley K, Smith MR, Weber R, Gregory BD, Poethig RS (2010) An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence* 1: 15.

Eveland AL, Jackson DP (2012) Sugars, signaling, and plant development. J. Exp. Bot. 63: 3367-3377.

- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387-415.
- Fischer U, Englbrecht C, Chari A (2011) Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 2: 718-731.
- Floris M, Mahgoub H, Lanet E, Robaglia C, Menand B (2009) Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *In. J. Mol. Sci.* 10: 3168-3185.
- Fornara F, Coupland G (2009) Plant phase transitions make a SPLash. Cell 138: 625-627.
- 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*. *Plant Cell* 19: 485-494.
- Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 50: 2123-2132.
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124: 509-525.
- Gauer L (2004) Caracterização funcional do gene *Bzo2h2* de *Arabidopsis thaliana*: um regulador da transcrição homólogo ao lócus *Opaco2* de milho. Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis LA, Nobuta K, German R, De Paoli E, Lu C, Schroth G, Meyers BC, Green PJ (2008) Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature Biotechnol.* 26: 941-946.
- Gibson SI (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 93-102.
- Goeres DC, Van Norman JM, Zhang W, Fauver NA, Spencer ML, Sieburth LE (2007) Components of the *Arabidopsis* mRNA decapping complex are required for early seedling development. *Plant Cell* 19: 1549-1564.

- Gómez-Porras JL, Riaño-Pachón DM, Dreyer I, Mayer JE, Mueller-Roeber B (2007) Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics*. 8: 260.
- Gutiérrez RA, Ewing RM, Cherry JM, Green PJ (2002) Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11513-11518.
- Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54: 467-475.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC (2010) The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation Argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22: 321-334.
- Henderson IR, Jacobsen SE (2007) Epigenetic inheritance in plants. Nature 447: 418-424.
- Hey SJ, Byrne E, Halford NG (2010) The interface between metabolic and stress signaling. *Ann. Bot.* 105: 197-203.
- Hirayama T, Shinozaki K (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 12: 343-351.
- Ho S-L, Chao Y-C, Tong W-F, Yu S-M (2001) Sugar coordinately and differentially regulates growthand stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol*. 125:877-890.
- Holtorf H, Schöb H, Kunz C, Waldvogel R, Meins Jr. F (1999) Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and β-1,3-glucanase genes involves increased RNA turnover possible role for ribosome-independent RNA degradation. *Plant Cell* 11: 471-483.
- Houseley J, Tollervey D (2009) The many pathways of RNA degradation. Cell 136: 763-776.
- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*. 132: 666-680.

- Hugouvieux, V, Kwak JM, Schroeder JI (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* 106: 477–487.
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S (2000) The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. Plant J. 23: 577-585.
- IPCC, 2007: Summary for policymakers. In Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden, and C.E. Hanson, Eds. Cambridge University Press, pp. 7-2.
- Iwasaki S, Takeda A, Motose H, Watanabe Y (2007) Characterization of *Arabidopsis* decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett.* 581: 2455-2459.
- Johnson MA, Pérez-Amador MA, Lidder P, Green PJ (2000) Mutants of Arabidopsis defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13991-13996.
- Kim TH, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 561-591.
- Kim T-H (2012) Plant stress surveillance monitored by ABA and disease signaling interactions. *Mol. Cells* 33: 1-7.
- 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. *Plant Cell* 16: 1163-1177.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acidinsensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant* 61: 377-383.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H (2002) Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.
- Kuhn JM, Hugouvieux V, Schroeder JI (2008) mRNA cap binding proteins: effects on abscisic acid signal transduction, mRNA processing and microarray analyses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 326: 139-150.

- Kultz D (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 225-257.
- Kurihara Y, Watanabe Y (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 12753-12758.
- Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12: 206-212.
- Kurihara Y, Matsui A, Hanada K, Kawashima M, Ishida J, Morosawa T, Tanaka M, Kaminuma E, Mochizuki Y, Matsushima A, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M (2009) Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 2453-2458.
- Kutz A, Müller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EW (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 30:95-106.
- Laby RJ, Kincaid MS, Kim D, Gibson SI (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants sis4 and sis5 are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* 23: 587–596.
- Lapik Y, Kaufman LS (2003) The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 and AtGPA1, the Arabidopsis Gα subunit interact with each other and regulate seed germination and early seedling development. *Plant Cell* 15: 1578-1590.
- Laubinger S, Zeller G, Henz SR, Buechel S, Sachsenberg T, Wang J-W, Rätsch G, Weigel D (2010) Global effects of the small RNA biogenesis machinery on the *Arabidopsis thaliana* transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 17466-17473.
- Lee BH, Kapoor A, Zhu J, Zhu JK (2006) STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 1736-1749.
- León P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. Trends Plant Sci. 8: 110-116.
- Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997) The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759-71.

- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW (2006) Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.* 16: 414-427.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, Martin C, Clarke J (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep.* 7: 1052-1058.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163: 16-20.
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua N-H (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4782-4787.
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffman B, Lecharny A, Le Rer M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064-1068.
- Mantovani R (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. Gene 239: 15-27.
- Marris E (2008) Water: more crop per drop. Nature 452: 273-277.
- Matiolli CC, Tomaz JP, Duarte GT, Prado FM, Del Bem LEV, Silveira AB, Gauer L, Corrêa LGG, Drumond RD, Viana AJC, Mascio PD, Meyer C, Vincentz M (2011) The Arabidopsis bZIP gene AtbZIP63 is a sensitive integrator of transiente abscisic acid and glucose signals. *Plant Physiology* 157: 692-705.
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol*. 29: 1135-1149.

Meshi T, Iwabuchi M (1995) Plant transcription factors. Plant Cell Physiol. 36: 1405-1420.

- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y (2008) Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute compleses is directed by the 5'terminal nucleotide. *Cell* 133: 116-127.
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, Klessig DF, Dobrowolska G (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12: 165-178.
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2009) Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 50: 1232-1248.
- Mizoguchi M, Umezawa T, Nakashima K, Kidokoro S, Takasaki H, Fujita Y, Yamaguchi-Schinozaki K, Shinozaki K (2010) Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell Physiol.* 51: 842-847.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332-336.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Mustilli A, 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. *Plant Cell* 14: 3089-3099.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Masatomo K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol.* 50: 1345-1363.
- Narsai R, Howell KA, Millar AH, O'Toole N, Small I, Whelan J (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 3418-3436.
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J (2006) Similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126: 467-475.
- Nishimura N, Kitahata N, Seki M, Narusaka Y, Narusaka M, Kuromori T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2005) Analysis of *ABA hypersensitive germination2* revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis. *Plant J.* 44: 972-984.

- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2007) ABA-hypersensitive germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J*. 50: 935-949.
- Nonogaki H (2010) MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant Cell Physiol.* 51: 1840-1846.
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 93-113.
- Orphanides G, Reinberg D (2002) A unified theory of gene expression. Cell 108: 439-451.
- Palusa SG, Golovkin M, Shin S-B, Richardson DN, Reddy ASN (2007) Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in Arabidopsis. *New Phytol.* 174: 537-550.
- Pandey S, Chen JG, Jones AM, Assmann SM (2006) G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiol.* 141: 243-256.
- Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible W-R (2009) Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol.* 150: 1541-1555.
- Park SY, Fung P, Hishimura N, Jensen DR, Fuji H, Zhao Y, Lumba S, Saniago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkestein R, Provart NJ, Desveaus D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science 324: 1068-1071.
- Paul MJ, Pellny TK (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. J. Exp. Bot. 54: 539-547.
- Pennisi E (2008) The blue revolution, drop by drop, gene by gene. Science 320: 171-173.
- Poethig RS (2009) Small RNAs and developmental timing in plants. Curr. Opin. Genet. Dev. 19: 374-378.
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009) Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 136: 629-641.

- Price J, Laxmi A, Martin SKS, Jang JC (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2128-2150.
- Provart N, Zhu T (2003) A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. Curr. Comput. Mol. Biol. 2003: 271-272.
- Raghavendra AG, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* 15: 395-401.
- Reyes JL, Chua N-H (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J.* 49: 592-606.
- Reverdatto SF, Dutko JA, Chekanova JA, Hamilton DA, Belostotsky DA (2004) mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA* 10: 1200-1214.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C-Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ,Ghandehari D, Sherman BK, Yu G-L (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290: 2105-2110.
- Rodríguez-Gacio MC, Matilla-Vázquez MA, Matilla AJ (2009) Seed dormancy and ABA signaling. *Plant Signal. Behav.* 4: 1035-1048.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675-709.
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J.* 26: 421–433.
- Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim T, et al. (2009) Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol*.150: 1345-1355.
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, et al. (2004) Gain-of-function and loss-offunction phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J.* 37: 354-369.

- Sarowar S, Oh HW, Cho HS, Baek KH, Seong ES, Joung YH, Choi GJ, Lee S, Choi D (2007) *Capsicum annuum* CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J.* 51: 792-802.
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236-243.
- Sclep G, Allemeersch J, Liechti R, De Meyer B, Beynon J, Bhalerao R, Moreau Y, Nietfeld W, Renou JP, Reymond P, Kuiper MT, Hilson P (2007) CATMA, a comprehensive genome-scale resource for silencing and transcript profiling of Arabidopsis genes. *BMC Bioinformatics* 8: 400.
- Seeley KA, Byrne DH, Colbert JT (1992) Red light-independent instability of oat phytochrome mRNA in vivo. *Plant Cell* 4: 29–38.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol* 6: 410-417.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 274-279.
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847-859.
- Temple BR, Jones AM (2007) The plant heterotrimeric G-protein complex. Annu. Rev. Plant Biol. 58: 249-266.
- Tester M, Langridge P (2010) Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327: 818-822.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J*. 37: 914-39.
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant. Sci.* 14: 310-317.

Tuteja N (2009) Signaling through G protein coupled receptors. Plant Signal. Behav. 4: 942-947.

- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20: 1736–1737.
- Ullah H, Chen J-G, Wang S, Jones AM (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of arabidopsis seed germination. *Plant Physiol*. 129: 897-907.
- Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) SRK2C, a SNF1related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101: 17306-17311.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 113-122.
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acidactivatd protein kinases in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 17588-17593.
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki Y (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol*. 51: 1821-1839.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11632-11637.
- Valliyodan B, Nguyen HT (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 189-195.
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell 136: 669-687.
- Wan J, Griffiths R, Ying J, McCourt P, Huang Y (2009) Development of drought-tolerant canola (*Brassica napus* L.) through genetic modulation of ABA-mediated stomatal responses. Crop Sci. 49: 1539-1554.
- Wang W, Vinocur B, Altman (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- Warren AJ (2002) Eukaryotic transcription factors. Curr. Opin. Struct. Biol. 12: 107-114.

- Wolters H, Jurgens G (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* 10: 305-317.
- Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockman MV, Romano LA (2003) The evolution of transcriptional regulation in Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1377-1419.
- Xu J, Yang JY, Niu QW, Chua NH (2007) *Arabidopsis* DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant J.* 18: 3386-3398.
- Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants. *Nature* 425: 521-525.
- Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y (2010) Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol. Plant* 3: 469-490.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- Yoine M, Nishii T, Nakamura K (2006) Arabidopsis UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth. *Plant Cell Physiol*. 47: 572-580.
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, et al. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 43: 1473-1483.
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K (2006) 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. *J. Biol. Chem.* 281: 5310-5318.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J*. 61: 672-685.
- Zeller G, Henz SR, Widmer CK, Sachsenberg T, Rätsch G, Weigel D, Laubinger S (2009) Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *Plant J.* 58: 1068-1082.
- Zhang JZ (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 430-440.

- Zhang W, Ruan J, Ho TD, You Y, Yu T, Quatrano RS (2005) Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in Arabidopsis thaliana. *Bioinformatics* 21: 3074-3081.
- Zhang J-F, Yuan L-J, Shao Y, Du W, Yan D-W, Lu Y-T (2008) The disturbance of small RNA pathways enhanced abscisic acid response and multiple stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*. 31: 562-574.
- Zhou L, Jang J-C, Jones TL, Sheen J (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10294-10299.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol*. 136: 2621-2632.
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 247-273.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão por qRT-PCR.

Idontificação	ACI	Diroto	Dovorso	FF
Actin2	AGI			L-L
ACUINZ	AI3G10700			X
AKINBETAI	AT5G21170			X
ANACU32	ATIG//450			X
ARP4	AT1G18450	AGTTAAAGTGTTGGCAAGCGGT	TGTTCCTCATACTCAGACTTGG	X
ATIG02820	ATIG02820	GTTTTTCAGACGAGGGTTTGC	ATGGTGCCTTCTCGCTTG	Х
AT1G23200	AT1G23200	CACGATCACCGCTCAATCAC	TAAGTTTCCGACGCAGTAGC	
AT1G23390	AT1G23390	GTTATTTCACTAGATGGAACTC	TGATTCATCACTGGTTTAGCT	Х
AT1G26500	AT1G26500	AGTTGTAGAGGCTTATGGGTT	GCTTCGCTTGCCCGTTTAATC	
AT2G17880	AT2G17880	CGTTTATGATCGGAGGACTCT	CAATTCCGTCCACCGTAACTG	
AT2G35300	AT2G35300	GGCGCAGGCCAAAGCTGAC	GGGTAGGGTAGGTGGAGTG	
AT2G37580	AT2G37580	CGCCGATCACCGAGACCAC	CACCATGAGACACACGGAGC	
AT3G12860	AT3G12860	TTTCTCAGATAACAGCACTACAG	CGTGGGGCAACACCTTTGTC	Х
AT3G15450	AT3G15450	CGTCAAAGGTTGTTCTGTGG	TTGAGTTCTTCCCAGATAAAC	х
AT4G12980	AT4G12980	CTTCAGATGTTTGCGATGC	TCCAAGGATGAGGATAGAG	х
AT5G03430	AT5G03430	CTTAACGGGAAAGGATAATGC	ACTTGATTTCTACGAACACATC	х
AT5G17460	AT5G17460	CTTCAAGGATATACAAACTCG	TGGACTGTGCCTTCTGCC	
AT5G26220	AT5G26220	CGACATTGAGCATGAGGAAG	TGAGAAACAATAGGCTTCAAC	х
AT5G44260	AT5G44260	TCCAATTACAACAGAGTAGTCC	CAAAGAAGCTCGACGGTGGTG	
AT5G48430	AT5G48430	GATGAAGAAGGTCAGCGATG	CAACGTCAAACTCCACCAAAG	
AT5G50360	AT5G50360	TTATATCGGACGGTTTAGGGAG	TTCATCACAAGCCACACACTC	
AT5G51440	AT5G51440	TTCTTCTCACATATACTCGATC	GATTTCGCTTACCTGGTCC	x
AT5G52190	AT5G52190	TTGTTTGTGTTGTTTGAGATGG	AAGATTAGTATGACGAGCACG	
AT5G64510	AT5G64510	CCTTTCTTTACCATATGATGTG	GATGACGCAAGCTAACAGATC	Х
AtbZIP9	AT5G24800	GAGAGTCAAGGTGAAACTAG	CGAGGTATTTCCCGTGTAGT	х
AtbZIP60	AT1G42990	AAACGAAGAAGGAGAGTAAGA	GTCCTAGTCTCAAGCATTCTC	х
AtbZIP63	AT5g28770	CGCGTTAATAGGATGCTCTC	GTTTGAGTTACATCAGTGAGA	х
BT2	AT3G48360	GACGCCGAATCGAGGAAGAA	CGTTTGATGGACCGACCAATG	х
BT5	AT4G37610	CAGAGGAATGATGAAGCAACAT	CATATCTTGTTTCTCATAGCAAG	х
CCOAMT	AT1G67980	GCTTACGAAGTTGGACTAGAG	ACTCACATTTGTCGTTCACC	х
CIPK6	AT4G30960	AAGAGTGAGAGTAGAGTAAGG	CACTTCCACGACAACAAACG	
COR15A	AT2G42540	CTAAAGGTGACGGCAACATCC	TTCAACAACGTAGTCTTTCGC	
CRK30	AT4G11460	GAAGTTTACAAGGGTACGTTAT	CTGAAGTTTTGCTACAAGAAGC	Х
CYP76C2	AT2G45570	TCTTGGACCTGTTTGGAGC	CACCTTTCTGACCAATCACAC	х
DREB1C	AT4G25470	ATGGATGAAGAGGCGATGTTG	CGACATCAAAATTATAGTTCCA	

Tabela	Suplementar	· 1.	Continua	ıção.
--------	-------------	------	----------	-------

Identificação	AGI	Direto	Reverso	E-E
DREB2A	AT5G05410	GCTACAAAGCCTCAACTACG	TTCTCCAGATCCAAGTAACTC	
ERD10	AT1G20450	TTGAAACAGCAACACCGATTG	TTGGCGTGATAACCTGGAAGC	
ERF107	AT5G61590	CTCAGGGGAAGAAAAGCTGT	AGGCTGTGGTACATCGGTTC	
FLA16	AT2G35860	GTTCAGGGTATTGATGGAGTC	CAATTTACCTCTTCTTGATTTAG	х
GLP9	AT4G14630	CAGCAGATGGCGTGTTTGTG	GCGTTATTTGTATTTCCAGGTC	х
GPT2	At1g61800	CTTTGTCTGGTGGGTAGTGG	TCCGCTTCATCGTATTACCG	Х
HAI1	AT5G59220	CGATCATAAGCCAGACCGTC	GCAAGTACTCCAAGGACACG	Х
HVA22	AT4G24960	AGAGAACAGTTCAAGAAACAC	AGCCTCGTGTCCCTCCCG	Х
MPK3	AT3g45640	GTCTGTTGGTTGTATCTTTATG	AAGCAACTCTGTCAATAAGCG	х
MYB3	AT1G22640	CGCCGCTGGATTACAAAGAT	GAGTTCATCTTCTTCTTCAGT	х
NDL1	AT5G56750	TTGGTTGAGGTTCAGGCTTG	GAGATGGTCTGTATAATCCG	х
NFU3	AT4G25910	GATTCCAGAGATCATGTCCG	CCTTAACTCAGAGAGAACCTT	Х
NF-YB2	AT5G47640	GCAGTATCACCAACATCATCAG	CACCTCCACTGTCGCTACC	
P5CS1	AT2G39800	TGCTGTGTTCCACAACGCC	CCTCTCATTATCCATCTCGT	Х
PP2AA3/PDF2	At1g13320	TAACGTGGCCAAAATGATGC	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	Х
PYL4	AT2G38310	CGTCGTTGATGTTCCTCCAG	CTCAGCCGCAGTATTCTCG	
PYL5	AT5G05440	CGGTGACGACACTACACGC	GCTTAGAGTTTCCTCCTCC	
PYL6	AT2G40330	GACGGCAAGAAGAGGACACG	CGAGTTTAGCCAGCGATTGC	
PYL7	AT4G01026	GTTCATCTTGTTTGGTCACTG	AGATTTGACATTTACTTCTCTG	Х
Rd20	AT2G33380	CGAAGGAAGGTATGTCCCA	ATTTCCCTCGGTTACATTCC	Х
Rd29b	AT5G52300	AAGGAGCGGTCACTTCTTG	CCATAGTCCCAACGGTGGT	Х
rev3	AT1G67500	CAACACCTAGCCACGATATGC	CTGAGCACGCAAGGGAATTG	Х
SPS2F	AT5G11110	TCCCGCTTTGATGCCTCCA	GATTACATTAAGCCTAGCTCC	Х
TPS8	AT1G70290	GTCAAACCACAAGGTGTAAGCA	ATGTCTTCGTCTGATCTATCG	Х
UPS5	AT1G26440	CTGTTCAGGCACTTCCTTTAG	CAGTAAACATCACCAGCATTCC	Х

Nota. A última coluna (E-E) marca os oligonucleotídeos construídos com pelo menos uma junção éxonéxon.

			Expressão	o Relativa		
Identificação	Controle	ABA	Glc	Cord	Cord + ABA	Cord + Glc
At2G35300	1,04	31,62 ^a	-	1,72	2,94 (1,72)	-
At5G26220	1,01	-	21,25 ^a	2,47 ^b	-	3,21 (1,3)
FLA16	1,01	-	9,64 ^a	1,95 ^b	-	2,90 (1,49)
GPT2	1,00	-	27,80 ^a	2,25 ^b	-	2,98 (1,32)
AT5G51440	1,07	-	77,65 ^a	-1,92	-	1,70° (3,26)
COR15A	1,16	5775 ^a	-	2,71	107,6° (39,7)	-
Rd29b	1,01	244,5 ^a	-	-1,04	8,37 ^c (8,72)	-
AT5G44260	1,01	-	-4,13 ^a	-4,81 ^b	-	-7,8 (-1,62)
AT1G23390	1,00	-	-16,01 ^a	-13,8 ^b	-	-14,53 (-1,05)
At5G48430	1,0	-15,03 ^a	-	-2,42 ^b	-4,95 (-2,05)	-

Tabela Suplementar 2. Níveis de RNAm obtidos por qRT-PCR para genes com respostas dependentes da transcrição.

Nota. A inibição da transcrição com cordicepina apresentou eficiência de ao menos 97%. Os 3% de atividade transcricional residuais só foram detectados para genes com induções muito fortes em resposta ao sinal (*AT5G51440*, *COR15A* e *AtRd29b*). Para transcritos com respostas mais tênues, a atividade transcricional residual não foi suficiente para que a diferença entre amostra tratada com cordicepina e a tratada com cordicepina + sinal fosse significativa (*AT2G35300*, *AT5G26220*, *FLA16*, *GPT2*, *AT5G1440*). Similarmente, a eficiência da inibição também foi verificada para genes com repressão transcricional, para os quais não houve diferença significativa em resposta ao sinal após a inibição da transcrição com relação à amostra tratada somente com cordicepina (*AT1G23390*, *HAT1*, *AT5G48430*). Os valores representam o número de vezes que os níveis de um transcrito é maior (valores positivos) ou menor (valores negativos) que o encontrado no controle sem tratamento em relação às amostras tratadas com ABA, glicose (Glc), cordicepina (cord), cordicepina + ABA (Cord + ABA), ou cordicepina + glicose (Cord + Glc). Entre parênteses está indicado a resposta pós-transcricional pela comparação Cord *vs* Cord + sinal. Teste t de Student (p < 0,05) e *fold* ≥ |2,0| foram considerados para uma diferença significativa entre as comparações de **a**. Controle *vs* Glc ou ABA; **b**. Controle *vs* Cord; **c**. Cord *vs* Cord + Glc ou Cord + ABA.

		Sinal (log2)			
AGI	CG vs	CA vs Cord	CGA vs	Descrição	
	Cord		Cord	-	
AT5G61590	-1.68	-0.68	-1.87	member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-3	
A13001330	-1,00	-0,00	-1,07	of ERF/AP2 transcription factor family	
AT5G28770	-1,44	-0,64	-1,19	bZIP protein BZO2H3	
AT1G03850	-1,02	-0,55	-1,03	glutaredoxin family protein	
AT4G26530	-0,82	-0,55	-0,79	putative fructose-bisphosphate aldolase	
AT1G13245	-0,67	-0,57	-1,12	ROTUNDIFOLIA LIKE 17 (RTFL17)	
AT5G18670	-1,04	0,64	-0,73	putative beta-amylase BMY3 (BMY3)	
AT5G52190	-1,04	0,69	-0,68	sugar isomerase (SIS) domain-containing protein	
AT2G15960	-1,50	0,59	-0,92	Unknown protein	
AT2C22600	0.92	1 20	1 20	1 27	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)
A15022000	0,05	1,20	1,47	family protein	
AT1G12080	0,95	0,74	_	unknown protein	
AT2G44670	0,97	1,01	0,92	senescence-associated protein-related	
AT3G21890	1,01	1,00	1,92	zinc finger (B-box type) family protein	
AT1G26500	1,10	0,80	1,09	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	
AT5C11110	1.25	2.08	2 11	protein with putative sucrose-phosphate synthase activity.	
AIJOIIIIU	1,25	2,08	2,11	Involved in pollen exine formation	
AT4C24060	1 30	3 19	3 49	homologous to a eukaryote specific ABA- and stress-inducible	
A14024900	1,38	2,18	2,48	gene first isolated from barley	
AT1G23200	1,57	1,87	2,01	pectinesterase family protein	

 Tabela Suplementar 3. Transcritos que responderam de forma pós-transcricional tanto à glicose como a ABA.

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + glicose (CG), cordicepina + ABA (CA), cordicepina + glicose + ABA (CGA) é em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). A descrição dos genes foi obtida no banco de dados do TAIR. Estabilização está representada com valores positivos em vermelho, desestabilização por valores negativos em verde, resposta abaixo do valor de corte por (–).

Sinal (Log ₂)						
AGI	CGA	CG	ABA	Descrição		
AT3G48360	-1,47	-0,99	-0,33	BTB AND TAZ DOMAIN PROTEIN 2 (bt2); (ATBT2)		
AT2G44380	-1,15	-0,55	-0,63	DC1 domain-containing protein		
AT1G55330	-1,04	-0,55	-0,09	ARABINOGALACTAN PROTEIN 21 (AGP21)		
AT2G41090	-0,94	-0,30	-0,35	calmodulin-like calcium-binding protein, 22 kDa (CaBP-22)		
AT2G17230	-0,94	-0,46	-0,52	EXORDIUM LIKE 5 (EXL5)		
AT4G27280	-0,87	-0,52	-0,16	calcium-binding EF hand family protein		
ATT1 C75020	0.07	0.26	0.42	LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 67 (LCR67);PLANT DEFENSIN		
ATTG/5830	-0,87	-0,26	-0,42	1.2 (PDF1.1)		
AT4G11650	-0,85	\$	\$	OSMOTIN 34 (ATOSM34)		
AT3G43720	-0,83	-0,32	-0,43	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein		
ATT5C 42700	0.02	0.25	0.40	AUXIN INDUCIBLE 2-11 (ATAUX2-11);INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 4		
A15045700	-0,83	-0,25	-0,49	(IAA4)		
AT5G65390	-0,83	0,08	-0,26	ARABINOGALACTAN PROTEIN 7 (AGP7)		
AT1G07135	-0,83	-0,37	-0,14	glycine-rich protein		
AT5G04530	-0,82	-0,55	-0,21	3-KETOACYL-COA SYNTHASE 19 (KCS19)		
AT2G41100	-0,82	-0,39	-0,19	TOUCH 3 (TCH3);ARABIDOPSIS THALIANA CALMODULIN LIKE 4 (ATCAL4)		
AT4G30280	-0,80	-0,40	-0,30	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 18 (XTH18)		
AT2G33830	-0,78	-0,56	-0,09	dormancy/auxin associated family protein		
AT1G48480	-0,78	-0,16	-0,13	RECEPTOR-LIKE KINASE 1 (RKL1)		
AT1G14870	-0,76	-0,52	-0,44	PLANT CADMIUM RESISTANCE 2 (PCR2)		
AT3G13520	-0,75	-0,29	-0,03	ARABINOGALACTAN PROTEIN 12 (AGP12); (ATAGP12)		
AT5G35525	-0,75	-0,38	-0,35	unknown protein		
AT7C19160	0.74	0.54	0.10	ARABIDOPSIS THALIANA BASIC LEUCINE-ZIPPER 2 (ATBZIP2);G-BOX		
A12018100	-0,74	-0,34	0,19	BINDING FACTOR 5 (GBF5)		
AT1G01190	-0,72	-0,22	-0,44	CYTOCHROME P450, FAMILY 78, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 8 (CYP78A8)		
AT5G39580	-0,71	-0,49	-0,30	peroxidase, putative		
AT5G56870	-0,70	-0,49	-0,10	beta-galactosidase 4 (BGAL4)		

Tabela Suplementar 4. Transcritos desestabilizados de forma pós-transcricional exclusivamente por glicose + ABA.

Nota: cordicepina + glicose (CG), cordicepina + ABA (CA), cordicepina + glicose + ABA (CGA). Desestabilização está representada por sinais negativos em verde; resposta não significativa pela estatística, em cinza. Os valores em preto da coluna CG correspondem à resposta por efeito osmótico, e por isso não foram considerados como responsivos à glicose. O sinal (\$) indica que não foi possível ser feita a análise estatística.

Tabela Suplementar 5. Transcritos estabilizados de forma pós-transcricional exclusivamente por glicose + ABA.

	Sinal (Log ₂)		g ₂)	
AGI	CGA	CG	ABA	Descrição
AT2G38760	0,73	0,33	0,30	ANNEXIN ARABIDOPSIS 3 (ANNAT3);ANNEXIN 3 (ANN3)
AT3G22370	0,73	0,33	0,48	ALTERNATIVE OXIDASE 1A (AOX1A); (ATAOX1A)
AT4G34710	0,74	0,51	0,15	ARGININE DECARBOXYLASE 2 (ADC2)
AT5G54960	0,74	0,37	0,53	PYRUVATE DECARBOXYLASE-2 (PDC2)
AT1G31760	0,74	0,06	0,08	SWIB complex BAF60b domain-containing protein
AT3G09260	0,74	0,11	0,15	(PYK10); (PSR3.1); (BGLU23);LONG ER BODY (LEB)
AT2G43920	0,75	-0,38	0,05	thiol methyltransferase, putative
AT3G59220	0,76	0,38	0,27	PIRIN (PRN); (PRN1); (ATPIRIN1)
AT2G30670	0,77	-0,38	-0,14	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase, putative
AT4G35720	0,77	0,56	0,39	unknown protein
AT4G10090	0,78	0,42	0,48	unknown protein
AT2G31560	0,78	0,54	0,39	unknown protein
AT1G68490	0,79	0,43	0,22	unknown protein
AT5G53120	0,81	0,53	0,45	(SPMS);SPERMIDINE SYNTHASE 3 (ATSPDS3)
AT3G16400	0.83	0.37	0.38	MYROSINASE-BINDING PROTEIN-LIKE PROTEIN-470 (ATMLP-
1115010400	0,05	0,57	0,50	470);NITRILE SPECIFIER PROTEIN 1 (NSP1)
AT3G16390	0,85	0,36	0,53	NITRILE SPECIFIER PROTEIN 3 (NSP3)
AT4G22212	0,86	0,12	0,02	defensin-like (DEFL) family protein
AT2G18230	0,87	0,43	0,38	ARABIDOPSIS THALIANA PYROPHOSPHORYLASE 2 (AtPPa2)
AT2G01021	0,88	0,30	0,08	unknown protein
AT5G19110	0,88	0,39	-0,09	extracellular dermal glycoprotein-related / EDGP-related
AT4G25480	0.80	0.43	0.53	DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A (DREB1A);C-REPEAT
111 1025 100	0,05	0,15	0,55	BINDING FACTOR 3 (CBF3); (ATCBF3)
AT1G66270	0,91	0,16	0,16	BGLU21
AT2G38390	0,93	-0,13	-0,08	peroxidase, putative
AT4G36010	0,94	0,50	0,20	pathogenesis-related thaumatin family protein
AT4G22210	0,98	0,18	0,15	LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 85 (LCR85)

Tabela Suplementar 5. Continuação.

