

**JULIANA CRISTINA BAPTISTA**

**“Sinalização por manose em *Arabidopsis thaliana*”**

**CAMPINAS  
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**JULIANA CRISTINA BAPTISTA**

**“Sinalização por manose em *Arabidopsis thaliana*”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da DISSERTAÇÃO defendida pela  
candidata

*Juliana Cristina Baptista*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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



Orientador: Prof Dr. Michel Georges Albert Vincenz

CAMPINAS,  
2013

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

Baptista, Juliana Cristina, 1979-  
B229s Sinalização por manose em *Arabidopsis thaliana* / Juliana Cristina Baptista. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Manóse. 2. *Arabidopsis*. 3. Expressão gênica. 4. Microarranjos de DNA. I.  
Vincentz, Michel Georges Albert, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Mannose signaling in *Arabidopsis thaliana*

**Palavras-chave em inglês:**

Mannose

*Arabidopsis*

Gene expression

DNA microarrays

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Michel Georges Albert Vincentz [Orientador]

Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Daniel Scherer de Moura

Fabio Tebaldi Silveira Nogueira

Maria Helena de Souza Goldman

**Data de defesa:** 29-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular



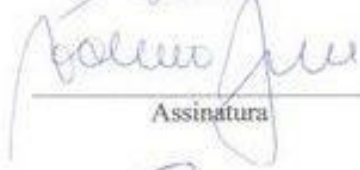
Campinas, 29 de agosto de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Prof Dr. Michel Georges Albert Vincentz (orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

  
Assinatura

Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura

  
Assinatura

Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldmann

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

---

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta

---

Assinatura

Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi

---

Assinatura



## RESUMO

---

A sinalização por açúcares como glicose, sacarose e trealose-6-fosfato em angiospermas tem um papel essencial na manutenção da homeostase energética e no controle do crescimento e desenvolvimento. Manose, uma hexose estruturalmente semelhante à glicose, precursora da vitamina C e também necessária para a montagem da parede celular e glicosilação de proteínas, pode promover respostas específicas, como a inibição da germinação em *Arabidopsis thaliana*. Para investigar mais profundamente o potencial da manose como uma molécula de sinalização, mudanças de expressão gênica em escala genômica foram analisadas usando a tecnologia de microarranjos de DNA. Foram identificados 44 genes regulados por manose. Análises comparativas das cinéticas de resposta (0h, 1/4h, 1/2h, 1h e 2h) à manose, glicose, frutose e manitol confirmaram a regulação específica, oposta ou mais acentuada da manose relativamente aos outros açúcares. Definimos também, pela análise da regulação da expressão gênica em diferentes concentrações de manose (50, 20, 10, 5 e 1 mM), que a sensibilidade da sinalização por manose não apresenta alterações nessa gama de concentrações. Mostramos que a regulação por manose é independente do sensor de glicose hexoquinase 1 (*HXK1*). Quantificamos ATP presente nas plântulas a fim de avaliar a possibilidade de a manose ter um efeito indireto de estresse energético por limitação de ATP resultando da fosforilação da manose por hexoquinases. Nenhuma alteração na quantidade de ATP foi notada na presença de manose permitindo descartar a hipótese de um efeito indireto da manose. Para confirmar esta conclusão avaliamos também a expressão gênica em resposta a manose em condições experimentais não submetidas a estresse energético e em condições experimentais sem fosfato e verificamos para ambas as condições que a regulação pela manose se mantém. Analisamos as respostas a manose na presença de cordicepina e os tratamentos revelaram que as regulações mediadas por essa hexose são essencialmente transcricionais. Os 44 genes regulados por manose foram classificados de acordo com os critérios do *Gene Ontology*. As categorias enriquecidas sugerem que o sinal manose regula genes envolvidos com resposta ao estresse, a estímulos bióticos e abióticos, proteínas com atividade hidrolase e atividade de transporte e genes localizados na parede celular plastidial e nos cloroplastos. Os dados representam evidências suplementares para a existência de uma rede de sinalização dedicada a manose.



## ABSTRACT

---

The signaling by sugars, such as glucose, sucrose and trehalose-6-phosphate in angiosperms has an essential role in the maintenance of energy homeostasis and the control of growth and development. Mannose is a hexose structurally similar to glucose, the precursor of vitamin C, required for the assembly of the cell wall, protein glycosylation and can promote specific responses, such as inhibition of germination in *Arabidopsis thaliana*. To investigate further the potential of mannose as a signaling molecule, gene expression changes on a genome-wide scale were analyzed using DNA microarray technology. We identified 44 genes regulated by mannose. Comparative analysis of the kinetic response time (0h, 1/4h, 1/2h, 1h and 2h) to mannose, glucose, fructose and mannitol confirmed the mannose-specific regulation as well as instances where regulation became more pronounced or inverted when treated with both mannose and the other sugars. We also analyzed the regulation of gene expression in different concentrations of mannose (50, 20, 10, 5 and 1 mM), which showed that the effect of mannose does not change in this concentration range. We have shown that mannose is independent of the regulation of hexokinase glucose sensor 1 (*HXK1*). ATP present in seedlings was quantified in order to evaluate the possibility of mannose having an indirect effect on energy limitation stress. No change in the amount of ATP was noted in the presence of mannose ruling out an indirect effect of mannose. To confirm this conclusion we also evaluated gene expression in response to mannose in experimental conditions not under energetic stress and experimental conditions without phosphate to check that for both conditions the regulation by mannose remains. Analyzing the answers to mannose in the presence of cordycepin revealed that the regulation mediated by this sugar is essentially transcriptional. The 44 genes regulated by mannose were classified according to the criteria of the *Gene Ontology*. The categories enriched suggest that the signal regulates genes involved in stress response to biotic and abiotic stimuli, proteins with hydrolase activity and transport activity and genes located in the cell wall and chloroplasts plastid. The results strongly suggest the existence of a signaling pathway dedicated to mannose.



# SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>RESUMO</b>                                                                                                                                                   | <b>vii</b> |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                                                                                                 | <b>ix</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                            | <b>1</b>   |
| 1.1 Carboidratos e energia                                                                                                                                      | 1          |
| 1.2 Sinalização por açúcares em plantas                                                                                                                         | 5          |
| 1.3 Metabolismo da manose                                                                                                                                       | 10         |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                                                                             | <b>15</b>  |
| 2.1 Objetivo geral                                                                                                                                              | 15         |
| 2.2 Objetivos específicos                                                                                                                                       | 15         |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                | <b>17</b>  |
| <b>3.1 PARTE I</b>                                                                                                                                              | <b>17</b>  |
| 3.1.1 Evidências para sinalização pela manose                                                                                                                   | 17         |
| 3.1.2 Comparações dos perfis de expressão gênica em resposta a manose e glicose usando microarranjo CATMA                                                       | 18         |
| <b>3.2 PARTE II</b>                                                                                                                                             | <b>25</b>  |
| 3.2.1 Manuscrito: “A manose promove mudanças específicas de expressão gênica em <i>Arabidopsis thaliana</i> : novas evidências para uma sinalização por manose” | 25         |
| <b>3.3 PARTE III</b>                                                                                                                                            | <b>89</b>  |
| 3.3.1 Avaliação preliminar da importância da biossíntese do ácido L-ascórbico a partir da manose na sinalização por este açúcar.                                | 89         |
| 3.3.2 Perfis da expressão de genes regulados por manose: MapMan                                                                                                 | 94         |
| <b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                                                                                  | <b>95</b>  |
| <b>5. PERSPECTIVAS</b>                                                                                                                                          | <b>97</b>  |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                                                            | <b>99</b>  |
| <b>7. MATERIAL SUPLEMENTAR</b>                                                                                                                                  | <b>112</b> |





*Dedico*

*Aos meus pais, Dorival e Olga,  
pelo amor e pela eterna confiança em minhas escolhas.*

*Ao Alonso,*

*pelo apoio incondicional, companheirismo, carinho, afeto e amor,  
e por constantemente me motivar e tornar meus dias mais cheios de luz.*



## AGRADECIMENTOS

---

Um agradecimento muito sincero ao Prof. Dr. Michel Vincentz, pela orientação, confiança, apoio, amizade e pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera e Prof. Dr. Renato Vicentini pelas sugestões e críticas na banca prévia.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, Prof. Dr. Daniel Scherer, Prof. Dr. Fabio Tebaldi e Profa. Dra. Maria Helena Goldman pela participação na banca e pelas discussões e sugestões junto à versão escrita desta tese.

Ao Dr. Jean-Pierre Renou e Dra. Sandra Pelletier pela contribuição a este projeto.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, Tutty, Mari, Américo, Rapha, Dudu, Amanda, David pela companhia, pela ajuda em diversas etapas do trabalho, pela simpatia, pelos constantes estímulos, pelos agradáveis momentos de descontração e pelas amizades sinceras, que tanto facilitam a realização e o enriquecimento do nosso trabalho.

À amiga Gi pela amizade e pela companhia nas minhas refeições no lab.

Aos meus pais, Dorival e Olga, irmãs, Graziela e Kassima e sobrinhos, Marco e Mateo, pelo apoio, confiança e amor.

Ao Alonso que me ensinou, entre outras coisas o valor e a grandiosidade da entrega, cumplicidade e do verdadeiro amor. Meu eterno companheiro que faz com que os dias mais árduos se tornem mais brandos na batalha em busca dos meus objetivos.

À Sandra Lúcia Martins pelo apoio técnico e ajuda com o cultivo das plantas.

À Sandra Scarano, Tânia Zambon e Gabriela Morais pela amizade e ajuda administrativa.

À Universidade Estadual de Campinas, por promover o crescimento e o conhecimento a todos os alunos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro aplicado nesta pesquisa.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho o meu mais sincero MUITO OBRIGADA!



*“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,  
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
se tornar um autor da própria história.  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar  
um oásis no recôndito da sua alma .  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um ‘não’.  
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.  
Pedras no caminho?*

*Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

*Fernando Pessoa*



# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Carboidratos e energia

As plantas, como organismos sésseis, precisam se adaptar rapidamente às oscilações ambientais a fim de garantir sua sobrevivência e reprodução. Para isso, elas desenvolveram uma série de mecanismos capazes de integrar os sinais que indicam o estado metabólico interno com os sinais que comunicam mudanças ambientais de curto e longo prazo. Entre os aspectos ambientais que podem afetar o crescimento e o desenvolvimento, a luz exerce papel fundamental, tanto através da sua percepção por fotoreceptores nas plantas quanto através de seu papel na fixação de carbono e produção de açúcares para o metabolismo e síntese de macromoléculas.

Durante a fotossíntese, a energia captada da luz é utilizada na produção de açúcares, sendo a glicose o principal produto da fotossíntese e o dissacarídeo sacarose, composto por glicose e frutose, a principal forma de açúcar transportado dos órgãos fotossintéticos para os demais órgãos (Rolland *et al.*, 2006). Além de seu papel no metabolismo, existem evidências de interação entre vias de sinalização de açúcares e vias de sinalização de hormônios, fosfato, luz e estímulos relacionados a estresses bióticos e abióticos (Rolland *et al.*, 2006; Baena-González *et al.*, 2007). Estas interações entre as vias de sinalização induzidas por açúcares e sinais hormonais e ambientais resultam na modulação do perfil de expressão gênica de forma a garantir o crescimento e desenvolvimento diante de alterações metabólicas previsíveis (oscilação circadiana na disponibilidade de açúcares e energia) ou imprevisíveis (estresse hídrico ou ataque de patógenos). Além disso, esta integração de sinais possui um papel central na regulação da distribuição de açúcares na relação fonte-dreno (Roitsch, 1999).

Parte dos açúcares produzidos na fotossíntese é transportada das áreas de produção (folhas e órgãos verdes capazes de realizar fotossíntese) para as áreas de metabolismo/crescimento ou armazenamento (*i.e.* flores, sementes e sistema radicular). Um número crescente de evidências sugere que a expressão de genes relacionados à fotossíntese, bem como a atividade das enzimas correspondentes a estes genes, são regulados pela demanda dos tecidos e órgãos dreno (Sheen, 1990; Jang e Sheen, 1994; Black *et al.*, 1995; Koch, 1996; Pego *et al.*, 2000; Paul e Foyer, 2001; Rolland *et al.*,

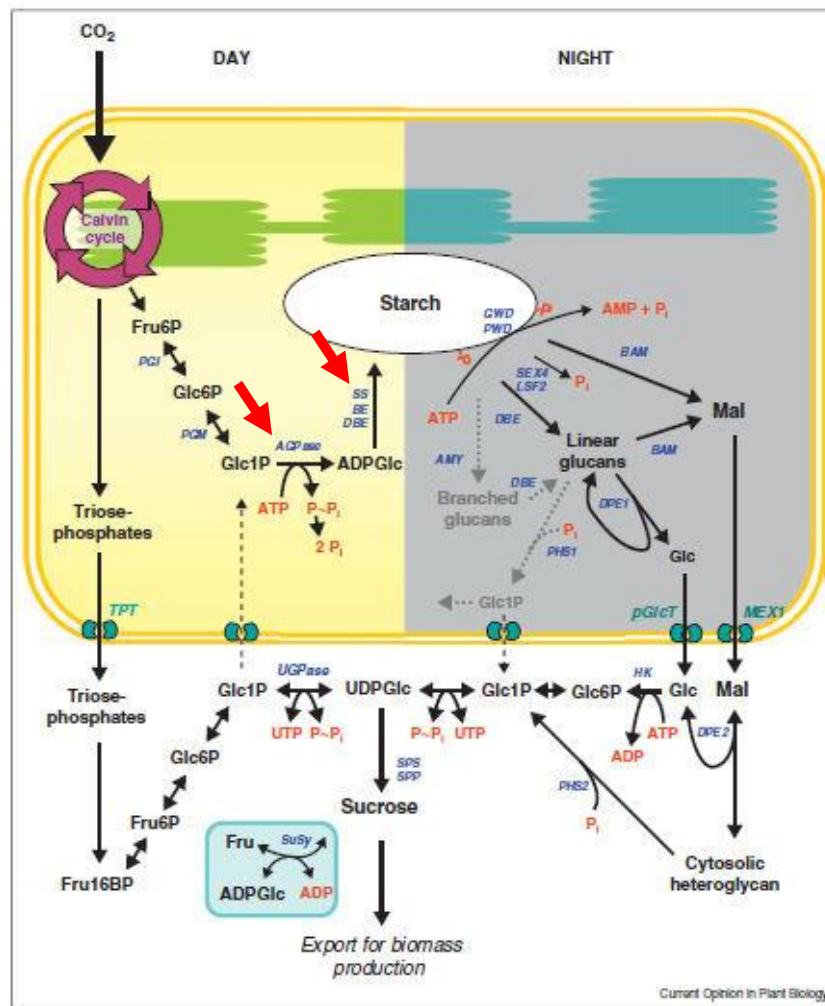
2002). Em geral, as atividades fonte como fotossíntese, mobilização e exportação dos fotoassimilados são induzidas em condições de baixa disponibilidade de açúcares, enquanto as atividades dreno como crescimento e armazenamento são induzidas quando as fontes de carbono estão disponíveis em abundância (Rolland *et al.*, 2006). Os mecanismos de regulação fonte-dreno ocorrem através de um sistema complexo formado por diversos sinais integrados numa rede de regulação gênica (Paul e Foyer, 2001).

A glicose produzida na fotossíntese é parte direcionada para o metabolismo nos próprios órgãos fotossintéticos ou convertida para sacarose para ser transportada para os tecidos dreno, e parte é canalizada para a síntese de amido (Gibon *et al.*, 2004). O amido é armazenado sob a forma de grânulos no interior dos cloroplastos durante o dia, sendo degradado durante a noite para fornecer energia quando a fotossíntese não é possível. Este processo de armazenamento de açúcar na forma de amido durante o dia e sua posterior conversão em glicose e sacarose durante a noite permite a manutenção de processos metabólicos básicos como a respiração, além de permitir um crescimento praticamente contínuo durante 24 horas através de processos alternativos como expansão da parede celular (Gibon *et al.*, 2004; Bläsing *et al.*, 2005). Esta distribuição de tarefas entre o dia e a noite poderia representar entre outras coisas, uma forma da planta maximizar o uso da energia que é limitada a noite e/ou uma forma de otimizar a expansão da parede e consequentemente o crescimento celular.