	Sir	nal (Lo	g ₂)	
AGI	CGA	CG	ABA	Descrição
AT2G43620	1,07	0,09	0,04	chitinase, putative
AT4G19760	1,09	0,12	0,06	glycosyl hydrolase family 18 protein
AT3G50970	1,83	0,31	\$	LOW TEMPERATURE-INDUCED 30 (LTI30); (XERO2)
AT4E20990	2,37	-0,15	0,05	No hit – Eugene prediction

Nota: cordicepina + glicose (CG), cordicepina + ABA (CA), cordicepina + glicose + ABA (CGA). Estabilização está representada por sinais positivos em vermelho; resposta não significativa pela estatística, em cinza. Os valores em preto da coluna CG correspondem à resposta por efeito osmótico, e por isso não foram considerados como responsivos à glicose. O sinal (\$) indica que não foi possível ser feita a análise estatística. AT4E20990 corresponde a um possível gene previsto pelo Eugene, sistema utilizado para a construção das sondas da plataforma CATMA.

Idantificação	ACI	Microarranjos qRT-PCR AGI Identificaçã CA vs Cord CA vs Cord			Microarranjos	qRT-PCR	
Identificação	AGI			Identificação	AGI	CA vs Cord	CA vs Cord
ARP4	AT1G18450		t	AT1G02820	AT1G02820		
AT5G17460	AT5G17460		t	AT1G23200	AT1G23200		t
AT5G48430	AT5G48430			AT1G26500	AT1G26500		t
AtbZIP60	AT1G42990		t	AT2G17880	AT2G17880		t
AtbZIP63	AT5G28770		t	AT3G15450	AT3G15450		t
CCOAMT	AT1G67980		t	AT5G52190	AT5G52190		t
CIPK6	AT4G30960		t	ATbZIP63	AT5G28770		t
DREB1C	AT4G25470		t	ERF107	AT5G61590		t
DREB2A	AT5G05410		t	FLA16	AT2G35860		
GLP9	AT4G14630			NDL1	AT5G56750		t
HAI1	AT5G59220		t	NFU3	AT4G25910		t
HVA22	AT4G24960		t	REV3	AT1G67500		
NF-YB2	AT5G47640		t	TSP8	AT1G70290		t
P5CS1	AT2G39800		t				
PYL4	AT2G38310		t				
PYL5	AT5G05440		t				
PYL6	AT2G40330		t				
PYL7	AT4G01026		t				
Rd20	AT2G33380		t				
SPS2F	AT5G11110		t				
UPS5	AT1G26440		t				

Tabela Suplementar 6. Validação dos resultados de microarranjos pela análise de genes responsivos a glicose e ABA por qRT-PCR.

Nota. Como os valores absolutos dos resultados de microarranjos e de qRT-PCR não são diretamente comparáveis, são apresentados os sentidos das regulações: desestabilização em verde; estabilização em vermelho. Em cinza estão apresentados os transcritos que não tiveram alteração dos níveis pela análise por qRT-PCR. As respostas ao tratamento cordicepina + ABA (CA) e cordicepina + glicose (CG) são em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). Valores de qRT-PCR considerados estatisticamente significativos segundo o teste t de Student estão denotados por um (t).

	Sinal (Log ₂)		(₂)	
AGI	CGA	CG	CA	Descrição
AT5G56750	-2,13	-2,45	-0,01	N-MYC DOWNREGULATED-LIKE 1 (NDL1)
AT1G80440	-2,02	-2,13	-0,29	kelch repeat-containing F-box family protein
AT3G15450	-1,96	-2,08	-0,23	unknown protein
AT5G49450	-1,72	-2,25	-0,02	Arabidopsis thaliana basic leucine-zipper 1 (AtbZIP1)
AT5G15350	-1,72	-0,81	-0,51	EARLY NODULIN-LIKE PROTEIN 17 (ENODL17)
AT1G76600	-1,52	-1,64	-0,33	unknown protein
				REGULATOR OF THE ATPASE OF THE VACUOLAR MEMBRANE
AT1G68840	-1,49	-1,04	-0,53	(RAV2);TEMPRANILLO 2 (TEM2);ETHYLENE RESPONSE DNA
				BINDING FACTOR 2 (EDF2)
AT4G36040	-1,47	-1,19	-0,53	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein (J11)
AT2G17880	-1,4	-1,63	-0,38	DNAJ heat shock protein, putative
AT2G32150	-1,39	-1,4	0,09	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
AT1G03870	-1,38	-0,59	-0,5	FASCICLIN-LIKE ARABINOOGALACTAN 9 (FLA9)
AT4C02280	1 27	176	0.05	SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21 (SAG21);ARABIDOPSIS
A14002380	-1,37	-1,70	76 -0,05	THALIANA LATE EMBRYOGENENSIS ABUNDANT LIKE 5 (AtLEA5)
AT3G10020	-1,32	-1,38	0,12	unknown protein
AT5G22920	-1,28	-1,29	-0,41	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT5G17400	1 26	1 59	0.02	ENDOPLASMIC RETICULUM-DENINE NUCLEOTIDE
A1301/400	-1,20	-1,30	-0,02	TRANSPORTER 1 (ER-ANT1)
AT3G57450	-1,22	-0,89	-0,25	unknown protein
AT3G15630	-1,17	-1,15	-0,38	unknown protein
AT4G27450	-1,12	-1,1	-0,41	unknown protein
AT5G39785	-1,12	-1,69	0,12	structural constituent of ribosome
AT1G02820	-1,12	-1,29	0,28	late embryogenesis abundant 3 family protein / LEA3 family protein
AT4G32480	-1,11	-1,45	-0,22	unknown protein
AT2G20670	-1,11	-1,19	-0,06	unknown protein
AT1G67500	-1,11	-1,25	-0,39	ARABIDOPSIS THALIANA RECOVERY PROTEIN 3 (ATREV3)
AT1G77210	-1,09	-0,95	-0,22	SUGAR TRANSPORTER 14 (STP14); (AtSTP14)
AT1G61820	-1,08	-0,9	-0,48	BETA GLUCOSIDASE 46 (BGLU46)

Tabela Suplementar 7. Transcritos desestabilizados de forma pós-transcricional por glicose + ABA e que também foram desestabilizados pelos tratamentos com glicose ou ABA.

Tabela Suplementar 7. Co	ontinuação.
--------------------------	-------------

	Sinal (Log ₂)		g ₂)	
AGI	CGA	CG	CA	Descrição
AT1G71030	-1,07	-1,07	-0,33	ARABIDOPSIS MYB-LIKE 2 (MYBL2)
AT5G26740	-1,07	-1,05	-0,09	unknown protein
AT3G62420	-1,06	-1,18	0	BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 53 (ATBZIP53)
AT1G78290	-1,04	-1,26	-0,32	serine/threonine protein kinase, putative
AT1G30730	-1,03	-1,01	-0,48	FAD-binding domain-containing protein
AT5G16110	-1	-1,32	0,31	unknown protein
AT2G37750	-0,97	-1,03	-0,14	unknown protein
AT4G25910	-0,95	-1,7	0,43	NFU DOMAIN PROTEIN 3 (NFU3); (AtCNFU3)
AT4G37250	-0,95	-1,01	-0,13	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein
AT5G61600	-0,94	-0,91	-0,18	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 104 (ERF104)
AT3G52840	-0,93	-0,74	-0,3	beta-galactosidase 2 (BGAL2)
AT1G35140	-0,93	-1,4	0,19	PHOSPHATE-INDUCED 1 (PHI-1);EXORDIUM LIKE 7 (EXL7)
AT3G13450	-0,92	-0,8	-0,08	DIN4 (DARK INDUCIBLE 4)
AT1G12440	-0,91	-0,87	0,12	zinc finger (AN1-like) family protein
AT1G47240	-0,91	-0,77	-0,44	NRAMP METAL ION TRANSPORTER 2 (NRAMP2); (ATNRAMP2)
AT1G47655	-0,91	-0,92	0,11	Dof-type zinc finger domain-containing protein
AT4G27745	-0,91	-0,81	0,06	unknown
AT3G61190	-0,9	-1,18	-0,44	BON ASSOCIATION PROTEIN 1 (BAP1)
AT1G80920	-0,89	-1,54	0,03	J8 mRNA, nuclear gene encoding plastid protein
AT3G26740	-0,89	-1,02	-0,23	CCR-LIKE (CCL)
AT4G38470	-0,88	-0,96	-0,26	protein kinase family protein
AT1G31817	-0,86	-1,03	-0,19	NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 3 (NFD3)
AT2G36900	-0,85	-1,01	0,3	MEMBRIN 11 (MEMB11); (ATMEMB11)
				MERISTEM-5 (MERI5B);MERISTEM 5 (MERI-5);XYLOGLUCAN
AT4G30270	-0,83	-0,92	-0,06	ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 24
				(XTH24);SENESCENCE 4 (SEN4)
AT1G76990	-0,83	-0,81	-0,09	ACR3
AT1G25400	-0,82	-1,23	-0,37	unknown protein
AT1G70290	-0,82	-0,87	0,02	TREHALOSE -6-PHOSPHATASE SYNTHASE S8 (TPS8); (ATTPSC)
AT1G27130	-0.82	-0.92	-0.32	ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU
	.,02	~~~	0,02	13 (ATGSTU13);GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 12 (GST12)

Tabela Suplementar 7.	. Continuação.
-----------------------	----------------

	Si	nal (Log	g ₂)	
AGI	CGA	CG	CA	Descrição
AT2G20130	-0,8	-0,91	0,46	LIKE COV 1 (LCV1)
AT2G21185	-0,79	-0,91	-0,01	unknown protein
AT1E61070	-0,79	-0,79	-0,09	EUGENE prediction
AT1G58180	-0,78	-0,75	0,06	BETA CARBONIC ANHYDRASE 6 (BCA6)
AT2G33990	-0,78	-0,95	-0,19	IQ-domain 9 (iqd9)
AT3G52060	-0,76	-0,73	\$	unknown protein
AT2G20120	-0,75	-0,91	0,33	CONTINUOUS VASCULAR RING (COV1)
AT1C12260	0.75	0 (1	0.19	RELATED TO ABI3/VP1 1 (RAV1);ETHYLENE RESPONSE DNA
AT1015200	-0,75	-0,01	-0,18	BINDING FACTOR 4 (EDF4)
AT4G29905	-0,75	-0,81	-0,05	unknown protein
AT1G78460	-0,74	-1,1	-0,1	SOUL heme-binding family protein
AT3G10113	-0,73	-0,75	0,53	myb family transcription factor
AT2G36320	-0,72	-0,98	0,07	zinc finger (AN1-like) family protein
AT3G29240	-0,72	-0,86	0,19	unknown protein
AT2C20400	0.71	0.0	0.05	TYPE ONE PROTEIN PHOSPHATASE 1 (TOPP1);PROTEIN
A12029400	-0,/1	-0,9	0,05	PHOSPHATASE 1 (PP1-AT)
AT3G24120	-0,71	-0,9	0,12	myb family transcription factor
AT4G31290	-0,71	-0,97	0,28	ChaC-like family protein
AT4G10160	-0,71	-0,71	0,04	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT5G61440	-0,71	-0,73	-0,26	ATYPICAL CYS HIS RICH THIOREDOXIN 5 (ACHT5)
AT4G19420	-0,7	-0,75	-0,33	pectinacetylesterase family protein
AT1G67980	-1,52	-1,03	-1,15	CAFFEOYL-COA 3-O-METHYLTRANSFERASE (CCOAMT)
AT5C57685	1.09	0.76	0.8	GLUTAMINE DUMPER3 (GDU3);LESS SUSCEPTIBLE TO BSCTV 1
A15057005	-1,00	-0,70	-0,0	(LSB1)
AT3G16150	-1,07	-0,73	-0,74	L-asparaginase, putative / L-asparagine amidohydrolase, putative
AT5G05440	-1.05	-1.03	-0.97	PYRABACTIN RESISTANCE 1-LIKE 5 (PYL5);REGULATORY
A15005440	-1,05	-1,05	-0,97	COMPONENT OF ABA RECEPTOR 8 (RCAR8)
AT5G48430	-1,01	-1,02	-1,05	aspartic-type endopeptidase
AT1G76160	-1	-0,86	-0,56	SKU5 Similar 5 (sks5)

Tabela Suplementar 7. Continuação.

	Sinal (Log ₂)			
AGI	CGA	CG	CA	Descrição
AT5G18290	-0,98	-0,83	-0,59	(SIP1;2);SMALL AND BASIC INTRINSIC PROTEIN 1B (SIP1b)
AT2G40330	-0,83	-0,59	-0,79	PYR1-LIKE 6 (PYL6)
AT4G14630	-0,77	-0,93	-0,92	GERMIN-LIKE PROTEIN 9 (GLP9)
AT2G38310	-1,23	-0,46	-1,33	PYR1-LIKE 4 (PYL4)
AT4G33610	-1,23	\$	-0,91	glycine-rich protein
AT1G13110	-0,96	-0,35 -0,77		CYTOCHROME P450, FAMILY (CYP71B7)
AT4G18197	-0,54	-0,09	-0,74	PEROXIN 17 (PEX17);PURINE PERMEASE 7 (PUP7)
AT1G58320	-0,89	-0,53	-0,72	unknown protein
AT3G44300	-0,89	-0,16	-0,72	NITRILASE 2 (NIT2);NITRILASE 2 (AtNIT2)
AT1G52200	-0,72	-0,47	-0,67	unknown protein
AT3G04720	-0,7	0	-0,66	PATHOGENESIS-RELATED 4 (PR4);HEVEIN-LIKE (HEL)

Nota: um corte de $|0,7| \log_2$ foi aplicado para filtrar os genes diferencialmente expressos em resposta à cordicepina + glicose + ABA e aumentar a confiabilidade da análise. Cordicepina + glicose (CG), cordicepina + ABA (CA), cordicepina + glicose + ABA (CGA). Desestabilização está representada por sinais negativos em verde; estabilização por sinais positivos em vermelho; resposta não significativa pela estatística, em cinza. Os valores em preto da coluna CG correspondem à resposta por efeito osmótico, e por isso não foram considerados como responsivos à glicose. O sinal (\$) indica que não foi possível ser feita a análise estatística.

	Sinal (Log ₂)		2)		
AGI	CGA	CG	CA	Descrição	
AT3G27250	0,7	0,12	1,11	unknown protein	
AT5C62220	0.7	0.26	0.57	exostosin family protein; A. THALIANA GLYCOSYLTRANSFERASE	
A13002220	0,7	0,50	0,57	18 (ATGT18)	
AT1G52827	0,71	0,51	0,65	CADMIUM TOLERANCE 1 (CDT1)	
AT5G08130	0,71	0,34	0,58	Arabidopsis thaliana basic helix-loop-helix (bHLH) family protein (BIM1)	
AT5G62130	0,72	0,35	0,77	Per1-like protein-related	
AT5G51160	0,72	0,6	0,56	ankyrin repeat family protein	
AT5C64520	0.72	0.29	0.(2	ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 104	
A15004550	0,72	0,38	0,03	(ANAC104);XYLEM NAC DOMAIN 1 (XND1)	
AT1G44960	0,72	0,2	0,73	unknown	
AT1G73480	0,73	0,36	1,2	hydrolase, alpha/beta fold family	
AT4G23920	0,74	0,51	0,59	UDP-D-GLUCOSE/UDP-D-GALACTOSE 4-EPIMERASE 2 (UGE2)	
AT5G12840	0,74	0,6	1,05	NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A1 (NF-YA1)	
AT3G24500	0,76	0,48	0,86	MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1C (MBF1C)	
AT3G15670	0,76	0,42	0,85	late embryogenesis abundant protein, putative	
AT4G29190	0,78	0,24	1,19	zinc finger (CCCH-type) family protein	
AT2G15970	0,78	0,33	1,05	(FL3-5A3);CYCLOPHILLIN 19 (ATCYP19)	
AT3G30210	0,79	0,03	0,63	MYB DOMAIN PROTEIN 121 (MYB121)	
AT5G53590	0,79	0,49	0,75	auxin-responsive family protein	
AT3C24840	0.70	0.41	0.50	SEC14 cytosolic factor, putative / phosphoglyceride transfer protein,	
AT5024040	0,79	0,41	0,39	putative	
AT1G26450	0,79	0,53	0,76	beta-1,3-glucanase-related	
AT4G11320	0,8	0,61	0,75	cysteine proteinase, putative	
AT1G52690	0,81	0,41	1,21	late embryogenesis abundant protein, putative	
AT5G52420	0,81	0,38	1,19	unknown protein	
AT1G79270	0,83	0,18	0,91	EVOLUTIONARILY CONSERVED C-TERMINAL REGION 8 (ECT8)	
AT4G08455	0,84	0,65	0,93	BTB/POZ domain-containing protein	
AT4G40010	0,84	0,6	0,9	SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.7 (SNRK2.7)	
AT2G22430	0,85	0,85	1,09	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX PROTEIN 6 (ATHB6)	

Tabela Suplementar 8. Transcritos estabilizados de forma pós-transcricional por glicose + ABA e que também foram estabilizados pelos tratamentos com glicose ou ABA.

Tabela Suplementar 8. Continuação.

	Sinal (Log ₂)		2)	-
AGI	CGA	CG	CA	Descrição
AT5G22290	0,86	0,51	1,24	ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 89 (anac089)
AT4G34230	0,86	0,6	0,66	CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 5 (CAD-5)
AT5C62700	0.96	0.41	1.24	ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102
A13003790	0,80	0,41	1,24	(anac102)
AT1G27930	0,86	0,32	0,67	unknown
ATEC 20070	0.07	0.50	0.97	ARABIDOPSIS THALIANA NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 19
A15G20070	0,87	0,39	0,87	(ATNUDX19)
AT1G77680	0,89	0,68	0,82	ribonuclease II family protein
AT2G46420	0,89	0,39	0,65	unknown protein
AT1G21790	0,9	0,1	0,97	unknown
AT3G13620	0,91	0,73	0,66	amino acid permease family protein
AT1C77120	0.02	0.01	1.07	ARABIDOPSIS THALIANA ALCOHOL DEHYDROGENASE
AI10//120	0,92	-0,01	1,07	(ATADH); (ATADH1)
AT2G17840	0,92	0,25	0,66	EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7 (ERD7)
				ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU
AT5G62480	0,95	0,71	0,92	9 (ATGSTU9);GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 14
				(GST14);GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 14B (GST14B)
AT1G70850	0,97	0,51	0,87	MLP-LIKE PROTEIN 34 (MLP34)
AT2C22510	0.00	0.19	1 1 2	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 17
A12052510	0,99	0,18	1,15	(MAPKKK17)
AT2G23120	1	0,12	1,05	unknown
AT2G41870	1,01	0,39	1,21	remorin family protein
AT4G11310	1,02	0,71	1,26	cysteine proteinase precursor-like
AT4G30470	1,02	0,71	1,03	cinnamoyl-CoA reductase-related
AT4G27410	1,05	0,31	1,1	RESPONSIVE TO DESICCATION 26 (RD26)
AT1G07870	1,05	0,35	0,74	protein kinase family protein
AT1G26440	1,05	0,54	1,21	ARABIDOPSIS THALIANA UREIDE PERMEASE 5 (ATUPS5); (UPS5)
AT3G24520	1,06	0,74	1,14	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR C1 (HSFC1)
AT2G39800	1,07	0,2	1,41	DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1 (P5CS1)

Tabela Suplementar 8. Continuação.

	Siı	nal (Log	(2)	
AGI	CGA	CG	CA	Descrição
				GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 30 (GST30);GLUTATHIONE S-
AT1G10370	1.02	0.1	11	TRANSFERASE TAU 17 (ATGSTU17);GLUTATHIONE S-
AT1010570	1,08	0,1	1,1	TRANSFERASE 30B (GST30B);EARLY-RESPONSIVE TO
				DEHYDRATION 9 (ERD9)
AT5C05410	1.00	0.75	1.50	DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2
A13003410	1,09	0,75	1,52	(DREB2)
AT4G21570	1,1	0,42	0,81	unknown protein
AT1G51140	1,11	0,6	1,34	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
AT3G62260	1,12	0,51	1,25	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative
AT2C22020	1 1 2	0.52	1.03	BETA-AMYLASE 1 (BAM1);BETA-AMYLASE 7 (BMY7); (TR-
AT3023920	1,15	0,52	1,05	BAMY)
AT3G29575	1,17	0,65	1,75	ABI FIVE BINDING PROTEIN 3 (AFP3)
AT1G18450	1,17	0,68	1,43	ACTIN-RELATED PROTEIN 4 (ARP4)
AT5G15960	1,17	0,09	1,33	cold and ABA inducible protein kin1 (KIN1)
AT3G11410	1 17	0.77	1 58	(AHG3);ARABIDOPSIS THALIANA PROTEIN PHOSPHATASE 2CA
115011410	1,17	0,77	1,50	(PP2CA)
AT4G34000	1.18	0.73	1 43	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3
1114054000	1,10	0,75	1,40	(ABF3);DC3 PROMOTER-BINDING FACTOR 5 (DPBF5)
AT1G80110	1,18	0,48	1,48	ARABIDOPSIS THALIANA PHLOEM PROTEIN 2-B11 (ATPP2-B11)
AT1G56600	1,19	0,1	0,86	ARABIDOPSIS THALIANA GALACTINOL SYNTHASE 2 (AtGolS2)
AT1G01470	1.2	0.41	1.24	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 14 (LEA14);LIGHT STRESS-
	-,-	0,11	-,	REGULATED 3 (LSR3)
AT3G22830	1,22	0,34	1,41	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A6B (HSFA6B)
AT1G16850	1,23	0,46	1,33	unknown protein
AT3G61890	1,23	0,35	1,68	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX 12 (ATHB12)
AT5G40390	1,25	0,99	0,75	SEED IMBIBITION 1-LIKE (SIP1)
AT3G57010	1,3	0,85	0,74	strictosidine synthase family protein
AT5G03210	1,31	0,83	1,07	unknown protein
AT2G21130	1,31	0,38	1,17	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / cyclophilin (CYP2) / rotamase

Tabela Suplementar 8	B. C	Continuaç	ão.
----------------------	-------------	-----------	-----

	Sinal (Log ₂)						
AGI	CGA	CG	CA	Descrição			
AT5G17460	1,33	0,27	1,36	unknown protein			
AT4G25670	1,34	0,53	1,04	unknown protein			
AT1G18980	1,44	0,72	1,54	germin-like protein, putative			
AT3G03341	1,51	0,65	1,61	unknown protein			
AT5G43150	1,56	0,93	1,27	unknown protein			
AT2G46680	1,57	0,89	1,85	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX 7 (ATHB7)			
AT4G12550	1,6	0,49	0,93	AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES 1 (AIR1)			
AT5G59220	1,81	1,5	2,38	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1 (HAI1)			
AT4G12545	1,81	0,52	0,84	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family			
AT5G47640	1,87	1,23	2,16	NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT B2 (NF-YB2)			
AT1G56170	1,89	0,55	1,71	NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C2 (NF-YC2); (HAP5B)			
AT1G78070	1,94	1,4	1,93	unknown			
AT2C47770	2,12 \$ 2,1		1 01	ARABIDOPSIS THALIANA TSPO (OUTER MEMBRANE			
A1204/770			2,01	TRYPTOPHAN-RICH SENSORY PROTEIN)-RELATED (ATTSPO)			
				LOW TEMPERATURE INDUCED 29 (LTI29);LOW TEMPERATURE			
AT1G20450	2,17	1,1	2,41	INDUCED 45 (LTI45); EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 10			
				(ERD10)			
AT4G22610	2,34	1,16	0,73	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family			
AT3G02230	0,82	0,91	0,19	REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1 (RGP1)			
AT1C69550	0.02	0.00	0.42	ERF (ethylene response factor) subfamily B-6 of ERF/AP2 transcription			
AT1008550	0,85	0,90	0,42	factor family			
AT2C25060	0.72	1.00	0.12	FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN 16 PRECURSOR			
A12033800	0,73	1,09	0,13	(FLA16)			

Nota: um corte de $|0,7| \log_2$ foi aplicado para filtrar os genes diferencialmente expressos em resposta à cordicepina + glicose + ABA e aumentar a confiabilidade da análise. Cordicepina + glicose (CG), cordicepina + ABA (CA), cordicepina + glicose + ABA (CGA). Estabilização está representada por sinais positivos em vermelho; resposta não significativa pela estatística, em cinza. Os valores em preto da coluna CG correspondem à resposta por efeito osmótico, e por isso não foram considerados como responsivos à glicose. O sinal (\$) indica que não foi possível ser feita a análise estatística.

	Regu	lação pós- Adap	transcric tação a es	ional por . stresse	ABA /	Regulação pós-transcricional por glicose / Adaptação a estresse				
	Mesmo	o sentido	Resposta oposta			Mesmo sentido		Resposta oposta		
Estresse	+/+	- / -	+/-	-/+	Total	+/+	-/-	+/-	- / +	Total
Frio 2h	10	0	0	3	13	1	0	0	27	28
Frio 10h	31	2	10	9	52	0	3	1	24	28
Seca 2h	100	2	2	0	104	3	1	5	37	46
Seca 10h	132	9	7	1	149	5	10	7	44	66
NaCl 2h	104	6	2	2	114	3	2	5	56	66
NaCl 10h	128	10	10	4	152	3	4	13	84	104

Tabela Suplementar 9. Comparação dos transcritos que apresentaram resposta pós-transcricional à glicose ou ABA com as respostas observadas em condições de estresses a seca, frio e alta salinidade.

Nota. Cada coluna mostra as comparações entre os transcritos regulados de forma pós-transcricional com relação aos identificados por Matsui *et al.* (2008), respectivamente. O sinal (+) representa estabilização pós-transcricional ou indução em condições normais de transcrição, enquanto (-) representa desestabilização pós-transcricional ou repressão em condições normais de transcrição.
		-	Sinal	(log2)
AGI	Símbolo	Família	CG vs	CGA vs
			Cord	Cord
AT1G75490	DREB2D	AP2-EREBP	-0,86	-0,49
AT5G61600	ERF104	AP2-EREBP	-0,91	-0,94
AT5G61590	ERF107	AP2-EREBP	-1,68	-1,87
AT1G68550	ERF118	AP2-EREBP	0,96	0,83
AT5G47220	ERF2, ATERF2	AP2-EREBP	-0,65	-0,59
AT1G13260	RAV1, EDF4	AP2-EREBP	-0,61	-0,75
AT1G68840	RAV2, RAP2.8, TEM2, EDF2	AP2-EREBP	-1,04	-1,49
AT2G21240	BPC4, BBR/BPC4, ATBPC4	BBR/BPC	-0,61	-0,51
AT3G19860	bLHL121	bHLH	-0,71	-0,63
AT5G49450*	ATBZIP1	bZIP	-2,25	-1,72
AT5G24800	ATBZIP9, BZO2H2	bZIP	-1,13	-0,50
AT3G62420	ATBZIP53	bZIP	-1,18	-1,06
AT5G28770*	ATBZIP63, BZO2H3	bZIP	-1,44	-1,19
AT3G21890	-	C2C2(Zn)-CO-like	1,01	1,92
AT3G07650	COL9	C2C2(Zn)-CO-like	-0,86	-0,59
AT1G47655	DOF1.6	C2C2(Zn)-Dof	-0,92	-0,91
AT3G55980	SZF1, ATSZF1	C3H-type 1(Zn)	-0,58	-0,67
AT3G24120	-	GARP-G2-like	-0,90	-0,71
AT3G10113	-	Myb	-0,75	-0,73
AT1G71030*	MYBL2, ATMYBL2	Myb	-1,07	-1,07
AT5G17300*	RVE1	Myb	-0,69	_
AT5G13080	ATWRKY75, WRKY75	WRKY	-0,66	_
AT3G48360	BT2	TAZ	-0,99	-1,47

Tabela Suplementar 10. Fatores de transcrição regulados de forma pós-transcricional por glicose.

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + glicose (CG) e cordicepina + glicose + ABA (CGA) são em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). A classificação foi feita com base no banco de dados do TAIR, *Gene Ontology* e segundo Mitsuda & Ohme-Takagi (2009). Estabilização está representada com valores positivos em vermelho, desestabilização por valores negativos em verde, e não-responsivo pelo sinal (–). Os fatores de transcrição marcados com asterisco são alvos de regulação por KIN10.

			Sina	l (log2)
AGI	Símbolo	Família	CA vs Cord	CGA vs Cord
AT3G61630	CRF6	AP2-EREBP	0,57	_
AT4G25490	DREB1B, CBF1	AP2-EREBP	0,76	_
AT4G25470	DREB1C, CBF2, FTQ4	AP2-EREBP	0,91	_
AT5G51990	DREB1D, CBF4	AP2-EREBP	1,44	0,69
AT5G05410	DREB2A	AP2-EREBP	1,52	1,09
AT3G11020	DREB2B	AP2-EREBP	0,72	_
AT4G36900	ERF009, RAP2.10	AP2-EREBP	0,76	0,57
AT5G61590	ERF107	AP2-EREBP	-0,68	-1,87
AT1G51140	bHLH122	bHLH	1,34	1,11
AT5G08130	BIM1, bHLH046	bHLH	0,58	0,71
AT4G34000	ATBZIP37, ABF3, DPBF5	bZIP	1,43	1,18
AT3G19290*	ATBZIP38, AREB2, ABF4	bZIP	0,72	_
AT4G01120*	ATBZIP54, GBF2	bZIP	1,28	_
AT1G42990	AtBZIP60	bZIP	0,57	0,58
AT5G28770*	ATBZIP63, BZO2H3	bZIP	-0,64	-1,19
AT3G21890	-	C2C2(Zn)-Dof	1,00	1,92
AT5G60850	OBP4, AtDof5. 4	C2C2(Zn)-Dof	0,76	_
AT3G19580*	AZF2	C2H2(Zn)	0,75	-
AT4G29190	-	C3H-type 1(Zn)	1,19	0,78
AT3G61890*	ATHB-12	Homeobox	1,68	1,23
AT4G40060	ATHB-16	Homeobox	0,59	_
AT2G22430	ATHB-6	Homeobox	1,09	0,85
AT2G46680	ATHB-7	Homeobox	1,85	1,57
AT3G22830	HSFA6b, AT-HSFA6B	HSF	1,41	1,22
AT3G24520	HSFC1, AT-HSFC1	HSF	1,14	1,06
AT3G24500	MBF1C, ATMBF1C	MBF1	0,86	0,76
AT3G30210	MYB121	MYB	0,63	0,79
AT1G22640	MYB3	MYB	0,64	_
AT5G67300	MYB44, ATMYBR1	MYB	0,71	_
AT1G77450	ANAC032	NAC	1,70	0,63

Tabela Suplementar 11. Fatores de transcrição regulados de forma pós-transcricional por ABA.

Tabela Suplementar 11. Continuação.

			Sina	l (log2)
AGI	Símbolo	Família	CA vs Cord	CGA vs Cord
AT5G22290	ANAC089	NAC	1,00	0,86
AT5G63790	ANAC102	NAC	1,24	0,86
AT5G64530	ANAC104, XND1	NAC	0,63	0,72
AT4G27410	RD26, ANAC072	NAC	1,10	1,05
AT5G12840	NF-YA1, ATHAP2A, HAP2A	NFYA/HAP2	1,05	0,74
AT1G30500	NFYA7	NFYA/HAP2	0,55	-
AT5G47640	NF-YB2, HAP3b	NFYB/HAP3	2,16	1,87
AT1G56170	NF-YC2, ATHAP5B, HAP5B	NFYC/HAP5	1,71	1,89

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + ABA (CA) e cordicepina + glicose + ABA (CGA) são em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). A classificação foi feita com base no banco de dados do TAIR, *Gene Ontology* e segundo Mitsuda & Ohme-Takagi (2009). Estabilização está representada com valores positivos em vermelho, desestabilização por valores negativos em verde, e não-responsivo pelo sinal (–). Os fatores de transcrição marcados com asterisco são alvos de regulação por KIN10.

			Sinal (log2)
AGI	Símbolo	Família	CGA vs Cord
AT4G25480	DREB1A, ERF072, CBF3	AP2-EREBP	0,89
AT5G47230	ERF5, ERF102	AP2-EREBP	-0,53
AT3G50260	ERF011, CEJ1, DEAR1	AP2-EREBP	0,51
AT5G43700	IAA4, ATAUX2-11	AUX-IAA	-0,83
AT2G18160	ATBZIP2, GBF5	bZIP	-0,74
AT5G62430	CDF1, AtDof5,5	C2C2(Zn)-Dof	0,58
AT1G75540	STH2	C2C2-CO-like	-0,58
AT3G54810	GATA8, BME3, BME3-ZF	C2C2-GATA (Zn)	-0,51
AT3G60530	GATA4	C2C2-Gata(Zn)	-0,60
AT2G40140	ATSZF2, CZF1, ZFAR1	C3H-type 1(Zn)	-0,62
AT2G40970	MYBC1	GARP-G2-like	-0,68
AT1G07530	SCL14, ATGRAS2	GRAS	-0,53
AT4G35550	HB-4, WOX13	Homeobox	0,67
AT5G08520	-	MYB	-0,57
AT5G59780	MYB59	MYB	-0,52
AT5G07680	ANAC079, ATNAC4, ANAC080	NAC	0,55

Tabela Suplementar 12. Fatores de transcrição regulados de forma pós-transcricional exclusivamente por glicose + ABA.

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + glicose + ABA (CGA) é em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). A classificação foi feita com base no banco de dados do TAIR, *Gene Ontology* e segundo Mitsuda & Ohme-Takagi (2009). Estabilização está representada com valores positivos em vermelho, desestabilização por valores negativos em verde.

Tabela Suplementar 13. Transcritos que apresentaram regulação pós-transcricional por glicose e que são alvos da regulação por KIN10. Como os microarranjos são de plataformas diferentes, foram comparados somente os sentidos das regulações.

AGI	Descrição	CG vs Cord	KIN10
AT5G49450	bZIP family transcription factor AtbZIP1	_	+
AT1G80440	kelch repeat-containing F-box family protein	-	+
AT3G15450	unknown protein	_	+
AT2G17880	DNAJ heat shock protein, putative	_	+
AT1G80920	J8; heat shock protein binding / unfolded protein binding	_	+
AT5G28770	BZO2H3 (basic leucine zipper O2 homolog 3); DNA binding /	_	+
1115020770	transcription factor		
AT1G35140	PHI-1 (PHOSPHATE-INDUCED 1)	-	+
AT2G32150	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	-	+
AT3G10020	unknown protein	-	+
AT5G22920	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-	+
AT1G78290	serine/threonine protein kinase, putative	-	+
AT5G56100	glycine-rich protein / oleosin	_	+
AT2G39570	ACT domain-containing protein	_	+
AT1G25400	unknown protein	_	+
AT2G20670	unknown protein	_	+
AT3G15630	unknown protein	_	+
AT4G27450	unknown protein	_	+
AT1G78460	SOUL heme-binding family protein	_	+
AT1C71020	ATMYBL2 (Arabidopsis myb-like 2); DNA binding /		
AIIG/1030	transcription factor	-	+
AT5G18670	BMY3 (beta-amylase 3); beta-amylase	_	+
AT1G03850	glutaredoxin family protein	-	+
AT3G26740	CCL (CCR-LIKE)	-	+
AT5G42900	unknown protein	-	+
AT4G38470	protein kinase family protein	-	+
AT3G07310	unknown protein	-	+
AT1G77210	sugar transporter, putative	-	+
AT3G15620	UVR3 (UV REPAIR DEFECTIVE 4)	_	+

Tabela Suplementar 13. Continuação.

AGI	Descrição	CG vs Cord	KIN10
	ERD5 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5,		
AT3G30775	PROLINE OXIDASE); proline dehydrogenase	-	+
AT4G30270	MERI5B (MERISTEM-5); hydrolase, acting on glycosyl bonds	_	+
AT1G61820	BGLU46; hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	_	+
AT1C70200	ATTPS8 (Arabidopsis thaliana trehalose phosphatase/synthase		
ATTG/0290	8); transferase, transferring glycosyl groups	_	+
AT3G29240	unknown protein	_	+
AT2G34070	unknown protein	_	_
AT3G13450	DIN4 (DARK INDUCIBLE 4)	_	+
AT4G35770	SEN1 (DARK INDUCIBLE 1)	_	+
AT1G10140	unknown protein	_	+
AT1G70820	phosphoglucomutase, putative / glucose phosphomutase, putative	_	+
AT1G58180	carbonate dehydratase/ zinc ion binding	-	+
AT4G19420	pectinacetylesterase family protein	_	+
AT4G16520	ATG8F (AUTOPHAGY 8F); microtubule binding	_	+
AT3G52060	unknown protein	-	+
AT2G24550	unknown protein	-	+
AT3G47160	protein binding / zinc ion binding	-	+
AT5G17300	myb family transcription factor	-	+
AT4G28270	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-	+
AT1G56220	dormancy/auxin associated family protein	-	+
AT2G38210	ethylene-responsive protein, putative	-	+
AT5G24165	unknown protein	-	+
AT1G42550	PMI1 (PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1)	-	+
AT2G39400	hydrolase, alpha/beta fold family protein	-	+
AT1G05340	unknown protein	-	+
AT1G03610	unknown protein	-	+
ATAC 35630	PSAT (phosphoserine aminotransferase); phosphoserine		
A14G35630	transaminase	+	_

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + glicose (CG) é em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). O sentido da resposta aos tratamentos está representado como: desestabilização (-); estabilização (+).

		Sina	l (log2)
AGI	Descrição	CA vs Cord	CGA vs Cord
At3g17510	SnRK3.16, CIPK1	-1,27	-0,65
At2g07180*	protein kinase, putative	-0,91	-0,64
At4g37250*	protein kinase family protein	-1,01	-0,95
At1g78290	SNRK2.8, SRK2C	-1,26	-1,04
At4g38470*	protein kinase family protein	-0,96	-0,88
At5g59440*	ATTMPK.1, ATTMPK.2, ZEUS1	-1,01	-0,59

Tabela Suplementar 14. Quinases reguladas de forma pós-transcricional por glicose.

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + glicose (CG) e cordicepina + glicose + ABA (CGA) são em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). A descrição foi feita com base no banco de dados do TAIR. Desestabilização está representada por valores negativos em verde. Estão marcadas por um asterisco as quinases que apresentaram resposta a ao menos uma das condições de estresse (ABA, frio, seca ou estresse salino) analisadas por Matsui *et al.* (2008).

	Sina	l (log2)
Descrição	CA vs Cord	CGA vs Cord
protein kinase family protein	-0,54	_
CIPK11, PKS5, SNRK3.22, SIP4 (SOS3-INTERACTING	0,54	0.52
PROTEIN 4)		0,52
protein kinase, putative	0,58	_
protein kinase family protein	0,74	1,05
ATWL4, SnRK3.9, WL4, CIPK12	0,83	_
SRK2F, SNRK2.7	0,90	0,84
MAPKKK17	1,13	0,99
CIPK6, SNRK3.14, SIP3 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 3)	1,17	0,66
	Descrição protein kinase family protein CIPK11, PKS5, SNRK3.22, SIP4 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 4) protein kinase, putative protein kinase family protein ATWL4, SnRK3.9, WL4, CIPK12 SRK2F, SNRK2.7 MAPKKK17 CIPK6, SNRK3.14, SIP3 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 3)	Sina Descrição CA vs Cord protein kinase family protein -0,54 CIPK11, PKS5, SNRK3.22, SIP4 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 4) 0,54 protein kinase, putative 0,58 protein kinase, putative 0,54 ATWL4, SnRK3.9, WL4, CIPK12 0,83 SRK2F, SNRK2.7 0,90 MAPKKK17 1,13 CIPK6, SNRK3.14, SIP3 (SOS3-INTERACTING PROTEINS) 1,17

 Tabela Suplementar 15. Quinases reguladas de forma pós-transcricional por ABA.

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + ABA (CA) e cordicepina + glicose + ABA (CGA) são em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). A descrição foi feita com base no banco de dados do TAIR. Estabilização está representada por valores positivos em vermelho, desestabilização por valores negativos em verde, e não-responsivo pelo sinal (–). Estão marcadas por um asterisco as quinases que apresentaram resposta a ao menos uma das condições de estresse (ABA, frio, seca ou estresse salino) analisadas por Matsui *et al.* (2008).

 Tabela Suplementar 16. Quinases reguladas de forma pós-transcricional exclusivamente por glicose +

 ABA.

		Sinal (log2)	
AGI	Descrição	CGA vs Cord	
At1g48480*	RKL1	-0,78	
At1g53730*	SRF6 (STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 6)	-0,63	
At2g02800	APK2B (PROTEIN KINASE 2B)	-0,52	
At4g08920*	ATCRY1, BLU1, HY4, OOP2, CRY1 (CRYPTOCHROME 1)	-0,50	
A.5.01020*	ATCIPK14, CIPK14, SnRK3.15, ATSR1 (ARABIDOPSIS	0.51	
Al3g01820*	THALIANA SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE 1)	0,51	
At5g14640*	ATSK13, SK13 (SHAGGY-LIKE KINASE 13)	0,55	
A+2~22000*	ATSR2, ATSRPK1, PKS7, SnRK3.10, CIPK7 (CBL-	0.62	
Al3g25000*	INTERACTING PROTEIN KINASE 7)	0,02	
At5g10930*	SnRK3.24, CIPK5 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 5)	0,66	

Nota: a expressão dos tratamentos cordicepina + glicose + ABA (CGA) é em relação a amostras tratadas somente com cordicepina (Cord). A descrição foi feita com base no banco de dados do TAIR. Estabilização está representada por valores positivos em vermelho, desestabilização por valores negativos em verde. Estão marcadas por um asterisco as quinases que apresentaram resposta a ao menos uma das condições de estresse (ABA, frio, seca ou estresse salino) analisadas por Matsui *et al.* (2008).

Tabela Suplementar 17. Genes responsivos de forma pós-transcricional à glicose e que são descritos como relacionados à síntese, degradação, transdução do sinal ou resposta à ativação por hormônios segundo a análise por ontologia.

AGI	Sinal (log2)	Descrição	Processo Biológico	Função
AT3G15450	-2,08	unknown protein	Auxin induced-regulated- responsive-activated	unknown protein
AT5G61590	-1,68	ERF (ethylene response factor) subfamily B-3 of ERF/AP2 transcription factor family	Ethylene signal transduction	transcription factor activity
AT3G17510	-1,27	CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 1 (CIPK1);SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 3.16 (SnRK3.16)	response to abscisic acid stimulus	kinase activity, protein binding
AT3G61190	-1,18	BON ASSOCIATION PROTEIN 1 (BAP1)	response to salicylic acid stimulus	protein binding, phospholipid binding
AT4G27450		unknown protein	Auxin induced-regulated- responsive-activated	unknown protein
AT1G71030	-1,07	ARABIDOPSIS MYB-LIKE 2 (MYBL2)	response to abscisic acid stimulus; response to ethylene stimulus; response to salicylic acid stimulus; response to gibberellin stimulus; response to jasmonic acid stimulus	transcription factor activity, DNA binding
AT1G03850	-1,02	glutaredoxin family protein	response to cytokinin stimulus	electron carrier activity
		MERISTEM 5 (MERI-5);XYLOGLUCAN	response to brassinosteroid	xyloglucan:xyloglucosyl transferase
AT4G30270	-0,92	ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 24	stimulus; gibberellic acid mediated	activity, hydrolase activity, acting on
		(XTH24);SENESCENCE 4 (SEN4)	signaling pathway	glycosyl bonds
AT5G61600	-0,91	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 104 (ERF104)	Ethylene signal transduction	transcription regulator activity

Tabela Suplementar 17. Continuação.

AGI	Sinal (log2)	Descrição	Processo Biológico	Função
AT5G63160	-0,91	BTB AND TAZ DOMAIN PROTEIN 1 (bt1)	response to auxin stimulus	transcription regulator activity, protein binding
AT2G20120	-0,91	COV1 (CONTINUOUS VASCULAR RING)	auxin mediated signaling pathway	-
AT3G58490	-0,87	phosphatidic acid phosphatase family protein / PAP2 family protein	response to abscisic acid stimulus	phosphoric ester hydrolase activity, sphingosine-1-phosphate phosphatase activity
AT1G20925	-0,85	auxin efflux carrier family protein	auxin polar transport	auxin:hydrogen symporter activity
AT2G26300	-0,83	ARABIDOPSIS THALIANA G PROTEIN ALPHA SUBUNIT 1 (ATGPA1)	gibberellic acid mediated signaling pathway; abscisic acid mediated signaling pathway	GTPase activity, GTP binding, signal transducer activity, GTPase inhibitor activity,
AT4G35770	-0,79	SENESCENCE 1 (SEN1);DARK INDUCIBLE 1 (DIN1)	response to jasmonic acid stimulus;	unknown
AT5G53160	-0,71	REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR 3 (RCAR3);PYR1-LIKE 8 (PYL8)	response to abscisic acid stimulus	unknown
AT5G17300	-0,69	REVEILLE 1 (RVE1)	auxin mediated signaling pathway	transcription factor activity, DNA binding
AT5G47220	-0,65	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 2 (ERF2)	ethylene mediated signaling pathway	transcription factor activity, transcription activator activity, DNA binding
AT2G38210	-0,63	PUTATIVE PDX1-LIKE PROTEIN 4 (PDX1L4)	response to ethylene stimulus	-
AT1G13260	-0,61	RELATED TO ABI3/VP1 1 (RAV1);ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 4 (EDF4)	response to brassinosteroid stimulus	transcription factor activity, DNA binding, transcription repressor activity
AT4G24960	1,38	HVA22 HOMOLOGUE D (HVA22D)	response to abscisic acid stimulus	unknown

Nota: Análise de ontologia foi realizada com o Classification SuperViewer, MapMan e de acordo com o banco de dados do TAIR.

AGI	Sinal (log2)	Descrição	Processo Biológico	Função
AT3G44300	-0,72	NIT2 (nitrilase 2); indole-3-acetonitrile nitrilase	Auxin synthesis-degradation	nitrilase activity
AT5G61590	-0.68	ERF (ethylene response factor) subfamily B-3 of	Ethylene signal transduction	transcription factor activity
A13001390	-0,08	ERF/AP2 transcription factor family	Emplene signar transduction	transcription factor activity
AT3G04720	-0.66	PATHOGENESIS-RELATED 4 (PR4);HEVEIN-	response to ethylene stimulus	chitin hinding
A15004720	-0,00	LIKE (HEL)	response to enrytene stimulus	chithi bhidhig
AT1G03850	-0,55	glutaredoxin family protein	response to cytokinin stimulus	electron carrier activity
AT2G33380	0.57	RESPONSIVE TO DESSICATION 20	response to salicylic acid stimulus	lipoxygenase activity, calcium ion
A12033360	0,57	(RD20);CALEOSIN 3 (CLO-3)	response to sancyne actu stinutus	binding
AT5G08130	0.58	hasic helix-loop-helix (hHI H) (BIM1)	brassinosteroid mediated signaling	transcription factor activity, DNA
A15008150 0,58			pathway	binding
			salicylic acid mediated signaling	
AT1G53130	0,60	GRIM REAPER (GRI)	pathway; jasmonic acid mediated	-
			signaling pathway	
AT2G22240	0.63	MYO-INOSITOL-1-PHOSTPATE SYNTHASE 2	response to auxin stimulus	inositol-3-phosphate synthase
1112022240	0,05	(MIPS2)	response to auxili stillulus	activity
AT1G22640	0,64	MYB-type transcription factor (MYB3)	response to salicylic acid stimulus	transcription factor activity
AT4G20880	0.68	ethylene-responsive nuclear protein (FRT2)	Ethylene induced-regulated-	_
1114020000	0,00	englene responsive nuclear protein (ERT2)	responsive-activated	
			response to salicylic acid stimulus;	
		MYB DOMAIN PROTEIN R1 (MYBR1)	response to ethylene stimulus;	transcription factor activity DNA
AT5G67300	0,71	(MVR44)	response to gibberellin stimulus;	hinding
		(11110++)	response to jasmonic acid stimulus;	omanig
			response to auxin stimulus	

Tabela Suplementar 18. Genes responsivos de forma pós-transcricional à ABA e que são descritos como relacionados à síntese, degradação, transdução do sinal ou resposta à ativação por hormônios segundo a análise por ontologia.

Tabela	Suplementar	18.	Continu	iação.
--------	-------------	-----	---------	--------

AGI	Sinal (log2)	Descrição	Processo Biológico	Função
AT3G19290	0.72	AREB2 ABE4 (ABRE BINDING FACTOR 4)	abscisic acid signal transduction	transcription factor activity, DNA
1115017270	0,72			binding
AT5G62490	0,73	ATHVA22B, HVA22B ATHVA22B	response to abscisic acid stimulus	unknown
AT5G53590	0,75	auxin-responsive family protein	response to auxin stimulus	unknown
		MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1C	ethylene mediated signaling	transcription coactivator activity,
AT3G24500	0,86	(MBF1C)	pathway.	transcription factor activity, DNA
			putiway,	binding
AT4G12550	0.93	AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES 1	response to auxin stimulus	linid binding
1111012550	0,95	(AIR1)	response to auxili stillardis	npiù onianig
		SOS3-INTERACTING PROTEIN 3 (SIP3);SNF1-		
AT4G30960	1 17	RELATED PROTEIN KINASE 3.14	hasipetal auxin transport	kinase activity
1111050700	1,17	(SNRK3.14);CBL-INTERACTING PROTEIN	ousipetal auxili transport	kinuse dett (tty
		KINASE 6 (ATCIPK6)		
AT5G15960	1 33	cold and ABA inducible protein kin1 (KIN1)	abscisic acid induced-regulated-	unknown
1115015700	1,55		responsive-activated	unknown
AT4G34000	1 43	DPBF5, ABF3 (ABSCISIC ACID RESPONSIVE	abscisic acid signal transduction	transcription factor activity, DNA
111 100 1000	1,15	ELEMENTS-BINDING FACTOR 3)	ubbeisie ueiu signui trunsuueiten	binding
AT4G24960	2,18	HVA22 HOMOLOGUE D (HVA22D)	response to abscisic acid stimulus	unknown
AT5G59220	2 38	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1 (HAI1)	abscisic acid induced-regulated-	Hydrolase activity
1115057220	2,50		responsive-activated	Tryatolase activity
AT2G47770	2.81	ARABIDOPSIS THAI JANA TSPO-RELATED	abscisic acid induced-regulated-	_
	2,01		responsive-activated	

Nota: Análise de ontologia foi realizada com o *Classification SuperViewer* (banco de dados do TAIR de Janeiro de 2010); as descrições foram obtidas no banco de dados do TAIR.

Tabela Suplementar 19. Genes com regulação pós-transcricional por ABA e que se apresentam diferencialmente expressos em mutantes relacionados à via de sinalização do ABA. A coluna CATMA mostra o valor da expressão obtida nos microarranjos (log2). indução está representada por (U), repressão por (D), diferença não significativa por (-), dado não disponível por (**nd**). Expressão de um mesmo mutante analisada em mais de uma condição está separada por barras. A nota abaixo detalhada as comparações nos experimentos. Os 13 genes da via central de percepção ao ABA estão destacados: PYR/PYL/RCAR (azul), PP2C (roxo) e SnRK2 (laranja).

					PP2Cs			SnRK	ls -		FTs
			Li et al.				srk2c/f °		srk2d/e/i ^g		areb1/areb2/abf3 ⁱ
AGI	GO Function	CATMA ^a	(2006) ^b	ahg1-1 °	ahg3-1 °	abi1-1 ^a	Seca / ABA	srk2d/e/i ^r	Seca / ABA / NaCl / vs areb1/areb2/abf3	abi4-102 ^h	Dry / NaCl / ABA
AT2G41870	DNA or RNA binding	1,21	U	-	-	- / -	-/-	U		-	-/-/-
AT1G07430	hydrolase activ.	0,60	U	U	U	- / -	- / -	D	D/D/D/D	-	-/-/-
AT1G23200	hydrolase activ.	1,87	U	-	-	D/-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G54010	hydrolase activ.	-0,66	-	D	-	- / U	- / -	-	-/-/-/-	U	-/-/-
AT1G72770	hydrolase activ.	0,57	U	-	-	- / -	- / -	-	D/D/D/-	-	-/-/-
AT1G73480	hydrolase activ.	1,20	U	-	-	- / D	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G78680	hydrolase activ.	0,59	-	D	D	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G45600	hydrolase activ.	0,58	-	-	-	nd / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G11410	hydrolase activ.	1,58	U	-	-	- / -	- / -	D	D/D/D/-	-	D/D/-
AT3G14067	hydrolase activ.	0,62	U	D	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G16150	hydrolase activ.	-0,74	-	-	U	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G17790	hydrolase activ.	0,65	U	-	-	- / U	- / -	-	-/-/-/-	U	-/-/-
AT3G62260	hydrolase activ.	1,25	U	-	-	- / U	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G11310	hydrolase activ.	1,26	D	D	D	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G11320	hydrolase activ.	0,75	-	D	D	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G04250	hydrolase activ.	1,08	U	U	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G18670	hydrolase activ.	0,64	-	-	-	D/-	- / -	-	-/-/-/-	D	-/-/-
AT5G20070	hydrolase activ.	0,87	-	-	-	D/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G23220	hydrolase activ.	0,54	-	D	-	- / -	- / -	U	-/-/D	-	-/-/-
AT5G59220	hydrolase activ.	2,38	U	-	D	- / -	- / -	-	D/D/D/-	-	D/D/-
AT1G07870	kinase activ.	0,74	U	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G65250	kinase activ.	-0,54	-	-	-	-/-	- / -	-	-/-/-/-	D	-/-/-
AT2G30360	kinase activ.	0,54	U	D	-	-/-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G32510	kinase activ.	1,13	U	-	-	- / -	- / -	-	- / - / - / D	-	-/-/-

					PP2Cs			SnRk	Ks		FTs
			Li et al.				srk2c/f ^e		srk2d/e/i ^g		areb1/areb2/abf3 ⁱ
AGI	GO Function	CATMA ^a	(2006) ^b	ahg1-1 °	ahg3-1 °	abi1-1 ^d	Seca / ABA	srk2d/e/i ^r	Seca / ABA / NaCl / vs areb1/areb2/abf3	abi4-102 ^h	Dry / NaCl / ABA
AT4G30960	kinase activ.	1,17	U	D	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G40010	kinase activ.	0,90	U	D	-	- / -	D / D	U	-/-/-/-	U	-/-/-
AT1G13110	other binding	-0,77	-	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G18980	other binding	1,54	-	-	D	- / D	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G76180	other binding	0,73	U	D	D	- / -	- / -	U	-/-/D	-	-/-/-
AT1G80110	other binding	1,48	U	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G33380	other binding	0,57	U	D	D	U / -	- / -	-	D/D/D/D	-	D/D/D
AT2G47770	other binding	2,81	U	U	-	- / D	D / -	-	D/D/D/D	D	-/-/-
AT3G04720	other binding	-0,66	-	D	D	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G22600	other binding	1,20	U	D	D	- / D	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G53980	other binding	0,55	-	D	D	-/-	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G22610	other binding	0,73	-	-	-	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G03380	other binding	-0,54	-	-	-	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G17450	other binding	0,88	-	-	-	-/-	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G47610	other binding	0,55	-	-	-	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G52190	other binding	0,69	-	-	-	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G76160	other enzyme activ.	-0,56	-	-	-	U/U	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G77120	other enzyme activ.	1,07	U	U	-	-/-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G21130	other enzyme activ.	1,17	U	U	-	-/-	- / -	-	-/-/-/-	nd	-/-/-
AT2G39800	other enzyme activ.	1,41	-	D	D	-/-	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G57010	other enzyme activ.	0,74	U	-	-	-/-	D / -	D	-/-/D	-	-/-/-
AT4G25100	other enzyme activ.	-0,64	-	D	D	U /-	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G30470	other enzyme activ.	1,03	U	-	-	U / D	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G34230	other enzyme activ.	0,66	U	D	-	- / U	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G38430	other enzyme activ.	-1,33	-	D	-	D / U	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G62220	other enzyme activ.	0,57	U	-	D	D/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G03850	other mol. func.	-0,55	-	-	-	- / U	- / -	U	-/-/-/-	D	-/-/-
AT2G43510	other mol. func.	-0,61	-	-	-	U / -	- / -	D	-/-/-/-	D	-/-/-

Tabela Suplementar 19. Continuação.

					PP2Cs			SnR	Ks		FTs
			Li et al.				srk2c/f ^e		srk2d/e/i ^g		areb1/areb2/abf3 ⁱ
AGI	GO Function	CATMA ^a	(2006) ^b	ahg1-1 °	ahg3-1 °	abi1-1 ^a	Seca / ABA	srk2d/e/i ¹	Seca / ABA / NaCl / vs areb1/areb2/abf3	abi4-102 ⁿ	Dry / NaCl / ABA
AT4G27140	other mol. func.	0,59	-	U	U	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G13740	protein binding	0,57	U	U	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G20450	protein binding	2,41	U	D	D	- / -	- / -	U	-/-/D	-	-/-/-
AT1G27930	protein binding	0,67	-	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G22240	protein binding	0,63	U	U	-	- / D	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G40330	protein binding	-0,79	D	-	-	-/-	- / -	U	U / - / - / -	D	-/-/-
AT3G29575	protein binding	1,75	U	-	-	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G26530	protein binding	-0,55	D	-	-	-/-	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G01520	protein binding	0,89	U	U	-	-/-	D/-	D	-/-/-/-	D	-/-/-
AT5G15500	protein binding	0,76	-	nd	nd	nd / nd	- / -	-	-/-/D	nd	-/-/-
AT5G57900	protein binding	0,80	U	-	-	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G24150	receptor binding or activ.	0,62	-	D	-	- / -	-/-	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G38310	receptor binding or activ.	-1,33	D	-	-	- / U	-/-	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G05440	receptor binding or activ.	-0,97	D	-	-	- / -	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G30500	FT activ.	0,55	U	-	-	- / D	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G51140	FT activ.	1,34	U	-	-	- / -	-/-	-	-/-/-/-	D	-/-/-
AT1G56170	FT activ.	1,71	U	-	-	- / -	-/-	U	-/-/-/-	D	-/-/-
AT1G77450	FT activ.	1,7	U	U	-	- / -	-/-	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G22430*	FT activ.	1,09	-	-	-	- / -	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G46680*	FT activ.	1,85	U	-	-	- / -	-/-	-	-/-/-/-	D	-/-/-
AT3G19290	FT activ.	0,72	-	-	-	- / -	-/-	D	-/-/-/-	U	-/-/-
AT3G19580	FT activ.	0,75	U	-	-	U / -	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G21890	FT activ.	1	U	-	D	D / -	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G22830	FT activ.	1,41	U	-	-	U / -	-/-	-	D/D/D/-	-	-/-/-
AT3G24500	FT activ.	0,86	U	-	-	-/-	-/-	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G24520	FT activ.	1,14	U	-	-	D/-	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G30210	FT activ.	0,63	U	-	-	-/-	-/-	-	-/-/-/-	-	D/D/-
AT3G61630	FT activ.	0,57	-	-	-	U/U	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-

Tabela Suplementar 19. Continuação.

					PP2Cs			SnRF	Ks		FTs
AGI	GO Function	CATMA ^a	Li <i>et al.</i> (2006) ^b	ahg1-1 °	ahg3-1 °	abi1-1 ^d	<i>srk2c/f</i> ^e Seca / ABA	srk2d/e/i ^f	srk2d/e/i ^g Seca / ABA / NaCl / vs areb1/areb2/abf3	abi4-102 ^h	areb1/areb2/abf3 ⁱ Dry / NaCl / ABA
AT3G61890*	FT activ.	1,68	U	-	-	-/-	-/-	-	-/-/-/-	D	-/-/-
AT4G01120	FT activ.	1,28	-	-	U	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G25470	FT activ.	0,91	U	-	-	U /-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G27410*	FT activ.	1,1	U	-	-	- / D	- / -	-	-/-/-/-	D	-/-/-
AT4G34000*	FT activ.	1,43	U	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G36900	FT activ.	0,76	-	-	-	- / D	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G40060	FT activ.	0,59	-	-	-	- / D	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G05410*	FT activ.	1,52	U	U	U	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G08130	FT activ.	0,58	-	-	-	- / U	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G12840	FT activ.	1,05	-	-	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G22290	FT activ.	1	U	-	-	- / -	D / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G28770	FT activ.	-0,64	D	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G43840	FT activ.	0,53	U	-	-	- / -	- / -	U	D/D/D/D	D	-/-/-
AT5G47640	FT activ.	2,16	U	-	D	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G51990*	FT activ.	1,44	U	-	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G60850	FT activ.	0,76	-	-	-	D/-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G61590	FT activ.	-0,68	D	-	-	- / D	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G63790	FT activ.	1,24	-	-	-	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G67300	FT activ.	0,71	U	-	-	U/U	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G10370	transferase activ.	1,10	U	D	-	D/-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G53680	transferase activ.	0,56	-	-	-	-/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G56600	transferase activ.	0,86	U	U	-	-/-	- / -	D	D/D/D/-	D	D/D/-
AT1G67980	transferase activ.	-1,15	-	-	-	- / U	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G29450	transferase activ.	0,64	U	D	-	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G40390	transferase activ.	0,75	U	D	D	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G62480	transferase activ.	0,92	U	-	-	- / -	- / -	D	-/-/D	-	-/-/-
AT1G26440	transporter activ.	1,21	-	-	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G71960	transporter activ.	0,68	U	U	-	-/-	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-

Tabela Suplementar 19. Continuação.