O metabolismo de amido é influenciado por fatores ambientais, como a duração do dia, temperatura, disponibilidade de nutrientes e fatores externos e internos que modificam o estado redox (Geigenberger, 2011; Kötting *et al.*, 2010; Zeeman *et al.*, 1998). Por exemplo, plantas cultivadas em dias curtos acumulam mais amido do que as cultivadas em dias longos, possivelmente em preparação para a maior duração da noite subsequente ao período curto de luz (Gibon *et al.*, 2004, Stitt e Zeeman, 2012, Matsoukas *et al.*, 2013). O relógio circadiano interage com a percepção da luz pelos fotorreceptores e com as oscilações dos níveis de carboidratos de forma a ajustar seu funcionamento de acordo também com sinais externos e internos (Viana *et al.*, 2013, não publicado). Além disso, o relógio circadiano permite que a planta antecipe as condições de disponibilidade e privação de energia que possivelmente acompanham o dia e a noite, respectivamente, evitando condições de estresse energético (Gibon *et al.*, 2004; Stitt e Zeeman, 2012; Matsoukas *et al.*, 2013).



As primeiras etapas na síntese de amido envolvem a conversão de intermediários do ciclo de Calvin em ADP-glicose que é o substrato para a amido sintase (*starch synthase*) (Figura 1, adaptada). A síntese de amido pode ser aumentada através da ativação alostérica de ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) (Figura 1, adaptada) em uma proporção relativa ao aumento de 3PGA/Pi (Preiss, 1988). Além da regulação alostérica, a atividade da AGPase é regulada pelo estado redox em resposta à luz ou aumento dos níveis de açúcar (Hendriks *et al.*, 2003; Tiessen *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2005), e também a transcrição da AGPase é induzida em resposta à alta concentração de sacarose (Koch, 1996), baixa disponibilidade de nitrato ou fosfato (Nielsen *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 1997).



**Figura 1.** Via de síntese e degradação de amido em folhas de arabis e via de síntese da sacarose. Destacando a starch synthase (SS) e AGPase, indicadas pelas setas vermelhas (adaptado de Stitt e Zeeman, 2012).

Entre os diversos genes centrais no controle do metabolismo de amido destacam-se os genes *Phosphoglucomutase* (PGM) e *Granule Bound Starch Synthase 1* (GBSS1) que integram a via de síntese de amido e os genes *Disproportionating Enzyme 2* (DPE2),  *$\alpha$ -Glucan Water Dikinase* (GWD1), *Phosphoglucan Water Dikinase* (PWD) e *Beta-amylase 9* (BAM9) que participam da degradação do amido. O gene *DPE2* codifica uma enzima citossólica envolvida no metabolismo da maltose, que é produzida a partir da degradação de amido e exportada para o citossol. Mais precisamente, a enzima DPE2 possui atividade de transglicosidase e amilomaltase, transferindo uma glicosil da maltose para outro glicano e liberando uma molécula de glicose a partir de cada molécula de maltose exportada do cloroplasto (Chia *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Stitt e Zeeman, 2012). A glicose liberada pode tanto ser usada no metabolismo da própria célula quanto na produção da sacarose que é exportada para outros órgãos e tecidos drenos. O mutante nulo *dpe2-3* acumula elevados níveis de maltose e amido nas folhas no final da noite, sugerindo que esta enzima é essencial no metabolismo de maltose, e indiretamente na degradação do amido (Chia *et al.*, 2004). Estudos mostraram que uma parcela significativa dos genes de *Arabidopsis* são diferencialmente expressos durante a extensão da noite (Usadel *et al.*, 2008). Mutantes *pgm* durante a extensão da noite mostraram que as plantas tiveram respostas a carência energética decorrente da exaustão das reservas de amido ao final da noite, levando a um estado de estresse energético (Gibon *et al.*, 2004).

Os açúcares glicose (Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2007), sacarose (Vaughn *et al.*, 2002), trealose-6-fosfato (Paul *et al.*, 2008), frutose (Pego e Smeeks, 2000), manose (Schnarrenberger, 1990) e baixa disponibilidade de energia (Baena-González e Sheen, 2007; Halford e Hey, 2009) funcionam como sinais que modulam o crescimento e desenvolvimento das plantas. Os fatores reguladores de transcrição têm importância fundamental neste processo, seja interagindo diretamente com motivos reguladores nas regiões promotoras dos genes, seja interagindo com outras proteínas no complexo regulador de transcrição (Baena-González e Sheen, 2007). Somam-se a essa modalidade de regulação, as modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, complementando e refinando a modulação exercida no nível transcricional. Também de suma importância na modulação de expressão gênica é a interação entre os sinais envolvidos no metabolismo energético (e.g. glicose; glicose-6-fosfato; sacarose, entre outros) e os hormônios que atuam tanto como reguladores do desenvolvimento como também

mediadores de respostas a estresses bióticos e abióticos (e.g. ABA; etileno; brassinosteróides, entre outros).

## 1.2 Sinalização por açúcares em plantas

Estudos fisiológicos e moleculares têm demonstrado que a síntese e transporte de açúcar são processos altamente regulados, sendo que vários genes possuem regulação transcricional e pós-transcricional frente a mudanças nos níveis intracelulares de açúcar (Sheen *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2000). Por exemplo, determinados açúcares podem favorecer a expressão de enzimas em conexão com a biossíntese, utilização e armazenamento de suas reservas (incluindo amido, lipídeos e proteínas), assim como agir reprimindo tal expressão de enzimas envolvidas na fotossíntese e mobilização de reservas.

Diversas vias de sinalização de açúcares têm sido descritas e extensivamente estudadas em leveduras, animais e plantas, sendo que estas análises sugerem que os mecanismos de percepção de açúcar são, ao menos parcialmente, conservados em células eucarióticas (Jang e Sheen, 1997; Smeekeens, 2000; Halford *et al.*, 1999; Johnston, 2005).

Foi demonstrado que no organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, a sacarose regula especificamente a transcrição dos mRNAs de um grupo restrito de fatores de transcrição da família do *basic leucine zipper* - bZIP (Rook *et al.*, 1998; Wiese *et al.*, 2004), indicando a participação destes fatores no controle da homeostasia energética (Baena-González *et al.*, 2007; Hanson *et al.*, 2008). Outro açúcar que também sinaliza mudanças importantes na expressão gênica é a hexose glicose (Koch, 1996; Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006), que participa da regulação de processos fundamentais do desenvolvimento da planta como embriogênese, germinação, crescimento de raiz, florescimento, além de processos como fotossíntese, senescência e resposta ao estresse (Rolland *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003; Gibson, 2005). Recentemente foi demonstrado que a frutose, uma abundante hexose em plantas, possui uma via de sinalização específica, e requer o gene *Fructose Insensitive 1* (FINS1), que codifica uma provável frutose 1-6 bifosfatase (Cho e Yoo, 2011). O dissacarídeo de glicose fosfatado trealose-6-fosfato (T6P) atua como uma molécula reguladora inibindo a atividade da enzima

*Sucrose non-fermenting related kinase 1* (SnRK1), uma importante quinase mediadora das respostas a estresse energético (Baena-González *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Além disso, a T6P é importante na regulação do tempo de floração, uma vez que a perda de função da enzima *Trehalose-6-Phosphate Synthase* (TPS1), essencial na síntese de T6P, provoca um significativo atraso no tempo de florescimento de *arabidopsis* (Wahl *et al.*, 2013).

As plantas são, constantemente, alvos de mudanças bioquímicas e fisiológicas decorrentes de condições que levam ao estresse energético. Condições que limitam a quantidade de energia disponível (baixa quantidade de luz, inibidores de fotossíntese e submergência) convergem na ativação da quinase KIN10, ativada e reprimida em condições de privação e fartura energética, respectivamente (Baena-González *et al.*, 2007). A ativação da KIN10 inicia um processo de economia de energia levando à repressão de vias biossintéticas, estimulando processos catabólicos (degradação de parede celular, mobilização de amido, degradação de lipídios, proteínas e aminoácidos) providenciando energia a partir de fontes secundárias e reprimindo genes relacionados a gastos energéticos como aqueles ligados ao anabolismo (síntese de parede celular, proteínas, aminoácidos) através de uma rede de sinalização que inclui fatores de transcrição tipo bZIP do grupo S e C (Baena-González *et al.*, 2007). Além de seu papel na manutenção da homeostase energética da célula e na tolerância a estresse, a KIN10 também influencia o crescimento, desenvolvimento, reprodução e senescência nas plantas (Baena-González *et al.*, 2007). Por outro lado, a quinase TOR (*Target of rapamycin*) também controla diversas funções celulares em células eucarióticas em resposta ao estresse, à disponibilidade de nutrientes, ao estado energético intracelular e mostrou-se essencial para o desenvolvimento embrionário em *Arabidopsis thaliana* (Mahfouz *et al.*, 2006). Está presente em todos os organismos eucarióticos e regula uma grande variedade de processos biológicos que contribuem coletivamente para o crescimento celular. Foi sugerido que, como em outros eucariotos, TOR em plantas poderia ser um dos principais contribuintes para a ligação entre estímulos ambientais e processos de crescimento (Dobrenel *et al.*, 2013).

Estudos com mutantes de *arabidopsis* hipersensíveis (*glo – glucose oversensitive*) e insensíveis (*gin - glucose insensitive*) à glicose revelam íntima associação com sinalização pelos hormônios ABA (Zhou *et al.*, 1998; Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Huisjer *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2002; Cheng *et*

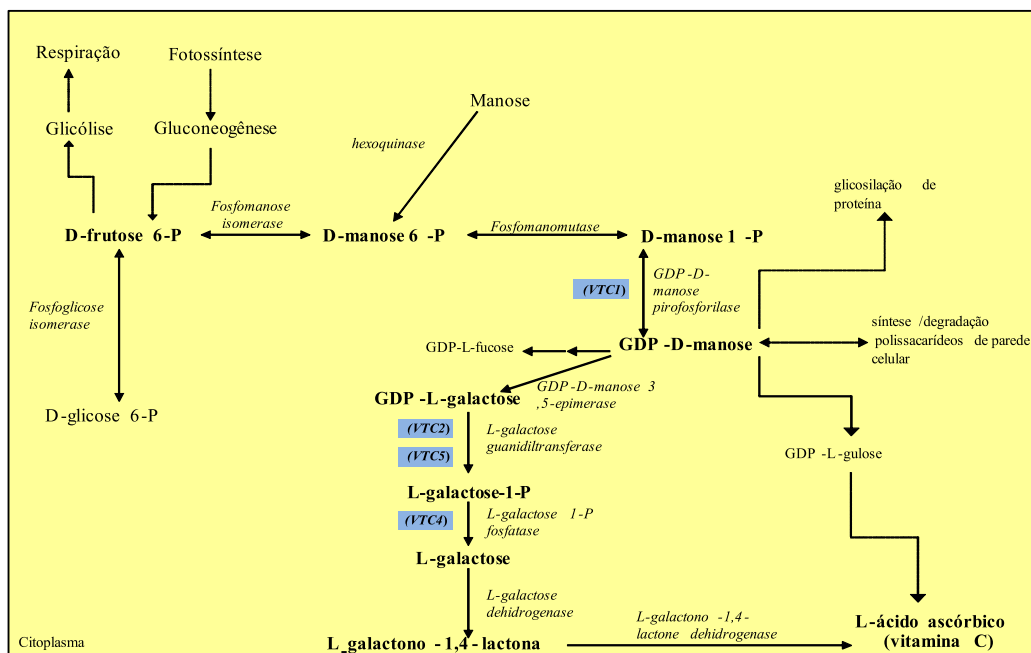
*et al.*, 2002; Brocard-Gifford *et al.*, 2004; Gibson, 2005; Rook *et al.*, 2006) e etileno (Zhou *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Léon e Sheen, 2003; Yanagisawa *et al.*, 2003). Esta associação parece ser essencial no ajuste fino do desenvolvimento da planta e nas respostas aos estresses ambientais, integrando informações do metabolismo energético e dos sinais transmitidos por hormônios.

Um aspecto conservado entre plantas e leveduras corresponde à atividade sensora da hexoquinase. Foi mostrado em *arabidopsis* que a *HXK1* (*Hexoquinase-1*) atua como um sensor da glicose independentemente da sua atividade catalítica de fosforilação (Moore *et al.*, 2003). *HXK1* reprime a expressão do gene *CAB2* (*Chlorophyll-a/b-binding*) interagindo com o promotor deste gene na forma de um complexo multiprotéico (Cho *et al.*, 2006). Além disso, mostrou-se também que as respostas induzidas pela glicose dependem do gene *GIN2* que codifica a *HXK1* (Cho *et al.*, 2006). *HXK1*, na presença de glicose poderia promover um aumento da síntese de ABA e subsequentemente a estimulação da via de transdução do ABA (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002). No contexto desta cascata de regulação, o gene *ABA2/GIN1* que codifica uma dehidrogenase/redutase envolvida na biossíntese de ABA (Cheng *et al.*, 2002) e o gene *ABI4/GIN6* que codifica um regulador da transcrição da família de fatores com domínio APETALA 2, envolvido na sinalização do ABA (Finkelstein *et al.*, 1994; Arenas-Huertero *et al.*, 2000), parecem ter um papel central nessa regulação (Rolland *et al.*, 2006). Aparentemente, o regulador ABI4 também age como repressor do promotor do gene *rbcS* (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit gene*) em resposta à glicose ou ABA (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005) e mostra-se estar envolvido na inibição da germinação de sementes por manose (Pego *et al.*, 1999; Huisjer *et al.*, 2000), sugerindo um papel geral de ABI4 na sinalização por hexoses. ABI4 foi também identificado como sendo um ponto chave importante da retro-regulação do cloroplasto para o núcleo (Koussevitzky *et al.*, 2007). Observou-se que ABI4 medeia o efeito da trealose exógena no crescimento de *arabidopsis*, a repressão mediada por glicose na expressão de genes da fotossíntese, a transição do crescimento heterotrófico para o fotoautotrófico e a expressão de uma série de genes envolvidos na quebra do amido (Avonce *et al.*, 2004; Ramon *et al.*, 2006; Koussevitzky *et al.*, 2007), posicionando ABI4 como um ponto de convergência entre diferentes vias de sinalização, inclusive as vias de açúcares e ABA.

O mutante *aba insensitive*, *abi4-1* (Finkelstein, 1994) possui reduzida sensibilidade na inibição da germinação por ABA e expressão gênica alterada na

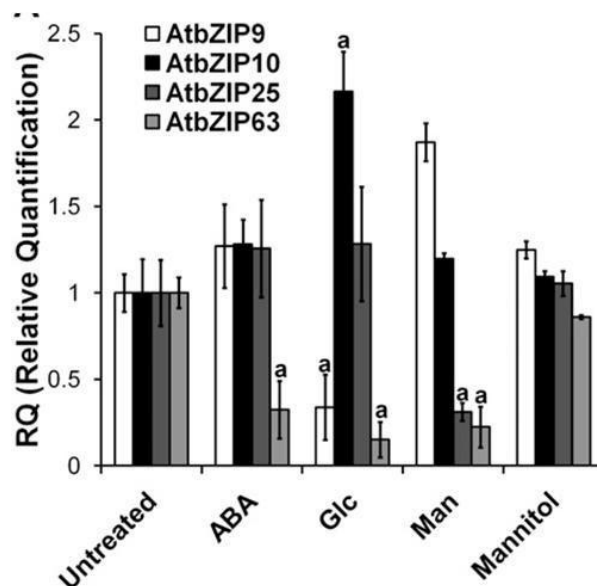
semente. A expressão de *ABI4* é alta em sementes durante a germinação, bem como no desenvolvimento inicial das plântulas, enquanto que níveis baixos estão presentes em tecidos vegetativos, desempenhando um papel fisiológico (Finkelstein, 1994).

Além disso, *ABI4* desempenha um papel chave na transmissão de informação sobre a abundância de ascorbato e, conseqüentemente, na capacidade das células tamponar estresses oxidativos. Portanto, as vias de sensibilidade a açúcar mediadas por *ABI4* são também sensíveis à abundância de ascorbato, fornecendo a evidência de sobreposição entre as vias de sinalização redox e açúcar (Foyer *et al.*, 2012). Estudos com os mutantes *vtc1* e *vtc2* deficientes na síntese de vitamina C (Figura 2 adaptada) têm mostrado que as vias de sinalização redox e ABA podem participar da interação SA-JA (ácido salicílico- ácido jasmônico) fornecendo regulação potencial adicional que aumentaria a flexibilidade e adaptação das plantas frente a variações ambientais e sinais metabólicos (Pastori *et al.*, 2003; Pavet *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Esquema geral das sequências metabólicas e compartimentalização das rotas de interconversão de precursores monossacarídicos que a manose integra. PGI: fosfoglicose isomerase, PMI: fosfomanose isomerase, PMM: fosfomanomutase, GMP: GDP-D-manose pirofosforilase, GME: GDP-D-manose 3,5-epimerase (adaptado de Wheeler *et al.*, 1998; Seifert, 2004).