					PP2Cs			SnRF	Ks		FTs
AGI	GO Function	CATMA ^a	Li <i>et al.</i> (2006) ^b	ahg1-1 °	ahg3-1 °	abi1-1 ^d	<i>srk2c/f</i> ^e Seca / ABA	srk2d/e/i ^f	srk2d/e/i ^g Seca / ABA / NaCl / vs areb1/areb2/abf3	abi4-102 ^h	areb1/areb2/abf3 ⁱ Dry / NaCl / ABA
AT2G41190	transporter activ.	0,54	U	-	-	- / -	D / -	U	-/-/D	-	- / D / D
AT3G13620	transporter activ.	0,66	-	-	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G17340	transporter activ.	0,69	U	D	D	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G01470	unknown	1,24	U	U	-	- / -	- / -	-	D/-/-/-	-	-/-/-
AT1G04560	unknown	0,68	U	U	-	- / -	- / -	-	D/D/D/D	-	-/-/-
AT1G12080	unknown	0,74	-	-	-	-/-	-/-	-	-/-/-/-	U	-/-/-
AT1G15330	unknown	0,69	-	U	U	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G16850	unknown	1,33	U	U	-	- / nd	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G21790	unknown	0,97	U	-	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G34000	unknown	-0,59	-	D	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G52200	unknown	-0,67	D	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G52690	unknown	1,21	U	-	-	- / -	D/-	-	D/D/D/D	-	-/-/-
AT1G62780	unknown	-0,66	-	D	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G64355	unknown	1,05	-	-	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G68585	unknown	-0,65	D	-	-	D/-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G70850	unknown	0,87	D	D	D	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G78070	unknown	1,93	U	-	-	- / D	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G79270	unknown	0,91	U	-	-	D / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G15960	unknown	0,59	-	-	-	- / D	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G15970	unknown	0,91	-	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G17840	unknown	0,66	U	U	-	D/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G23120	unknown	1,05	-	-	-	D / D	- / -	-	D/-/-/-	-	-/-/-
AT2G38790	unknown	0,64	-	-	-	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G38820	unknown	0,71	-	U	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G39050	unknown	0,56	U	-	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT2G46420	unknown	0,65	-	-	-	- / U	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G05880	unknown	0,61	U	-	D	-/-	-/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G11690	unknown	0,56	U	-	-	-/-	D/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-

Tabela Suplementar 19. Continuação.

					PP2Cs			SnRk	Ks		FTs
AGI	GO Function	CATMA ^a	Li <i>et al.</i> (2006) ^b	ahg1-1 °	ahg3-1 °	abi1-1 ^d	<i>srk2c/f</i> ^e Seca / ABA	srk2d/e/i ^f	srk2d/e/i ^g Seca / ABA / NaCl / vs areb1/areb2/abf3	<i>abi4-102</i> ^h	areb1/areb2/abf3 Dry / NaCl / ABA
AT3G12320	unknown	0,62	-	-	-	D/-	-/-	-	-/-/-	-	-/-/-
AT3G15670	unknown	0,85	U	-	-	- / -	D / -	-	D/D/D/D	-	-/-/-
AT3G50970	unknown	2,49	U	U	-	D / D	- / -	-	D/-/-/-	-	-/-/-
AT3G51750	unknown	0,73	U	-	-	- / D	D / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G51810	unknown	0,76	U	U	U	- / -	- / -	D	D/-/-/D	-	-/-/-
AT3G53400	unknown	0,59	-	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G54000	unknown	0,64	-	-	-	U /-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G01026	unknown	0,61	-	-	-	- / -	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G23870	unknown	0,56	-	D	D	- / -	- / -	-	-/-/-/-	U	-/-/-
AT4G24960	unknown	2,18	U	-	D	- / D	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G27657	unknown	1,14	U	U	-	- / U	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G28240	unknown	0,58	-	-	-	D/-	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G35190	unknown	0,94	U	-	-	D/-	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G36600	unknown	0,69	U	U	U	- / -	- / -	D	D/D/D/D	-	-/-/-
AT5G05220	unknown	0,76	U	U	U	- / D	D/-	D	-/-/-/-	-	D/D/-
AT5G15960	unknown	1,33	U	-	-	- / D	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G19875	unknown	0,57	U	D	-	D / nd	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G43150	unknown	1,27	U	-	-	- / D	- / -	U	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G49280	unknown	0,66	U	D	D	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G52300	unknown	0,61	U	-	-	- / nd	D/-	D	D/D/D/D	D	-/-/-
AT5G52310	unknown	1,05	U	U	-	D/-	- / -	-	D/D/D/-	-	-/-/-
AT5G52420	unknown	1,19	-	U	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G58650	unknown	0,72	-	U	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G62130	unknown	0,77	-	-	D	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G62490	unknown	0,73	U	-	-	- / -	D / -	-	D/D/D/-	D	D/D/-
AT1G01240	nd	0,74	-	-	-	- / -	- / -	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G44960	nd	0,73	-	U	-	- / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT1G68500	nd	0,73	U	-	-	nd / -	-/-	D	-/-/-	-	-/-/-

Tabela Suplementar 19. Continuação.

					PP2Cs			SnRK	ίs –		FTs
			Li et al.				srk2c/f ^e	6	srk2d/e/i ^g		areb1/areb2/abf3 ⁱ
AGI	GO Function	CATMA ^a	(2006) ^b	ahg1-1 °	ahg3-1 °	abi1-1 ^u	Seca / ABA	srk2d/e/i ¹	Seca / ABA / NaCl / vs areb1/areb2/abf3	abi4-102 "	Dry / NaCl / ABA
AT1G72610	nd	-0,71	-	D	D	- / -	- / -	-	-/-/-/-	D	-/-/-
AT3G17520	nd	0,52	U	U	-	- / -	D/-	D	D/D/D/D	D	-/-/-
AT3G52920	nd	0,58	U	-	-	- / D	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT3G63060	nd	0,88	U	U	-	- / -	D/-	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT4G20880	nd	0,68	-	-	-	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G45310	nd	1,18	-	-	-	- / -	D/-	D	-/-/-/-	-	-/-/-
AT5G64310	nd	1,09	U	-	-	U / -	- / -	-	-/-/-/-	-	-/-/-

Tabela Suplementar 19. Continuação.

Nota.

^a Regulação pós-transcricional por ABA segundo os microarranjos CATMA. Valores positivos em vermelho indicam estabilização do transcrito, e desestabilização por valores negativos em verde;

^b Expressão após tratamento de 4h com ABA (Li et al., 2006);

^c Expressão nos mutantes *ahg1-1* e *ahg3-1* de plantas de 2 dias crescidas em meio contendo 0,5μM ABA em comparação com Col-0 (Nishimura *et al.*, 2007; *Genevestigator*);

^d Expressão em hipocótilo e sementes, respectivamente, no mutante *abi1-1* em comparação com Ler-0 (Genevestigator);

^e Expressão no mutante *srk2c/f* de plantas de duas semanas após 4h de seca ou 100µM ABA, em comparação com Col-0 (Mizoguchi *et al.*, 2010; *Genevestigator*);

^f Expressão em sementes do mutante *srk2d/e/i* em comparação com Col-0 (Nakashima *et al.*, 2009);

- ^g Expressão no mutante *srk2d/e/I* de plantas de doze dias em comparação com o triplo-mutante *areb1/areb2/abf3* ou após 6h de seca, 50µM ABA ou 250mM NaCl em comparação com Col-0 (Fujita *et al.*, 2009);
- ^h Expressão de plântulas no mutante *abi4-102* em comparação com Col-0 (*Genevestigator*);
- ⁱ Expressão no mutante *areb1/areb2/abf3* de plantas de doze dias após 6h de seca, 250mM NaCl ou 50μM ABA em comparação com Col-0 (Yoshida *et al.*, 2010).

Tabela Suplementar 20. Genes com regulação pós-transcricional por ABA e que se apresentam diferencialmente expressos em mutantes de controle da estabilidade de RNAm. A coluna CATMA mostra o valor da expressão obtida nos microarranjos (log2). Indução está representada por (**U**), repressão por (D), diferença não significativa por (-), dado não disponível por (**nd**). Expressão de um mesmo mutante analisada em mais de uma condição está separada por barras. Para o mutante *ahg2* é dado o *fold* da expressão (mutante / WT). Possíveis alvos de regulação por miRNA estão marcados por um **X**. A nota abaixo detalhada as comparações nos experimentos. Os 7 genes da via central de percepção do ABA para os quais há indícios de controle de estabilidade do RNAm estão destacados: PYR/PYL/RCAR (azul) e PP2C (roxo).

AGI	COF		NMD ^b	Splicing ^c		mił	RNA ^d		Deadenilação ^e	Alvos de	Exossomo ^g
AGI	GO Function	CATMA"	<i>upf1-1</i> ou <i>upf3-1</i>	abh1	dcl2-1	dcl1-7	hyl1-2	se-1	ahg2-1	miRNA ^f	rrp4 ^{RNAi} /rrp41 ^{RNAi} /csl4-2
AT1G72770	hydrolase activ.	0,57	- / -	-/-	-	-	-	D	-	-	-/-/-
AT5G59220	hydrolase activ.	2,38	- / -	-/-	D	-	-	U	-	X	-/-/-
AT3G16150	hydrolase activ.	-0,74	- / -	-/-	U	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G54010	hydrolase activ.	-0,66	- / -	-/-	-	U	-	D	1,21	-	-/-/-
AT2G45600	hydrolase activ.	0,58	- / -	-/-	-	-	-	U	1,04	-	-/-/-
AT3G14067	hydrolase activ.	0,62	- / -	D / D	-	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT5G18670	hydrolase activ.	0,64	- / -	U/U	-	-	-	-	0,51	-	-/-/-
AT3G17790	hydrolase activ.	0,65	- / -	-/-	-	-	U	D	0,99	-	-/-/-
AT4G11320	hydrolase activ.	0,75	- / -	D / -	-	U	-	-	0,47	-	-/-/-
AT5G20070	hydrolase activ.	0,87	U/U	-/-	-	-	-	-	0,96	-	-/-/-
AT5G04250	hydrolase activ.	1,08	- / -	-/-	-	D	-	-	nd	X	- / - / <mark>U</mark>
AT1G73480	hydrolase activ.	1,20	- / -	-/-	-	-	D	-	0,96	X	- / - / <mark>U</mark>
AT3G62260	hydrolase activ.	1,25	- / -	-/-	-	-	-	-	nd	-	D/D/-
AT4G11310	hydrolase activ.	1,26	- / -	D/-	-	U	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G23200	hydrolase activ.	1,87	- / -	-/-	U	-	-	U	nd	-	-/-/-
AT1G65250	kinase activ.	-0,54	- / -	D/D	-	-	-	D	0,96	-	-/-/-
AT2G30360	kinase activ.	0,54	- / -	D/-	-	-	-	-	nd	X	- / <mark>U</mark> / -
AT4G30960	kinase activ.	1,17	U/U	-/-	-	D	-	D	0,89	-	-/UD/-
AT1G13110	other binding	-0,77	- / -	D/-	-	-	-	D	1,06	-	-/-/-
AT3G04720	other binding	-0,66	- / -	- / U	-	U	D	D	nd	-	-/-/-
AT3G53980	other binding	0,55	- / -	U/U	-	-	U	U	0,87	-	-/-/-
AT5G47610	other binding	0,55	- / -	U / -	D	-	D	U	nd	-	-/-/-

	60 F	~ ·	NMD ^b	Splicing ^c		miR	NA ^d		Deadenilação ^e	Alvos de	Exossomo ^g
AGI	GO Function	CATMA "	<i>upf1-1</i> ou <i>upf3-1</i>	abh1	dcl2-1	dcl1-7	hyl1-2	se-1	ahg2-1	miRNA ^f	rrp4 ^{RNAi} /rrp41 ^{RNAi} /csl4-2
AT2G33380	other binding	0,57	-/-	- / D	-	-	-	D	1,14	X	- / - / D
AT5G52190	other binding	0,69	-/-	-/-	-	-	-	U	0,95	-	-/-/-
AT4G22610	other binding	0,73	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT5G17450	other binding	0,88	-/-	D/-	U	-	-	-	1,15	-	-/-/-
AT3G22600	other binding	1,20	- / -	D/-	U	U	D	D	0,82	-	-/-/-
AT1G80110	other binding	1,48	-/-	- / -	-	-	-	U	nd	-	-/-/-
AT1G18980	other binding	1,54	-/-	- / -	-	-	-	D	nd	-	- / D / -
AT2G47770	other binding	2,81	-/-	- / -	-	D	-	U	nd	-	-/-/-
AT4G25100	other enzyme activ.	-0,64	-/-	- / -	U	-	D	-	0,45	-	-/-/-
AT1G76160	other enzyme activ.	-0,56	-/-	- / -	-	U	-	-	0,71	X	-/-/-
AT5G62220	other enzyme activ.	0,57	-/-	- / D	-	U	-	-	nd	-	-/-/-
AT4G34230	other enzyme activ.	0,66	-/-	- / -	-	-	-	D	1,14	-	-/-/-
AT3G57010	other enzyme activ.	0,74	- / -	D/-	-	-	D	-	1,00	-	-/-/-
AT4G30470	other enzyme activ.	1,03	- / -	- / -	-	D	-	D	0,85	-	- / - / D
AT1G77120	other enzyme activ.	1,07	- / -	- / -	-	-	-	-	0,93	-	-/-/-
AT2G39800	other enzyme activ.	1,41	- / -	- / -	D	-	-	D	1,12	-	-/-/-
AT2G43510	other mol. func.	-0,61	- / -	- / <mark>U</mark>	U	-	D	D	nd	-	-/-/-
AT1G03850	other mol. func.	-0,55	- / -	U / U	-	D	-	D	0,97	-	-/-/-
AT4G27140	other mol. func.	0,59	- / -	- / -	-	-	-	U	1,01	-	-/-/-
AT2G40330	protein binding	-0,79	- / -	nd	-	-	-	D	-	-	-/-/-
AT4G26530	protein binding	-0,55	- / -	D / D	D	D	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G13740	protein binding	0,57	- / -	- / -	-	-	-	-	1,21	-	-/-/-
AT5G01520	protein binding	0,89	- / -	- / D	U	D	D	-	0,79	Х	-/-/-
AT3G29575	protein binding	1,75	- / -	- / -	-	D	-	U	1,37	-	-/-/-
AT1G20450	protein binding	2,41	- / -	- / -	-	D	-	-	0,98	-	-/-/-
AT2G38310	receptor binding or activ.	-1,33	- / -	- / -	-	U	-	-	0,99	-	-/-/-
AT5G05440	receptor binding or activ.	-0,97	- / -	U / -	-	-	-	-	-	-	-/-/-
AT5G61590	FT activ.	-0,68	- / -	- / -	-	-	U	D	0,90	-	- / <mark>U</mark> / -
AT5G28770	FT activ.	-0,64	- / -	- / -	-	D	-	D	nd	-	-/-/-
AT1G30500	FT activ.	0,55	- / -	- / -	-	-	-		nd	-	-/-/-

Tabela Suplementar 20. Continuação.

		CLENK + 3	NMD ^b	Splicing ^c		miR	NA ^d		Deadenilação ^e		Exossomo ^g
AGI	GO Function	CATMA "	<i>upf1-1</i> ou <i>upf3-1</i>	abh1	dcl2-1	dcl1-7	hyl1-2	se-1	ahg2-1	Alvos de miRNA '	rrp4 ^{RNAi} /rrp41 ^{RNAi} /csl4-2
AT5G08130	FT activ.	0,58	-/-	D/-	-	-	-	-	0,86	Х	- / - / D
AT5G67300	FT activ.	0,71	-/-	-/-	-	U	U	-	nd	-	-/-/-
AT3G19580	FT activ.	0,75	-/-	-/-	-	-	D	-	0,94	-	-/-/-
AT4G36900	FT activ.	0,76	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	Х	-/-/-
AT5G60850	FT activ.	0,76	-/-	-/-	-	-	-	-	0,81	-	-/-/-
AT3G24500	FT activ.	0,86	-/-	-/-	-	D	D	D	1,10	-	-/-/-
AT4G25470	FT activ.	0,91	-/-	- / D	D	-	-	U	nd	-	-/-/-
AT3G21890	FT activ.	1,00	-/-	- / U	-	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT5G12840	FT activ.	1,05	-/-	-/-	-	-	-	-	1,03	Х	-/-/-
AT2G22430	FT activ.	1,09	-/-	-/-	-	-	-	-	1,29	-	-/-/-
AT4G27410	FT activ.	1,1	-/-	- / U	U	U	-	D	0,88	-	-/-/-
AT3G24520	FT activ.	1,14	-/-	- / D	D	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT5G63790	FT activ.	1,24	-/-	-/-	U	U	-	-	nd	-	- / - / D
AT1G51140	FT activ.	1,34	-/-	-/-	-	D	-	-	1,14	-	-/-/-
AT3G22830	FT activ.	1,41	-/-	-/-	-	-	-	-	1,06	-	- / <mark>U</mark> / -
AT4G34000	FT activ.	1,43	-/-	-/-	-	-	-	-	1,02	-	U / U / -
AT5G05410	FT activ.	1,52	-/-	D / -	-	-	-	-	0,84	-	-/-/-
AT3G61890	FT activ.	1,68	-/-	-/-	-	D	-	-	1,15	X	-/-/-
AT1G77450	FT activ.	1,70	-/-	- / <mark>U</mark>	-	-	D	-	nd	-	-/-/-
AT1G56170	FT activ.	1,71	-/-	-/-	-	-	-	U	1,05	-	-/-/-
AT2G46680	FT activ.	1,85	-/-	-/-	-	D	D	-	nd	-	-/-/-
AT5G47640	FT activ.	2,16	-/-	-/-	-	-	-	-	1,05	-	-/-/-
AT2G29450	transferase activ.	0,64	-/-	D / D	-	-	D	D	1,22	-	-/-/-
AT5G40390	transferase activ.	0,75	-/-	-/-	-	-	-	-	1,32	-	-/-/-
AT1G56600	transferase activ.	0,86	-/-	- / D	nd	nd	nd	-	1,00	-	-/-/-
AT1G10370	transferase activ.	1,10	-/-	- / D	-	U	-	-	1,06	-	-/-/-
AT2G41190	transporter activ.	0,54	-/-	-/-	-	-	-	-	0,97	-	-/-/-
AT3G13620	transporter activ.	0,66	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G71960	transporter activ.	0,68	-/-	-/-	-	-	U	-	nd	-	-/-/-
AT4G17340	transporter activ.	0,69	-/-	-/-	-	U	-	-	0,56	-	-/-/-

Tabela Suplementar 20. Continuação.

AGI	GO Function	CATMA ^a	NMD ^b	Splicing ^c abh1	miRNA ^d				Deadenilação ^e		Exossomo ^g
			<i>upf1-1</i> ou <i>upf3-1</i>		dcl2-1	dcl1-7	hyl1-2	se-1	ahg2-1	Alvos de mikna	rrp4 ^{RNAi} /rrp41 ^{RNAi} /csl4-2
AT1G52200	unknown	-0,67	-/-	-/-	-	U	-	D	nd	-	-/-/-
AT1G68585	unknown	-0,65	-/-	- / U	D	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G34000	unknown	-0,59	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	Х	-/ U /-
AT2G39050	unknown	0,56	-/-	-/-	U	-	-	U	nd	Х	-/-/-
AT4G23870	unknown	0,56	-/-	-/-	D	D	-	-	0,74	-	-/-/-
AT3G11690	unknown	0,56	-/-	-/-	-	D	-	D	0,97	-	-/-/-
AT5G19875	unknown	0,57	-/-	- / U	-	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT3G53400	unknown	0,59	U/U	D/D	-	-	-	-	nd	Х	-/-/-
AT2G15960	unknown	0,59	-/-	-/-	-	-	-	D	0,84	Х	U / U / -
AT5G52300	unknown	0,61	-/-	-/-	-	-	-	-	1,51	-	-/-/-
AT3G12320	unknown	0,62	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	Х	-/-/-
AT2G38790	unknown	0,64	-/-	D/D	-	U	-	-	nd	-	-/-/-
AT2G46420	unknown	0,65	-/-	U/U	-	U	U	-	1,32	-	-/-/-
AT5G49280	unknown	0,66	-/-	-/-	-	-	-	-	0,84	Х	-/-/-
AT1G04560	unknown	0,68	-/-	-/-	-	-	-	U	1,26	-	-/ U /-
AT1G15330	unknown	0,69	-/-	-/-	-	-	-	U	0,95	-	-/-/-
AT2G38820	unknown	0,71	-/-	-/-	-	D	-	-	1,18	-	-/-/-
AT5G58650	unknown	0,72	-/-	-/-	U	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT3G51750	unknown	0,73	-/-	-/-	D	D	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G12080	unknown	0,74	-/-	-/-	-	D	D	-	nd	X	-/-/-
AT5G05220	unknown	0,76	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	-	- / - / D
AT3G51810	unknown	0,76	-/-	-/-	-	-	-	U	1,13	-	-/-/-
AT5G62130	unknown	0,77	-/-	-/-	-	-	-	U	1,24	-	-/-/-
AT3G15670	unknown	0,85	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G70850	unknown	0,87	-/-	-/-	-	-	-	-	0,64	-	D/D/-
AT2G15970	unknown	0,91	-/-	-/-	-	-	-	U	0,56	Х	- / U / -
AT1G79270	unknown	0,91	-/-	U/U	-	-	-	U	1,23	-	-/-/-
AT4G35190	unknown	0,94	-/-	-/-	-	-	U	-	nd	-	-/-/-
AT1G21790	unknown	0,97	-/-	- / D	-	D	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G64355	unknown	1,05	-/-	- / D	-	-	-	-	nd	-	-/-/-

Tabela Suplementar 20. Continuação.

AGI	GO Function	CATMA ^a	NMD ^b	Splicing ^c	miRNA ^d				Deadenilação [°]		Exossomo ^g
			<i>upf1-1</i> ou <i>upf3-1</i>	abh1	dcl2-1	dcl1-7	hyl1-2	se-1	ahg2-1	Aivos de miRNA	rrp4 ^{RNAi} /rrp41 ^{RNAi} /csl4-2
AT2G23120	unknown	1,05	- / -	- / D	-	-	-	-	nd	-	-/-/-
AT5G52310	unknown	1,05	-/-	D / D	D	D	-	U	1,62	Х	-/-/-
AT4G27657	unknown	1,14	-/-	D / D	D	U	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G52690	unknown	1,21	-/-	D / D	-	D	-	-	nd	-	-/-/-
AT5G15960	unknown	1,33	-/-	-/-	-	-	-	U	1,20	Х	-/-/-
AT1G16850	unknown	1,33	-/-	- / -	-	-	-	-	nd	-	U / - / -
AT1G78070	unknown	1,93	-/-	D / D	-	-	D	-	1,21	Х	-/-/-
AT4G24960	unknown	2,18	-/-	U / -	-	-	-	U	nd	-	-/-/-
AT3G50970	unknown	2,49	-/-	-/-	D	D	U	-	nd	-	-/-/-
AT3G17520	nd	0,52	-/-	-/-	-	-	-	U	nd	-	-/-/-
AT3G52920	nd	0,58	-/-	-/-	-	-	U	-	1,51	Х	-/-/-
AT4G20880	nd	0,68	-/-	-/-	-	-	-	-	nd	Х	-/-/-
AT1G68500	nd	0,73	-/-	- / U	-	D	-	-	nd	-	-/-/-
AT1G01240	nd	0,74	-/-	- / -	-	D	-	-	0,87	Х	-/-/-
AT3G63060	nd	0,88	-/-	- / -	-	-	-	-	1,48	-	-/-/-
AT5G64310	nd	1,09	-/-	-/-	-	U	-	-	nd	-	-/-/-
AT5G45310	nd	1,18	- / -	- / D	-	-	-	U	1,28	-	-/-/-

Tabela Suplementar 20. Continuação.

Nota.

^a Regulação pós-transcricional por ABA segundo os microarranjos CATMA. Valores positivos em vermelho indicam estabilização do transcrito, e desestabilização por valores negativos em verde;

^b Alvos de NMD identificados nos mutantes *upf1-1* ou *upf3-1* (Yoine *et al.*, 2006; Kurihara *et al.*, 2009);

^c Alvos de atividade de *splicing* identificados no mutante *abh1* sem tratamento e com ABA em comparação com o tipo selvagem (Kuhn *et*

al., 2008; Genevestigator);

^d Alvos de miRNAs identificados nos mutantes dcl2-1, dcl1-7, hyl1-2 e se-1 em comparação com o tipo selvagem (Genevestigator);

^e Alvos de Deadenilação identificados no mutante AtPARN/ahg2-1 em comparação com o tipo selvagem (Nishimura et al., 2005);

^f Identificação de alvos de miRNAs por parallel analysis of RNA ends (German et al., 2008);

^g Alvos de regulação 3'-5'nos mutantes *rrp4^{RNAi}*, *rrp41^{RNAi}* e csl4-2 (Chekanova et al., 2007).



Figura Suplementar 1. Análise de enriquecimento segundo as três classes de ontologia feita pelo *Classification SuperViewer* dos genes com resposta pós-transcricional a (**A**) Glicose; (**B**) ABA; (**C**) glicose + ABA. O enriquecimento é calculado pela comparação da frequência encontrada de cada classe em relação à esperada segundo o genoma de *A. thaliana*, com base no banco de dados do TAIR de Janeiro de 2010.



Família PYR/PYL/RCAR

Figura Suplementar 2. Relação evolutiva da família PYR/PYL/RCAR em plantas. Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos de *A. thaliana* (AT), *Oryza sativa* (Os), *Selaginella moellendorffii* (Sm) e *Physcomitrella patens* (Pp; adaptado de Umezawa *et al.*, 2010). Os transcritos que apresentaram possíveis controles pós-transcricionais (nossas análises) encontram-se destacados, estando representados por quadros verdes os que foram desestabilizados por ABA, e por quadros vermelhos os estabilizados.



Sub-família PP2C grupo A

Figura Suplementar 3. Relação evolutiva da subfamília de fosfatases PP2C do grupo A em plantas. Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos de *A. thaliana* (AT), *Oryza sativa* (Os), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Physcomitrella patens* (Pp) e *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr; adaptado de Umezawa *et al.*, 2010). Os transcritos estabilizados por ABA por possíveis controles póstranscricionais identificados pelos microarranjos encontram-se destacados por quadros vermelhos.





Figura Suplementar 4. Relação evolutiva do subgrupo A da família SnRK2 em plantas. Árvore filogenética por Neighbor-Joining, indicando as três subclasses, baseada na sequência de aminoácidos de *A. thaliana* (AT), *Oryza sativa* (Os), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Physcomitrella patens* (Pp), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr) e *Ostreococcus tauri* (Ot – adaptado de Umezawa *et al.*, 2010). O transcrito que apresentou possível estabilização pós-transcricional por ABA identificado pelos microarranjos encontra-se destacado por um quadro vermelho.

CAPÍTULO 2

O envolvimento da via dos miRNAs no controle do desenvolvimento primário mediado por glicose em *Arabidopsis thaliana*

Involvement of microRNA pathway in glucose-mediated control of Arabidopsis early seedling development

Gustavo Turqueto Duarte¹, Cleverson Carlos Matiolli¹, Bikram Datt Pant², Armin Schlereth², Wolf-Rüdiger Scheible², Mark Stitt², Michel Vincentz^{1,3,*}

¹ Laboratorio de Genética de Plantas, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-875, CP 6010, Campinas, SP, Brazil

² Max-Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam-Golm, Germany

³ Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CEP 13083-875, CP 6009, Campinas, SP, Brazil

Matiolli: Gustavo duarte.gst@gmail.com; Turqueto Duarte: Cleverson Carlos matiolli@gmail.com; bdpant@noble.org; Bikram Datt Pant: Armin Schlereth: Schlereth@mpimp-golm.mpg.de; Wolf-Rüdiger Scheible: Scheible@mpimp-golm.mpg.de; Mark Stitt: MStitt@mpimp-golm.mpg.de;

Corresponding author: Michel Vincentz: mgavince@unicamp.br; Tel: +55 19 3521-1140; Fax: +55 19 3521-1089

Running title

Arabidopsis development delay by glucose-mediated post-transcriptional control

Abstract

In plants, sugars such as glucose act as signaling molecules that promote changes in gene expression programs impacting on growth and development. A few evidences have revealed the potential participation of mRNA decay control in some aspects of glucose-mediated regulatory responses suggesting a possible role of microRNAs (miRNAs) in these responses. In order to get some hints about glucose-mediated development modulation involving miRNA-related regulatory pathways, early seedling development of mutants impaired in miRNA biogenesis (hyl1-2) and miRNA-activity (ago1-25) was evaluated. Both mutants exhibited a glucose hyposensitive phenotype between germination and seedling establishment, indicating that miRNA regulatory pathways may be involved in the glucose-mediated delay of early seedling development. To obtain further evidences about which miRNAs could be involved in glucosemediated responses during these early developmental stages, the expression profile of 200 primary miRNA transcripts (pri-miRs) was evaluated by large-scale quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) profiling. 38 pri-miRs were regulated by glucose, several of which are known to participate directly or indirectly in plant development. The data indicates that in response to glucose, deficiency in miRNA machinery leads to a deregulated expression of several miRNA target genes but also of the three Abscisic Acid Insensitive transcription factors ABI3, ABI4 and ABI5 mRNAs. It is concluded that miRNA-regulatory pathways may participate in the adjustments of growth and development triggered by glucose signaling.

Key words: abscisic acid, AGO1, development delay, glucose, HYL1, miRNA, plant development, post-transcriptional control

Abbreviations: abscisic acid (ABA); *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis); double-stranded RNA (dsRNA); glucose insensitive (*gin*); microRNA (miRNA); precursor miRNA (pre-miRNA); primary miRNA (pri-miR); quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR); RNA-induced silencing complex (RISC); Relative Quantification (RQ); trans-acting siRNA (tasiRNA).