Outras rotas sensíveis à glicose têm sido descritas (para revisão ver Rolland *et al.*, 2002; 2006). Uma delas é a rota metabólica dependente da glicólise que requer a atividade catalítica das hexoquinases e que regula a expressão dos genes *PR* (*Pathogenesis Related*) *PR1* e *PR2* (Xiao *et al.*, 2000). A terceira via está envolvida na regulação de um número limitado de genes como da chalcona sintase e uma invertase de parede e é independente de qualquer atividade catalítica da hexoquinase (Roitsch, 1995; Xiao *et al.*, 2000). Evidências genéticas também revelaram a existência de um mecanismo de detecção e sinalização da glicose, independente das hexoquinases, envolvendo um receptor acoplado a uma proteína G em *Arabidopsis* (Ullah *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Chen e Jones, 2004; Chen *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Mostrou-se que os níveis de mRNA dos fatores de transcrição *AtbZIP9* e *AtbZIP25*, dois genes pertencentes ao grupo C de fatores de transcrição do tipo bZIP de *Arabidopsis thaliana* que estudamos no laboratório, respondem de maneira diferencial a glicose e manose (Figura 3, Mاتيولli *et al.*, 2011). Estes dados exemplificam a possibilidade da manose poder atuar como sinal genuíno em plantas. Esta conclusão está também de acordo com a inibição da germinação por manose (Figura 4, Resultados e Discussão, PARTE I, página 16), um mecanismo dependente de *ABI4* (Pego *et al.*, 1999; Huisjer *et al.*, 2000; Yuan e Wysocka-Diller, 2006).



**Figura 3.** Regulação da expressão dos genes bZIPs do Grupo C de *Arabidopsis thaliana*. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0) com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As

plântulas foram tratadas com 100  $\mu$ M ABA, 110 mM de glicose 110 mM de manose e 110 mM de manitol por 4 horas. Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. As diferenças em relação ao controle não tratado foram consideradas significativas em  $P < 0,05$  (teste t de Student) e estão indicadas pela letra “a” (Matiolli et al., 2011).

### 1.3 Metabolismo da manose

O significado biológico da sinalização relacionada por manose é essencialmente desconhecido. Sabe-se que a manose além de poder servir como fonte de energia, também se apresenta como precursor principal da biossíntese da vitamina C, da biossíntese de polissacarídeos da parede celular e da glicosilação de proteínas. Porém, qual destes vários aspectos da biologia da planta envolve a sinalização da manose ainda precisa ser investigado. A manose livre existe em plantas apenas em pequenas quantidades e é fosforilada imediatamente pela hexoquinase (*HKX*) em manose-6-fosfato e lentamente metabolizada (Herold e Lewis, 1977).

A manose é encontrada na parede celular como componente da hemicelulose manano, cujo polímero apresenta ligações  $\beta$ -1,4-D-Man, estando também presente nos glucomananos e galactomananos ligados a hemicelulose (Gilbert, 2010). Os mananos surgiram cedo na evolução das plantas terrestres e são um componente relativamente abundante da parede celular de briófitas, lycopodiófitas, pteridófitas e espermatófitas gimnospermas, mas presente em pequenas quantidades em angiospermas (Poppe, 2008).

A biossíntese da parede celular em plantas envolve diferentes etapas, tanto ao nível celular quanto ao nível bioquímico e molecular, assim como diversas rotas metabólicas, enzimas, genes estruturais e regulatórios. Os açúcares utilizados como precursores para a formação de polissacarídeos de parede celular relacionados a manose e de vitamina C derivam da GDP-D-manose que é sintetizada a partir de D-frutose-6-fosfato pela ação sequencial de três enzimas: uma isomerase, uma fosfomutase e uma pirofosforilase. Uma vez formada, a GDP-D-manose é convertida em GDP-L-fucose por ação da *GMD2* (GDP-D-manose desidratase), cujos genes têm sido identificados pelos mutantes *mur1* (Bonin et al., 1997) e a epimerase-redutase bifuncional *GER1* (Bonin e Reiter, 2000). A GDP-L-galactose e GDP-L-gulose são sintetizadas também a



partir de GDP-manose pela ação de enzimas GDP-manose epimerases (*GME*) (Figura 2, adaptada de Wheeler *et al.*, 1998; Seifert, 2004).

Os polissacarídeos de reserva da parede celular são classificados em três grupos distintos: os mananos, os xiloglucanos e os (arabino) galactanos. Esta classificação é baseada essencialmente na estrutura química desses polímeros, sendo os mananos subdivididos em mananos puros, glucomananos e galactomananos. Considerando a relevância com a qual a manose será abordada neste trabalho, vale a pena lembrar que os polissacarídeos mananos de mono e dicotiledôneas (exceto leguminosas) sugerem que este polímero seja uma molécula bifuncional, exercendo as funções de constritor e protetor mecânico do embrião e também de polissacarídeo de reserva (Giorgini e Comoli, 1996; Toorop *et al.*, 1996). Na maioria dos casos, a degradação do manano pode ser induzida por ácido giberélico, que promove a germinação, e em alguns casos é inibida por ácido abscísico (Bewley *et al.*, 1997). Os galactomananos são polissacarídeos móveis, degradados por enzimas hidrolíticas até seus monossacarídeos constituintes (manose e galactose) ao mesmo tempo em que há produção de sacarose (Buckeridge *et al.*, 2000).

Além do importante papel estrutural, a manose também é um dos precursores da rota biossintética do ácido L-ascórbico, que ocorre em plantas via GDP-D-manose, GDP-L-galactose e L-galactose (Wheeler *et al.*, 1998; Figura 2 adaptada). Tal confirmação foi obtida por análises de mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes em ácido L-ascórbico (Conklin *et al.*, 1999; Conklin *et al.*, 2000) e da identificação e manipulação de vários dos genes envolvidos (Keller *et al.*, 1999; Tabata *et al.*, 2001; Gatzek *et al.*, 2002). Contudo rotas alternativas têm sido sugeridas (Jain *et al.*, 2000; Smirnoff, 2000; Smirnoff e Wheeler, 2000; Smirnoff, 2001; Smirnoff *et al.*, 2001; Agius *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Linster *et al.*, 2007; Wolucka e Van Montagu, 2003 ; Valpuesta e Botella, 2004) e os mecanismos que controlam o acúmulo de ácido L-ascórbico em diferentes tecidos mantêm-se ainda elusivos.

Conforme citado anteriormente, mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes em ácido L-ascórbico e representantes de *loci* diferentes (VTC1, VTC2, VTC3, VTC4 e VTC5) envolvidos na manutenção de vitamina C, tem sido descritos como ferramentas valiosas no entendimento do papel fisiológico do ascorbato (Conklin *et al.*, 1996; Conklin *et al.*, 1999; Filkowski *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2004; Pastori *et al.*, 2003; Conklin *et al.*, 2000; Muller-Moule *et al.*, 2002; Muller-Moule *et al.*, 2003; Laing *et al.*, 2004; Jander *et al.*, 2002; Conklin *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 1998; Linster *et al.*,

2007).

Mostrou-se que a enzima GDP-L-galactose fosforilase (que converte GDP-L-galactose a L-galactose 1-P) é codificada pelo gene VTC2 (*At4g26850*) de *Arabidopsis thaliana* o qual catalisa este passo na via biossintética do ascorbato (Figura 2 adaptada). Um homólogo de VTC2, o gene VTC5 (*At5g55120*), também codifica uma fosforilase GDP-L-galactose com propriedades semelhantes ao VTC2. Crescimento normal dos mutantes dos genes VTC2 e VTC5 foi restaurado por suplementação com ácido ascórbico ou L-galactose, indicando que ambas as enzimas são necessárias para a produção de ácido ascórbico (Dowdle *et al.*, 2007). Além disso, foi mostrado que VTC5 pode compensar a expressão do VTC2 em estágios precoces de germinação, resultando na manutenção do nível de ácido ascórbico em mutantes *vtc2-1* quando comparado ao selvagem (Gao *et al.*, 2011). Tais estudos ressaltam a importância da via GDP-manose como a única fonte significativa de ascorbato em plântulas de *A. thaliana*, bem como o papel da GDP-L-galactose fosforilase no controle da biossíntese do ácido ascórbico o qual é essencial para o crescimento das plântulas.

Destaca-se também os passos envolvidos na síntese de L-galactose a partir de L-galactose-1-fosfato caracterizados pela obtenção de uma linha de inserção homozigótica do T-DNA carente de um produto funcional do gene *At3g02870* (VTC4) deficiente em ascorbato (50% do tipo selvagem) e da atividade da L-galactose-1-fosfato fosfatase. Testes de complementação genéticas revelaram que tal enzima desempenha um importante papel na biossíntese de ascorbato de planta (Conklin *et al.*, 2006) e além disso foi possível determinar que a enzima VTC4 é bifuncional e está envolvida tanto na via do ascorbato quanto na de síntese do mioinositol (Torabinejad *et al.*, 2009).

Crescentes evidências sugerem um modelo para a homeostase redox em que o antioxidante a espécies reativas de oxigênio (ROS) age como metabólito de interferência para sinalizar derivados do metabolismo e do meio ambiente (Foyer e Noctor, 2005). Essa interface modula uma indução apropriada nos processos de aclimatização, ou alternativamente, a ativação de programas de morte celular (Navabpour *et al.*, 2003; Chen e Dickman, 2004; Lavoie *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2004; Foyer e Noctor, 2005; Pavet *et al.*, 2005). Outra caracterização bioquímica e molecular utilizando os mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes em ácido L-ascórbico, induziu nos mutantes *vtc1*, *vtc2-1* e *vtc2-2*, os genes *PR*, as atividades da peroxidase da parede celular e da fitoalexina camalexina, sugerindo que tais mutantes são afetados na via de sinalização em resposta a patógeno, indicando o possível envolvimento da manose como precursor

da vitamina C e a necessidade de desvendar seu papel sinalizador (Colville e Smirnoff, 2008).

A manose apresenta-se como precursor da via biossintética do ácido L-ascórbico (ascorbato, vitamina C; Figura 2 adaptada) um metabólito que funciona como um antioxidante, cofator enzimático e um modulador da sinalização celular em vários processos fisiológicos, incluindo biossíntese da parede celular, metabólitos secundários, fitohormônios, resistência aos estresses bióticos (patógenos e ataques de pragas) e abióticos (ferimentos mecânicos, calor, frio, seca, entre outros), fotoproteção, divisão celular e crescimento (Pastori *et al.*, 2003; Pignocchi e Foyer, 2003; Barth *et al.*, 2004; De Pinto e De Gara, 2004; Potters *et al.*, 2004; Tokunaga *et al.*, 2005). O ascorbato contribui ainda para a manutenção da homeostase de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Barth *et al.*, 2004; Conklin *et al.*, 1996; Conklin *et al.*, 2004) e suas funções antioxidantes têm sido explicadas durante a divisão celular, metabolismo da parede celular, expansão celular e interações planta-patógeno (Smirnoff *et al.*, 2000).

Diante da importância da manose como precursora da vitamina C, uma molécula essencial no controle do estresse oxidativo, de sua participação para montagem da hemicelulose da parede celular, para glicosilação das proteínas e das evidências crescentes do seu papel de sinalização (Matiolli *et al.*, 2011), torna-se essencial desvendar sua participação como molécula de regulação em plantas superiores possibilitando o entendimento de sua atuação. Assim, nesse trabalho buscamos contribuir para desvendar o papel fisiológico da manose na planta eudicotiledônea modelo, *Arabidopsis thaliana*.



## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

Contribuir para definição em *Arabidopsis thaliana* da rede de regulação gênica controlada pela manose e os mecanismos moleculares subjacentes.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Identificação de programas de expressão gênica, relacionados à manose, pela análise da mudança do transcriptoma em resposta a esta hexose;
2. Avaliar a sobreposição entre sinalização das hexoses manose, glicose e frutose;
3. Avaliar possíveis efeitos secundários da manose relacionados ao sequestro de Pi e ao estresse energético;
4. Avaliar a sinalização por hexoquinase-1 nos genes regulados por manose;
5. Definir a cinética e a sensibilidade de resposta à manose;
6. Avaliar se a sinalização por manose ocorre em nível transcricional ou pós-transcricional.

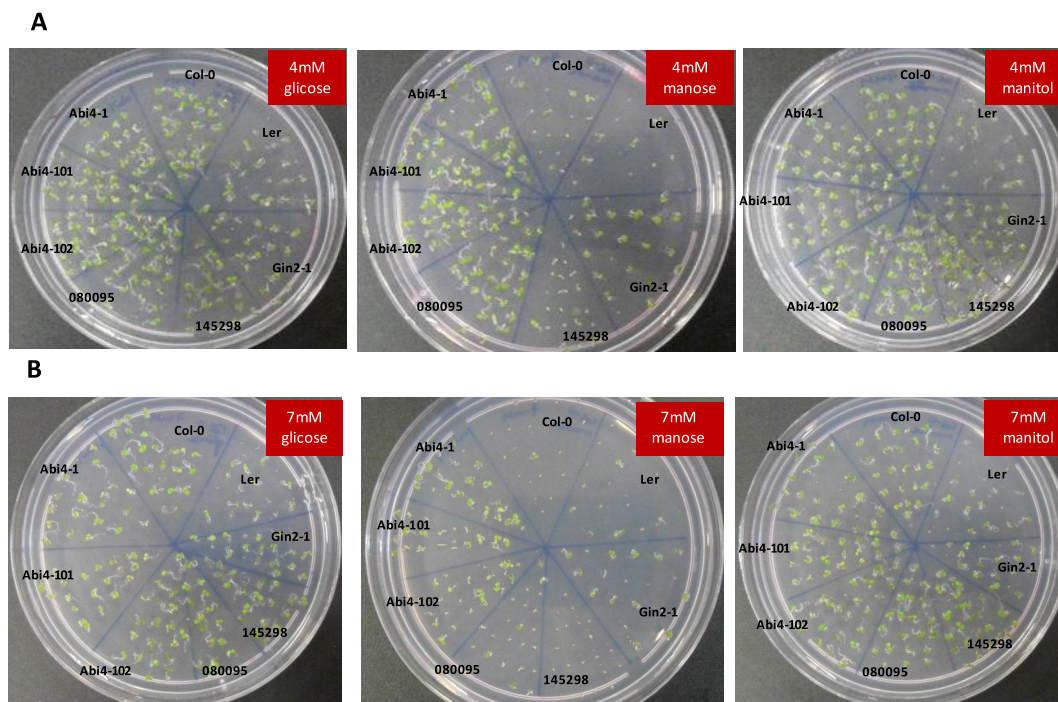


### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PARTE I

##### 3.1.1 Evidências genéticas para sinalização pela manose

Evidências da manose, como um regulador de processos biológicos, consistem na observação de que essa hexose é um potente inibidor da germinação da semente e os dois reguladores *ABI3* e *ABI4*, elementos da via de sinalização de ABA, estão envolvidos neste processo (Dekkers *et al.*, 2004; Yuan e Wysocka-Diller, 2006). A Figura 4 mostra a inibição específica da germinação pela manose e a insensibilidade a manose de mutantes no *locus* *ABI4*.



**Figura 4.** Inibição da germinação por manose. A. Plântulas germinadas em 4 mM de glicose, manose ou manitol e B. Plântulas germinadas em 7 mM glicose, manose ou manitol. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0) e Ler (Landsberg erecta) e dos mutantes, aba insensitive, *abi4-1* (Finkelstein, 1994; background Col-0), *abi4-101* e *abi4-102* (Laby, *et al.*, 2000; background Col-0), os mutantes nulos do locus *ABI4*, por inserção de T-DNA (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>; background Col-0) *SALK\_145298* e *SALK\_080095* e além do mutante *gin2-1* (glucose insensitive2,

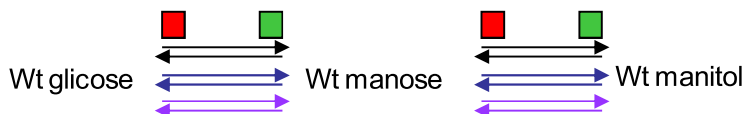
background Ler) (Jang *et al.*, 1997) cultivadas em meio MS/2 com diferentes concentrações de manose, glicose e manitol (4 e 7 mM) sob luz contínua por 5 dias e após dois dias de quebra de dormência a 4°C na obscuridade.

Com o objetivo de se definir melhor tal possibilidade, perfis de transcritos em resposta a manose foram analisados. Visando uma aproximação das respostas primárias, analisamos os transcritos após 2 h de tratamento com manose.

### 3.1.2 Comparações dos perfis de expressão gênica em resposta a manose e glicose usando microarranjo CATMA

Para avaliar a importância do controle da expressão gênica pela manose e identificar elementos da via de sinalização deste açúcar, mudanças de expressão gênica em escala genômica foram analisadas usando a tecnologia de microarranjos de DNA com o sistema CATMA (Complete *Arabidopsis* Transcriptome MicroArray; <http://www.catma.org>). Das 24576 sondas do sistema CATMA, que representam 85% dos genes de *Arabidopsis thaliana* preditos pelo programa Eugène (Foissac *et al.*, 2003), identificamos após remoção de redundância (várias sondas CATMA para um mesmo gene), 4682 genes diferencialmente expressos no total entre todos os diferentes experimentos realizados e descritos em seguida.

Foram comparados tratamentos com glicose e manose e tratamentos com manose e manitol (controle osmótico) (Figura 5). Para os experimentos quatro repetições biológicas foram realizadas para cada um dos tratamentos e foram feitas duas comparações com três repetições experimentais para cada e duas lâminas por comparação, totalizando 12 lâminas, sendo que a amostra marcada com Cy3 na primeira lâmina foi necessariamente marcada com Cy5 na segunda lâmina (Figura 5). O quarto experimento biológico serviu para confirmar os dados de microarranjos por qRT-PCR.



**Figura 5.** Esquema das comparações realizadas nos experimentos de microarranjo CATMA. Cada par de setas representa um experimento biológico e indica o “dye swap”



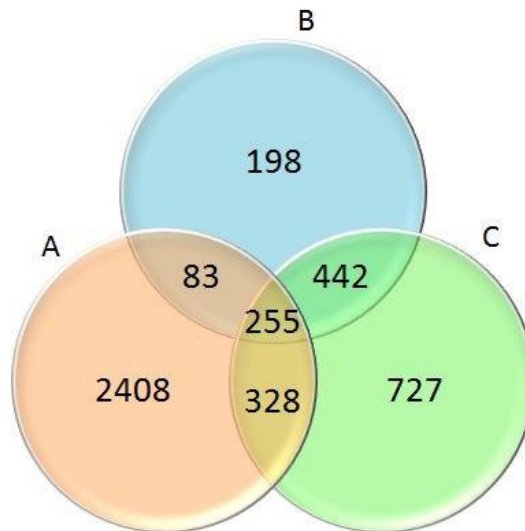
entre as amostras. Wt corresponde ao ecótipo Col-0, tratado com 110 mM de glicose, manose ou manitol por 2 horas.

No total, 3074 genes com AGI foram encontrados ser diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ; para detalhes ver Material e Métodos do manuscrito na PARTE II, página 38) em resposta a glicose e manose, 1608 genes em resposta a manitol e manose, Figura 5 e Tabela 1).

| <b>Tabela 1.</b> Número de genes diferencialmente expressos nas comparações realizadas |                                                                |                                 |                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Comparações</b>                                                                     | <b>Número de genes em comum entre as repetições biológicas</b> | <b>Genes com razão positiva</b> | <b>Genes com razão negativa</b> |
| wt glicose x wt manose                                                                 | 3074                                                           | 1657 (53,8%)                    | 1417 (46,1%)                    |
| wt manitol x wt manose                                                                 | 1608                                                           | 1042 (64,8%)                    | 566 (35,2%)                     |

Perfis de transcritos, em larga escala, (microarray Affymetrix com aproximadamente 24.000 genes) em resposta a glicose e usando condições experimentais similares às nossas foram descritos em *arabidopsis* (Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Estes dados foram usados para avaliar a sobreposição entre as alterações de transcritos induzidas por manose e glicose procurando verificar o quanto a manose pode atuar como um sinal genuíno independente da glicose e se está envolvida com estresse energético. Acredita-se que a fosforilação da manose pela hexoquinase pode promover um déficit em Adenosina Trifosfato (ATP) uma vez que a manose-6-fosfato não é eficientemente metabolizada, gerando desta forma, um estresse energético.

Consequentemente, comparamos os 3074 genes diferencialmente expressos entre glicose/manose (nosso estudo) com os 1752 genes regulados por glicose após 2 e 4h de tratamento proveniente do estudo de Li e colaboradores (Li *et al.*, 2006) (Figura 6). Verificamos que dos 1752 genes regulados por glicose no trabalho de Li, 1169 (66,7%) também estão possivelmente regulados de maneira similar por manose uma vez que não se sobrepõem aos 3074 genes diferencialmente regulados por glicose/manose (nosso estudo). Esta observação sugere que manose não atua apenas como indutor de estresse energético por esgotamento de ATP. Apenas 583 genes regulados por glicose no estudo de Li também apresentaram uma regulação diferencial entre manose e glicose no nosso estudo. Esta sobreposição provavelmente é subestimada devido a um corte (tratado com glicose/não tratado  $\geq 2,5$  vezes) aplicado no estudo de Li (Li *et al.*, 2006).



**Figura 6.** O cruzamento entre os dados obtidos conduzido pelo programa Gene List Venn Diagram (<http://www.bioinformatics.org/gvenn/vennresults.php>). **A.** 3074 genes diferencialmente expressos entre glicose/manose (nosso estudo); **B.** 1752 genes regulados por glicose (Li *et al.*, 2006) e **C.** 978 genes regulados por glicose (Price *et al.*, 2004)

Com o intuito de limitar nossa análise a genes cuja expressão entre glicose e manose seria mais diferenciada e selecionar seguramente genes regulados mais especificamente por manose, adotamos um corte estrigente de  $\log_2 \geq |-1,5|$  da razão glicose/manose para os 2408 genes diferencialmente expressos após as comparações com experimentos realizados em condições similares (Li *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2004). Assim, restringimos o número de genes para 253.

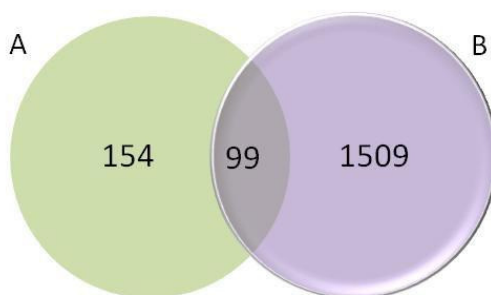
Conhecendo a taxa de indução ou repressão promovida pela glicose (razão da amostra tratada com glicose durante 2 e 4h/amostra não tratada, dados de Li *et al.*, 2006 e disponíveis no genevestigator: <https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmerman *et al.*, 2004), é possível inferir o sentido mais provável da regulação resultante do tratamento com manose no nosso estudo através da comparação da razão glicose/manose obtido nos nossos experimentos com a razão glicose por 2 e 4h/não tratado (Li *et al.*, 2006 e Zimmerman *et al.*, 2004).

Nos estudos de Li *et al.*, (2006) foram considerados apenas genes cuja regulação por glicose passou de um limite correspondente a  $\log_2 \geq 2,5$  ou  $\leq -2,5$ . Desta forma, uma comparação mais exaustiva envolvendo valores de regulação por glicose

correspondentes a  $\log_2$  da razão tratado/não tratado  $>|-0,5|$  (2 e 4 horas de tratamentos) foi realizada a partir dos dados disponíveis no Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmerman *et al.*, 2004).

Os 253 genes foram agrupados conforme a Tabela 2, sendo que 109 genes apresentam razão glicose/manose positiva, que comparados com os genes relacionados a estresse energético mediado por KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007) nos permitiu verificar que a manose poderia regular 12% (13/109) desses genes no mesmo sentido que KIN10 e de maneira oposta à glicose (Tabela 2). Ainda dentro dos 253 genes, 144 genes apresentam razão glicose/manose negativa. Comparando-os com os genes mediados por KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007), verificamos que a manose poderia regular no mesmo sentido que KIN10 e de maneira oposta a glicose 9% (10/144) dos genes (Tabela 2). Além disso, dentro dos 253 genes, 9,2% (10/109) e 12,5% (18/144) correspondem aos genes que não possuem ID Affymetrix correspondente ao CATMA, ou seja, são genes regulados por hexoses, mas que na literatura não apresentam papel na sinalização de açúcar até o momento (Tabela Suplementar 1 item 7 Material Suplementar página 106 ).

Para mostrar que as respostas dos 253 genes com razão glicose/manose positiva ou negativa não são devidas à ocorrência de mudança osmótica, analisamos a regulação desses genes em resposta a manitol. Para isso, comparamos estes genes com os 1608 genes diferencialmente expressos da comparação wt manitol x wt manose (Tabela 1 e Figura 7). Esta comparação revelou que para 99 genes (46 dos 109 genes com razão glicose/manose positiva e 53 dos 144 genes com razão glicose/manose negativa) suas respostas seriam mais especificamente relacionadas às regulações osmóticas e não relacionados especificamente a manose (Tabela 2).



**Figura 7.** O cruzamento entre os dados obtidos conduzido pelo programa Gene List Venn Diagram (<http://www.bioinformatics.org/gvenn/vennresults.php>). **A.** 253 genes diferencialmente expressos entre glicose/manose (nosso estudo) após corte estrigente

de  $\log_2 \geq |-1,5|$  e **B**. 1608 genes diferencialmente expressos da comparação wt manitol x wt manose.

**Tabela 2.** Análise da sobreposição entre regulação por glicose, manose e Kin10 dos genes com  $\log_2$  da razão  $> \text{ou} < 1,5$

| Sinal do $\log_2$ da razão |              |                | Log2 de A/log2 de B | Regulação sugerida | Descrição da regulação sugerida                                             | A e B | A, B e C | D  |
|----------------------------|--------------|----------------|---------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------|----------|----|
| A                          | B            | C              |                     |                    |                                                                             |       |          |    |
| +                          | +            | -              | >1                  | Gli +/Man -        | Gene induzido por glicose e reprimido por manose                            | 34    | 6        | 22 |
| +                          | +            | -              | <1                  | Gli ++/Man +       | Gene induzido por glicose e manose                                          | 21    | 4        | 11 |
| +                          | +            | -              | =1                  | Gli +/Man 0        | Gene induzido por glicose e não responsivo a manose                         | 4     | 2        | 3  |
| +                          | -            | -              | >1                  | Gli -/Man - -      | Gene reprimido por glicose e reprimido por manose de maneira mais acentuada | 30    |          | 7  |
| +                          | <sup>a</sup> | <sup>b</sup> - | >1                  | Gli 0/Man -        | Gene não responsivo a glicose e reprimido por manose                        | 10    | 1        | 3  |
| -                          | -            | +              | <1                  | Gli -/Man +        | Gene reprimido por glicose e induzido por manose                            | 34    | 3        | 20 |
| -                          | -            | +              | >1                  | Gli - -/Man -      | Gene reprimido por glicose e manose                                         | 31    | 9        | 17 |
| -                          | -            | +              | =1                  | Gli -/Man 0        | Gene induzido por glicose e não responsivo a manose                         | 5     | 1        | 4  |
| -                          | +            | -              | <1                  | Gli +/Man + +      | Gene induzido por glicose e induzido por manose de maneira mais acentuada   | 49    |          | 8  |
| -                          | <sup>b</sup> | <sup>a</sup> + | <1                  | Gli 0/Man +        | Gene não responsivo a glicose e induzido por manose                         | 7     |          | 4  |

Os valores de  $\log_2$  das razões foram usados para comparações

A = razão glicose/manose com valor  $\log_2 \geq |-1,5|$  (nosso experimento)

B = razão glicose 2 e 4h / não tratado (Li *et al.*, 2006, Price *et al.*, 2004 e Genevestigator)

C = genes reprimidos (-) ou induzidos (+) por KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007)

A e B = genes da razão A sobrepostos a razão B

A, B e C = genes da razão A sobrepostos a razão B e C

D = genes regulados por mudança osmótica (genes com razão manitol/manose não significativamente diferente de 1; nosso experimento)

<sup>a</sup> = razão glicose 2 e 4h / não tratado (Li *et al.*, 2006 e Genevestigator)  $\log_2 \leq 0,5$

<sup>b</sup> = razão glicose 2 e 4h / não tratado (Li *et al.*, 2006 e Genevestigator)  $\log_2 \leq -0,5$

Dessa forma, efetivamente encontramos 52 genes que apresentam razão positiva glicose/manose e 72 genes que apresentam razão negativa glicose/manose como indicativos de possíveis elementos de sinalização rápida por manose. Estes genes foram classificados em quatro categorias:

1. 24 genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por glicose (gli<sup>++</sup>/man<sup>+</sup> e gli<sup>--</sup>/man<sup>-</sup>; Tabela Suplementar 2 item 7 Material Suplementar página 106);
2. 64 genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (gli<sup>+</sup>/man<sup>++</sup> e gli<sup>-</sup>/man<sup>--</sup>; Tabela Suplementar 3 item 7 Material Suplementar página 107);
3. 26 genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (gli<sup>+</sup>/man<sup>-</sup> e gli<sup>-</sup>/man<sup>+</sup>; Tabela Suplementar 4 item 7 Material Suplementar página 109);
4. 10 genes regulados apenas por manose (gli<sup>0</sup>/man<sup>-</sup> ou gli<sup>0</sup>/man<sup>+</sup>; Tabela Suplementar 5 item 7 Material Suplementar página 109).

Entre os genes das Tabelas Suplementares 2 a 5 encontramos 13 genes em que o valor log<sub>2</sub> da razão glicose por 2 e 4 horas/não tratado (Li *et al.*, 2006, Zimmerman *et al.*, 2004) apresentou sinal oposto (por exemplo, glicose 2h/não tratado log<sub>2</sub> da razão igual a -0,75 e glicose 4h/não tratado igual a 0,28) e nestes casos adotamos o valor da razão glicose 2h/não tratado pelo fato de nosso experimento ter sido conduzido sob este tempo de tratamento. Os valores das razões disponíveis no Genevestigator usados como critério para inferir o sentido da regulação resultado do tratamento com manose no nosso estudo são mostrados como material suplementar (Tabela Suplementar 6 item 7 Material Suplementar página 110).

Os grupos descritos acima representam genes que são regulados por manose e glicose de forma diferencial, e poderiam representar vias de sinalização específicas da sinalização por manose, exceto os 24 genes que são regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por glicose (gli<sup>++</sup>/man<sup>+</sup> e gli<sup>--</sup>/man<sup>-</sup>).

Várias análises detalhadas de mudanças de perfis de mRNA em resposta a manose foram realizadas buscando definir melhor as características da sinalização por este açúcar e estão descritas e apresentadas no manuscrito a seguir PARTE II página 23.



## 3.2 PARTE II

### 3.2.1 Manuscrito: “A manose promove mudanças específicas de expressão gênica em *Arabidopsis thaliana*: novas evidências para uma sinalização por manose”

Juliana Cristina Baptista<sup>1</sup>, Cleverson Carlos Mاتيولli<sup>1</sup>, Renato Vicentini<sup>2</sup>, Paulo Mazzafera<sup>3</sup>, Jean-Pierre Renou<sup>4</sup>, Sandra Pelletier<sup>5</sup>, Michel Vincentz<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética de Plantas, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-875, CP 6010, Campinas, SP, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-875, CP 6010, Campinas, SP, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, CP 6109, Campinas, SP, Brasil

<sup>4</sup> Unité de Recherche en Génomique Végétale, Evry Cedex, France/ INRA Centre d'Angers, Beaucouzé Cedex, France

<sup>5</sup> URGV Plant Genomics, INRA/University of Evry, Evry, France/ Molecular Seed Physiology UMR 1191, INRA, Angers, France

Juliana Cristina Baptista: [juliana.baptista@cbmeg.unicamp.br](mailto:juliana.baptista@cbmeg.unicamp.br); Cleverson Carlos Mاتيولli: [mاتيولli@gmail.com](mailto:mاتيولli@gmail.com); Paulo Mazzafera: [pmazza@unicamp.br](mailto:pmazza@unicamp.br), Renato Vicentini: [shinapes@unicamp.br](mailto:shinapes@unicamp.br)

**Corresponding author:** Michel Vincentz: [mgavince@unicamp.br](mailto:mgavince@unicamp.br); Tel: +55 19 3521-1140; Fax: +55 19 3521-1089

## Resumo

A manose, um dos isômeros estruturais da glicose, precursora da vitamina C, componente da parede celular e da glicosilação de proteínas, pode desencadear respostas específicas em *Arabidopsis thaliana*, como por exemplo, a inibição da germinação. Para investigar mais detalhadamente o potencial da manose como uma molécula de sinalização, análises de mudanças de expressão gênica em curto prazo em *Arabidopsis thaliana* foram realizadas em escala genômica. Foram identificados 44 genes regulados por manose dos quais alguns respondem de maneira menos acentuada ou em sentido oposto a glicose e frutose. Este conjunto de genes pertence proeminentemente às categorias de metabolismo da parede celular e resposta a estímulos bióticos e abióticos. Além disto, a manose interage com hormônios, regulando *BR6OX2*, um gene chave da biossíntese dos brassinosteróides e o gene *EBF2* e da via de sinalização do etileno. Mostramos também que as regulações promovidas pela manose são independentes do sensor de glicose *Hexokinase 1 (HXK1)*. Baixas concentrações de manose (1 mM) foram capazes de induzir mudanças significativas de expressão gênica indicando um alto grau de sensibilidade a este açúcar. Adicionalmente, a resposta a manose foi rápida, podendo ser detectada logo após 15 min de tratamento sugerindo que, pelo menos em parte, as regulações de expressão gênica mediadas por esta hexose podem ser diretas. Tratamentos com manose em condições de inibição da transcrição revelaram que as regulações mediadas pela manose são essencialmente transcricionais. A possibilidade de a manose atuar indiretamente promovendo um estresse energético por limitação de ATP resultando da sua fosforilação por hexoquinase foi excluída uma vez que nenhuma alteração da quantidade de ATP após tratamento com manose foi observada. Esta conclusão foi reforçada pela ausência de efeito da carência de fosfato sobre as regulações induzidas por manose. Os resultados obtidos sugerem a existência de via de sinalização dedicada à manose e as possíveis funções fisiológicas desta sinalização são discutidas.