Introduction

Photosynthetic-derived sugars are the main source of carbon skeletons and energy in plants. Thus, it is not surprising that glucose (Moore et al., 2003; Li et al., 2006; Price et al., 2004), fructose (Cho and Yoo, 2011; Li et al., 2011), sucrose (Vaughn et al., 2002) and trehalose-6-phosphate (Delatte et al., 2011) are important signaling molecules that impact on gene expression and on several aspects of plant growth and development phases (e.g., germination, flowering, senescence) (Eveland and Jackson, 2011). In addition, sugars such as glucose have shown to interact with the hormones abscisic acid (ABA), ethylene (Yanagisawa et al., 2003; Karve et al., 2012), auxin and cytokinin (Moore et al., 2003) for regulating plant development (Rolland *et al*, 2006). The only sugar sensor that has been described unambiguously up to now is Hexokinase1 (HXK1), which senses glucose. Remarkably, HXK1-sensing directly mediates the glucose-dependent transcriptional repression of chlorophyll a/b-binding protein 2 CAB2 gene (Cho et al., 2006). Alternatively, effects of glucose over gene expression may occur through an HXK1-independent pathway, which may or may not involve glucose metabolism (Rolland et al., 2006; Smeekens et al., 2010). Further evidence for transcriptional control comes from the observation that the APETALA2-type transcription factor ABI4, component of ABA signaling pathway, is involved in sugar-induced gene expression changes (Li et al., 2006; Bossi et al., 2009). In addition, regulation of *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) S-group bZIP-type transcription factor mRNA translation by sucrose (Rahmani et al., 2009), and the glucoseinduced degradation of the Ethylene Insensitive 3 (EIN3) transcription factor (Yanagisawa et al., 2003), show that post-transcriptional regulations are also involved in sugar signaling. Moreover, it has been shown that glucose may modulate the stability of the Arabidopsis transcription factor AtbZIP63 mRNA as part of a regulatory scheme integrating energetic and abiotic stress (Matiolli et al., 2011). This observation prompted us to address the question of whether miRNAs-related regulatory pathways participate in glucose responses. MIRNA genes are mainly transcribed by RNA polymerase II, resulting in a primary miRNA (pri-miR) transcript that is first converted into a precursor miRNA (pre-miRNA) by DICER-like1 (DCL1). Subsequently, the C2H2-zinc finger protein SERRATE (SE), the double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) and DCL1, interact to trim the pre-miRNA generating a 21-nucleotide double-stranded miRNA/miRNA* duplex that is exported to the cytoplasm through the action of HASTY and other factors (Voinnet, 2009). This mature duplex fragment is then methylated by HEN1, protecting the fragment from degradation by exonucleases, being then recognized preferentially by ARGONAUTE1 (AGO1) and integrated into the RNA-induced silencing complex (RISC) through a process that also might require HYL1 activity (Eamens *et al.*, 2009), which guides the miRNA to the target mRNAs promoting its cleavage and/or translational repression (Mi *et al.*, 2008; Voinnet, 2009). Sensitivity of seedling development to glucose was used as a readout to analyze the capacity of *hyl1-2* mutant, which is defective in pre-miRNA production (biosynthesis mutant), and *ago1-25* mutant, that is impaired in miRNA activity, to modulate glucose responses. Both mutants showed a glucose-insensitive phenotype (*gin*) which was defined by the lower capacity of glucose to delay early seedling development. This phenotype was correlated with the regulation of a set of 38 pri-miRs expression by 4% glucose in young seedlings. The data indicate that miRNA-related regulatory processes modulate glucose-induced delay of seedling development and some clues about the underlying mechanisms are provided.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia-0 (Col-0) was used for comparison with *abi4-1* (Finkelstein, 1994), *aba2-1* (Schwartz *et al.*, 1997), *ago1-25* (Morel *et al.*, 2002), *hyl1-2* (Vazquez *et al.*, 2004) and Landsberg *erecta* (L*er*) as a wild-type control for *gin2-1* (Moore *et al.*, 2003). Seeds were surface-sterilized and sown in plates with half-strength Murashige and Skoog media (MS/2) containing 0.5% (w/v) agar (Type E), adjusted to 1% to 6% glucose, 4% mannitol or 0.5 μ M to 4 μ M ABA (all Sigma-Aldrich reagents). For phenotypic assays, each plate contained at least 20 seeds of each genotype and the assays were carried out in replicates or triplicates. For expression analysis assays, 0.05 mg of seeds of each evaluated genotype was plated in triplicates or quadruplicates. The plates were placed in the dark at 4°C for two days for stratification and then incubated at 24°C under continuous light (50 µmol m⁻² s⁻¹) for ten days.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated following a LiCl-based protocol for seeds (Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa, 2008), except for addition of 3 μ L of glycogen 20 mg mL⁻¹ (Roche) in the last precipitation step. For pri-miRs profiling, total RNA was treated with TURBO DNA*-free* (Ambion) following manufacturer's recommendations. For other qRT-PCR analysis, DNAse treatment was carried out only in case the primers pairs did not spanned exon-exon junctions. Synthesis of cDNA was carried out with ImProm II Reverse Transcriptase (Promega), according to manufacturer's instructions.

qRT-PCR analysis

Gene expression analysis by qRT-PCR was conducted as described by Czechowski *et al.* (2005) and Udvardi *et al.* (2008), evaluating gene expression with Delta-Delta Ct method (Livak and Schmittgen, 2001). For the pri-miRs profiling, cDNA was diluted four times before qRT-PCR analysis with SYBR Green (Applied Biosystems) on a 384-well 7900HT Real-Time PCR (Applied Biosystems), using *PP2AA3* (*At1g13320*), *At2g283904*, *At5g15710* and *UBQ10* (*At4g05320*) as reference genes. For the validation of pri-miRs profiling results, qRT-PCR was performed with SYBR Green (Invitrogen) on a 96-well 7500 Fast Real-Time PCR (Applied

Biosystems), using *PP2AA3* (*At1g13320*) as reference gene. For the large scale expression analysis, differences in gene expression were considered significant for fold change $\geq |1.5|$ between treated and control samples and when p < 0.05 according to Student's *t* test. Sequences of the qRT-PCR primers are given in Supplementary Table S1.
Results

hyl1-2 and ago1-25 mutants exhibit a glucose insensitive phenotype during the transition from germination to seedling establishment

In order to evaluate the involvement of miRNAs-related regulatory pathway in glucoseinduced delay of Arabidopsis early seedling development (reviewed in Gibson *et al.*, 2005; Eveland and Jackson, 2012), development of the miRNA biogenesis mutant *hyl1-2*, the miRNA activity mutant *ago1-25* and their corresponding wild-type counterpart Col-0 was scored as germination (*testa* rupture; Supplementary Fig. S1A), post-germination (radicle elongation; Supplementary Fig. S1B), and establishment (cotyledon development and greening; Supplementary Fig. S1C) in response to a range of glucose or mannitol (osmotic control) concentrations. In addition, the glucose insensitive mutants *gin2-1* (HXK1 glucose sensor mutant in L*er* background; Moore *et al.*, 2003) and *abi4-1* (Apetala2-type transcription factor involved in ABA signalization in Col-0 background; León and Sheen, 2003) were included as controls.

A first set of experiments revealed that during the transition from germination to seedling establishment the miRNA-deficient mutants were significantly less sensitive to high concentrations of glucose than seedlings from their corresponding wild-type accessions, being comparable to the glucose-hyposensitive mutant *abi4-1* (Supplementary Fig. S2). Nevertheless, after a prolonged period of incubation (10 days) at 4% glucose, all genotypes reached the seedling establishment phase (data not shown). Similar results were obtained with different seed batches although variation in development rate was observed between them (data not shown).

From these initial data it was deduced that 4% of glucose is the most favorable conditions to accurately evaluate the degree of glucose sensitivity of the miRNA pathway mutants (Supplementary Fig. S2). Under this condition and after two days, only 50% of Ler and 20% of Col-0 seedlings germinated (Fig. 1A), while 80% of ago1-25 and nearly all hyl1-2 seeds germinated (Fig. 1A), indicating a significant lower sensitivity of the miRNA deficient genotypes to 4% glucose which was comparable to the gin2-1 response (Fig. 1A). The same differences in glucose sensitivity were essentially maintained among the different genotypes for both the post-germination and seedling establishment stages until the fifth day (Fig. 1A). These differences in glucose, early seedling development of all genotypes was almost indistinguishable

(Supplementary Fig. S2). In addition, the osmotic control 4% mannitol was unable to reproduce the effects of glucose (Fig. 1B), indicating that glucose-mediated delay of seedling development is not due to osmotic effect. Together, these observations imply that miRNAs-related machinery is involved in glucose-induced early seedling development delay and that this effect appears to be restricted to a limited developmental window between germination and seedling establishment.



Fig.1. Glucose-induced delay on early seedling development is dependent on miRNA machinery activity. (A) Effects of 4% glucose on germination and development of miRNA-deficient mutants *ago1-25* and *hyl1-2* was less severe than the observed for wild-type Col-0 and Ler, and was similar to the glucose insensitive *gin2-1*. (B) Osmotic control 4% mannitol could not reproduce the delay observed for glucose. In media not supplied with sugar, all seeds reached post-germination stage after two days, and

establishment within three days (data not shown). In glucose-supplied media, growth arrest was not observed before seedling establishment. Seeds (n = 20) of each genotype were sown in MS/2 plates supplied or not with the indicated sugar, kept for two days at 4°C in the dark for stratification and transferred to continuous light (50 μ mol m⁻² s⁻¹) at 24°C. Germination (*testa* rupture), post-germination (radicle elongation), and establishment (cotyledons greening) were scored from two to five days after light exposure. Results presented are the means ± SD of three biological replicates.

Since glucose effect can be mediated by ABA signaling pathway during early seedling development (León and Sheen, 2003; Dekkers *et al.*, 2008), it was important to verify whether seedling development of the miRNA-deficient mutants would also be affected by ABA (Supplementary Fig. S3). Except for *hyl1-2*, that was found to be more sensitive to ABA (Supplementary Fig. S3; Lu and Fedoroff, 2000; Kim *et al.*, 2008), and for *abi4-1* which was found to be ABA hyposensitive (Supplementary Fig. S3; Finkelstein, 1994), no significant differences between the *ago1-25* and wild-type genotypes were observed for germination and post-germination (Supplementary Fig. S3). Therefore, it appears that the glucose insensitivity phenotype of miRNA-related regulatory pathway mutants is independent of ABA-related signaling pathway.

Expression of miRNAs genes in response to glucose

To identify which miRNAs may be involved in the glucose-induced early seedling development delay, a platform established for quantification of 200 pri-miRs expression by qRT-PCR was used (Szarzynska *et al.*, 2009; Pant *et al.*, 2009). Although pri-miRs are not the biologically active molecules, their accumulation may reflect the levels of the mature miRNA (Bari *et al.*, 2006; Pant *et al.*, 2009). The expression analysis was carried out with RNAs from Col-0 and Ler seedlings grown for three days in media supplied or not with 4% glucose or mannitol (osmotic control). A total of 38 pri-miRs belonging to 32 families were found to be regulated by glucose in Col-0, 33 of which showed the same response in Ler accession (Fig. 2). In addition, only five of the 38-glucose responsive miRNA precursors – pri-miR156d,f, pri-miR167d, pri-miR3932a, and pri-miR825a – were found to require glucose HXK1-sensing activity, as revealed by the comparison between pri-miRs accumulation in *gin2-1* seedlings and

Ler wild-type (Fig. 2). This result suggests that HXK1-sensing pathway is not the main route involved in glucose-mediated regulation of miRNA genes expression. In a new set of experiments the glucose-specific regulation of ten pri-miRs accumulation among twelve that were evaluated (83%) was confirmed (Supplementary Fig. S4 and Table 1), essentially validating the high throughput data. Quite noticeably, the mature forms of several identified glucose-responsive pri-miRs are known to target mRNAs that participate directly or indirectly in plant development (Table 1; Supplementary Table S2).



Fig. 2. Pri-miRs levels in Col-0 and Ler seedlings after 3 days of light exposure grown in control media, 4% glucose (Glc) media and 4% manitol (Man) media. Potential HXK1-sensing dependent pri-miRs are marked with an asterisk. Seed dormancy was previously broken by imbibition for 2 days at 4° C in the dark. This set of glucose-responsive pri-miRs (column 3) presented at least 1.5 fold expression difference

to non-treated control samples (column 2), at least 2 fold difference to mannitol-treated samples (column 1), and were considered to be significantly different according to Student's *t* Test (p < 0.05). The boxes represent the log₂ values of the relative quantification between (Col-0 *vs* Col-0 + treatment) and (Ler *vs* Ler + treatment); green boxes indicate repression, red boxes indicate induction. Mannitol-treatet Ler is not shown.

Table 1. Validation by qRT-PCR of glucose-regulated pri-miRs related to development control and their expression in *ago1-25* and *hyl1-2* mutants.

	Untreated (RQ)		Glucose-treated (RQ)						
Pri-miRNAs	ago1-25 /	go1-25 / hyl1-2 /		ago1-25 /	hyl1-2 /	Target	Developmental Process	Deference	
	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Family		Kelefelice	
Pri-miR156d	0.94	2.67	0.43	0.10	0.67	CDI	Vagatativa laavaa amanaanaa	Wu et al., 2009; Martin et	
Pri-miR156f	0.67	2.39	0.07	ND	0.18	3PL	vegetative leaves emergence	al., 2010	
Pri-miR159b	0.95	4.54	2.90	3.31	34.45	MYB	Seedling growth and development / ABA response	Reyes and Chua, 2007	
Pri-miR166c	1.19	0.57	0.38	0.17	0.55	HD-ZIP III	Leaf flattening	Husbands et al., 2009	
Dui uni D 160a	0.41	2 10	4.00	2.02	0.02	NE V	Embryo development / ABA	Li et al., 2008; Yamamoto	
PII-IIIIK109a	0.41	2.18	4.90	2.05	9.02	INΓ-I	response	et al., 2009	
Pri-miR 390a	0.88	29.53	5.04	3.11	130.56	TAS3	Lateral root development / leaf	Marin et al., 2010	
TTT IIII(5)0u	0.00	27.55	5.01	5.11	150.50	11100	polarity		
Pri-miR773	0.63	2.58	20.90	7.70	20.74	MET2	Biotic stress response	Fahlgren <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2010	
Pri-miR775	0.99	1.09	18.83	9.91	12.17	GT	Arabinogalactan-proteins biosynthesis	TarBase	
Pri-miR823	1.00	1.32	10.80	5.65	10.43	CMT3	Embryo development	TarBase	
Pri-miR828	1.33	1.24	18.74	4.92	25.45	MYB	Nutrients availability control	Luo et al., 2011	

Note. The values are the relative quantification (RQ) from 3 days old seedlings grown in media supplied or not with 4% glucose in comparison with untreated Col-0 seedlings (Ctrl). Target gene families are based on the indicated published results or according to TarBase database (Vergoulis *et al.*, 2011).

Possible reasons for the gin phenotype of ago1-25 and hyl1-2

In an attempt to get some insights into how miRNAs-related pathways may mediate sensitivity of early seedling development to glucose, a set of ten glucose-responsive pri-miRs whose mature forms are known to be involved in developmental cues (miR156, miR159, miR166, miR169, miR390, miR823), biotic stress response (miR773), adaptation to mineral

nutrient availability (miR828), arabinogalactan-proteins biosynthesis (miR775) were analyzed into more detail (Table 1). The analysis consisted in evaluating the glucose-mediated expression changes of these ten selected *MIRNA* genes together with their target genes in Col-0, *ago1-25* and *hyl1-2* mutants backgrounds.

Deficiencies in HYL1 or AGO1 were shown to exert different effects over the accumulation of the selected pri-miRs (Table 1; Supplementary Fig. S5). Since HYL1 is required for pri-miR processing, higher accumulation of pri-miRs in untreated *hyl1-2* mutant would be expected. Indeed, all ten pri-miRs tested but one (pri-miR166c) were found to be more abundant (pri-miR156d,f, pri-miR159b, pri-miR169a, pri-miR390a, pri-miR773) or present at equal levels (pri-miR775, pri-miR823, pri-miR828) in *hyl1-2* as compared to the wild-type (Table 1; Fig. 3 and 4; Supplementary Fig. S5). Pri-miR166c was found to be significantly reduced in *hyl1-2* (Table 1; Supplementary Fig. S5), indicating the existence of an alternative role for HYL1 or a feedback regulation affecting pri-miR166c expression.



Fig. 3. Expression of (**A**) pri-miR159b, (**B**) *MYB33*, (**C**) *MYB101* and (**D**) *ABI3*, (**E**) *ABI4* and (**F**) *ABI5* in Col-0, *ago1-25* and *hyl1-2* seedlings grown in 4% glucose or control media after three days of light exposure. All expression values are in comparison to untreated Col-0. The values are means of three biological replicates \pm SD. Below each graph is given the relative transcript abundance. Changes in transcript accumulation were considered significant for differences with fold change $\geq |1.5|$ and according to Student's *t* test (p < 0.05) for the following comparisons: **a.** untreated *ago1-25* or *hyl1-2 vs* untreated Col-0; **b.** glucose *vs* untreated samples (same genotype); **c.** glucose-treated mutant *vs* glucos-treated Col-0.



Fig. 4. Expression of (**A-B**) pri-miR156d,f, and (**C**) *SPL13* in Col-0, *ago1-25* and *hyl1-2* seedlings grown in 4% glucose or control media after three days of light exposure. All expression values are in comparison to untreated Col-0. The values are means of three biological replicates \pm SD. Below each graph is given the relative transcript abundance. Changes in transcript accumulation were considered significant for differences with fold change $\geq |1.5|$ and according to Student's *t* test (p < 0.05) for the following comparisons: **a.** untreated *ago1-25* or *hyl1-2* vs untreated Col-0; **b.** glucose *vs* untreated samples (same genotype); **c.** glucose-treated mutant *vs* glucos-treated Col-0.

In untreated *ago1-25* plants the accumulation of most of the pri-miRs was not affected (Table 1; Supplementary Fig. S5), a result that was expected since AGO1 is not involved in miRNA biogenesis. However, pri-miR169a and pri-miR773 levels were reduced in *ago1-25* (Table1; Supplementary Fig. S5), possibly reflecting an indirect effect, such as feedback regulations. Curiously, most pri-miRs accumulation in response to glucose in *ago1-25* appears be attenuated in comparison to Col-0, except for pri-miR166c and pri-miR156d,f, both of which

being repressed by glucose and presented a stronger fold change in comparison to Col-0 (Fig. 3 and 4; Supplementary Fig. S5).

Inverse correlation between changes of pri-miRs levels and the accumulation of the target mRNA in response to glucose in the wild-type was observed only for pri-miR166c/PHV, primiR390/TAS3, pri-miR775a/At1g53290 and pri-miR773/MET2 (Supplementary Fig. S5). For the remaining six miRNAs and their targets, pri-miR828/TAS4, pri-miR823/CMT3, pri-miR169a/NF-YA5, pri-miR156d-156f/SPL13, and pri-miR159/MYB33-MYB101 (Fig. 3 and 4; Supplementary Fig. S5), the glucose-induced modulation of pri-miRs levels was unexpectedly correlated with parallel changes of their targets. Overall, the wild-type pattern of target mRNA accumulation in control conditions and/or in response to glucose was found to be qualitatively similar in the ago1-25 and hyl1-2 mutants, yet some quantitative differences were observed in both mutants for PAP1 that is a target of TAS4 derived trans-acting siRNAs (ta-siRNA), as part of feed-back regulatory loop (Luo et al., 2011), for TAS4 in hyl1-2, for NF-YA5 and SPL13 in ago1-25, and for MYB33 in *hyl1-2* (Fig. 3 and 4; Supplementary Fig. S5). Additionally, the mRNA level of the transcriptional factor Squamosa Promoter-Binding Protein Like 13 (SPL13), whose accumulation was reported to lead to delay of vegetative leaves emergence (Martin et al., 2010; Nonogaki, 2010), was found to be significantly higher in both ago1-25 and hyl1-2 as compared to Col-0 (Fig. 4). How these observed quantitative differences in miRNA target genes mRNA levels in the ago1-25 and hyl1-2 mutants are involved in the glucose insensitive phenotype of these mutants remains elusive.

A potential candidate gene to explain the *gin* phenotype of *ago1-25* and *hyl1-2* is the transcription factor MYB33 gene which is regulated by miR159b and mediates ABA-induced seedling developmental inhibition (Reyes and Chua, 2007). The lower level of *MYB33* mRNA in *ago1-25* than in wild-type in response to glucose (Fig. 4B) may partly explain the *gin* phenotype of *ago1-25*. However, the higher amount of *MYB33* mRNA in response to glucose in *hyl1-2* in comparison to the wild-type (Fig. 3B) would be expected to increase glucose sensitivity of *hyl1-2* which is the opposite of the observed *gin* phenotype of *hyl1-2*. Since MYB33 is part of an ABA-related network which involves ABI3 and ABI5 and retards seedling development under abiotic stress conditions (Reyes and Chua, 2007), but also because mutants for ABI3, ABI4 and ABI5 have been described as *gin* mutants (reviewed in Gibson, 2005) it was important to evaluate the glucose-induced modulation of the expression of these three genes in the miRNA pathway

mutants. *ABI3*, *ABI4* and *ABI5* expression was found to be strongly induced by glucose (Fig. 3D-F) but not by mannitol discarding the possibility of an osmotic effect (Supplementary Fig. S4). This glucose-specific effect was significantly attenuated in the *ago1-25* and *hyl1-2* mutants (Fig. 3D-F) which is surprising because *ABI3*, *ABI4* and *ABI5* are not known to be direct miRNA targets. In any case, it is thus possible that these three ABA signaling elements are partly responsible for the *gin* phenotype of miRNA pathway mutants.

Discussion

Developmental processes and responses to environmental changes may rely on fast and fine adjustments of mRNA or protein profiles, which can be achieved through miRNA-mediated control of mRNAs decay and/or translation (Voinnet, 2009; Floris *et al.*, 2009). Thus, the regulation of *MIRNA* gene expression is crucial for proper growth and development. The modulation of the expression of up to 38 pri-miRs genes by glucose shown in this study (Fig. 2; Supplementary Table S2), mainly via HXK1-sensing independent pathway, reveals a new aspect of how sugar signaling could impact on seedling growth and development. Moreover, since glucose and other sugars are involved in energy-mediated growth control, which has been shown to be integrated into the diurnal fluctuation of starch accumulation (Smith and Stitt, 2007; Graf *et al.*, 2010), it is tempting to suggest that miRNA are also integrated in this regulatory circuit.

Making the reasonable assumption that the level of pri-miR reflects the accumulation of active mature miRNA (Bari *et al.*, 2006; Pant *et al.*, 2009) the consequences of pri-miRs regulation by glucose on the accumulation of their target mRNA was not found to be fully predictable based solely on the activity of miRNA-mediated mRNA degradation. Indeed, among ten target mRNAs that were analyzed into more details, the accumulation of only four of them (Fig. 3, 4 and Supplementary Fig. S5) showed an inverse correlation with the levels of glucose-promoted changes of pri-mRs levels in wild-type (Supplementary Fig. S5). The trend observed for the remaining six targets mRNA was to follow the expression pattern of the pri-miR (Fig. 3, 4 and Supplementary Fig. S5). These later results may reflect feed-forward (Vidal *et al.*, 2010) or dampening regulatory mechanisms, differential tissue-specific expression patterns of the miRNA and its target (Voinnet, 2009) or even control of miRNA activity (Alonso-Peral *et al.*, 2012).

Also, *ago1-25* and *hyl1-2* mutants had variable consequences on target mRNAs accumulation as compared to the wild-type (Fig. 3, 4 and Supplementary Fig. S5). Although target mRNA would be expected to accumulate to higher levels in miRNA mutants, it was found to be true for a limited set of targets in the *ago1-25* and/or the *hyl1-2* mutants either in control conditions and/or in response to glucose, (*NF-YA5*, *TAS3*, *At1g53290*, *MYB33* and *SPL13*; Fig. 3, 4 and Supplementary Fig. S5). Such absence of correlation between miRNA levels and target mRNA accumulation in *ago1-25* and *hyl1-2* mutants have been previously reported (Kurihara *et al.*, 2009). A feasible explanation relies on the fact that since miR168 targets AGO1 in a feedback

regulation, levels of *AGO1* mRNA may be increased in miRNA-deficient mutants (Vaucheret *et al.*, 2004), what could have implications in target mRNA regulation considering that *ago1-25* is a weak allele.

The absence of systematic increase of target mRNA levels in these mutants may be due to different reasons including the strength of the mutation which is leaky in the case of *ago1-25* and activity redundancy which have been reported for AGO proteins (Mi *et al.*, 2008) and HYL1 (Vazquez et al., 2004; Szarzynska *et al.*, 2009). The few differences in target gene mRNA levels that were observed in *ago1-25* and *hyl1-2* as compared to the wild type did not provide a clear cut reason for the *gin* phenotype of these mutants. For instance, *MYB33* may partly be involved in the *ago1-25 gin* phenotype but cannot be responsible for the *hyl1-2* glucose insensitivity (Fig. 3). It is however possible that rather than a single causal change it is the combination of small or subtle alterations that underlies the *gin* phenotype of the *ago1-25* and *hyl1-2* mutants between germination and seedling establishment. Alternatively, since ABI3, ABI4 and ABI5 are known to modulate sensitivity of seedling development to glucose (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2003; Dekkers *et al.*, 2008), the weaker accumulation of *ABI3*, *ABI4* and *ABI5* mRNA in response to glucose in *ago1-25* and *hyl1-2* mutants could be directly involved in the *gin* phenotype of these mutants. How the glucose-mediated regulation of these ABA signaling elements is altered in the *ago1-25* and *hyl1-2* mutants is unknown but is likely to be indirect.

To conclude, the regulation of miRNA expression by glucose support the notion that mRNA decay control represents another mechanistic aspect involved in tuning glucose regulatory network.

Supplementary Data

Table S1. Primers sequences.

Table S2. Glucose-regulated pri-miRs and corresponding miRNAs targets.

Figure S1. Phases considered for development monitoring.

Figure S2. Effects of different concentrations of glucose on early seedling development.

Figure S3. Effects of ABA on early seedling development.

Figure S4. Expression of *MIRNA* genes pri-miRs, *ABI3*, *ABI4*, and *ABI5* in Col-0 seedlings grown in 4% glucose, 4% mannitol and control media.

Figure S5. Expression of MIRNA genes pri-miRs and the respective miRNA targets in Col-0, *ago1-25* and *hyl1-2* seedlings.

Acknowledgements

The authors thank S. A. Martins for technical support, Dr. Hervé Vaucheret for kindly providing *Arabidopsis* mutants, Dr. M. Stitt and Dr. W-R. Scheible groups for experimental support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grant 2008/54529-4).

References

Alonso-Peral MM, Sun, Millar AA. 2012. MicroRNA159 can act as a switch or tuning microRNA independently of its abundance in Arabidopsis. *PLoS ONE* **7**, e34751.

- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P. 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. Genes & Development 14, 2085-2096.
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, León P. 2003. Three genes that affect sugar sensing (*Absicisc Acid Insensitive 4*, *Abscisic Acid Insensitive 5*, and *Constitutive Triple Response 1*) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. *Plant Physiology* 133, 231-242.
- **Bari R, Pant BD, Stitt M, Scheible WR.** 2006. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology* **141**, 988-999.
- Bossi F, Cordoba E, Dupré P, Mendoza MS, Roán CS, León P. 2009. The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling. *The Plant Journal* 59, 359-374.
- Cheng W-H, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* 14, 2723-2743.

- Cho YH, Yoo SD, Sheen J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* **127**, 579-589.
- Cho YH, Yoo SD. 2011. Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in Arabidopsis thaliana. PLOS Genetics 7, e1001263. doi:10.1371/journal.pgen.1001263.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Schible WR. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 5-17.
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM. 2008. Interaction between sugar and abscisic acid signaling during early seedling development in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 67, 151-167.
- Delatte TL, Sedijani P, Kondou Y, Matsui M, de Jong GJ, Somsen GW, Wiese-Klinkenberg A, Primavesi LF, Paul MJ, Schluepmann H. 2011. Growth arrest by trehalose-6phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiology* 157, 160-174.
- Eamens AL, Smith NA, Curtin SJ, Wang MB, Waterhouse PM. 2009. The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. RNA 15, 2219-2235.
- **Eveland AL, Jackson DP.** 2012. Sugars, signaling, and plant development. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3367-3377.
- Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC. 2006. Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. Current Biology 16, 939-944.
- Finkelstein RR. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* **5**, 765-771.
- Floris M, Mahgoub H, Lanet E, Robaglia C, Menand B. 2009. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3168-3185.
- Gibson SI. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signalin. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 93-102.

- Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 107, 9458-9463.
- Husbands AY, Chitwood DH, Plavskin Y, Timmermans MCP. 2009. Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes & Development* 23, 1986-1997.
- Karve A, Xia X, Moore Bd. 2012. Arabidopsis Hexokinase-Like1 and Hexokinase1 form a critical node in mediating plant glucose and ethylene responses. *Plant Physiology* 158, 1965-1975.
- Kim S, Yang JY, Xu J, Jang IC, Prigge MJ, Chua NH. 2008. Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs. *Plant & Cell Physiology* 49, 1634-1644.
- Kurihara Y, Kaminuma E, Matsui A, Kawashima M, Tanaka M, Morosawa T, Ishida J, Mochizuki Y, Shinozaki K, Toyoda T, Seki M. Transcriptome analyses revealed diverse expression changes in *ago1* and *hyl1* Arabidopsis mutants. *Plant & Cell Physiology* 50, 1715-1720.
- León P, Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections. TRENDS in Plant Science 8, 110-116.
- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW. 2006 Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res*earch 16, 414-427.
- Li Y, Zhang QQ, Zhang J, Wu L, Qi Y, hou JM. 2010. Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology* **152**, 2222-2231.
- Li P, Wind JJ, Shi X, Zhang H, Hanson J, Smeekens SC, Teng S. 2011. Fructose sensitivity is suppressed in *Arabidopsis* by the transcription factor ANAC089 lacking the membrane-bound domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 3436-3441.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-408.
- Lu C, Fedoroff N. 2000. A mutation in the Arabidopsys *HYL1* gene enconding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin and cytokinin. *Plant Cell* **12**, 2351-2366.

- Luo QJ, Mittal A, Jia F, Rock CD. 2012. An autoregulatory feedback loop involving *PAP1* and *TAS4* in response to sugars in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **80**, 117-129.
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A. 2010. miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. The Plant Cell 22, 1104-1117.
- Martin RC, Asahina M, Liu PP, Kristof JR, Coppersmith JL, Pluskota WE, Bassel GW, Goloviznina NA, Nguyen TT, Martínez-Andújar C, Kumar MBA, Pupel P, Nonogaki H. 2010. The microRNA156 and microRNA172 gene regulation cascades at post-germinative stages in *Arabidopsis*. Seed Science Research 20, 79-87.
- Matiolli CC, Tomaz JP, Duarte GT, Prado FM, Del Bem LEV, Silveira AB, Gauer L, Corrêa LGG, Drumond RD, Viana AJC, Mascio PD, Meyer C, Vincentz M. 2011. The Arabidopsis bZIP gene AtbZIP63 is a sensitive integrator of transiente abscisic acid and glucose signals. *Plant Physiology* 157, 692-705.
- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y. 2008. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **113**, 116-127.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. *Science* **300**, 332-336.
- Morel JB, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H. 2002. Fertile hypomorphic *ARGONAUTE* (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**, 629-639.
- Nonogaki H. 2010. MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1840-1846.
- **Oñate-Sánchez L, Vicente-Carbajosa J.** 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana* including seeds and siliques. *BMC Research Notes* **1**, 93.
- Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible W-R. 2009. Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by

comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiology* **150**, 1541-1555.

- Price J, Li T-C, Kang SG, Na JK, Jang J-C. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132, 1424-1438.
- Rahmani F, Hummel M, Schuurmans J, Wiese-Klinkenberg A, Smeekens S, Hanson J. 2009. Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frameencoded peptide. *Plant Physiology* **150**, 1356-1367.
- **Reyes JL, Chua NH.** 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal* **49**, 592-606.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 675-709.
- Schwartz SH, Léon-Kloosterziel KM, Koorneef M, Zeevaart JAD. 1997. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 114, 161-166.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 274-279.
- Smith AM, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1126-1149.
- Szarzynska B, Lukasz S, Pant BD, Balazadeh S, Scheible W-R, Mueller-Roeber B, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. 2009. Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs. Nucleic Acids Research 37, 3083-3093.
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* **20**, 1736-1737.
- Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99, 10876-10880.
- Vazquez F, Gasciolli V, Crete P, VAucheret H. 2004. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology* 14, 346-351.

- Vergoulis T, Vlachos IS, Alexiou P, Georgakilas G, Maragkakis M, Reczko M, Gerangelos S, Koziris N, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. 2012. TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Research* 40, D222-D229.
- Vidal EA, Araus V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutiérrez RA. 2010. Nitrateresponsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 107, 4477-4482.
- Voinnet O. 2009. Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs. Cell 136, 669-687.
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS. 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138, 750-759.
- Yamamoto A, Kagaya Y, Toyoshima R, Kagaya M, Takeda S, Hattori T. 2009. Arabidopsis NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seedspecific ABRE-binding factors. *The Plant Journal* 58, 843-856.
- Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* **425**, 521-525.

Supplementary Data

Supplementary Table S1. Primers sequences.

Primer Sequences				
Target	AGI	Forward (5' - 3')	Reverse (5'- 3')	Reference
PAP1/AtMYB75	AT1G56650	GGTTGAACTATTTGAAGCCA	GCAATTAAAGACCACCTATTC	
TAS4	AT3G25795	CGACCTCGATCCTTCACCT	ATTTTCTAGACCTGCATTGTTTAT	Luo <i>et al.,</i> 2011
AT2G28390	AT2G28390	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	
AT5G15710	AT5G15710	AAGTTCGCCAGCAAAACATGTC	GCTGACCAGGTCTTCATTAACACTG	
PP2AA3/PDF2	At1g13320	TAGATCGCTCGGAACTTGGAAA	ССТСАССААААСТСАААТСАСТСС	
Pri-miR156d	AT5G10945	CAGAAGAGAGTGAGCACACAAAGGG	GTGAGCACGCAAAAGCAACCATATAC	
Pri-miR156f	AT5G26147	TGGTGAGGAATTGATGGTGACA	CCTTCAAATATGCAAGAAAGCCAC	
Pri-miR159b	AT1G18075	GGAGGGTTTAGCAGGGTGAAGTAAAG	CCAAAGAAGAGTGAAGCCATTAAAGGG	
Pri-miR166c	AT5G08712	AGTGTTGAGAGGATTGTTGTCTGGC	GAATGAAGCCTGGTCCGAGAATCATC	
Pri-miR169a	AT3G13405	AAAGTAACATGATCGGCAAGTTGTCC	GCGACACAAAGTAACGTGTAGCC	Pant <i>et al.,</i>
Pri-miR390a	AT2G38325	TAGCGCCATGATGATCACATTC	AATGAAACTCAGGATGGATAGCG	2009
Pri-miR399c	AT5G62162	CATCTTTCTATTGGCAGGCGACTTGG	AAGCAGTGACAGGGCAACTCTCC	
Pri-miR773	AT1G35501	AGGAGGCAATAGCTTGAGCAAA	AGGTGACAGCTTTAGTCGATGGA	
Pri-miR775	AT1G78206	CATTGAAACTGTCTTTCAACATTCCA	TGGCACTGCTAGACATCGAAAAT	
Pri-miR823	AT3G13724	CCATTTAGTTCTAGTGGGTGGTGAT	GATATGTTTCACTGTTACCATTACCAATCT	
Pri-miR827a	AT3G59884	TCCTTGTGTTGATCGATTGGTTTA	CGATGCAAAACCACGAAAGAG	
Pri-miR828	AT4G27765	AAATGATTCACTCACTCGTAT	GATATTAAATAGTCCCACTTCC	
UBQ10	AT4G05320	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT	
ABI3	AT3G24650	GCAGTGCCGCCTCAATTAC	TTCTGGTTTCCATCCCTGCC	
ABI4	AT2G40220	GAGGTGGCGTTAGGGCAGG	GGTGGATGAGTTATTGATAGAC	
ABI5	AT2G36270	GCAAGAAAACAAGCATATACAG	TTCCTCTTCCTCTCCAACTC	
ARF3	AT2G33860	CTGTCTCTGAGGGGATTCG	GGCTCCACCATCCGAACAAG	
AT1G53290	AT1G53290	TATCGAAGAGGAGTACAGTAAG	TAGCAGAGAGAGTCGATCTG	
CMT3	AT1G69770	TCAGGTTCACAATCAAAGTCC	AATTCGCTCCCTTTCTCTTGG	
MET2/DMT2	AT4G14140	AGGTTTACGCTATGATGCTGG	GTAGTTCCATACTCTTTGTTTAT	This Work
MYB33	AT5G06100	GCACGTATGGCTGCACATTTG	CACTCAAGTGCCTCAACATGC	
MYB101	AT2G32460	CATTCATCATTGGGAGCAAACC	ΑΤΑΑΤΤCΑΤCΑΤCΑΤCΑΤCCACC	
NF-YA5	AT1G54160	AATGCCGTAAACCGTACCTTC	GCTTCTTTGTATTGAGGAAACG	
PHV/ATHB9	AT1G30490	AACATGAAGAGTTTCTCGAAG	AGCACAACCTCCAACCACATT	
SPL13A	AT5G50570	ACAATGCAGCAGGTTTCATG	GACGACCGATATGTTCAGGC	
TAS3	AT3G17185	AAACATAACCTCCGTGATGC	GCTCAGATAGGATAACACCG	

miRNA Family	Glucose-responsive pri-miRNAs	Mannitol fold Glucose fold	Target Family	Target Genes
	<u>156d</u>	1,24 -1,67		AT1G27360, AT1G27370, AT1G53160,
156/157	<u>156f</u>	-1,02 -7,62	SDI	AT1G69170, AT2G33810*, AT2G42200,
150/157	157a	1,24 -2,83	3PL	AT3G15270*, AT3G57920, AT5G43270,
	157c	1,95 -2,50		AT5G50570, AT5G50670
158	158b	1,34 3,42	PPR	-
159	159b	3,24 6,70	МҮВ	AT2G26950, AT2G32460, AT4G26930, AT5G55020
161	161a	1,89 4,90	PPR	AT1G06580, AT1G62590, AT1G62670, AT1G62860, AT1G62910, AT1G62930, AT1G63070, AT1G63080, AT1G63130, AT1G63150, AT1G63230, AT1G63330, AT1G63400, AT1G64580, AT2G41720, AT3G16710, AT4G26800, AT5G16640, AT5G41170, AT5G65560
163	163a	1,86 -1,87	SAMT	AT1G66690, AT1G66700, AT1G66720, AT3G44860, AT3G44870
164	164a	1,15 -2,59	NAC	AT1G56010, AT3G12977, AT3G15170, AT5G07680, AT5G53950, AT5G61430
	165a	1,17 3,68	HD-ZIP III	AT1C20400 AT1CE21E0 AT2C24710
165/166	165b	1,63 3,36		ATIG32490, ATIG32130, AT2G34710,
	166c	3,55 -1,61		A14032880, A13000090
167	<u>167d</u>	2,72 -3,38	ARF	-
169	169a	1,90 4,37	HAP2	AT1G17590, AT1G54160, AT1G72830, AT3G20910, AT5G12840
173	173a	1,64 5,61	TAS1,TAS2	AT1G50055, AT2G27400, AT2G39675, AT2G39681
390	390a	1,29 9,88	TAS3	AT3G17185
394	394a	-1,06 5,51	F-Box	AT1G27340
395	395a	-1,21 4,67	APS,AST	AT3G22890, AT4G14680, AT5G10180, AT5G43780
399	399a 399c	2,45 5,03 -17,71 8,00	E2-UBC	AT2G33770
402	402	1,10 2,52	ROS1-Like	AT4G34060
413	413	1,55 4,96	-	-
773	773a	4,72 17,45	MET2	AT4G14140
775	775	4,00 22,28	GT	AT1G53290
777	777	1,23 3,25	CIP4.1-like	AT1G30060
779	779	2,84 7,39	-	AT5G53890
823	823	4,40 17,06	CMT3	AT1G69770
825	825	1,22 -3,61	-	-
827	827	-1,53 3,39	SPX	AT1G02860

Supplementary Table S2. Glucose-regulated pri-miRs and corresponding miRNAs targets.

miRNA Family	Glucose-responsive pri-miRNAs	Mannitol fold Glucose fold	Target Family	Target Genes
828	828	1,41 3,93	МҮВ	AT1G66370
829	829	2,85 10,91	-	-
850	850	-1,31 -3,90	-	-
856	856	6,67 13,39	СНХ	AT5G41610
861	861	1,43 -2,31	-	-
863	863	-1,12 -3,39	-	-
865	865	-1,08 2,03	-	-
3932	<u>3932b</u>	-1,09 -9,87	-	-
4221	4221	2,35 7,06	-	-

Supplementary Table S2. Continued.

Note. Red denotes induction by glucose; green represents repression. Mannitol and glucose fold values are in comparison to the pri-miR expression in non-treated Col-0 seedlings. Potential HXK1-dependent pri-miRs (Fig. 1) are underlined. *SPL* genes marked with an asterisk are exclusive targets of miR156. Target gene families are based on miRBase (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011) and TarBase (Vergoulis *et al.*, 2011) databases.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* **39**, D152-D157.



Supplementary Fig. S1. Phases considered for development monitoring. (A) Germination (*testa* rupture);(B) Post-germination (radicle elongation); (C) Establishment (cotyledons greening).



Supplementary Fig. S2. Effects of different concentrations of glucose on early seedling development of wild-type Col-0, miRNA-deficient mutants *ago1-25* and *hyl1-2*, and glucose-tolerant mutant *abi4-1*. Germination (*testa* rupture), post-germination (radicle elongation), and establishment (cotyledons greening) were scored three days (**A**), five days (**B**) and seven days (**C**) after light exposure. Seeds (n = 20) of each genotype were sown in MS/2 plates supplied with the indicated sugar concentration, kept for two days at 4°C in the dark for stratification and transferred to continuous light (50 μ mol m⁻² s⁻¹) at 24°C. Results presented are the means ± SD of two biological replicates.



Supplementary Fig. S3. Effects of different ABA concentrations on early seedling development of wild-type Col-0, miRNA-deficient mutants *ago1-25* and *hyl1-2*, ABA-insensitive mutant *abi4-1*, and ABA-biosynthesis mutant *aba2-1*. Germination (*testa* rupture), post-germination (radicle elongation), and establishment (cotyledons greening) were scored (**A**) three days and (**B**) five days after light exposure. Except for the ABA-insensitive mutant *abi4-1*, all genotypes had the development arrested before establishment within five days (data not shown). Seeds (n = 20) of each genotype were sown in MS/2 plates supplied with the indicated ABA concentration, kept for two days at 4°C in the dark for stratification and transferred to continuous light (50 μ mol m⁻² s⁻¹) at 24°C. Results presented are the means \pm SD of two biological replicates.



Supplementary Fig. S4. Expression of *MIRNA* genes pri-miRs, *ABI3*, *ABI4*, and *ABI5* in Col-0 seedlings grown in 4% glucose, 4% mannitol or control media after three days of light exposure. All expression values are in comparison to untreated Col-0. The values are means of three biological replicates \pm SD. Below each graph is given the relative transcript abundance. Changes in transcript accumulation were considered significant for differences with fold change $\geq |1.5|$ and according to Student's *t* test (p < 0.05) for the following comparisons: **b.** glucose *vs* untreated samples; **d.** mannitol-*vs* glucose-treated samples.



Supplementary Fig. S4. Continued.



Supplementary Fig. S5. Expression of *MIRNA* genes pri-miRs and the respective miRNA targets in Col-0, *ago1-25* and *hyl1-2* seedlings grown in 4% glucose or control media after three days of light exposure. All expression values are in comparison to untreated Col-0. The values are means of three biological replicates \pm SD. Below each graph is given the relative transcript abundance. Changes in transcript accumulation were considered significant for differences with fold change $\geq |1.5|$ and according to Student's *t* test (p < 0.05) for the following comparisons: **a.** untreated *ago1-25* or *hyl1-2 vs* untreated Col-0; **b.** glucose *vs* untreated samples (same genotype); **c.** glucose-treated mutant *vs* glucos-treated Col-0.











MET2



Supplementary Fig. S5. Continued.





Supplementary Fig. S5. Continued.



Supplementary Fig. S5. Continued.

ANEXO 1

The Arabidopsis bZIP Gene AtbZIP63 Is a Sensitive **Integrator of Transient Abscisic Acid** and Glucose Signals^{1[W][OA]}

Cleverson Carlos Matiolli², Juarez Pires Tomaz², Gustavo Turqueto Duarte, Fernanda Manso Prado, Luiz Eduardo Vieira Del Bem, Amanda Bortolini Silveira, Luciane Gauer, Luiz Gustavo Guedes Corrêa, Rodrigo Duarte Drumond, Américo José Carvalho Viana, Paolo Di Mascio, Christian Meyer, and Michel Vincentz*

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CP6010 Campinas, Sao Paulo, Brazil (C.C.M., J.P.T., G.T.D., L.E.V.D.B., A.B.S., L.G., L.G.G.C., R.D.D., A.J.C.V., M.V.); Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CP6009 Campinas, Sao Paulo, Brazil (M.V.); Unité de Nutrition Azotée des Plantes, Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, 78026 Versailles cedex, France (C.M.); and Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP26077 Sao Paulo, Brazil (F.M.P., P.D.M.)

Glucose modulates plant metabolism, growth, and development. In Arabidopsis (Arabidopsis thaliana), Hexokinase1 (HXK1) is a glucose sensor that may trigger abscisic acid (ABA) synthesis and sensitivity to mediate glucose-induced inhibition of seedling development. Here, we show that the intensity of short-term responses to glucose can vary with ABA activity. We report that the transient (2 h/4 h) repression by 2% glucose of AtbZIP63, a gene encoding a basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor partially involved in the Snf1-related kinase KIN10-induced responses to energy limitation, is independent of HXK1 and is not mediated by changes in ABA levels. However, high-concentration (6%) glucose-mediated repression appears to be modulated by ABA, since full repression of AtbZIP63 requires a functional ABA biosynthetic pathway. Furthermore, the combination of glucose and ABA was able to trigger a synergistic repression of AtbZIP63 and its homologue AtbZIP3, revealing a shared regulatory feature consisting of the modulation of glucose sensitivity by ABA. The synergistic regulation of AtbZIP63 was not reproduced by an AtbZIP63 promoter-5'-untranslated region:: β -glucuronidase fusion, thus suggesting possible posttranscriptional control. A transcriptional inhibition assay with cordycepin provided further evidence for the regulation of mRNA decay in response to glucose plus ABA. Overall, these results indicate that AtbZIP63 is an important node of the glucose-ABA interaction network. The mechanisms by which AtbZIP63 may participate in the finetuning of ABA-mediated abiotic stress responses according to sugar availability (i.e., energy status) are discussed.

To optimize their growth and development as sessile organisms, plants have developed a range of efficient mechanisms to sense and respond adequately to ever-changing environmental conditions. For instance, the availability of sugar produced

through photosynthesis, which relies on light access, represents an important signal that, in combination with developmental and other environmental cues such as mineral nutrition, water availability, or pathogen attacks, influence the use of energy resources to ensure survival and propagation (Corruzi and Zhou, 2001; Forde, 2002; Rolland et al., 2006; Rook et al., 2006; Gutiérrez et al., 2007; Smith and Stitt, 2007; Baena-González and Sheen, 2008).

Sugars are key metabolic signals that control gene expression (Koch, 1996; Price et al., 2004; Li et al., 2006) and modulate different developmental phases, including embryogenesis, germination, seedling development, root growth, flowering, and important processes such as photosynthesis, senescence, and stress responses (Smeekens, 2000; Rolland et al., 2002; Moore et al., 2003; Gibson, 2005). Several sugar sensing and signaling mechanisms have been described. Suc, for example, which is the main transported form of sugar, specifically regulates the mRNA translation of five members of S-group basic-leucine zipper (bZIP) tran-

scription.

Plant Physiology®, October 2011, Vol. 157, pp. 692-705, www.plantphysiol.org © 2011 American Society of Plant Biologists. All Rights Reserved.

¹ This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, BIOEN Program, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and the Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil.

² These authors contributed equally to the article.

^{*} Corresponding author; e-mail mgavince@unicamp.br.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Michel Vincentz (mgavince@unicamp.br).

[[]W] The online version of this article contains Web-only data. [OA] Open Access articles can be viewed online without a sub-

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.181743

⁶⁹²

scriptional regulators in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*; Rook et al., 1998; Wiese et al., 2004).

Glc, one of the hydrolytic hexose products of Suc, is a major sugar signaling metabolite. The characterization of glucose insensitive2 (gin2) mutants has provided compelling evidence for a Hexokinase1 (HXK1)-dependent Glc sensing and signaling pathway that is uncoupled from HXK phosphorylation activity and mediates the repression of photosynthetic gene expression and growth control in Arabidopsis (Moore et al., 2003). The molecular mechanisms responsible for Glc-dependent transcriptional repression of the chlorophyll a/b CAB2 involve a nuclear HXK1 complex that binds the CAB2 promoter (Cho et al., 2006). Complementation of the gin2 Arabidopsis mutant with rice (Oryza sativa) HXK5 and HXK6 indicates that HXK-mediated Glc sensing is conserved in angiosperms (Cho et al., 2009).

Other Glc sensing pathways have been described (for review, see Rolland et al., 2002, 2006). One of them is a glycolysis-dependent pathway that requires HXK catalytic activity and regulates the expression of the pathogenesis-related genes PR1 and PR2 (Xiao et al., 2000). A third pathway is involved in the regulation of a restricted number of genes such as those coding for chalcone synthase and cell wall invertase and is independent of increased HXK activity and HXK1 (Roitsch, 1999; Xiao et al., 2000). Genetic evidence also indicates that a HXK-independent Glc sensing and signaling mechanism involving a G protein-coupled receptor system exists in plants (Ullah et al., 2002; Chen et al., 2003a, 2006; Chen and Jones, 2004; Huang et al., 2006). Interestingly, a genetic interaction between G protein signaling and a Golgi-localized hexose transporter has been reported (Wang et al., 2006).

The use of Glc signaling mutants has revealed a relationship between Glc and the signaling pathways of hormones such as abscisic acid (ABA; Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001; Brocard et al., 2002; Cheng et al., 2002; Brocard-Gifford et al., 2004), ethylene (Zhou et al., 1998; Gibson et al., 2001; Cheng et al., 2002; Cho et al., 2010), and auxin and cytokinin (Moore et al., 2003). HXK1-dependent Glc-induced responses require ABA synthesis and subsequent ABA signal transduction (Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Cheng et al., 2002). Within this regulatory cascade, the ABA biosynthetic genes ABA2/GIN1 encoding a short-chain dehydrogenase/reductase (Cheng et al., 2002), ABA3/GIN5 encoding a molybdenum cofactor sulfurase (Arenas-Huertero et al., 2000), and the ABA signaling gene ABI4/GIN6 gene coding for a transcriptional regulator of the APETALA2 domain family (Finkelstein et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000) have pivotal roles (for review, see León and Sheen, 2003; Rolland et al., 2006). ABI4 also represses the promoter of an *rbcS* gene in response to Glc or ABA (Acevedo-Hernández et al., 2005), which may partly reflect the central role of ABI4 in retrograde signaling from the chloroplast to the nucleus (Koussewitzky

Plant Physiol. Vol. 157, 2011

et al., 2007). Moreover, ABI4 is a regulator of Maninduced inhibition of seedling germination (Pego et al., 1999; Huijser et al., 2000), suggesting a general role for *ABI4* in hexose signaling. ABI4 is also involved in the synergistic activation of *APL3* (a large subunit of *ADP-glucose pyrophosphorylase*) by Glc and ABA and is an example of a Glc-induced response that is modulated by ABA (Rook et al., 2001; Li et al., 2006). Several other ABA signaling components were shown to be involved in defining Glc sensitivity (Ramon et al., 2008).

Our knowledge of the interactions between Glc and ABA signaling pathways and their integration with developmental programs is still incomplete. For instance, we still do not know whether ABA synthesis and/or signaling are involved in HXK-independent Glc-induced responses. It is also unclear to what extent short-term responses to Glc fluctuations are interrelated with ABA (Li et al., 2006). The latter point is becoming increasingly relevant to our understanding of how carbon resources are used to minimize growth inhibition under conditions of energy limitation and ABAmediated abiotic stress responses (Baena-González and Sheen, 2008; Usadel et al., 2008). Transcription factor genes coregulated by short-term treatment with Glc or ABA have been identified and represent potential candidates for integrating transient changes in Glc and ABA (Li et al., 2006). Recently, some members of the Arabidopsis S- and C-groups of bZIP transcription factor genes (Jakoby et al., 2002; Corrêa et al., 2008) have emerged as important mediators of the adaptive responses induced by the Snf1-related kinases (SnRK1) KIN10 and KIN11 during energy or sugar limitation (Baena-González et al., 2007; Usadel et al., 2008). In addition, a restricted set of S-group proteins associates with C-group members by forming heterodimers, thus creating another level of interaction in the regulation of gene expression (Weltmeier et al., 2006; Alonso et al., 2009).

During work on the functional diversification of C-group bZIP genes, we observed that the expression of AtbZIP63 (At5g28770), one of the four Arabidopsis group C members that is likely to represent an ancestral angiosperm function (Vincentz et al., 2003), is regulated by Glc, ABA, and Man, suggesting the involvement of this gene in the cross talk between carbohydrate and ABA-mediated responses (e.g., in abiotic stress). To assess this possibility, we investigated the dependence of Glc-induced repression of AtbZIP63 on ABA synthesis and signaling. We show here that the Glc-induced repression of AtbZIP63 is independent of HXK1 and that the short-term response of AtbZIP63 to 2% Glc does not rely on ABA accumulation. Furthermore, the requirement of ABA synthesis to obtain full repression of AtbZIP63 by 6% Glc together with the synergistic repression of AtbZIP63 by Glc+ABA, which partly relies on posttranscriptional regulation, suggest that ABA modulates Glc-mediated responses. Since AbZIP63 is involved in the control of energy homeostasis (Baena-González and Sheen, 2008), mediating

693

partially KIN10-induced responses, we also discuss the importance of the modular regulation of *AtbZIP63* expression by Glc and ABA.

RESULTS

AtbZIP63 Is Repressed by Glc and ABA, and Glc-Induced Repression Is Independent of HXK1 Glc Sensing Activity

To evaluate the short-term responses of C-group bZIP genes AtbZIP9 (At5g24800), AtbZIP10 (At4g02640), AtbZIP25 (At3g54620), and AtbZIP63 (At5g28770) to Glc and ABA signals, wild-type Columbia (Col-0) seedlings grown for 6 d (growth stage 1.0, corresponding to fully opened cotyledons; Boyes et al., 2001) under constant dim light (20 μ mol m⁻² s⁻¹) and in half-strength Murashige and Skoog (MS/2) liquid medium were treated for 4 h with 2% Glc or 100 μM ABA. Treatment efficiency was verified by the induction of Rd29a (At5g52310) by ABA (Arroyo et al., 2003) and repression of XTR7 (At4g14130) by Glc (Price et al., 2004). While AtbZIP63 was repressed by both Glc (6.7-fold; Fig. 1A) and ABA (3.3-fold with 100 μ M and 2-fold with 10 μ M; Fig. 1A; Supplemental Fig. S1), AtbZIP9 and AtbZIP10 only responded to Glc. AtbZIP9 was repressed by Glc and AtbZIP10, being induced (3.3- and 2.2-fold, respectively) by this signal (Fig. 1A). These alterations were not caused by osmotic stress, since 2% mannitol only marginally changed the mRNA levels of these genes (Fig. 1A). AtbZIP25 was not responsive to Glc or ABA (Fig. 1A).

To determine whether the Glc-induced repression of AtbZIP9 and AtbZIP63 is mediated by HXK1 (At4g29130) Glc sensing activity (Moore et al., 2003) or requires HXK catalytic activity to produce downstream regulatory metabolites (glycolysis dependent; Xiao et al., 2000), the Glc analogue Man, which is readily phosphorylated by HXK and poorly metabolized, was used. The promotion of Glc-like responses by Man would be indicative of HXK sensing activity, whereas the absence of any response to Man would be indicative of a glycolysis-dependent or HXK-independent pathway. Man was almost as efficient as Glc in repressing AtbZIP63 mRNA (Fig. 1A), suggesting a role for HXK sensing and signaling in this regulation. In contrast, AtbZIP9 mRNA was unresponsive to Man (Fig. 1A), indicating that Glc-induced repression of AtbZIP9 was dependent on Glc metabolism or independent of HXK activity (Xiao et al., 2000; Villadsen and Smith, 2004). Interestingly, AtbZIP25 was specifically repressed by Man (Fig. 1A), revealing the possible existence of a Man-restricted signaling pathway.

To evaluate more precisely the involvement of HXK1 sensing activity in the control of *AtbZIP63* expression by Glc, we analyzed the regulation of this gene in an HXK1 null mutant, *gin2-1* (ecotype Landsberg *erecta* [Ler] background), which is deficient in Glc-dependent photosynthetic gene repression (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006). Expression analysis was

done under low-nitrogen conditions (MS/10; Moore et al., 2003). Under these conditions, there was no HXK1-mediated Glc-induced inhibition of carbonic anhydrase (At5g14740) photosynthetic gene expression in gin2-1 (Fig. 1C; Moore et al., 2003), while the HXK1-independent Glc-induced repression of the Glndependent Asparagine synthetase1 (ASN1; At3g47340) gene was, as expected, still effective in the gin2-1 mutant (Fig. 1B; Baena-González et al., 2007). The levels of AtbZIP63 mRNA in response to Glc were also not significantly different between gin2-1 and the wild type (Fig. 1B), indicating that a pathway independent of HXK1 Glc sensing activity was involved in the Glc-induced regulation of this gene. Similarly, the Glc-induced repression of AtbZIP9 expression was as efficient in Ler and gin2-1 and, therefore, is also independent of HXK1 Glc sensing activity (data not shown). Several lines of genetic evidence support the role of ABA synthesis and sensing in Glc-mediated responses (see the introduction; for review, see León and Sheen, 2003). Since AtbZIP63 is also regulated by ABA (Fig. 1A), we next examined the extent to which Glc-dependent control of AtbZIP63 expression is connected to ABA signaling.

The Repression of *AtbZIP63* by Glc Is Modulated by ABA

The interaction between Glc and ABA to regulate gene expression may involve Glc-triggered modulation of ABA levels, as suggested previously (Arenas-Huertero et al., 2000). To assess the possibility that Glc-induced repression of *AtbZIP63* could be the result of an increase in ABA content, we monitored the changes in ABA levels in response to short-term Glc treatment. In addition, the changes in *AB15* (At2g36270) mRNA levels were used as a positive control to verify the efficiency of the treatments (Fig. 2B), since this gene is induced by ABA (Lopez-Molina et al., 2003).

Two percent Glc or mannitol had no substantial effect on ABA accumulation in whole seedlings after 4 h of treatment, while 6% Glc or mannitol was able to induce a 10- or 5-fold increase in ABA content, respectively (Fig. 2A). These findings indicate that the repression of AtbZIP63 by 2% Glc (Fig. 2C) was not mediated by ABA accumulation. Treatment with 2% mannitol had only a marginal effect on AtbZIP63 expression, probably because of osmotic activity (Fig. 2C), which could also be the reason for ABI5 mRNA induction by 2% Glc or mannitol (3.5- and 4.7-fold, respectively; Fig. 2B). At higher sugar concentrations (e.g., 6% Glc or mannitol), AtbZIP63 down-regulation was around three times greater than the repression caused by 2% of the corresponding hexose (Fig. 2C). As expected, 6% Glc or mannitol strongly induced ABI5, most likely as the result of an increase in ABA content (Fig. 2, A and B; Price et al., 2003). The stronger repression of AtbZIP63 by 6% Glc could be triggered by the combination of the Glc signal and an increase in ABA content that has been induced by high concen-



Figure 1. The expression of the Arabidopsis C-group bZIP genes AtbZIP9, AtbZIP10, AtbZIP25, and AtbZIP63 is regulated by ABA, Glc, or Man, and Glc-mediated regulation of AtbZIP63 is independent of HXK1 sensing activity. Wild-type Col-0 and Ler or mutant gin2-1 seedlings were grown for 6 d in MS/2 or MS/10 liquid medium for Ler and gin2-1 and were subsequently treated with 100 µM ABA, 2% Glc, 2% Man, or 2% mannitol for 4 h. Total RNA was analyzed by gRT-PCR assays. A, Relative transcript abundance of C-group bZIP genes. The data are means \pm sp (error bars) of at least three independent experiments. B, Expression of AtbZIP63 and AtASN1 in response to Glc treatment in gin2-1, a HXK1 null mutant, and the corresponding Ler wild type. The data are means of at least three independent experiments. C, RNA integrity. C stands for the untreated control. The effectiveness of the treatments was verified by evaluating the induction of Rd29a by ABA and the repression of XTR7 by Glc and Man by semiquantitative RT-PCR. Carbonic anhydrase (CAA; At5g14740) was used as a control for HXK1-mediated Glc-dependent gene repression. The differences from the untreated control were considered significant

trations of sugars (Fig. 2A). This result suggests that Glc and ABA may interact to repress AtbZIP63. In the case of 6% mannitol, the AtbZIP63 repression (Fig. 2C) could be attributed to an increase in ABA content (Fig. 2A), which is in agreement with the repression observed in response to ABA application (Fig. 1A). To further assess the contribution of ABA to the repression of AtbZIP63 by 6% Glc or mannitol, we analyzed the expression of AtbZIP63 in the ABA-deficient mutant aba2-1 (Col-0 ecotype; accumulates approximately 10% of the wild-type ABA level; Léon-Kloosterziel et al., 1996). The repression of AtbZIP63 by 6% Glc was significantly less effective in aba2-1 than in the wildtype (12-fold repression versus 33-fold, respectively; Fig. 2C), and essentially the same value was obtained when 2% Glc was used (Fig. 2C). The same trend was observed in the case of 6% mannitol, although the difference between aba2-1 and the wild type was more tenuous (2.4-fold repression versus 3-fold, respectively; Fig. 2C), possibly because mannitol exerts an ABA-independent osmotic activity and/or aba2-1 is slightly leaky. Interestingly, the supply of 1 µM ABA to aba2-1 seedlings treated with 6% Glc or mannitol restored the wild-type AtbZIP63 mRNA repression level (Fig. 2C). As a control, the induction of ABI5 by 6% Glc or mannitol was reduced in aba2-1, and full induction could also be restored by exogenously applied 1 μ M ABA (Fig. 2B). These results support the hypothesis of a combinatorial effect of Glc and ABA to modulate AtbZIP63 repression. We next were interested in evaluating the mechanism involved in this regulatory pattern.

The Synergistic Repression of *AtbZIP63* by a Combination of Glc and ABA Partly Involves the Modulation of mRNA Decay

Initially, we wished to determine whether Glc- and ABA-induced repression of AtbZIP63 could be the result of transcriptional control. To this end, the expression of the GUS reporter gene under the control of the AtbZIP63 promoter and the 5' untranslated region (UTR) sequence in response to ABA, Glc, and Man was evaluated in transgenic seedlings containing the AtbZIP63 promoter-5'UTR::GUS fusion. Two transgenic lines homozygous for a single insertion of the AtbZIP63 promoter-5'UTR::GUS transgene and that were representative of the overall expression pattern found among six independent lines were analyzed. The detection of GUS activity in situ and in plant extracts indicated that transgenic seedlings grown with 0.3% Glc accumulated more GUS activity than those grown in 2% Glc (Fig. 3, A and B), suggesting that AtbZIP63 promoter and 5'UTR sequences were

at P < 0.05 (Student's t test) and are indicated by the letter a. Expression data are normalized to the *Actin2* mRNA levels, and the relative quantification refers to the respective untreated wild-type Col-0 or Ler genotype.