## Introdução

As plantas, por serem organismos sésseis, possuem mecanismos eficientes para se adequar rapidamente às flutuações ambientais. A manutenção do balanço energético (homeostasia) em plantas, através do uso adequado de carboidratos e outros nutrientes, é essencial para a otimização de seu crescimento e desenvolvimento (Corruzi e Zhou, 2001; Forde, 2002; Rolland *et al.*, 2006; Rook *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2007). A



percepção dos níveis de açúcar em combinação com hormônios permite ajustar de forma precisa a expressão gênica e manter o crescimento, desenvolvimento e reprodução (Koch, 1996; Smeekeens, 2010; Rolland *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004; Gibson, 2005; Li *et al.*, 2006), mesmo em condições ambientais adversas.

Diversas vias de sinalização de açúcares têm sido descritas e extensivamente estudados em leveduras, animais e plantas, sendo que estas análises sugerem que os mecanismos de percepção de açúcar são, ao menos parcialmente, conservados em células eucarióticas (Jang e Sheen, 1997; Smeekeens, 2000; Halford *et al.*, 1999; Johnston, 1999). Foi demonstrado que no organismo modelo *Arabidopsis thaliana* a sacarose regula especificamente a tradução do mRNA de um grupo restrito de fatores de transcrição da família do *basic leucine zipper* - bZIP (Rook *et al.*, 1998; Wiese *et al.*, 2004), indicando a participação destes fatores no controle da homeostasia energética (Baena-González *et al.*, 2007; Hanson *et al.*, 2008). Outro açúcar que também sinaliza mudanças importantes na expressão gênica é a hexose glicose (Koch, 1996; Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006), que participa da regulação de processos fundamentais do desenvolvimento da planta como embriogênese, germinação, crescimento de raiz, florescimento, além de processos como fotossíntese, senescência e resposta ao estresse (Rolland *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003; Gibson, 2005). Recentemente foi demonstrado que a frutose, uma abundante hexose em plantas, possui uma via de sinalização específica, e requer o gene *Fructose Insensitive 1 (FINSI)*, que codifica uma provável frutose 1-6 bifosfatase (Cho & Yoo, 2011). Outra evidência que sugere a existência de uma via específica de sinalização por frutose envolve o fator de transcrição ANAC089, cujo alelo mutante *gain-of-function FSQ6/ANAC089* apresenta reduzida sensibilidade a frutose, e não a glicose ou sacarose (Li *et al.*, 2011). O dissacarídeo de glicose fosfatada trealose-6-fosfato (T6P) atua como uma molécula reguladora inibindo a atividade da enzima *Sucrose non-fermenting related kinase 1 (SnRK1)*, uma importante quinase mediadora das respostas a estresse energético (Baena-González *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Além disso, a T6P é importante na regulação do tempo de floração, uma vez que a perda de função da enzima *Trehalose-6-Phosphate Synthase (TPS1)*, essencial na síntese de T6P, provoca um significativo atraso no tempo de florescimento de *arabidopsis* (O'Hara *et al.*, 2013).

Algumas evidências sugerem que a hexose manose, um isômero estrutural da glicose, também poderia ativar vias específicas de sinalização de forma independente de

glicose, frutose, sacarose. Por exemplo, concentrações como 5 mM de manose inibem a germinação de sementes de *Arabidopsis* de forma independente do metabolismo e dependente da atividade da hexoquinase (HXK), sendo que esta inibição não é devida a reduções nos níveis de ATP ou fosfato e ocorre em concentrações significativamente menores que a inibição de germinação provocada por glicose (200 mM) (Pego *et al.*, 1999). A manose também pode induzir a expressão de *Sus1*, a principal *Sucrose synthase* (*SuSy*) em *Arabidopsis*, em concentrações mais baixas que glicose ou sacarose (Ciereszko & Kleczkowski, 2002). Neste trabalho os autores demonstraram que a inibição da atividade enzimática de HXK por *N*-acetil-glicosamina diminui a indução de *Sus1* por glicose e sacarose, mas não por manose. Além disso, a superexpressão de HXK aumenta a indução de *Sus1* por glicose e sacarose, mas reduz a indução por manose, sugerindo que manose pode regular *Sus1* através de vias de sinalização distintas daquelas observadas para os demais açúcares. Mostrou-se que os níveis de mRNA dos fatores de transcrição *AtbZIP9* e *AtbZIP25*, são reprimidos por manose de forma específica e independente de glicose (Matiolli *et al.*, 2011). O conjunto destes dados exemplifica a possibilidade da manose poder atuar como sinal genuíno em plantas.

A manose é encontrada na parede celular como componente da hemicelulose manano, cujo polímero apresenta ligações  $\beta$ -1,4-D-Man, estando também presente nos glucomananos e galactomananos ligados a hemicelulose (Gilbert, 2010). Os mananos surgiram cedo na evolução das plantas terrestres e são um componente relativamente abundante da parede celular de briófitas, licopodiófitas, pteridófitas e espermatófitas gimnospermas, mas presente em pequenas quantidades em angiospermas (Poppe, 2008). A manose também atua como molécula precursora na síntese de vitamina C e glicosilação de proteínas (Lukowitz *et al.*, 2001; Pastori *et al.*, 2003). A manose livre existe em plantas apenas em pequenas quantidades e é fosforilada imediatamente pela hexoquinase (*HKX*) a manose-6-fosfato e lentamente metabolizada (Herold e Lewis, 1977).

Com o intuito de se obter novas evidências sobre o papel da manose como molécula sinalizadora específica em plantas superiores, iniciamos uma análise em larga escala da capacidade da manose em promover mudanças de expressão gênica em curto prazo em *Arabidopsis thaliana*. Mostramos que a manose pode induzir mudanças rápidas e específicas de expressão gênica e que estas mudanças não são devidas a redução dos níveis de ATP ou fosfato e independentes de HXK1. Encontramos também

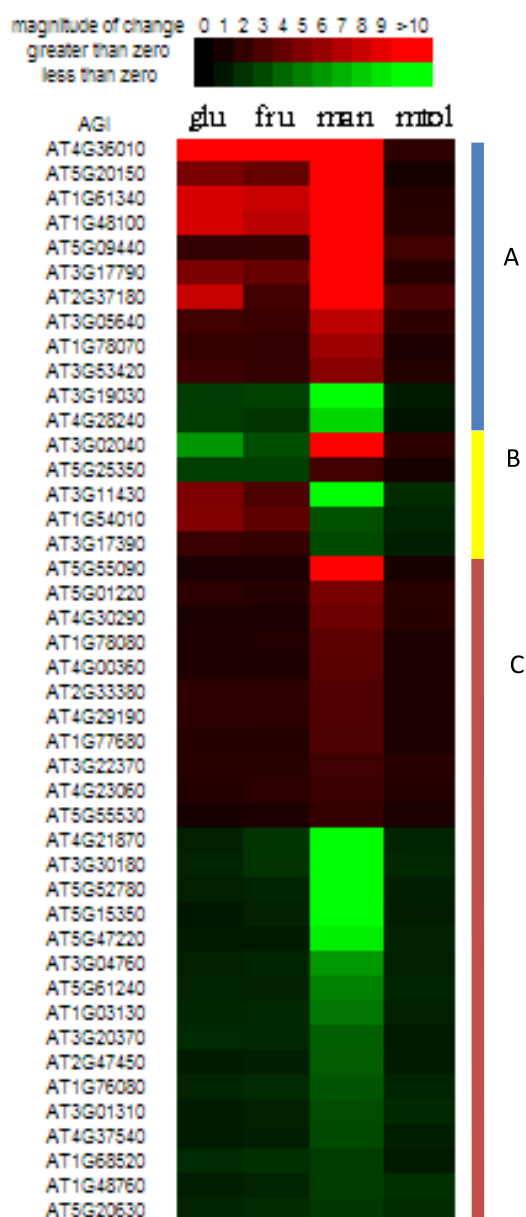
que a manose regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo da parede celular e resposta a estresses bióticos e abióticos. Mostramos que as mudanças de expressão gênica induzidas por manose envolvem principalmente mecanismos transcricionais. Os conjuntos de dados sugerem que podem existir vias específicas de sinalização ativadas por manose.

## **Resultados**

### *A manose promove mudanças de expressão gênica específica e independente de HXK1 em tratamentos de curto prazo*

Para avaliar a importância do controle da expressão gênica pela manose em *Arabidopsis thaliana* e revelar uma possível via de sinalização ativada por este açúcar, mudanças de expressão gênica em escala genômica promovidas por manose foram avaliadas usando a tecnologia de microarranjos de DNA com o sistema CATMA (<http://www.catma.org>, Foissac *et al.*, 2003). Plântulas de *Arabidopsis thaliana* (ecótipo Col-0), com seis dias de idade, foram tratadas com 110 mM de manose ou 110 mM de glicose ou 110 mM de manitol (controle osmótico) durante 2 horas para identificar genes de resposta rápida a manose. Um corte estridente de  $\log_2 \geq |-1,5|$  da razão glicose/manose foi adotado restringindo o número de genes potencialmente regulados por manose para 253. Uma comparação detalhada da expressão desses 253 genes com genes regulados por glicose em condições experimentais similares (Li *et al.*, 2006, Price *et al.*, 2004) foi realizada e permitiu, após ter eliminado os genes regulados por manitol, definir um conjunto de 100 genes potencialmente regulados por manose.

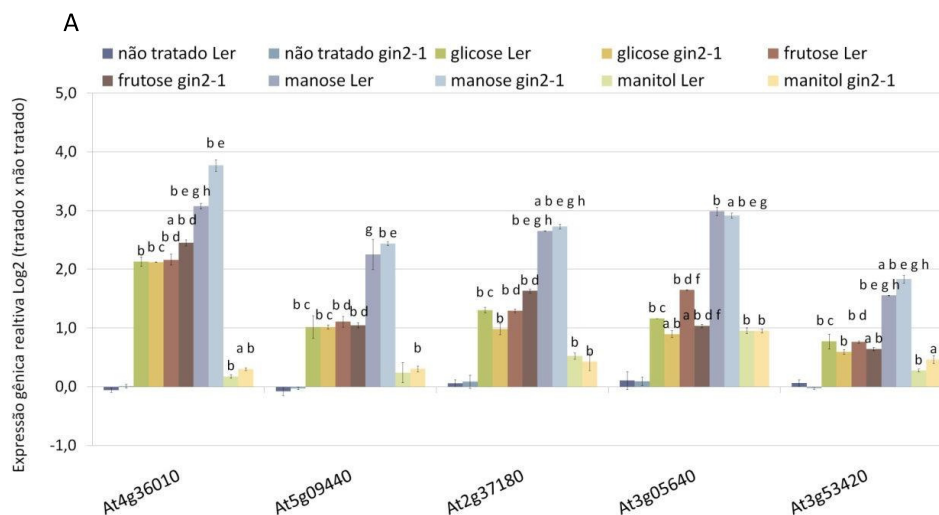
Destes 100 genes, amostramos os 75 mais diferencialmente expressos com relação a glicose e usando qRT-PCR, validamos a regulação por manose para 44 genes (Figura 1 e Tabela Suplementar 2, página 57, manuscrito). Estes genes validados foram classificados em 3 categorias: 1. Genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose; 2. Genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos e 3. Genes regulados por manose e não por glicose (Figura 1, Figura Suplementar 1, página 63, manuscrito e Tabela Suplementar 2 página 57, manuscrito).

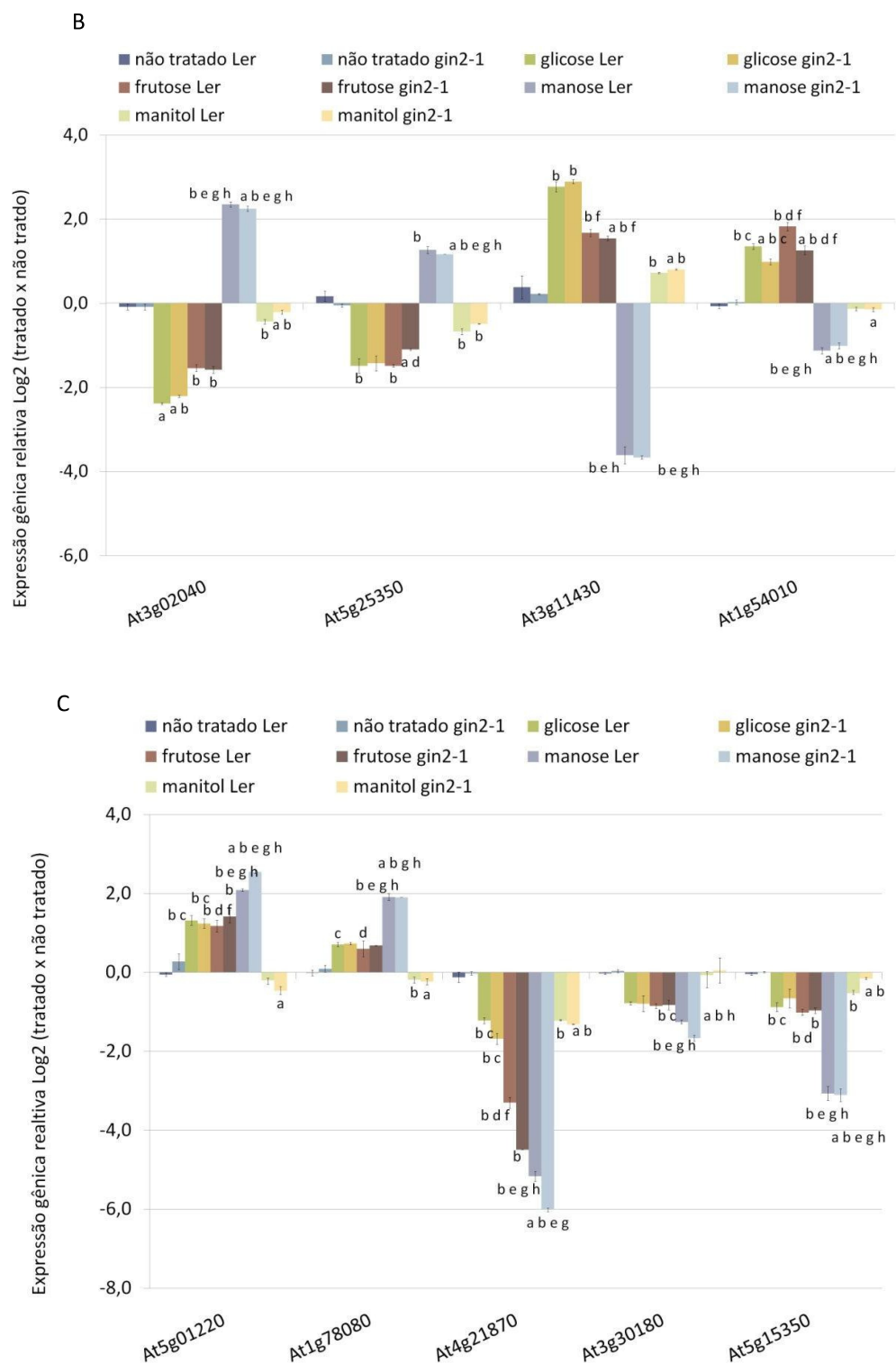


**Figure 1.** A manose promove alterações de expressão gênica. Uma análise comparativa da expressão de um conjunto de genes representativos em resposta a glicose (glu), frutose (fru), manose (man) e manitol (mtol, controle osmótico) foi realizada. *Heat map* dos genes regulados por manose. **A.** 12 genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (gli+/man++ e gli-/man--); **B.** 5 genes regulados por manose e glicose de maneira oposta (gli+/man- e gli-/man+) e **C.** 27 genes regulados por manose e não por glicose (gli0/man+ e gli0/man-). Os detalhes dos dados são mostrados na Tabela Suplementar 2 página 57 e na Figura Suplementar 1 página 63, ambas do manuscrito.