Matiolli et al.



Figure 2. The repression of *AtbZIP63* by Glc is modulated by ABA. A, Quantification of ABA in untreated whole seedlings or seedlings treated with 2% or 6% Glc or 2% or 6% mannitol. Significant differences between treated and untreated seedlings and between Glc and mannitol treatments are indicated by letters a and c, respectively (n = 6; P < 0.05). FW, Fresh weight. B and C, Relative *ABI5* (B) and *AtbZIP63* (C) mRNA quantification in response to 2% and 6% Glc or mannitol in *aba2-1* (with or without 1 μ M ABA application) and the Col-0 wild type. All experiments were performed with 6-d-old seedlings. Numbers above the bars represent mean values of the relative quantification (n = 3). Significant differences between treated and untreated seedlings of the same genotype (letter a), between equally treated *aba2-1* and Col-0 (letter b), and between Glc and mannitol treatments (letter c; n = 5; P < 0.05) are indicated. Growth (MS/2), treatments, and qRT-PC analysis

apparently able to mediate Glc-induced regulation. We next measured the transient effect of Glc and ABA on GUS mRNA. The Glc- and ABA-induced repression of AtbZIP63 was partly mediated by the AtbZIP63 promoter and 5'UTR sequences, since changes in GUS mRNA accompanied those of AtbZIP63 mRNA in response to these signals (Fig. 3C). Collectively, these data provide evidence for a role of transcription and/ or 5' UTR-mediated control of mRNA stability in the regulation of AtbZIP63 expression by Glc and ABA. This finding prompted us to investigate whether ABI4, which encodes for an AP2-type transcriptional regulator involved in ABA and Glc response pathways (Finkelstein et al., 1998; Acevedo-Hernández et al., 2005), would be part of both Glc- and ABA-mediated regulation of AtbZIP63 expression. To this end, we analyzed the AtbZIP63 responses to Glc and ABA in the abi4-1 mutant (Col-0 ecotype), which lacks ABI4 activity (Söderman et al., 2000). The Glc- and ABA-induced repression of AtbZIP63 was stronger in the abi4-1 mutant compared with the wild type (23.3- versus 8.3-fold for Glc and 13.6versus 4-fold for ABA; Supplemental Fig. S2), suggesting that ABI4 antagonizes the Glc- and ABA-induced repression of AtbZIP63. This possibility is reinforced by the presence of two ABI4-binding sites, CCAC, in the AtbZIP63 promoter (Supplemental Table S1)

A comparison of how signals alone and in combination can regulate the expression of target genes could provide clues about how these signals interact. Therefore, we analyzed the regulation of AtbZIP63 mRNA abundance by combinations of ABA, Glc, and Man. The most important finding of this analysis was that the combination of Glc and ABA synergistically repressed AtbZIP63 (Fig. 3C), a response also observed in the Wassilewskija (Ws) ecotype (data not shown). The combination Glc+ABA repressed AtbZIP63 mRNA by approximately 33-fold, which was almost 3-fold more than the sum of the repression levels observed for each stimulus separately (approximately 3.8-fold for ABA and approximately 8.3-fold for Glc; Fig. 3C). This response was specific for the combination Glc+ABA, since no synergy was observed when the Man+ABA combination was used (Fig. 3C). Moreover, among the four members of the group-C bZIP genes, the synergistic response was restricted to AtbZIP63 (Supplemental Fig. S3). The evolutionary relatedness between C-group and S-group bZIP genes (Corrêa et al., 2008) prompted us to evaluate the Glc- and ABA-mediated regulations of the S-group genes *AtbZIP1* (At5g49450), *AtbZIP2* (At2g18170), *AtbZIP11* (At4g34590), and AtbZIP53 (At3g62420), which are functionally related to AtbZIP63 (Baena-González et al., 2007; Dietrich et al., 2011). None of them were synergistically downregulated by Glc+ABA, but interestingly, AtbZIP11 was synergistically induced by these signals (Fig. 4),

were performed as described in Figure 1 except that transcript levels were normalized to *PDF2* mRNA.


revealing the diversification of ABA- and Glc-related regulatory output. However, *AtbZIP3* (At5g15830), another S-group gene that is down-regulated by Glc and ABA (Li et al., 2006), shared synergetic down-regulation with *AtbZIP63* (Fig. 4), raising the possibility that these two genes are under the control of the same regulatory mechanisms. Indeed, *AtbZIP63* and *Atb-ZIP3* promoters share common motifs related to Glc and ABA regulation (Supplemental Table S1).

Surprisingly, the AtbZIP63 promoter and 5'UTR sequences were not sufficient to synergistically repress the GUS reporter gene (Fig. 3). Thus, the repression of AtbZIP63 mRNA accumulation by the combination Glc+ABA may either require a transcriptional regulatory element not included in our construct or involve a control of AtbZIP63 mRNA decay. To assess this latter possibility, we determined the half-life of AtbZIP63 mRNA by using cordycepin (3-deoxyadenosine) to inhibit transcription (Holtorf et al., 1999; Gutiérrez et al., 2002; Souret et al., 2004). We designed a protocol that produced almost complete inhibition (97%) of ABAmediated Rd29b mRNA transcription (Fig. 5A; Uno et al., 2000), indicating that conditions for the efficient inhibition of transcription were achieved. The half-lives of AtMPK3 (At3g45640) and AtF12 (At5g03430) mRNA

Plant Physiol. Vol. 157, 2011

Figure 3. The synergistic repression of Ath7IP63 by ABA+Glc cannot be reproduced by AtbZIP63 promoter sequences. Transgenic seedlings of the PH3.13.4 and PH3.35.8 lineages (both homozygote for one transgenic locus) containing the reporter gene GUS under the control of the AtbZIP63 promoter, 5'UTR, and 36 bp of coding sequences were grown for 5 d in MS/2 solid medium supplemented with 0.3% Glc or 2% Glc (w/v) under constant light at 22°C for GUS activity assays (A and B) and for 6 d in MS/2 liquid medium and were treated for 4 h with 100 µM ABA, 2% Glc, 2% Man, or different combinations of these molecules (used at the same final concentration as when applied individually) for qRT-PCR assays (C). A, Histochemical analysis of in situ GUS activity in the PH3.35.8 lineage. B, Relative GUS activity in PH3.13.4 and PH3.35.8 lineages. The raw fluorescence units were normalized by total protein content. Relative GUS activity refers to the respective genotype treated with 0.3% Glc. Relative GUS activity was defined in the linear portion of the enzymatic kinetic. Significant differences are represented by the letter a (n = 3; P < 0.05). C, Relative transcript abundance of AtbZIP63 and GUS in transgenic seedlings. The data are means \pm sp (error bars) of three independent experiments. Total RNA was treated with DNase and analyzed by gRT-PCR as described in Figure 1 except that transcript levels were normalized to PDF2 mRNA. The numbers at the bottom represent mean decreases of transcript amounts in response to each treatment relative to the corresponding untreated (Unt.) sample.

were in good agreement with previous results (Fig. 5B; Gutiérrez et al., 2002), further indicating that our protocol was efficient. Under our conditions, the half-life of AtbZIP63 mRNA was approximately 95 min (Fig. 5B). This estimate implies that only around 17% of the synergistic repression fold of AtbZIP63 mRNA after a 4-h treatment with Glc+ABA (expected 5.6-fold based on half-life estimation versus the observed 33-fold reduction; Fig. 3C) can theoretically be accounted for by transcriptional control. The remaining 83%, therefore, must be related to mRNA degradation. The increase of AtbZIP63 mRNA decay rate by simultaneously combining cordycepin and Glc+ABA (half-life of AtbZIP63 mRNA was reduced to approximately 33 min; Fig. 5B) agrees with a control of AtbZIP63 mRNA stability by these two signals. The increased AtbZIP63 mRNA decay triggered by Glc+ABA seems to be specific, since the Actin2 reference gene used to normalize quantitative reverse transcription (qRT)-PCR data was stable among all treatments. To further confirm and refine this conclusion, we also examined the impact of Glc and ABA signals individually on the posttranscriptional control of AtbZIP63 mRNA. The addition of Glc or Glc+ABA to seedlings treated with cordycepin reduced AtbZIP63 mRNA accumulation

697

162



Figure 4. The expression of the Arabidopsis S-group bZIP genes *AtbZIP1*, *AtbZIP2*, *AtbZIP3*, *AtbZIP11*, and *AtbZIP53* is regulated by Glc and ABA. Wild-type Col-0 seedlings were grown for 6 d in MS/2 liquid medium under constant dim light and were subsequently treated with 2% mannitol (osmotic control), 100 μ M ABA, and/or 2% Glc for 4 h. Total RNA was extracted and analyzed. cDNA synthesized from total RNA treated with DNase was used in qRT-PCR assays. S-group bZIP transcript levels were normalized to the *PDF2* mRNA levels, and the relative quantification refers to untreated Col-0. The data are means \pm so (error bars) of three independent experiments. Differences from the untreated control were considered significant at *P* < 0.05 (Student's t test) and are indicated by the letter a. The number at the top of each column corresponds to the relative expression level.

by almost 3-fold compared with the control treatment with cordycepin alone (Fig. 5C). These results indicate that Glc alone may also control the stability of *AtbZIP63* mRNA and that the expected Glc+ABA-mediated synergistic repression was hindered in the presence of cordycepin (Fig. 5C), raising the possibility that successful synergism requires transcription. This latter conclusion also applies to Glc-induced down-regulation of *AtbZIP63*, since this regulation was significantly weaker in the presence of cordycepin compared with the samples treated only with Glc (Fig. 5C). In contrast, the ABA-mediated reduction of *AtbZIP63* mRNA in the presence of cordycepin was not significantly different from the control treatments with cordycepin or



Figure 5. The control of AtbZIP63 and AtbZIP3 mRNA decay is involved in the response to Glc+ABA. Inhibition of transcription was performed with 100 µg mL⁻¹ cordycepin (Cord). Wild-type Col-0 6-dold seedlings were grown in MS/2 liquid medium, treated with cordycepin, and harvested after 0, 1, and 2 h for half-life measurements or pretreated with cordycepin for 1 h and then treated with 100 µM ABA and/or 2% Glc (w/v) for an additional 2 h. A, ABA-mediated induction of Rd29b was used to monitor the efficiency of transcription inhibition. B, Kinetics of mRNA decay and half-life of AtbZIP63 in the absence and presence of Glc+ABA and of two genes with known half-lives (AtMPK3 [At3g45640] and AtF12 [At5g03430]; Gutiérrez et al., 2002); λ = decay constant; t1/2 (h) = half-life in hours; t1/2 (min) = half-life in minutes. C, Repression of AtbZIP63 and AtbZIP3 by 2% Glc, 100 µM ABA, and 2% Glc + 100 µM ABA with or without cordycepin. Transcript levels were normalized to the Actin2 mRNA. Significant differences between treated samples with or without cordycepin are indicated by the letter a (n = 3; P < 0.05). The numbers at the bottom represent mean decreases of transcript amounts in response to each treatment relative to the untreated (Unt.) sample.

ABA alone (Fig. 5C), indicating that ABA acts mainly by limiting transcription.

Since *AtbZIP63* and *AtbZIP3* are coregulated in response to ABA and/or Glc, we wondered whether the regulation of *AtbZIP3* expression also involves the control of mRNA stability. As with *AbZIP63*, efficient synergistic repression of *AtbZIP3* did not tolerate transcriptional inhibition by cordycepin (Fig. 5C), indicating that both genes are subjected to similar regulatory aspects. However, in contrast to *AtbZIP3* mRNA levels was attributable mainly to transcriptional repression (Fig. 5C).

Together, these data support the idea that Glc- and Glc+ABA-induced repression of AtbZIP63 mRNA levels and Glc+ABA-induced reduction of AtbZIP3 transcripts are partly attributable to accelerated mRNA decay, which requires ongoing transcription for full efficiency. For instance, continuous transcription may be necessary to maintain an active pool of a factor mediating mRNA decay in response to Glc+ABA. Alternatively, a specific transcriptional control step in response to Glc+ABA may be required to trigger posttranscriptional control of AtbZIP63 and AtbZIP3 mRNAs. Based on this reasoning, it is conceivable that the Glc+ABA-mediated transcriptional activation of an AtbZIP63-related microRNA (miRNA) gene may be involved. However, this possibility was discarded, because the synergistic repression of AtbZIP63 remained functional in miRNA pathway mutants (Supplemental Fig. S4). Moreover, this result was further supported by the lack of any AtbZIP63related miRNA in miRBase (http://www.mirbase.org/; Griffiths-Jones et al., 2008)

To obtain some additional clues about the physiological role of AtbZIP63, we searched for putative AtbZIP63 target genes.

ASN1, SEN1, and DIN10 Are Putative Target Genes of AtbZIP63

AtbZIP63 has been shown to interact with the SnRK1.1 KIN10 to promote the expression of Glndependent ASN1 in a transient protoplast assay system (Baena-González et al., 2007). KIN10 is a key regulator of energetic stress adaptation, which involves a large extent of transcriptional changes (Baena-González et al., 2007). To further assess the involvement of AtbZIP63 in KIN10-mediated responses, we analyzed the expression of selected genes that are known to be induced by KIN10 and highly coexpressed with AtbZIP63 (http:// cressexpress.org; Srinivasasainagendra et al., 2008) in two AtbZIP63 mutants corresponding to T-DNA insertion lines (atbzip63-1 in Col-0 and atbzip63-2 in Ws; Fig. 6, A and B). We found that ASN1 and SEN1 (for senescence-associated protein 1; At4g35770) are misregulated in both atbzip63-1 and atbzip63-2 after 24 h of darkness when compared with their respective wildtype genotypes. Additionally, DIN10 (for dark inducible 10; At5g20250) expression was found to present significant differences from the wild type only in atbzip63-1 (Fig. 6C). DIN10 is a putative raffinose synthase (EC 2.4.1.82) from the GH36 family (http://www. cazy.org/GH36.html) that shares approximately 38% identity with a functionally characterized raffinose synthase from pea (*Pisum sativum*; European Bioinformatics Institute accession no. AJ426475; Peterbauer et al., 2002) that catalyzes the conversion of Suc and galactinol into myoinositol and raffinose. The differential expression profile between *atbzip63-1* and *atbzip63-2* could be due to the different genetic backgrounds, Col-0 and Ws, respectively. In conclusion, these results support the notion that *AtbZIP63* participates in the KIN10-mediated transcriptional changes.

DISCUSSION

Higher plants have evolved strategies to use their energy resources in such a way as to optimize growth and development and ensure survival (Polge and Thomas, 2006; Smith and Stitt, 2007; Baena-González and Sheen, 2008; Baena-González, 2010). Recent evidence indicates that the SnRK1 kinases KIN10 and KIN11 are key players in the ability of plants to adjust to energy deprivation. The interaction of KIN10 with members of S-group bZIP transcription factors (AtbZIP1, AtbZIP2/GBF5, AtbZIP11, and AtbZIP53) and AtbZIP63, a C-group bZIP factor, can partially trigger the transcriptional responses involved in energy reposition (Baena-González et al., 2007; Usadel et al., 2008).

As shown here, AtbZIP63 is also an early Glcresponsive gene that is a good candidate for a role in Glc transduction pathways (Fig. 1A). The Glc-sensing activity of HXK1 is not involved in this regulation (Fig. 1B), and the participation of Glc phosphorylation and/ or further metabolism requires more analysis. Moreover, the 2% Glc-induced repression of AtbZIP63 does not involve changes in ABA levels (Fig. 2). However, ABA can interact with Glc to modulate AtbZIP63 repression (Figs. 2 and 3), indicating that ABA-related processes are not limited to long-term adaptive responses to Glc but are also involved in early Glc-triggered regulation, further emphasizing the importance of the link between ABA and Glc signaling (Gibson, 2005). Recently, a HXK1dependent early seedling developmental arrest was found to be promoted by low 2% Glc. Interestingly, this long-term response appeared to be also uncoupled from ABA synthesis but requires low-nitrogen conditions (Cho et al., 2010). Whether short-term Glc-mediated repression of AtbZIP63 can also be modulated by nitrogen supply is an interesting possibility related to nitrogen/carbon regulatory features that remains to be tested.

The strong repression of *AtbZIP63* by Glc and ABA and the striking synergistic negative effect conferred by the combination Glc+ABA on the mRNA level of *AtbZIP63* constitute good support for the idea that *AtbZIP63* is a cross talk node between Glc and ABA signaling cascades. The repression of *AtbZIP63* by Glc is consistent with the reported interaction between

699

Plant Physiol. Vol. 157, 2011



Figure 6. Putative AtbZIP63 target genes. The expression of ASN1 (At3g47340) and SEN1 (At4g35770) is misregulated in two AtbZIP63 T-DNA insertion mutants after dark-induced energy starvation. A, Schematic representation of T-DNA insertion sites in atbzip63-1 and atbzip63-2 mutants. LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border. Primers used to locate T-DNA insertion and detect chimeric transcripts are indicated by the arrows (for primer sequences, see Supplemental Table S2). B, PCR amplification from genomic DNA of the T-DNA insertion region and RT-PCR after DNase treatment showing chimeric transcripts between AtbZIP63 and T-DNA in both atbzip63-1 and atbzip63-2 mutants. Size differences between amplification products from genomic DNA (1,200 bp) and cDNA (810 bp) in atbzip63-1 are due to introns that are absent in spliced AtbZIP63 mRNA. C, ASN1, SEN1, and DIN10 transcript accumulation in atbzip63-1 (Col-0 ecotype) and atbzip63-2 (Ws ecotype) 6-d-old seedlings after 24 h of dark treatment. Significant differences related to seedlings of the same genotype without dark treatment (light) are represented by the letter a (n = 3; P < 0.05) and those between equally treated mutants and their respective wild-type genotype are represented by the letter b (n = 3; P < 0.05). Growth (MS/2), treatments, and qRT-PCR analysis were performed as described in Figure 1 except that transcript levels were normalized to the PDF2 mRNA.

AtbZIP63 and KIN10, which is possibly involved in a broader regulatory scheme dedicated to optimizing energy supply under adverse conditions (Baena-González et al., 2007). The identification of the three KIN10-activated genes *ASN1*, *SEN1*, and *DIN10* as putative AtbZIP63 target genes (Fig. 6C) is in agreement with the participation of AtbZIP63 in the KIN10-related signaling pathway.

We hypothesize that the Glc-induced repression of *AtbZIP63* and the attenuation of KIN10-mediated processes by Glc or Suc (Baena-González et al., 2007; Usadel et al., 2008) help to tune and ultimately reset to minimum levels the KIN10/AtbZIP63-mediated energy starvation response. A further level of com-

plexity is added to this regulatory scheme by the ABA-induced repression of *AtbZIP63*. This control suggests that AtbZIP63 activity is incompatible with ABA-mediated responses and, more particularly, with abiotic stress (Seki et al., 2007), an energy-consuming process (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2006) that requires adjustment according to the available energy level. For instance, the ABA-induced accumulation of osmolytes such as sugars and Pro (Seki et al., 2007; Kempa et al., 2008) improves tolerance to drought and salt stress but also provides an alternative source of energy, carbon, and even nitrogen that may be essential when energy is scarce.

We propose that AtbZIP63 integrates a network that coordinates the use of available energy to sustain growth with the need to correct the adverse effect of abiotic stress and that an important mechanistic aspect of AtbZIP63 participation involves the finetuning of AtbZIP63 mRNA levels by two mechanisms. First, ABA or low Glc concentration (2%) directly down-regulates AtbZIP63 expression partly at the transcriptional level (Figs. 1A and 3C). Direct ABA measurement revealed that short-term treatment with 2% Glc did not alter ABA levels (Fig. 2A), suggesting that Glc-mediated regulation of AtbZIP63 does not rely on a linear pathway in which the stimulation of ABA accumulation by Glc would subsequently trigger this response. However, as suggested by the observation that the stronger repression of AtbZIP63 by 6% Glc compared with 2% Glc (33versus 11-fold) is ABA2 dependent (Fig. 2C), it is likely that ABA can modulate the sensitivity to Glc. This possibility is further supported by the synergistic repression conferred by Glc+ABA (Fig. 3C). The latter regulatory feature constitutes the second mechanism by which AtbZIP63 integrates Glc and ABA signals. The synergistic response most likely reflects a situation of unlimited energy availability that favors an optimal response to abiotic stress. Interestingly, only part of the response (15% of the total repression fold) was associated with the *AtbZIP63* promoter and 5'UTR sequences (Fig. 3C), suggesting that a posttranscriptional control step acting on AtbZIP63 mRNA was also involved. Three additional pieces of evidence support this conclusion. First, the estimated half-life of AtbZIP63 mRNA (Fig. 5B) cannot explain the large decrease in AtbZIP63 mRNA in response to Glc+ABA treatment solely by invoking transcriptional inhibition. Second, the AtbZIP63 mRNA decay rate was accelerated by ABA+Glc treatment (approximately 3-fold compared with the untreated control; Fig. 5B). Third, even under preestablished transcriptional inhibition with cordycepin, Glc and Glc+ABA still significantly reduced AtbZIP63 mRNA levels by 3-fold (Fig. 5C). However, Glc+ABA-induced synergistic repression was hampered by cordycepin-induced transcriptional inhibition (Fig. 5C), indicating that an unstable or Glc+ABA transiently induced regulatory factor may be involved. Together, these results provide evidence for a pathway regulating AtbZIP63 mRNA decay that is efficiently activated by the convergence of Glc and ABA signals. Interestingly, this regulatory model for AtbZIP63 also applies to the evolutionarily related S-group AtbZIP3 gene. Since S-group genes apparently derived from C-group genes (including AtbZIP63) in the ancestral lineage of angiosperms (Corrêa et al., 2008), it remains to be defined whether this regulatory feature is an ancestrally shared derived character or reflects an event of convergence. Conserved regions were identified in the 3'UTR sequences of AtbZIP3 and AtbZIP63 (Supplemental Fig. S5) and represent putative posttranscriptional cis-regulatory sequences.

The control of mRNA metabolism during ABAmediated stress responses has been described and may involve various mechanisms (Lu and Fedoroff, 2000; Xiong et al., 2001; Nishimura et al., 2005; Kant et al., 2007), including miRNA- or small interfering RNAmediated regulation (Borsani et al., 2005; Reyes and Chua, 2007). However, the direct participation of miRNA in the repression of AtbZIP63 mRNA accumulation is incompatible with our observation that AtbZIP63 synergistic repression was almost the same in ago1-25 and dcl1-9 when compared with their respective wild-type genotypes (Supplemental Fig. S4). Interestingly, the synergistic response was stronger in the hyl1-2 miRNA biogenesis mutant compared with the wild type (150- versus 40-fold in the Col-0 ecotype; Supplemental Fig. S4), and the hypersensitivity of this mutant to ABA (Lu and Fedoroff, 2000) may partly explain this result. Several molecular pathways are involved in the control of mRNA decay (Narsai et al., 2007; Houseley and Tollervey, 2009), and further analysis should reveal the mechanistic aspects of the synergistic down-regulation of AtbZIP3 and AtbZIP63 mRNA levels by Glc and ABA. Suc-mediated translational control has been shown to be a relevant posttranscriptional regulatory step of a subset of S-group bZIP genes (Wiese et al., 2004), and our data highlight the importance of mRNA stability control as an additional means to regulate the expression of members of C- and S-group bZIP genes.

The previous description of an ABI4-dependent synergistic transcriptional induction of *APL3* (At4g39210) by ABA+Glc (Li et al., 2006), together with the partly posttranscriptional synergistic repression of *AtbZIP63* and *AtbZIP3* shown here (Figs. 3C and 5), underlies the mechanistic versatility involved in the interaction between ABA and Glc.

It remains now to define to what extent the core signaling components PYR/PYL/RCAR-PP2C-Snrk2 and downstream ABF bZIP regulators (Hubbard et al., 2010; Umezawa et al., 2010) mediate the ABA-induced regulation of *AtbZIP63* expression and whether ABA-, Glc-, and KIN10-related signaling converge toward specific regulatory hubs or act through distinct pathways (Halford and Hey, 2009).

AtbZIP63 may function as part of a heterodimerization network involving C- and S-group bZIPs (Ehlert et al., 2006; Kang et al., 2010). The modulation of DNA binding specificity by heterodimerization together with divergent expression patterns may contribute to establish specific gene expression profiles (Fig. 4; Weltmeier et al., 2006). For instance, DNA binding specificity of the AtbZIP1 homodimer is drastically different from that of the AtbZIP1/63 heterodimer (Kang et al., 2010), which, in addition to the opposite ABA-mediated regulation of *AtbZIP1* and *AtbZIP63* expression (Figs. 2 and 4), is expected to promote a shift in target gene selection. Similarly, the repression of *AtbZIP63* expression by Glc and/or ABA may affect the activity of potential AtbZIP63 heterodimerization partners, such as AtbZIP10,

which is a positive regulator of the hypersensitive defense response (Kaminaka et al., 2006), or AtbZIP1, AtbZIP53, and AtbZIP11, which stimulate Pro degradation and Asn synthesis (Weltmeier et al., 2006; Baena-González et al., 2007; Hanson et al., 2008; Kang et al., 2010; Dietrich et al., 2011). In any case, the finding that synergistic down-regulation by Glc+ABA among the above-mentioned bZIP genes is restricted to *AtbZIP63* suggests a prominent role for this bZIP regulator in shaping the heterodimerization network of C- and S-group proteins in response to Glc and ABA.

Glc is one of the oldest signaling molecules in life's evolutionary history, and a comprehensive knowledge of the diversity of its associated regulatory networks remains an important issue in understanding the regulation of plant growth and development. Our results highlight the interplay of transcriptional and posttranscriptional regulatory processes in integrating Glc and ABA signals.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Growth Conditions, and Treatments

Arabidopsis (Arabidopsis thaliana) Col-0, Ws, and Ler wild-type ecotypes, as well as the mutants aba2-1 (Léon-Kloosterziel et al., 1996; Cheng et al., 2002), abi4-1 (Finkelstein, 1998), gin2-1 (Jang et al., 1997), atbzip63-1 (SALK_006531), and atbzip63-2 (FLAG_610A08), were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center. Segregation analysis of kanamycin resistance was used to isolate genotypes homozygous for one T-DNA locus. Seeds (10 mg) were surfaced sterilized and incubated in MS/2 for 72 h at 4°C in the dark to break dormancy. Seedlings were subsequently grown for 5 d in 10 mL of liquid MS/2 or MS/10 salt medium (Sigma) adjusted to 0.3% Glc (w/v) at 22°C, constant light (20 µmol m⁻² s⁻¹), and constant agitation (70 rpm). The medium was then replaced by 10 mL of Glc-free medium, and seedlings were further grown for 24 h followed by 2- or 4-h treatments with 2% or 6% Glc or mannitol, 2% Man, or 100 µM ±cis.trans-ABA (Sigma). Transcription inhibition assays consisted of challenging 6-d-old seedlings (MS/2) with 100 µg mL⁻¹ (final concentration) cordycepin (3-deoxyadenosine; Sigma). Measurements of mRNA half-life were performed as described by Lam et al. (2001) and Gutiérrez et al. (2002), with samples treated with cordycepin for 1 and 2 h. Since the degradation of a mRNA obeys firstorder kinetics, the difference in mRNA levels between 0 and 1 h was used to estimate the decay constant (λ), which was used in the equation $t_{1/2} = \ln(2)/2$ λ to estimate the transcript half-life. Glc- and ABA-mediated posttranscriptional responses were evaluated by incubating seedlings with 100 μ g mL cordycepin for 1 h followed by 2-h treatments with 2% Glc and/or 100 µM ABA.

DNA Constructs, Plant Transformation, and GUS Detection

Transgenic lines expressing a translational fusion between the *AtbZIP63* promoter and the reporter gene *GUS* were obtained following the strategy described by Silveira et al. (2007). The *AtbZIP63* (At5g28770) promoter, 5' UTR sequence (75 bp), and 36 bp coding for the first 12 amino acids (approximately 2.8 kb) were amplified from genomic DNA with two specific primers, 5' GGTGATTGCCCAATCTGCAGCTTTAATCG-3' and 5' GTGATGGGATCC-GGAGATTGCTGC-3', in which a *Pst1* and a *Bam*HI restriction site, respectively, was introduced to facilitate a translational fusion with *GUS* in PBI21 plant transformation binary vector (Chen et al., 2003b) from which the cauliflower mosaic virus 355 promoter was removed. Poly(A) signals are from the nopaline synthase gene present in pBI121. Two homozygous lines (PH3.13.4 and PH3.35.8) for a single transgenic locus were selected based on kanamycin resistance segregation, and the presence of the chimeric gene was verified by

PCR amplification. In situ detection of GUS activity was realized as described by Silveira et al. (2007). Fluorometric GUS assays were performed as described previously (Jefferson et al., 1987). GUS activity was standardized with respect to protein content in the extract determined by the bicinchoninic acid method (BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions.

RNA Isolation, DNase Treatment, RT, and PCR

Total RNA was isolated with a buffer containing 8 m guanidine-HCl (Invitrogen), 50 mm Tris-HCl, pH 8.0 (Invitrogen), 20 mm EDTA, pH 8.0 (Invitrogen), and 50 mm β -mercaptoetanol (Gibco) following the methodology described by Logemann et al. (1987). When necessary, RNA was treated with DNase (Turbo DNA Free; Ambion) following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis from 1.5 μ g of total RNA (final volume of 12.5 μ L) was performed using ImProm II Reverse Transcriptase (Promega) and oligo(dT)₁₆ essentially according to the manufacturer's instructions. Semiquantitative PCR conditions were basically realized as described by Silveira et al. (2007). Control genes for ABA, Glc, and Man treatments were Rd29a for ABA (At5g52310; Arroyo et al., 2003) and XTR7 for Glc and Man (At4g14130; Price et al., 2004), respectively. The carbonic anhydrase gene (At5g14740) was used as a Glc-repressible HXK1-dependent positive control (Moore et al., 2003). Primers and annealing temperatures are given in Supplemental Table S2.

Real-Time PCR Analysis

qRT-PCR was performed using an ABI PRISM 7500 HT (Applied Biosystems). Gene expression was calculated with the Delta-Delta cycle threshold method (Livak and Schmittgen, 2001). *Actin2 (At3g18780)* or PDF2 (*At1g13320*) was used as the reference gene (Czechowski et al., 2005). *ABI5 (At2g36270)*, *Rd29a (At5g52310)*, and *Rd29b (At5g52300)* were used as controls for ABA treatment. Primers of all genes are given in Supplemental Table S2. For most of the genes, one primer spanning an exon-exon junction was designed. In the case of intronless genes, DNase-treated RNA was used, and a control without reverse transcriptase was included.