Como a manose pode ser convertida em frutose-6-fosfato (Bonin e Reiter, 2000), consideramos importante avaliar o grau de sobreposição entre a regulação por manose e frutose. Portanto, analisamos a regulação pela frutose dos 44 genes responsivos a manose. A hipótese de que a resposta a manose é específica para estes genes foi mantida, uma vez que as respostas induzidas pela frutose são semelhantes as respostas induzidas por glicose e distintas daquelas promovidas pela manose (Figura Suplementar 1, página 63 e Tabela Suplementar 2, página 57, ambas do manuscrito) reforçando a noção de regulação específica ou mais acentuada por manose.

Trabalhos anteriores demonstraram que hexoquinases (HXK) medeiam indiretamente algumas respostas fisiológicas a manose (Pego *et al.*, 1999; Ciereszko & Kleczkowski, 2002). Além disto, a HXK1 foi identificada como um sensor da glicose em arabis. Por isso, comparamos a expressão de uma amostragem de três genes de cada categoria dos genes regulados por manose em resposta a manose, glicose, frutose e manitol entre o mutante nulo para HXK1 (*gin2-1*) e o ecótipo selvagem correspondente Ler (Landsberg *erecta*) (Figura 2). Verificamos para esta amostragem de genes que a regulação pelos açúcares testados é comparável entre o tipo selvagem e o mutante *gin2-1* indicando que a HXK1 não está envolvida nas respostas destes genes em tratamentos de curto prazo por estes açúcares.





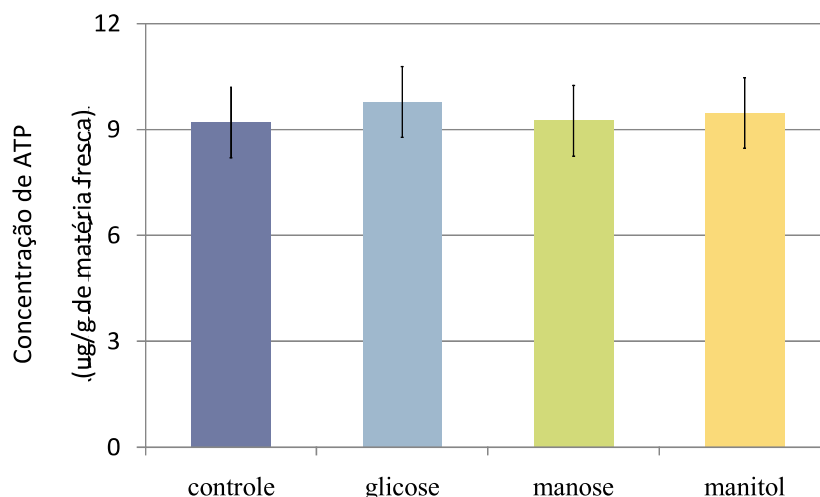
**Figura 2.** A HXK1 não está envolvida na regulação mediada por manose. Análise comparativa da expressão (qRT-PCR) de genes em resposta a glicose, frutose, manose e

manitol no mutante nulo da HXK1 (*gin2-1*) e seu correspondente genótipo selvagem Ler. **A.** Genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2 do manuscrito); **B.** Genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2 do manuscrito) e **C.** Genes regulados por manose e não por glicose (categoria 3, Tabela Suplementar 2 do manuscrito). Foram utilizadas plântulas com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/50, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose ou 110 mM de frutose ou 110 mM de manose ou 110 mM de manitol durante 2 horas. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* (Czechowski *et al.*, 2005) como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de três experimentos independentes para todos os tratamentos. Diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (mutante *gin2-1* x wt), “b” (tratado x não tratado), “c” (glicose x manitol), “d” (frutose x manitol), “e” (manose x manitol), “f” (frutose x glicose), “g” (manose x glicose) e “h” (manose x frutose) no gráfico.

*O efeito da manose sobre expressão gênica não está relacionado com estresse energético ou carência em ATP ou fosfato*

A manose pode ser fosforilada pela hexoquinase a manose-6-fosfato e a falta de metabolização eficiente da manose-6-fosfato (Herold e Lewis, 1977) poderia promover um déficit em Adenosina Trifosfato (ATP) e indiretamente em fosfato, levando a um estresse energético. Para avaliar o quanto as respostas a manose poderiam estar relacionadas a efeitos indiretos decorrentes da carência em ATP e fosfato, quantificamos o ATP em plântulas tratadas e não tratadas com 110 mM de manose, glicose e manitol por 2 h. Mostramos que não houve alterações significativas da quantidade de ATP entre os tratamentos (Figura 3), eliminando a possibilidade de efeitos indiretos devidos a esgotamento de ATP e reforçando assim a evidência da sinalização direta por manose. Numa abordagem complementar, analisamos o efeito de estresse energético e carência em fosfato sobre a expressão dos 44 genes responsivos à manose. Para tanto, analisamos a expressão destes genes em condições experimentais não submetidas a estresse energético (Figura Suplementar 2, página 65, manuscrito) e avaliamos numa amostragem de cada categoria de genes responsivos a manose o efeito

da carência de fosfato (Figura Suplementar 3, página 67, manuscrito). Nenhuma destas duas condições alterou as respostas a manose eliminando a possibilidade de efeitos indiretos relacionados à carência em fosfato ou estresse energético.



**Figura 3.** A manose não tem efeito sobre o conteúdo de ATP na planta após tratamentos de curto prazo. O ATP foi quantificado por *High Performance Liquid Chromatograph*. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Col-0, com seis dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose ou 110 mM de frutose ou 110 mM de manose ou 110 mM de manitol durante 2 horas. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de dez experimentos independentes para todos os tratamentos.

Posteriormente nos dedicamos a determinar a velocidade das mudanças de expressão dos genes regulados de forma mais acentuada ou específica por manose. Além disso, avaliamos a resposta em função da dose de manose para definir o nível de sensibilidade a manose.

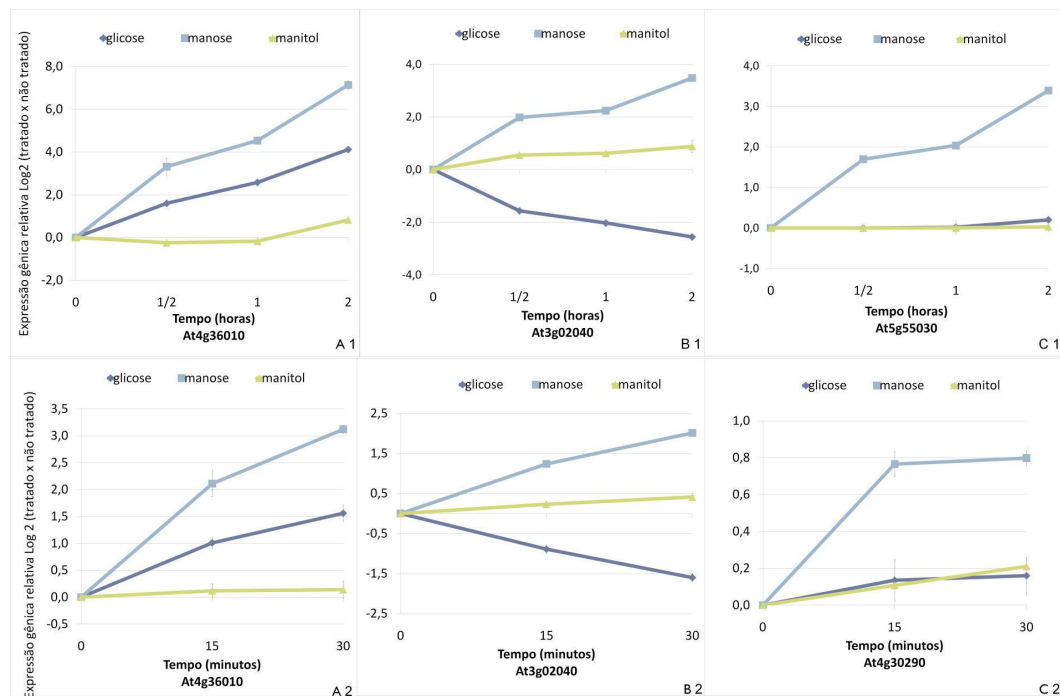
*As mudanças da expressão gênica promovidas pela manose são rápidas e também ocorrem em baixas concentrações deste açúcar*

Com o intuito de avaliar mais precisamente o potencial envolvimento da interconversão metabólica da manose/manose-6-fosfato para a glicose-6-fosfato nas regulações desencadeadas pela manose realizamos uma análise comparativa das cinéticas (0h, ½h, 1h e 2h) de regulação promovida por 110 mM de manose versus 110



mM de glicose e 110 mM de manitol (controle osmótico). Mostramos para os 44 genes validados que as diferenças de regulação por manose e glicose, observadas após 2 h de tratamento já estão iniciadas de maneira clara após 30 minutos, mantendo-se constante no decorrer da cinética de tratamento (Figura 4, Figura Suplementar 4, página 70, manuscrito). Além disso, mostramos para uma amostra de 16 genes (6 genes da categoria 1; os 5 genes da categoria 2 e 5 genes da categoria 3), que as mudanças de expressão gênica para os genes amostrados das categorias 1 e 2 e um gene da categoria 3 ocorrem tão cedo quanto 15 min após o início do tratamento pela manose (Figura Suplementar 5, página 72, manuscrito).

Os resultados sugerem que as regulações de expressão gênica promovida pela manose são independentes da sua conversão em glicose e indicam uma atuação direta e rápida da manose, levantando a possibilidade do envolvimento de um sensor da manose.



**Figura 4.** Cinética de regulação por manose versus glicose e manitol. Análise quantitativa por RT-qPCR da expressão de uma amostra representativa de genes regulados por manose. **A.** genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose, **B.** genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos, e **C.** genes regulados por manose e não por glicose. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose ou 110 mM de manitol durante ½ h, 1 hora e 2

horas (A1, B1 e C1) e durante 15 min e 30 min (A2, B2 e C2). O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* (Czechowski *et al.*, 2005) como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento (~ início do tratamento,  $t = 0$ ). Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. As cinéticas de resposta do conjunto completo dos 44 genes estão mostrados na Figura Suplementar 4 do manuscrito

Uma vez que as mudanças de expressão gênica ocorrem de forma rápida após o tratamento com 110 mM de manose, procuramos avaliar também qual seria a sensibilidade destas alterações de expressão a concentrações menores de manose. Para tanto, uma análise da regulação da expressão gênica em resposta a diferentes concentrações de manose (50, 20, 10, 5 e 1mM) e nos tempos de tratamento de 1/2h e 2h (Figura Suplementar 6, página 74 e Figura Suplementar 7, página, ambas do manuscrito) para uma amostra de 17 genes dos 44 genes validados. Mostramos que 1 mM de manose é quase tão eficiente quanto 50 mM para induzir mudanças rápidas de expressão gênica, sugerindo uma alta sensibilidade a este açúcar. Interessantemente, 1 mM de glicose também foi suficiente para promover mudanças de expressão gênica significativas.

#### *Regulação por manose é preferencialmente transcricional*

A fim de avaliar o quanto as respostas à manose refletem regulações transcricionais e/ou da estabilidade dos transcritos, analisamos as respostas a esta hexose na presença de cordicepina (3'-deoxiadenosina) uma molécula análoga ao ATP que quando incorporada interrompe a polimerização da cadeia de RNAm (Gutiérrez *et al.*, 2002). Definimos as mudanças do perfil de transcritos em resposta a manose e glicose em condições de inibição transcricional (incubação com 100  $\mu$ g/mL de cordicepina iniciado 1h antes da adição das hexoses e mantido durante o tratamento). A eficiência da inibição da transcrição pela cordicepina foi verificada a partir da comparação da expressão do gene *At4g36010* em plântulas tratadas apenas com manose e em plântulas tratadas com cordicepina e manose. A expressão de *At4g36010* foi induzida 116 vezes e 0,5 vezes por manose na ausência e presença de cordicepina,

respectivamente. Este dado indica que o tratamento com cordicepina reduziu eficientemente a transcrição, e que a regulação de *At4g36010* é essencialmente transcricional (Tabela Suplementar 3, página 59, manuscrito).

O efeito da manose sobre a acumulação de RNAm dos 15 genes regulados por manose mostrou ser essencialmente transcricional, sendo 10 dos genes regulados unicamente por mudanças na taxa de transcrição e os outros 5 genes resultado da combinação entre alterações nas taxas de transcrição e possível modulação da estabilidade do RNAm.

#### *Análise das redes de regulação gênica envolvendo genes regulados por manose*

Os 44 genes regulados por manose foram classificados de acordo com as categorias do *Gene Ontology* (Figura Suplementar 8, página 82, manuscrito). As categorias enriquecidas sugerem que o sinal manose regula genes envolvidos com vias de energia e transporte de elétrons, estímulos abióticos e bióticos e resposta a estresse, além de genes localizados no plastídeo.

Ainda na tentativa de elucidar quais processos fisiológicos poderiam ser influenciados pelo sinal manose, realizamos uma análise de quais genes são freqüentemente coexpressos com os genes regulados por manose. Para isso, utilizamos redes de coexpressão (Mutwill *et al.*, 2011) e verificamos quais grupos possuem um maior enriquecimento dos genes que demonstramos serem regulados por manose.

Identificamos 7 grupos de coexpressão que apresentam pelo menos dois genes regulados por manose. Os genes contidos em cada grupo de coexpressão foram classificados de acordo com o processo biológico no qual estão envolvidos baseado nas categorias descritas no MapMan (<http://www.bar.utoronto.ca/>). (Tabela Suplementar 4, página 61 e Figura Suplementar 9, página 83, ambas do manuscrito).

## **Discussão**

No presente trabalho mostramos que manose pode promover respostas rápidas e específicas na expressão gênica de *Arabidopsis thaliana*. A partir da análise em escala genômica das mudanças induzidas por manose e glicose na expressão gênica, chegamos a um conjunto de 44 genes que são regulados por manose de forma específica ou mais acentuados em relação à glicose e frutose.

O potencial da manose como molécula reguladora tem sido abordado em experimentos de longo prazo, avaliando o efeito da manose sobre a germinação (Pego *et*

*al.*, 1999) e sobre o desenvolvimento de raízes (Baskin *et al.*, 2001). Uma vez que a manose é fosforilada pela HXK, mas pobremente metabolizada (Herold e Lewis, 1977), seus efeitos sobre o estado energético também tem sido abordados. Foi demonstrado que a inibição da germinação por manose não é resultante da redução dos níveis de ATP ou seqüestro de fosfato pela manose em experimentos de longo prazo (Pego *et al.*, 1999). Em nosso trabalho, mostramos que em tratamentos de curto prazo com manose (2 h) não ocorre depleção de ATP e que a regulação da expressão gênica por manose independe da presença ou ausência de fosfato no meio de cultivo, sugerindo que as mudanças de expressão gênica deflagradas pela manose não seriam resultado de estresse energético nem de carência em fosfato, mas sim uma resposta específica a manose. Também mostramos que as respostas a manose em tratamentos de 2 horas não dependem de HXK1, o sensor de glicose, uma vez que após o tratamento com manose os níveis de expressão dos genes amostrados dos 44 genes são semelhantes entre o mutante nulo *gin2-1* (nulo para *HXK1*) e seu respectivo ecótipo selvagem Ler.

Nossos resultados sugerem que as regulações de expressão gênica promovida pela manose em curto período de tempo provavelmente não dependem da sua conversão metabólica em glicose-6-fosfato ou frutose-6-fosfato, uma vez que os tratamentos com estes açúcares não são capazes de reproduzir o sentido (indução ou repressão) e/ou a intensidade das respostas observadas após o tratamento com manose. Além disso, numa amostra de 16 dos 44 genes responsivos a manose verificamos que em 11 genes as mudanças de expressão gênica já são significativas após 15 minutos de tratamento com manose e numa amostra de 17 dos 44 genes responsivos a manose, 1 mM deste açúcar é quase tão eficiente quanto 50 mM para induzir mudanças rápidas de expressão gênica. A rapidez (15-30 minutos) e a sensibilidade (1 mM) das respostas a manose, junto ao dado de que a manose não é eficientemente transportada para o interior da célula (Klein e Stitt, 1998) levantam a possibilidade do envolvimento de um sensor da manose na parte externa da célula. Além disso, os resultados gerados sugerem a existência de duas vias de respostas/sinalização à manose. Tal hipótese é baseada na observação de que nossas condições experimentais apresentaram três categorias principais de resposta a manose, sendo a primeira correspondente a genes que respondem exclusivamente a manose (indução ou repressão), a segunda incluindo genes que respondem de maneira mais acentuada a manose, ou seja, responde a manose, glicose e frutose no mesmo sentido, mas não com a mesma intensidade de respostas, sendo a manose mais eficiente na indução ou repressão e a terceira que inclui genes regulados por manose, glicose e

frutose de maneira oposta. É tentador sugerir que sensores com afinidade diferentes para manose e outros hexoses possam mediar estas respostas diferenciais.