ABA Quantification by HPLC-Tandem Mass Spectrometry

For ABA extraction, 200 mg of powdered Col-0 seedlings was mixed with 1 mL of extraction solvent (acetone:water:acetic acid, 80:19:1 [v/v/v]) and 60 ng of (-)-5,8',8',8'-d4-ABA internal standard (NRC Plant Biotechnology Institute; http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/ibp/pbi.html). The supernatant was lyophilized at room temperature and dissolved in 100 µL of methanol: acetic acid (99:1, v/v), combined with 900 µL of water:acetic acid (99:1, v/v), and centrifuged for 1 min. The supernatant was passed through a 1-mL solidphase extraction cartridge (Oasis HLB 1; Waters) previously equilibrated with 1 mL of methanol and 1 mL of water:methanol:acetic acid (90:10:1, v/v/v). ABA was eluted with 1 mL of methanol:water:acetic acid (80:19:1, v/v/v) and lyophilized. Samples were resuspended in 120 μ L of 0.07% acetic acid: acetonitrile (85:15, v/v) and analyzed with a HPLC system (Shimadzu; Phenomenex Mercury MS C-18 column, 20 × 4 mm, 5-µm particle size) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Quattro II; Micromass) using a FCV-12AH valve (Shimadzu) to direct the flow rate, ranging from 17.4 to 21 min, to the mass spectrometer. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid as solvent A and acetonitrile as solvent B, with a flow rate of 0.2 mL minfrom 0 to 22.1 min, 0.6 mL min⁻¹ from 22.3 to 34.5 min, and 0.2 mL min⁻¹ until 35.0 min. Negative multiple reaction monitoring analyses were done monitoring the mass transition of ABA (mass-to-charge ratio 263 \rightarrow 153) and ABA d_4 (mass-to-charge ratio 267 \rightarrow 156) with the following parameters: source temperature at 100°C, desolvation temperature at 200°C, capillary voltage at 4.0 kV, collision energy at 15 eV, and sample cone voltage and extractor cone voltage at 20 and 5 V, respectively. For ABA determination, a standard curve containing ABA (0–0.04 ng μL^{-1}) and the internal standard ABA- d_4 (0.1 ng µL⁻¹) was used. Data were processed by Mass Lynx NT version 3.2 software (Micromass).

Statistical Analysis

All statistical comparisons were done using Student's t test (P < 0.05).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

- Supplemental Figure S1. The expression of AtbZIP63 is repressed by 10 μ M ABA.
- Supplemental Figure S2. ABI4 modulates ABA- and Glc-induced Atb-ZIP63 repression.
- Supplemental Figure S3. Regulation of the three C-group bZIP genes, AtbZIP9, AtbZIP10, and AtbZIP25, by different combinations of ABA, Glc, and Man.
- Supplemental Figure S4. The synergistic repression of AtbZIP63 by Glc+ABA does not rely directly on miRNA activity.
- Supplemental Figure S5. Sequence analyses of *AtbZIP3* and *AtbZIP63* 3'UTRs.
- Supplemental Table S1. Common promoter motifs between AtbZIP63 and AtbZIP3.
- Supplemental Table S2. Primers used in PCR, semiquantitative RT-PCR, and qRT-PCR assays.
- Supplemental Table S3. Actin2 and PDF2 qRT-PCR cycle threshold (Ct) in different treatments and mutants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S.A. Martins for technical support, the Arabidopsis Biological Resource Center stock center for the different mutant genotypes, and Hervé Vaucheret for kindly providing miRNA pathway mutants.

Received June 14, 2011; accepted August 13, 2011; published August 15, 2011.

LITERATURE CITED

- Acevedo-Hernández GJ, León P, Herrera-Estrella LR (2005) Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. Plant J 43: 506–519
- Alonso R, Oñate-Sanchez L, Weltmeier F, Ehlert A, Diaz I, Dietrich K, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W (2009) A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. Plant Cell 21: 1747–1761
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. Genes Dev 14: 2085–2096
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, León P (2003) Three genes that affect sugar sensing (Abscisic Acid Insensitive 4, Abscisic Acid Insensitive 5, and Constitutive Triple Response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. Plant Physiol 133: 231–242
- Baena-González E (2010) Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. Mol Plant 3: 300–313
- Baena-González E, Rolland F, Thevelin JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. Nature 448: 938–943
- Baena-González E, Sheen J (2008) Convergent energy and stress signaling. Trends Plant Sci 13: 474–482
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. Cell **123**: 1279–1291
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2002) Regulation and role of the Arabidopsis Abscisic Acid-Insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. Plant Physiol 129: 1533–1543
- Brocard-Gifford I, Lynch TJ, Garcia ME, Malhotra B, Finkelstein RR (2004) The Arabidopsis thaliana abscisic acid-insensitive8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. Plant Cell 6: 406–421
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR,

Plant Physiol. Vol. 157, 2011

Görlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Anabidopsis. Plant Cell 13: 1499–1510

- Chen JG, Jones AM (2004) AtRGS1 function in Arabidopsis thaliana. Methods Enzymol 389: 338–350
- Chen JG, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP (2003a) A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. Science 301: 1728–1731
- Chen P-Y, Wang C-K, Soong S-C, To K-Y (2003b) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Mol Breed 11: 287–293
- Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J, Zhang J (2006) The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in Arabidopsis seed germination. Plant Physiol 140: 302–310
- Cheng W-H, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, et al (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. Plant Cell 14: 2723–2743
- Cho J, Ryoo N, Eom J, Lee D, Kim H, Jeong S, Lee Y, Kwon Y, Cho M, Bhoo SH, et al (2009) Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. Plant Physiol 149: 745–759
- Cho Y, Sheen J, Yoo S (2010) Low glucose uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and C2H4 responses in Arabidopsis. Plant Physiol 152: 1180–1182
- Cho Y-H, Yoo S-D, Sheen J (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. Cell 127: 579–589
- Corrêa LGG, Riaño-Pachón DM, Guerra Schrago C, Vicentini dos Santos R, Mueller-Roeber B, Vincentz M (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. PLoS ONE 3: e2944
- Corruzi GM, Zhou L (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging "matrix effect." Curr Opin Plant Biol 4: 247–253
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiol 139: 5–17
- Dietrich K, Weltmeier F, Ehlert A, Weiste C, Stahl M, Harter K, Dröge-Laser W (2011) Heterodimers of the Anabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. Plant Cell 23: 381–395
- Ehlert A, Weltmeier F, Wang X, Mayer CS, Smeekens S, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W (2006) Two-hybrid protein-protein interaction analysis in Ambidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. Plant J 46: 890–900
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The Ambidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. Plant Cell 10: 1043–1054
- Forde BG (2002) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. Annu Rev Plant Biol 53: 203–224
- Gibson SI (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. Curr Opin Plant Biol 8: 93-102
- Gibson SI, Laby RJ, Kim D (2001) The sugar-insensitive1 (sis1) mutant of Arabidopsis is allelic to ctr1. Biochem Biophys Res Commun 280: 196–203
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res (Database Issue) 36: D154–D158
- Gutiérrez RA, Ewing RM, Cherry JM, Green PJ (2002) Identification of unstable transcripts in Arabidopsis by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. Proc Natl Acad Sci USA 99: 11513–11518
- Gutiérrez RA, Lejay LV, Dean D, Chiaromonte F, Shasha DE, Coruzzi GM (2007) Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in Arabidopsis. Genome Biol 8: R7
- Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. Biochem J 419: 247–259
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MMWB, Smeekens S (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHE-TASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. Plant J 53: 935–949
- Holtorf H, Schöb H, Kunz C, Waldvogel R, Meins F Jr (1999) Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and β -1,3-

glucanase genes involves increased RNA turnover: possible role for ribosome-independent RNA degradation. Plant Cell **11**: 471-483

- Houseley J, Tollervey D (2009) The many pathways of RNA degradation. Cell 136: 763–776
- Huang J, Taylor JP, Chen JG, Uhrig JF, Schnell DJ, Nakagawa T, Korth L, Jones AM (2006) The plastid protein THYLAKOID FORMATION1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in Arabidopsis. Plant Cell 18: 1226–1238
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. Genes Dev 24: 1695–1708
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S (2000) The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCI-SIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. Plant J 23: 577–585
- Jakoby M, Weisshaar B, Döge-Laser W, Vicent-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. Trends Plant Sci 7: 106–111
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell 9: 5–19
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901–3907
- Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schütze K, Chaban C, Holt BF III, Merkle T, Schäfer E, Harter K, et al (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. EMBO J 25: 4400-4411
- Kang SG, Price J, Lin P-C, Hong JC, Jang J-C (2010) The Arabidopsis bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. Mol Plant. 3: 361–373
- Kant P, Kant S, Gordon M, Shaked R, Barak S (2007) Stress response suppressor1 and stress response suppressor2, two dead-box RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. Plant Physiol 145: 814–830
- Kempa S, Krasensky J, Dal Santo S, Kopka J, Jonak C (2008) A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. PLoS ONE 3: e3935
- Koch KE (1996) Carbohydrates modulate gene expression in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 509–540
- Koussewitzky S, Not A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J (2007) Signal from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. Science 316: 715–719
- Laby RJ, Kincaid MS, Kim D, Gibson SI (2000) The Arabidopsis sugarinsensitive mutants sis4 and sis5 are defective in abscisic acid synthesis and response. Plant J 23: 587–596
- Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltnane JM, Averett LM, Zhao H, Davis RE, Sathyamoorthy M, et al (2001) Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. Genome Biol 2: 1–11
- León P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. Trends Plant Sci 8: 110–116
- Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. Plant J 10: 655–661
- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW (2006) Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine. Genome Res 16: 414–427
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25: 402–408
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal Biochem 163: 16–20
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. Genes Dev 17: 410–418
- Lu C, Fedoroff N (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. Plant Cell 12: 2351–2365
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the *Anabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. Science **3000**: 332–336

- Narsai R, Howell KA, Millar AH, O'Toole N, Small I, Whelan J (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 19: 3418–3436
- Nishimura N, Kitahata N, Seki M, Narusaka Y, Narusaka M, Kuromori T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2005) Analysis of ABA Hypersensitive Germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. Plant J 44: 972–984
- Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1999) Mannose inhibits Ambidopsis germination via a hexokinase-mediated step. Plant Physiol 119: 1017–1023
- Peterbauer T, Mach L, Mucha J, Richter A (2002) Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. Planta 215: 839–846
- Polge C, Thomas M (2006) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? Trends Plant Sci 12: 20–27
- Price J, Laxmi A, Saint Martin S, Jang J-C (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 2128–2150
- Price J, Li T-C, Kang SG, Na JK, Jang J-C (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. Plant Physiol 132: 1424–1438
- Ramon M, Rolland F, Sheen J (2008) Sugar sensing and signaling. The Arabidopsis Book 6: e0117, doi/10.1199/tab.0117
- Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miRNA159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. Plant J 49: 592–606
- Roitsch T (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. Curr Opin Plant Biol 2: 198–206
- Rolland F, Baena-González E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu Rev Plant Biol 57: 675–709
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. Plant Cell (Suppl) 14: S185–S205
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. Plant J 26: 421–433
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, Van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. Plant J 15: 253–263
- Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. Plant Cell Environ 29: 426–434
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. Curr Opin Plant Biol 10: 296–302
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. J Exp Bot 58: 221–227
- Silveira AB, Gauer L, Tomaz JP, Cardoso PR, Carmello-Guerreiro S, Vincentz M (2007) The Arabidopsis AtbZIP9 protein fused to VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. Plant Sci 172: 1148–1156
- Smeekens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51: 49–81
- Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. Plant Cell Environ 30: 1126–1149
- Söderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2000) Regulation of the Arabidopsis-insensitive 4 gene in seed and abscisic acid response signaling network. Plant Physiol 124: 1752–1765
- Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. Mol Cell 15: 173–183
- Srinivasasainagendra V, Page GP, Mehta T, Coulibaly I, Loraine AE (2008) CressExpress: a tool for large-scale mining of expression data from Arabidopsis. Plant Physiol 147: 1004–1016
- Ullah H, Chen JG, Wang S, Jones AM (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination. Plant Physiol 129: 897–907
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. Plant Cell Physiol 51: 1821–1839
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc Natl Acad Sci USA 97: 11632–11637

Arabidopsis C-Group bZIPs, ABA, and Glc Signaling

- Usadel B, Blasing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Hohne M, Gunther M, Stitt M (2008) Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes. Plant Physiol 146: 1834–1861
- Villadsen D, Smith S (2004) Identification of more than 200 glucoseresponsive Arabidopsis genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. Plant Mol Biol 55: 467–477
- Vincentz MGA, Bandeira-Kobarg C, Gauer L, Schlögl P, Leite A (2003) Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque-2 regulatory protein. J Mol Evol 55: 1–12
- Wang HX, Weerasinghe RR, Perdue TD, Cakmakci NG, Taylor JP, Marzluff WF, Jones AM (2006) A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis*. Mol Biol Cell 17: 4257–4269

Weltmeier F, Ehlert A, Mayer CS, Dietrich K, Wang X, Schütze K, Alonso R,

Harter K, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W (2006) Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. EMBO J 25: 3133–3143

- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S (2004) A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. Plant Cell 16: 1717–1729
- Xiao W, Sheen J, Jang JC (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. Plant Mol Biol 44: 451–461
- Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu W, Galbraith D, Zhu J-K (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. Dev Cell 1: 771–781
- Zhou L, Jang J-C, Jones TL, Sheen J (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. Proc Natl Acad Sci USA 95: 10294–10299



Figure S1. The expression of *AtbZIP63* is repressed by 10 μ M ABA. Wild-type Columbia-0 (Col-0) seedlings were grown for six days in MS/2 liquid medium and were subsequently treated with 10 μ M ABA. Total RNA was analyzed by qRT-PCR assays. The data are the mean +/- standard deviation (error bar) of four independent experiments. The numbers above the bars represent the mean values of the relative quantification. The effectiveness of the treatments was verified by evaluating the induction of *AB15*. The differences to the untreated control were considered significant when *P* < 0.05 (Student's *t* test) and are indicated by letter **a**. Expression data are normalized to the *PDF2* mRNA levels and the relative quantification is referring to the untreated Col-0.



Figure S2. ABI4 modulates ABA- and Glc-induced *AtbZIP63* repression. Regulation of *AtbZIP63* expression by ABA and Glc was compared between *abi4*-and wild-type Col-0. **A.** Relative transcript abundance of *AtbZIP63* in untreated and treated *abi4-1* and Col-0 wild-type 6-day-old seedlings. Significant difference between untreated and treated seedlings of the same genotype (letter **a**) and equally treated *abi4-1* and Col-0 wild-type (letter **b**) (n = 3; P < 0.05) are indicated. The number above each column represents the relative expression level (RQ). **B.** RNA integrity and treatments efficiency. Growth (MS/2), treatments and qRT-PCR analysis were performed as described in Figure 1.



Figure S3. Regulation of three C-group bZIP genes *AtbZIP9*, *AtbZIP10* and *AtbZIP25* by different combinations of ABA, Glc and Man. Combinations of (ABA + Glc) and (ABA + Man) had at most additive regulatory effects when compared to each signal applied individually. Wild-type Col-0 6-day-old seedlings were grown in MS/2 and subsequently treated with ABA 100 μ m, 2% Glc (w/v), 2% Man (w/v) or different combinations of these molecules for 4 h. Transcripts levels were normalized to the expression of *Actin2* mRNA. The data are the mean +/- standard deviation (error bar) from two independent experiments. The numbers in the bottom of the graphic represent the relative quantity of transcript compared to those in untreated seedlings. Control of treatment efficiency was determined by quantifying *AtbZIP63* mRNA levels (see Figure 3).



Figure S2. ABI4 modulates ABA- and Glc-induced *AtbZIP63* repression. Regulation of *AtbZIP63* expression by ABA and Glc was compared between *abi4*-and wild-type Col-0. **A.** Relative transcript abundance of *AtbZIP63* in untreated and treated *abi4-1* and Col-0 wild-type 6-day-old seedlings. Significant difference between untreated and treated seedlings of the same genotype (letter **a**) and equally treated *abi4-1* and Col-0 wild-type (letter **b**) (n = 3; P < 0.05) are indicated. The number above each column represents the relative expression level (RQ). **B.** RNA integrity and treatments efficiency. Growth (MS/2), treatments and qRT-PCR analysis were performed as described in Figure 1.



Figure S3. Regulation of three C-group bZIP genes *AtbZIP9*, *AtbZIP10* and *AtbZIP25* by different combinations of ABA, Glc and Man. Combinations of (ABA + Glc) and (ABA + Man) had at most additive regulatory effects when compared to each signal applied individually. Wild-type Col-0 6-day-old seedlings were grown in MS/2 and subsequently treated with ABA 100 μ m, 2% Glc (w/v), 2% Man (w/v) or different combinations of these molecules for 4 h. Transcripts levels were normalized to the expression of *Actin2* mRNA. The data are the mean +/- standard deviation (error bar) from two independent experiments. The numbers in the bottom of the graphic represent the relative quantity of transcript compared to those in untreated seedlings. Control of treatment efficiency was determined by quantifying *AtbZIP63* mRNA levels (see Figure 3).



Figure S4. The synergistic repression of AtbZIP63 by Glc+ABA does not rely directly on miRNA activity. The regulation of AtbZIP63 expression by ABA, Glc and Glc+ABA was compared between homozygous mutants that lack an intact miRNA pathway and wild-type Col-0. dcl1-9 (Jacobsen et al, 1999) is a nonlethal allele that is deficient in miRNA biogenesis. Originally isolated in WS (Wassilewskija) background, the dcl1-9 was back crossed six times into Col-0 (Hervé Vaucheret, personal communication). hyl1-2 (Lu & Fedoroff, 2000; Vazquez et al., 2004; Han et al., 2004) shows reduced accumulation of miRNA. ago1-25 (Morel et al, 2002) is impaired in miRNA-directed cleavage of target mRNA. Seedlings of Col-0, hyl1-2 and ago1-25 were grown in MS/2 liquid medium as described in Material and Methods, and were subsequently treated with 100µM ABA and/or 2% Glc for 4 h. dcl1-9 homozygous seedlings were identified in the progeny resulting from selfing of (DCL1 / dcl1-9) heterozygous plants and which was grown for 8 days in solid MS/2 supplemented with 0.3% Glc. dcl1-9 seedlings and their corresponding wild-type Col-0 (grown under the same conditions as dcl1-9) were then transferred to Glc-free MS/2 liquid medium for 24 h and subsequently treated as described above. PDF2 was used as reference control gene. The data on the graphic are the mean +/- standard deviation (error bar) from three independent experiments for each treatment. A. Relative AtbZIP63 transcript abundance in untreated genotypes, quantification is referring to the untreated wild type Col-0. Letter b represents a significant difference of expression between equally treated mutants and Col-0. dcl1-9 and ago1-25 show reduced accumulation of AtbZIP63 mRNA compared to Col-0, indicating that the regulation by miRNA may have an indirect effect on AtbZIP63 expression. B. Fold repression of AtbZIP63 in treated Col-0, dcl1-9, hyl1-2 and ago1-25, relative quantification is referring to the respective untreated genotype. Letter a represents a significant difference of expression between treated mutant and the same treatment in Col-0. C. Treatments effectiveness was verified by evaluating the induction of Rd29a by ABA and repression of Xtr-7 by glucose. CSD2 (At2g28190; Cu/Zn Superoxide Dismutase 2), whose posttranscriptional induction results from the down-regulation of miR398 (Sunkar et al., 2006), was used as a control of miRNA pathway mutants. Letter a represents a significant difference of expression between treated and untreated plants (for Rd29a and Xn-7) and letter b between equally treated mutants and Col-0 (for CSD2). Differences were considered significant when P < 0.05 (n= 3).

References Figure S3

Han M, Goud S, Song L, Fedoroff N. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation (2004) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:1093 -1098.

Jacobsen S, Running M, Meyerowitz E. Disruption of an RNA helicase/RNAse III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems (1999) Development 126:5231-5243.

Lu C, Fedoroff N (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. Plant Cell 12: 2351–2365.

Morel JB, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. Plant Cell 14: 629–639.

Sunkar R, Kapoor A, Zhu J. Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance (2006) Plant Cell 18:2051-2065.

Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gasciolli V, Mallory AC, Hilbert J, Bartel DP, Crété P. Endogenous trans-Acting siRNAs Regulate the Accumulation of Arabidopsis mRNAs (2004) Molecular Cell 16:69-79.



Figure S5. Sequence analysis of *AtbZIP3* and *AtbZIP63* 3' UTRs. Sequence motifs shared by *Arabidopsis thaliana* and *A. lyrata AtbZIP63* or *AtbZIP3* orthologs were in a first step identified. *AtbZIP3* and its *A. lyrata* ortholog (488428 – JGI accession number) 3'UTRs are 94.2% identical while *AtbZIP63* and its ortholog (489663) 3'UTRs are 87% identical. Subsequently, the presence of shared motives in both *A. thaliana AtbZIP63* and *AtbZIP3* and *AtbZIP3* was evaluated. A – Schematic representation and alignment of the six common motifs between *AtbZIP3* and *AtbZIP63* 3' UTRs. B – Palindromic sequences present in *AtbZIP63* 3' UTR along with inverted repeats that may potentially form a secondary structure. C – Palindromic sequence present in *AtbZIP3* 3' UTR. The alignments were produced by Blast2Seq

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi; optimized for Blastn, word size=7 and low complexity filter off).

Table SI. Common promoter motifs between AtbZIP63 and AtbZIP3.

Motif name	Motif sequence	Responsiveness	Transcription factor	Reference
CANBNNAPA	CNAACAC	Embryo and endosperm-specificity	Unknown	Ellerstrom et al. (1996)
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	ABA, stress, cold, leaf, seed	AtMYC2 (Arabidopsis - bHLH)	Abe et al. (2003); Lee et al. (2005)
WBOXHVISO1	TGACT	Sugar (SURE)	SUSIBA2 (barley - WRKY)	Sun et al. (2003)
IBOX	GATAAG	Light	LeMYB1 (tomato - MYB-like)	Giuliano et al. (1988); Rose et al. (1999)
ABRELATERD1	ACGTG	ABA, dehydration, etiolation	bZIP-type ABRE-binding proteins (AREBs; Arabidopsis)	Simpson et al. (2003); Nakashima et al. (2006)
RBCSCONSENSUS	AATCCAA	Light, leaf, shoot	Unknown	Manzara & Gruissem (1988); Donald & Cashmore (1990)
TBOXATGAPB	ACTTTG	Light	Unknown	Chan et al. (2001)
TGACGTVMAMY	TGACGT	Cotyledon, seed germination	Unknown	Yamauchi (2001)
HDMOTIFPCPR2	CTAATTGTTTA	Pathogen defense	HD (parsley)	Korfhage et al. (1994)
UPRMOTIFILAT	CCNNNNNNNNNNNCCACG	UPR	Unknown	Martinez & Chrispeels (2003); Oh et al. (2003)
SREATMSD	TTATCC	Sugar repression	Unknown	Tatematsu et al. (2005)
GT1GMSCAM4	GAAAAA	Pathogen- and salt-induction	GT-1-like (soybean)	Park et al. (2004)
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	ABA	bZIP (carrot, Arabidopsis)	Kim st al. (1997)
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTTC	GA, ABA	Unknown	Cercos et al. (1999)

Only promoter blocks conserved between Arabidopsis thaliana AtbZIP63 and AtbZIP63 and their corresponding Arabidopsis hyata (~90% of identity) orthologs were analyzed. We used the complete upstream intergenic space of A. thaliana genes in the alignments. Orthologs promoters were aligned using BLATn (Kent, 2002 - Genome Research) and motifs present within the conserved blocks were predicted using PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE). All presented motifs are identical between A. thaliana and A. hyrata orthologs. ABI4 binding motif (CCAC; Koussevitzky et al., 2007) was only present in AtbZIP63 promoter and its A. hyrata ortholog.

References Table SI

Ellerström M, Stölberg K, Ezcurra I, Rask L. (1996) Functional dissection of a napin gene promoter: Identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. Plant Mol. Biol. 32, 1019 1027.

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki RAK. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signalling. Plant Cell 15: 63-78.

Lee BH, Henderson DA, Zhu JK. (2005) The Arabidopsis Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. Plant Cell, 17: 3155-3175

Sum C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C. (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the isol promoter. Plant Cell 15: 2076-2092

Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore, AR. (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. Proc Natl Acad Sci USA 85:7089-7093

Rose A, Meier I, Wienand U. (1999) The tamato I-box binding factor LeMYBI is a member of a novel class of Myb-like proteins. Plant J 20: 641-652

Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and darkinduced senescence. Plant J. 33: 259-270

Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis. Plant Mol Biol. 60:51-68

Manzara T, Gruissem W. (1988) Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. Photosynth Res 16:117-139

Donald RGK, Cashmore AR. (1990) Mutation of either G box or 1 box sequences profoundly affects expression from the Arabidopsis rbcS-1A promoter. EMBO J 9:1717-1726

Chan CS, Guo L, Shih MC. (2001) Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol 46: 131-141

Yamauchi D. (2001) A TGACGT Motif in the 5'-Upstream Region of alpha-Amylase Gene from Vigna mungo is a cis-Element for Expression in Cotyledons of Germinated Seeds. Plant Cell Physiol 42: 635-641

Korfhage U. Trezzini GF. Meier I. Hahlbrock K. Somssich IE. (1994) Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. Plant Cell 6:695-708

Martinez IM, Chrispeels MJ. (2003) Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. Plant Cell. 15:561-576

Oh DH, Kwon CS, Sano H, Chung WJ, Koizumi N. (2003) Conservation between animals and plants of the cis-acting element involved in the unfolded protein response. Biochem Biophys Res Commun. 301:225-230

Tatematus K, Ward S, Leyser O, Kamiya Y, Nambara E. (2005) Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in Arabidopsis. Plant Physiology 138: 757-766

Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. Plant Physiol. 135: 2150-2161

Kim SY, Chung HJ, Thomas TL. (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. Plant J 11: 1237-1251

Cercos M, Gomez-Cadenas A, Ho THD. (1999) Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. Plant J 19: 107-118

		Table SII. Primers used in P	PCR assays	
		Prime	ers (5' - 3')	
AGI	Gene	forward	reverse	Exon-exon junction
At4g14130	Xtr-7#	cgtcactgcttactacttgtcttcac	ccataagcattgagctcggttgcc	Yes
At4g14130	Xtr-7*	ctgcttactacttgtcttcac	cccttgagcaaagacattgg	Yes
At5g52310	Rd29A#	ccaaagaagaaactggaggag	cacatcatcacttctcgccg	Yes
At5g52310	Rd29A*	cccaccaaagaagaaactgg	ttgtcctggcttctgatcag	Yes
At5g14740	CAA#	gcttctcattgagaaggatga	gaatgaacgggggaattcc	Yes
At2g36270	ABI5*	gcaagaaaacaagcatatacag	ttcctcttcctccaactc	Yes
At5g52310	Rd29B*	aaggagcggtcacttcttg	ccatagtcccaacggtggt	Yes
At2g28190	CSD2*	gtggacaatcagattcctctg	tttccagtggtcagactaagc	Yes
At5g49450	AtbZIP1*	caggttccgacatagatgag	cgtgtcttccattaacttctg	No
At2g18160	AtbZIP2*	cggtgcaggatttggtgttg	actcatcatattcatatcatcg	No
At5g15830	AtbZIP3*	cgagaaccaccagcttttag	ggatgtgataacctgacgaag	No
At4g34590	AtbZIP11*	gcaaggagatcaagaatgaag	ggtagtgttgcgttgtgatg	No
At3g62420	AtbZIP53*	gcttcggagttgacggatag	aagggttctgcatagattcag	No
At5g24800	AtbZIP9*	gagagtcaaggtgaaactag	cgaggtatttcccgtgtagt	Yes
At4g02640	AtbZIP10*	cctcgaaacacaggttaatg	gccattttcaccttagctct	Yes
At3g54620	AtbZIP25*	gctcaaggctccattgtgg	ccatcaagatcatcgtcatc	Yes
At5g28770	AtbZIP63*	cgcgttaataggatgctctc	gtttgagttacatcagtgaga	Yes
At3g18780	Actin2*	cgtacaaccggtattgtgctgg	ctctctctgtaaggatcttcatg	Yes
At3g45640	AtMPK3*	gtctgttggttgtatctttatg	aagcaactctgtcaataagcg	Yes
At5g03430	AtF12*	cttaacgggaaaggataatgc	acttgatttctacgaacacatc	Yes
At1g13320	Pdf2*	catgttccaaactcttacctg	gttctccacaaccgcttggt	Yes
At3g47340	ASN*	aggtgcggacgagatctttg	gtgaagagccttgatcttgc	Yes
At4g35770	SEN1*	cagagtcggatcaggaatgg	attatgatttcatcgtgtttcc	Yes
At5g20250	DIN10*	tgtcagtgattctcctggaa	caccatcacgggcaggatc	Yes
T-DNA left border atbzip63-1	1fw	attttgccgatttcggaac		No
T-DNA left border atbzip63-2	2rv		gggttggggtttctacaggac	No
At5g28770 specific primer 1	1rv		ctgtgaaacttgtgtctctag	No
At5g28770 specific primer 2	2fw	atggaaaaatggttctccga		No
	GUS*	gcaattgctgtgccaggca	gcatcgaaacgcagcacgat	No

(#), semiquantitative RT-PCR;(*), qRT-PCR Anealing temperatures for all primers is 60°C

mutant line	es.						
a	Col	Ler	Ws	aba2-1	abi4-1	abi5-1	gin2-1
Untreated	15.30±0.58 (55)	15.11±0.35 (8)	15.13±0.37 (20)	15.15±0.42 (14)	15.10±0.40 (14)	15.20±0.58 (22)	15.41±0.65 (12)
ABA	15.29±0.30 (13)		15.16±0.35 (6)	15.04±0.21 (7)	15.30±0.29 (5)	15.32±0.33 (8)	
Glc	15.49±0.44 (21)	15.51±0.42 (4)	15.33±0.39 (14)	15.41±0.34 (6)	15.30±0.27 (6)	15.48±0.37 (13)	15.46±0.29 (9)
b							
ABA	0.95	*	0.88	0.44	0.26	0.46	**
Glc	0.12	0.16	0.14	0.16	0.19	0.33	0.16

Table SIII A. Actin2 qRT-PCR cycles at threshold R= 0.2 from different ecotypes and mutant lines.

a. Cycle average by treatment ± standard deviation. Numbers in parenthesis represent the number of experiments analysed. b. Significance of Student's t test of the Actin2 cycles compared to its correspondent untreated genotype. No significant difference was found.

а	Col	ago1-25	hyl1-2	dcl1-9	aba2-1
Untreated	19.25±0.24 (15)	18.84±0.44 (19)	19.28±0.22 (9)	19.15±0.39 (6)	19.15±0.32 (14)
ABA	19.01±0.38 (17)	19.04±0.18 (22)	19.34±0.54 (7)	18.91±0.32 (9)	19.14±0.43 (11)
Glc	18.95±0.55 (19)	19.06±0.36 (24)	18.86±0.28 (15)	19.06.±0.47 (7)	18.96±0.09 (12)
b					
ABA	0.16	S - S	0.92	0.56	0,88
Glc	0.23	0.85	0.18	0.13	0.36

a. Cycle average by treatment ± standard deviation. Numbers in parenthesis represent the number of experiments analysed. b. Significance of Student's t test of the PDF2 cycles compared to its correspondent untreated genotype. No significant difference was found.