O tratamento com cordicepina apresentou uma predominância de regulação transcricional promovida por manose sugerindo a existência de fatores de transcrição mediando as mudanças de expressão gênica deflagradas por este sinal e, conseqüentemente, motivos associados nas regiões promotoras dos respectivos genes. Futuras análises de motivos conservados nas regiões promotoras dos genes regulados transcricionalmente por manose poderão fornecer pistas sobre quais fatores de transcrição estariam associados.

O antagonismo nos mecanismos de regulação envolvidos nas respostas a manose e glicose, principalmente no caso dos genes que respondem de maneira oposta aos tratamentos com glicose ou manose, sugere que as vias de transdução de sinal ativadas por estes sinais são distintas (Tabela Suplementar 3, página 59, manuscrito). Um caso interessante é aquele que envolve a regulação oposta entre glicose e manose do gene *EBF2* (*EIN3-binding F-Box protein 2 - At5g25350*), que codifica uma proteína do tipo F-Box responsável pela degradação do fator de transcrição EIN3 (*Ethylene insensitive 3*) na ausência de etileno (Guo & Ecker 2003). O fator de transcrição EIN3 é um regulador positivo das respostas induzidas por etileno que é rapidamente degradada na ausência deste hormônio, sendo esta degradação acelerada pela presença de glicose (Yanagisawa *et al.*, 2003). A indução transcricional de *EBF2* pela manose sugere um efeito deste açúcar sobre a sinalização de etileno que seria distinto da glicose, a qual reprime a expressão de *EBF2*. Curiosamente, glicose acelera a degradação de fator de transcrição EIN3, mas reprime a acumulação de RNAm de *EBF2* (Yanagisawa *et al.*, 2003). O efeito ambíguo da glicose sobre a expressão de *EBF2* possivelmente reflete alguma alça de regulação que ajusta a intensidade da resposta a etileno, glicose.

Levando em consideração que a manose poderia representar um sinal genuíno em plantas, iniciamos uma análise detalhada dos 44 genes regulados por manose com o objetivo de tentar elucidar em quais processos fisiológicos a sinalização por manose poderia estar envolvida. Utilizando bancos de dados de expressão públicos (Genevestigator, Zimmerman *et al.*, 2004), as categorias de GO (*Gene Ontology*), TAIR (<http://www.arabidopsis.org>), BAR e MapMan, (<http://www.bar.utoronto.ca/>). Procuramos também identificar em quais possíveis redes de regulação a manose estaria envolvida utilizando grupos (*clusters*) de coexpressão, AraNet (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/aranet>; Mutwill *et al.*, 2011).

De acordo com os critérios do GO, dentre os 44 genes regulados por manose há um enriquecimento de genes relacionados a processos de conversão de energia (cadeia transportadora de elétrons e vias de produção de energia) e respostas a estresses bióticos e abióticos. Utilizando as redes de coexpressão (Mutwill *et al.*, 2011) verificamos que 7 grupos possuem um maior enriquecimento dos genes que demonstramos serem regulados por manose.

Os dados obtidos a partir da classificação de acordo categorias descritas no MapMan sugerem que as regulações promovidas pela manose estariam relacionadas, ao menos parcialmente, a metabolismo de lipídeos, hormônios e parede celular. Mais especificamente, a repressão significativa do gene Brassinosteroid-6-oxidase 2 (BR6OX2/At3g30180) do citocromo p450 que catalisa a última reação da produção de brassinolide (Nomura *et al.*, 2005), assim como a indução do gene *EBF2*, *EIN3-binding F-Box protein* (EBF2/At5g25350) de um regulador chave da sinalização do etileno (Binder *et al.*, 2007) exemplificam o potencial impacto da manose sobre os vários aspectos do crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses mediados pelos dois hormônios brassinosteróides e o etileno.

Um resultado interessante está relacionado ao gene *Constans-like 6* (COL6; At1g68520), reprimido por manose ( $\log_2 = -1,27$ ) e pertencente ao grupo 19, o qual também inclui outros dois genes regulados por manose (At5g58720 e At3g04760) (Tabela Suplementar 3 do manuscrito). Uma possibilidade é que o fator de regulação da transcrição COL6 poderia regular diretamente a transcrição destes genes, uma vez que At5g58720 e At3g04760 possuem o motivo CCAAT em suas regiões promotoras e são coexpressos com COL6 em diversas condições. Os fatores de transcrição do tipo *Constans-like* não possuem motivos específicos de interação com o DNA, mas o fazem por meio de outras proteínas classificadas como *CCAAT binding factors* (Ben-Naim *et al.*, 2006), as quais ligam-se aos motivos CCAAT e medeiam a interação de *constans-like* fator de transcrição com o DNA.

Em conclusão, nossas análises preliminares dos perfis de expressão gênica em resposta a manose e glicose evidenciaram que manose pode atuar na regulação de genes de maneira restrita, mais acentuada ou mesmo de maneira oposta à glicose sugerindo a existência de pelo menos uma via de sinalização mais dedicada a manose. Em conjunto, os dados descritos até o momento estabelecem uma correlação entre manose, etileno, resposta a patógeno, ABA, brassinosteróides e estresse osmótico. No entanto, a relação

exata entre esses sinais e a sinalização por manose precisa agora ser investigada mais detalhadamente.

## **Material e métodos**

### *Manutenção do material vegetal, condições de crescimento e tratamentos*

Para a multiplicação dos genótipos, sementes de *Arabidopsis thaliana* (Ecótipos Col-0 e Ler) e dos mutantes *aba insensitive*, *abi4-1* (Finkelstein, 1994) e *gin2-1* (*glucose insensitive2*) (Jang *et al.*, 1997), obtidas do *Arabidopsis Biological Resource Center*, foram crescidas em vasos contendo terra (substrato para cultivo de ornamentais Holambra Substrato) e vermiculita (vermiculita expandida Plantmax) na proporção de 2:1, respectivamente. Para cultivo *in vitro* em meio líquido, 10 mg de sementes foram esterilizadas (etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito 40% por 20 minutos sob agitação, seguido por quatro lavagens com água milli-Q) e incubadas a 4°C por 48h, no escuro, para quebra de dormência. O fotoperíodo utilizado foi de 16 horas de luz artificial diária (lâmpada fluorescente luz do dia e grolux, Silvania) para crescimento em placa e em vasos ou luz contínua para crescimento em meio líquido e temperatura de 22°C.

Para as análises de qRT-PCR sementes de *Arabidopsis thaliana* (Ecótipo Col-0) foram semeadas em 10 mL de meio MS líquido (Murashige & Skoog, 1962) modificado (MS/2) (Silveira *et al.*, 2007), correspondente a 2,1g/L de sais MS (MS salt mixture, Invitrogen), acrescido de 4,4mL/L de tampão MES 3mM, pH 5,7 (Invitrogen) e ajustado a 0,3% de glicose (Sigma), enquanto que o Ecótipo Ler e o mutante *gin2-1* (*glucose insensitive2*) (Jang *et al.*, 1997) foram semeados em 10 mL de meio MS líquido (Murashige & Skoog, 1962) modificado (MS/50) cultivadas durante 5 dias em luz contínua de baixa intensidade (lâmpadas fluorescente luz do dia e grolux, Silvania) e temperatura de 22°C, sobre agitação orbital de 70 rpm. No sexto dia após a germinação, o meio de cultura foi trocado para meio MS/2 ou MS/50 sem glicose. Após 24 h, plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, manose ou manitol e amostras dos genótipos foram coletadas após 2 horas de tratamento. Para as análises relacionadas à sinalização da frutose nos genes diferencialmente expressos do nosso experimento os mesmos procedimentos foram realizados, porém no sexto dia após a germinação as plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, frutose, manose ou manitol por 2 horas (Qian *et al.*, 2004; Jeter *et al.*, 2004; Goutier *et al.*, 2010).

Para avaliarmos a expressão gênica por manose em condições experimentais não submetidas a estresse energético utilizamos as mesmas condições descritas acima,

porém sem privação de açúcar no sexto dia após germinação e sob luz contínua com quantidade em torno de  $100 - 150 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . Para avaliarmos a principal causa do efeito inibitório da manose pelo acúmulo de manose-6-fosfato e conseqüente elevação do seqüestro de Pi e ao estresse energético (Herold e Lewis, 1977) quantificamos a expressão gênica a partir de mRNA de plântulas crescidas em condições experimentais sem fosfato, ou seja, em meio MS líquido (Murashige & Skoog, 1962) modificado (MS/2 sem fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) sendo mantida as demais condições experimentais.

Para verificarmos a inibição da transcrição com cordicepina (Sigma – Número de catálogo C3394) as mesmas condições experimentais descritas acima foram mantidas porém no sexto dia, as plântulas (ecótipo Col-0) receberam o tratamento de  $100 \mu\text{g/mL}$  de cordicepina, por 1 hora antes dos tratamentos com  $110 \text{ mM}$  de glicose ou  $110 \text{ mM}$  de manose durante 2 horas. Posteriormente, alguns genes foram selecionados para o acompanhamento dos níveis de mRNA após o tratamento com a cordicepina (Tabela Suplementar 4).

#### *Análises de quantificação por HPLC*

Para dosar os níveis de adenosina trifosfato (ATP) nas através da determinação por HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*) as condições experimentais foram mantidas conforme descritas acima e posteriormente submetidas à extração por PCA (ácido perclórico) para posterior quantificação (Liu, *et al.*, 2006).

#### *Extrações de RNA e síntese de DNA complementar*

A extração de RNA total das plântulas utilizadas nos experimentos de expressão gênica foi realizada de acordo com a técnica descrita anteriormente (Logemann *et al.* 1987) com modificações. As plântulas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O tecido foi macerado em cadinho com nitrogênio líquido e então homogeneizado em  $0,9 \text{ mL}$  de tampão de extração Guanidina HCl  $8 \text{ M}$  (Ultra Pure Guanidine Hydrochloride, Invitrogen), Tris HCl  $50 \text{ mM}$ , pH  $8,0$  (Invitrogen), EDTA  $20 \text{ mM}$ , pH  $8,0$  (Ultra Pure EDTA, Invitrogen) e  $\beta$ -Mercaptoetanol  $50 \text{ mM}$  (Vertec). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose  $1\%$  (Invitrogen) contendo  $5\%$  de formaldeído  $37\%$  (Merck) como agente denaturante (Sambrook *et al.*, 1989) e em tampão MOPS  $1\times$  (MOPS  $0,4 \text{ M}$ , acetato de sódio  $0,1 \text{ M}$  e EDTA  $0,01 \text{ M}$ , pH  $7$ ) e sua quantificação foi feita através de absorbância medida no espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare). Quando necessário o RNA foi tratado



com DNase (Turbo DNA Free; Ambion) seguindo as instruções do fabricante. Para síntese de DNA complementar (cDNA), a reação de transcrição reversa foi realizada com 1,5 µg de RNA (volume final de 12,5 µL) usando ImPromII™ Reverse Transcriptase (Promega) e oligo(dT)<sub>18</sub> de acordo com as instruções do fabricante.

Para os experimentos de microarranjos de DNA, o RNA total de 150 mg das plântulas utilizadas nos experimentos foi extraído com *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) seguindo-se as recomendações do fabricante. As análises de microarranjos foram desenvolvidas no laboratório de Genômica Funcional de Arabidopsis do Dr. Jean Pierre Renou (Unité de Recherche en Génomique Végétale, INRA, Evry, França – <http://www.versailles.inra.fr/urgv/>). Os protocolos podem ser acessados em <http://www.evry.inra.fr/public/projects/transcriptome/Protocols.html>. As análises estatísticas dos dados foram feitas conforme descritos anteriormente (Lurin *et al.*, 2004). A normalização dos valores brutos de intensidade foi realizada pelo algoritmo de Lowess (Yang *et al.*, 2002).

Para analisar detalhadamente os genes diferencialmente expressos para cada comparação, usamos informações de microarranjos Affymetrix disponíveis no programa Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmerman *et al.*, 2004), a classificação destes genes foi feita segundo critérios do Gene Ontology (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>; BAR, <http://www.bar.utoronto.ca/>) e MapMan (<http://mapman.gabipd.org/web/guest>). O cruzamento entre os dados obtidos foi conduzido com o programa Gene List Venn Diagram (<http://www.bioinformatics.org/gvenn/vennresults.php>) e o agrupamento hierárquico dos genes realizado utilizando o programa de Genesis 1.0 (<http://genome.tugraz.at>). Para controlar o número de falsas descobertas, aplicamos o critério de FDR (*False Discovery Rate*) com 5% de significância, ou seja, cada lista de termos GO que cumpre o critério  $p\text{-value} \leq 0,05$  espera-se que contenha 5% que são falsas descobertas e, portanto foram desconsideradas.

#### *RT-PCR e Real-Time PCR (qRT-PCR)*

As condições da PCR semiquantitativa foram realizadas basicamente conforme descrito por Silveira *et al.* (2007). Para a realização de qRT-PCR o gene *Pdf2* (*At1g13320*) foi usado como gene de referência (Czechowski *et al.*, 2005) e para controles dos tratamentos com glicose, manose e frutose foram usados: *xyloglucan endotransglycosylase-related protein - XTR-7* (*At4g14130*), *chlorophyll A/B-binding*

*protein 2 – CAB2 (At1g29920)* e *ethylene response factor -2 - ERF2 (At5g47220)* (Price *et al.*, 2004).

*Primers* para qRT-PCR foram desenhados seguindo os seguintes critérios: (1)  $T_M$ : 60°C, (2) tamanho aproximado do *amplicon* 150 pb, (3) *primers* de aproximadamente 20 nucleotídeos, (4) conteúdo de guanina-citosina entre 35% e 55% e (5) um iniciador abrangendo uma junção éxon-éxon para não haver a amplificação de DNA genômico contaminante. No caso de genes sem intron, usou-se tratamento com DNase (Turbo DNA Free; Ambion) e um controle sem transcriptase reversa foi incluído. Na Tabela Suplementar 1 (página 54, manuscrito) encontra-se a descrição dos oligonucleotídeos utilizados. A especificidade dos *primers* foi checada pela análise do desempenho da curva de dissociação após 40 ciclos e também através de análise de *amplicons* provenientes de RT-PCR semi-quantitativa. As reações foram realizadas no sistema de detecção ABI PRISM 7500 HT (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green como detector. As reações foram montadas em 12,5 µL de Master Mix SYBR Green (Invitrogen), 1 µL de ROX (referência passiva), 200 nM de cada *primer* e cDNA, totalizando 25 µL de reação. As condições utilizadas nas reações foram: um passo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Curvas de dissociação foram feitas após cada reação através do aquecimento de 60° para 95°C, subindo 1°C por minuto. Este procedimento serviu para comprovar a ausência de contaminação ou da formação de *primers-dimers* nas reações. A expressão gênica foi calculada pelo método Delta-Delta *cycle threshold* (Livak e Schmittgen, 2001). A linha de base foi coletada entre os ciclos 3 e 15, sendo todas as amplificações analisadas utilizando o *threshold*  $R_n$  em 0,02 para a obtenção dos valores de Ct. O nível de expressão de cada gene foi quantificado em relação ao controle não tratado, utilizando como padronização o gene controle endógeno *Pdf2* (Czechowski *et al.*, 2005). Os detalhes dos dados estão mostrados na Tabela suplementar 2 do manuscrito e na Figura Suplementar 1 do manuscrito e foram analisados usando a ferramenta HeatMapper do Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics (<http://bar.utoronto.ca/>).

#### *Análise estatística*

Todas as comparações estatísticas foram feitas usando o Teste *t* de *Student*, fixando um limite  $P \leq 0,05$ .

### *Análise comparativa de co-expressão*

Os genes validados foram analisados usando a ferramenta AraNet (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/aranet>; Mutwill *et al.*, 2011) que se baseia na plataforma de análise de co-expressão e pelo software Cytoscape 2.8.2. (Shannon *et al.*, 2003).

### **Financiamento**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (bolsa de doutorado 2008/10917-0) e pelo programa BIOEN (2008/52071-0).

### **Referências**

- Akutsu T, Miyano S, Kuhara S. 2000. Algorithms for identifying Boolean networks and related biological networks based on matrix multiplication and fingerprint function. *Journal of Computational Biology*, 7(3-4): 331-343.
- 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*, 15; 14(16):2085-96.
- Arkin A, Ross J, McAdams HH. 1998. Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage-infected *Escherichia coli* cells. *Genetics*, 149: 1633-1648.
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448 (7156):938-42.
- Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR. 2006. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, 141: 988–999.
- Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E. 2006. The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *The Plant Journal*, 46(3):462-76.
- Binder BM, Walker JM, Gagne JM, Emborg TJ, Hemmann G, Bleecker AB, Vierstra RD. 2007. The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*. 19 (2):509-23.
- Bonin CP, Reiter WD. 2000. A bifunctional epimerase/reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the de novo synthesis of GDP-L-fucose in

- Arabidopsis*. The Plant Journal, 21:445-454.
- Brazhnik P, de la Fuente A, Mendes P. 2002. Gene networks: how to put the function in genomics. TRENDS in Biotechnology, 20(11):467-472.
- 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 Physiology, 129(4):1533-43.
- Brocard-Gifford I, Lynch TJ, Garcia ME, Malhotra B, Finkelstein PR. 2004. The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. Plant Cell, 16(2):406-21.
- Brouquisse R, Evrard A, Rolin D, Raymond P, Roby C. 2001. Regulation of Protein Degradation and Protease Expression by Mannose in Maize Root Tips Pi Sequestration by Mannose May Hinder the Study of Its Signaling Properties. Plant Physiology, 125: 1485–1498.
- Buckeridge MS, Tiné MAS, Dos Santos HP, De Lima DU. 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. R. Bras. Fisiol. Veg., 12: 137-162.
- Callard D, Axelos M, Mazzolini L. 1996. Novel Molecular Markers for Late Phases of the Growth Cycle of *Arabidopsis thaliana* Cell-Suspension Cultures Are Expressed during Organ Senescence. Plant Physiology, 11 (2): 705-715.
- Cao J. 2012. The Pectin Lyases in *Arabidopsis thaliana*: Evolution, Selection and Expression Profiles. PLoS ONE 7(10): e46944. doi:10.1371/journal.pone.0046944.
- Cheng Y, Zhou W, El sheery NI, Peters C, Li M, Wang X, Huang J. 2011. Characterization of the *Arabidopsis* glycerophosphodiesterphosphodiesterase (GDPD) family reveals a role of the plastid-localized AtGDPD1 in maintaining cellular phosphate homeostasis under phosphate starvation. The Plant Journal, 66: 781–795.
- Ciereszko I, Kleczkowski LA. 2002. Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. Plant Physiol Biochem 40: 907–911.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Schible W.R. 2005 Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. Plant Physiology 139: 5-17.
- Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnov N, Last RL. 1999. Genetic

- evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4198-4203.
- Conklin PL, Gatzek S, Wheeler GL, Dowdle J, Raymond MJ, Rolinski S, Isupov M, Littlechild JA, Smirnov N. 2006. *Arabidopsis thaliana VTC4* Encodes L-Galactose-1-P Phosphatase, a Plant Ascorbic Acid Biosynthetic Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 23 (281):15662–15670.
- Cheng YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129:661–677.
- Cho YH, Yoo SD. 2011. Signaling Role of Fructose Mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 7 (1): e1001263.
- Corrêa LGG, Riaño-Pachón DM, Schrago CG, 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(8):e2944.
- Corruzi GM, Zhou L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging ‘matrix effects’. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:247–253.
- D’Haeseleer P, Wen X, Fuhrman S, Somogyi R. 1999. Linear modeling of mRNA expression levels during CNS development and injury. *Pac. Symp. Biocomput.*, 3: 41–52.
- Dekkers BJ, Schuurmans JA, Smeekens SC. 2004. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 218(4):579-88.
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnov N. 2007. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactosephosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal*, 52(4):673-89. Erratum in: *The Plant Journal*, 2008, 53(3):595.
- Dojer N, Gambin A, Mizera A, Wilczyński B, Tiuryn J. 2006. Applying dynamic Bayesian networks to perturbed gene expression data. *BMC bioinformatics*, 7(1):249.
- Duan K, Yi K, Dang L, Huang H, Wu W, Wu P. 2008. Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *The Plant Journal*, 54: 965–975.
- El Samad H, Khammash M, Petzold L, Gillespie D. 2002. Stochastic Modeling of Gene Regulatory Networks. *Int. Journal of Robust and Nonlinear Control*, 00:1-6.

- Farrar JF, Minchin PEH, Thorpe MR. 1995. Carbon import into barley roots: effects of sugars and relation to cell expansion. *J. Exp. Bot.*, 46: 1859–1865.
- Finkelstein RR. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal*, 5:765-771.
- Foissac S, Bardou P, Moisan A, Cros M.J, Schiex T. 2003. EUGENE'HOM: A generic similarity-based gene finder using multiple homologous sequences. *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3742-5.
- Forde BG. 2002. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 53:203–224.
- Francia P, Simoni L, Cominelli E, Tonelli C, Galbiati M. 2008. Gene trap-based identification of a guard cell promoter in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.*, (9):684-6.
- Friedman N, Linial M, Nachman I, Pe'er D. 2000. Using Bayesian Networks to Analyse Expression Data. *Journal of Computational Biology*, 7: 601-620.
- Gao Y, Badejo AA, Shibata H, Sawa Y, Maruta T, Shigeoka S, Page M, Smirnoff N, Ishikawa T. 2011. Expression analysis of the VTC2 and VTC5 genes encoding GDP-L-galactosephosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 75(9): 1783-8.
- Garrard LA, Humphreys TE. 1969. The effect of d-mannose on sucrose storage in the corn scutellum: evidence for two sucrose transport mechanisms. *Phytochemistry*, 8: 1065–1077.
- Gibson S. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin Plant Biology*, 8(1):93-102.
- Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell* 6: 761–772.
- Goutier W, Spaans PA, van der Neut MAW, McCreary AC, Reinders JH. 2010. Development and application of an LC–MS/MS method for measuring the effect of (partial) agonists on cAMP accumulation in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 188:24–31.
- Gutiérrez RA, Lejay LV, Dean A, 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(1):R7.
- Halford NG, Purcell PP, Grahame D, Hardie DG. 1999. Is hexokinase really a sugar

- sensor in plants? Trends in Plant Science, (4): 117-120.
- Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Pete'tot J, Somerville C, Poirier Y. 2002. Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. Plant Cell, 14: 889-902.
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks M, Smeeckens S. 2008. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. The Plant Journal, 53(6):935-949.
- Harris GC, Cheesbrough JK, Walker DA. 1983. Effects of mannose on photosynthetic gas exchange in spinach leaf discs. Plant Physiology, 71: 108-111.
- Harris GC, Gibbs PB, Ludwig G, UnA, Sprengnether M, Kolodny N. 1986. Mannose metabolism in corn and its impact on leaf metabolites, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence. Plant Physiology, 82: 1081-1089.
- Hasty J, McMillen D, Isaacs F, Collins JJ. 2001. Computational studies of gene regulatory networks: in numero molecular biology. Nature Reviews Genetics, 2: 268-279.
- Gilbert, HJ. 2010. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. Plant Physiology, vol. 153 no. 2 444-455.
- Hartemink A, Gifford DK, Jaakkola TS, Young RA. 2001. Using Graphical Models and Genomic Expression Data to Statistically Validate Models of Genetic Regulatory Networks. Pacific Symposium on Biocomputing, 6: 422-433.
- Herold A, Lewis DH. 1977. Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. New Phytol. 79:1-40.
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeeckens S. 2000. The *Arabidopsis* *Sucrose uncoupled-6* gene is identical to *Abscisic acid insensitive-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. The Plant Journal, 23 (5):577-585.
- Imoto S, Tomoyuki H, Goto T, Tashiro K, Kuhara S, Miyano S. 2004. Combining microarrays and biological knowledge for estimating gene networks via bayesian networks. Journal of Bioinformatics and Computational Biology, 11 (35): 77-98.
- Jang JC, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. Plant Cell, 6: 1665-1679.
- Jang JC, Sheen J. 1997a. Sugar sensing in higher plants. Trends Plant Sci., 2:208-214.
- Jang J.-C, León P, Zhou L, Sheen J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell, 9: 5-19.

- Jeter CR, Tang W, Henaff E, Butterfield T, Stanley J, Roux SJ. 2004. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in Arabidopsis. *The Plant Cell* Vol. 16:2652–2664.
- Johnson KL, Jones BJ, Bacic A, Schultz CJ. 2003. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology*, 133:1911-1925.
- Johnston M, Kim JH. 2005. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry Society Transcripts*, 33: 247-252.
- Khan JA, Wang Q, Sjölund RD, Schulz A, Thompson GA. 2007. An early nodulin-like protein accumulates in the sieve element plasma membrane of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143: 1576–1589.
- Khuri S, Bakker FT, Dunwell JM. 2001. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse super family of proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 18:593–605.
- Kime MJ, Ratcliffe RG, Loughman BC. 1982. The application of <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance to higher plant tissue. *J. Exp. Bot.*, 33: 670–681.
- Klein D, Stitt M. 1998. Effects of 2-deoxyglucose on the expression of *rbcS* and the metabolism of *Chenopodium rubrum* cell cultures. *Planta*, 205: 223-234.
- Kobe B, Kajava AV. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 725–732.
- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 47:509-540.
- Laing WA, Bulley S, Wright M, Cooney J, Jensen D, Barraclough D, Mac Rae E. 2004. A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(48):16976–16981.
- 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. *The Plant Journal*, 23(5):587-96.
- Larkindale J, Vierling E. 2008. Core Genome Responses Involved in Acclimation to High Temperature. *Plant Physiology*, 146: 748–761.
- León P, Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science*, 8(3):110-116.
- Li Y, Lee K, Walsh S, Smith C, Bevan M. 2006. Establishing glucose- and ABA-



- regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Research*, 16:414-427.
- Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, Steven G, Clarke SG. 2007. Arabidopsis VTC2 encodes a GDP-L-galactosephosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *J. Biol. Chem.*, 282(26):18879-85.
- Liu H, Jiang Y, Luo Y, Jiang W. 2006. A Simple and Rapid Determination of ATPADP and AMP Concentrations in Pericarp Tissue of Litchi Fruit by High Performance Liquid Chromatography. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(4) 531–534.
- Loughman BC, Ratcliffe RG, Southon TE. 1989. Observations of the cytoplasmic and vacuolar orthophosphate pools in leaf tissues using in vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *FEBS Lett*, 242: 279–284.
- Lukowitz W, Nickle TC, Meinke DW, Last RL, Conklin PL, Somerville CR. 2001. Arabidopsis *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyl transferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98 (5):2262-7.
- Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Ret ML, 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(8):2089-103.
- Liu T, Aung K, Tseng C, Chang T, Chen Y, Chiou T. 2011. Vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  Transport Activity Is Required for Systemic Phosphate Homeostasis Involving Shoot-to-Root Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156: 1176–1189.
- Matheson NK, Myers DK. 1998. Inhibition of germination by glucose analogues that are hexokinase substrates. *Phytochemistry*, 48: 241–248.
- Matiolli CC, Tomaz JP, Duarte GT, Prado FM, Del Bem LEV, Silveira AB, Gauer L et al. 2011. The Arabidopsis bZIP gene *AtbZIP63* is a sensitive integrator of transient ABA and glucose signals. *Plant Physiology*, 157: 692-705.
- Mestl T, Plahte E, Omholt SW. 1995. A mathematical framework for describing and analysing gene regulatory networks. *J. Theor. Biol.*, 176:291–300.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W, Liu Y, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient light and hormonal signaling.

- Science, 300(5617):332-336.
- Moler EJ, Radisky DC, Mian I S. 2000. Integrating naive Bayes models and external knowledge to examine copper and iron homeostasis in *S. cerevisiae*. *Physiol. Genom.*, 4:127-135.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murphy K, Mian S. 1999. Modelling Gene Expression Data using Dynamic Bayesian Networks. Computer Science Division University of California Life Sciences Division Lawrence Berkeley National Laboratory Berkeley 12p.
- Mutwil M, Usadel B, Schütte M, Loraine A, Ebenhöf O, Persson S. 2010. Assembly of an Interactive Correlation Network for the Arabidopsis Genome Using a Novel Heuristic Clustering Algorithm. *Plant Physiology*, 152: 29-43.
- Nomura T, Kushiro T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yamaguchi S. 2005. The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450sCYP85A3 in tomato and CYP85A2 in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, 6; 280(18):17873-9.
- Nygaard P. 1971. Studies on the germination of pine pollen (*pinusmugo*) in vitro: III. Inhibition by d-mannose and deoxyhexoses. *Physiol Plant* 24: 130–136.
- Pal R, Datta A, Bittner ML, Dougherty ER. 2005. Intervention in context-sensitive probabilistic Boolean networks. *Bioinformatics*, 21(7):1211-1218.
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell*, 15:939–951.
- Plaxton W. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. *In* JP Lynch, J Deikman eds *Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular Cellular Organismic and Ecosystem Processes*. American Society of Plant Physiologists Rockville MD, 229–241.
- Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekeens SCM. 1999. Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology*, 119:1017–1023.
- Popper ZA. 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls *Current Opinion in Plant Biology*. Volume 11, Issue 3, p. 286–292.
- Price J, Laxmi A, Martin S, Jang J. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16 (8): 2128-50.
- Qian T, Cai Z, M.S. Yang MS. 2004. Determination of adenosine nucleotides in

- cultured cells by ion-pairing liquid chromatography–electro spray ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 325:77–84.
- Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, 14(Supplement):S185-205.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Rev. of Plant B.*, 57:675-709.
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, Van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeeckens S. 1998. Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal*, 5: 253-263.
- 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. *The Plant Journal*, 26(4):421-33.
- Rook F, Hadingham S, Li Y, Bevan M. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell & Environment*, 29(3) :426-434.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.*, 15: 2122–2133.
- Sanda S, Yu B, Benning C. 2001. Sulfolipid Biosynthesis: The joining of sulfur sugar and lipid metabolism to produce a unique anionic sulfolipid in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. 12th international conference on arabidopsis research.
- Schäfer J, Strimmer K. 2005. An empirical Bayes approach to inferring large-scale gene associations networks. *Bioinformatics*, 21 (6): 754-764.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13:2498-2504.
- Shi H, Kim YS, Guo Y, Stevenson B, Zhu LK. 2003. The Arabidopsis *SOS5* Locus Encodes a Putative Cell Surface Adhesion Protein and Is Required for Normal Cell Expansion. *Plant Cell*, 15:19-32.
- Shimajima M. 2011. Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Progress in Lipid Research*, 50(3): 234–239.
- Shmulevich I, Dougherty ER, Kim S, Zhang W. 2002. Probabilistic Boolean networks: a rule-based uncertainty model for gene regulatory networks. *Bioinformatics*, 18 (2): 261-274.

- Siegl G, Stitt M. 1990. Partial purification of two forms of spinach leaf sucrose-phosphate synthase which differ in their kinetic properties. *Plant Sci.*, 66: 205–210.
- 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. and Plant Mol. Biol.*, 51:49-81.
- Smolen P, Baxter D, Byrne J. 2000. Mathematical modeling of gene networks. *Neuron*, 26:567-580.
- Stein JC, Hansen G. 1999. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiology*, 121: 71–79.
- Tamada Y, Kim S, Bannai H, Imoto S, Tashiro K, Kuhara S, Miyano S. 2003. Estimating gene networks from gene expression data by combining Bayesian network model with promoter element detection. *Bioinformatics*, 19:ii227-ii236.
- Torabinejad J, Donahue JL, Gunesequera BN, Allen-Daniels MJ, Gillaspie GE. 2009. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, 150(2):951-61.
- Tsuchihira A, Hanba Y, Maeshima M. 2010. Expression of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin PIP2; 3 is enhanced in response to high temperatures. 21st international conference on *Arabidopsis* research.
- vanSomeren E, Wessels L, Backer E, Reinders M. 2002. Genetic network modeling. *Pharmacogenomics*, 3:507–525.
- Van Quy L, Champigny ML. 1992. NO<sub>3</sub><sup>2-</sup> enhances the kinase activity for phosphorylation of phosphoenol pyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase proteins in wheat leaves. *Plant Physiology*, 99: 344–347.
- Wang Y, Ribot C, Rezzonico E, Poirier Y. 2004. Structure and expression profile of the *Arabidopsis* PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiology*, 135: 400–411.
- Weaver DC, Workman CT, Stormo GD. 1999. Modeling regulatory networks with weight matrices. *Pac. Symp. Biocomput.*, 4:112–123.
- 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.
- Woolf PJ, Wang Y. 2000. A fuzzy logic approach to analyzing gene expression data.

- Physiol Genomics, 3: 9–15.
- Wyrick JJ, Richard A, Young RA. 2002. Deciphering gene expression regulatory networks. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12:130–136.
- Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 425:521–525.
- Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. 2002. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biology*, 3:62.
- Yang J, Sardar H.S, McGovern KR, Zhang Y, Showalter AM. 2007. A lysine-rich arabinogalactan protein in Arabidopsis is essential for plant growth and development including cell division and expansion. *The Plant Journal*, 49(4):629-40.
- Yuan K, Wysocka-Diller J. 2006. Phytohormone signalling pathways interact with sugars during seed germination and seedling development. *J. Exp. Bot*, 57(12):3359-67.
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Powers SJ, Schlupmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ. 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol*. 149, 1860–1871.
- Zhou L, Jang JC, 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 PHirsch-Hoffmann M, Gruissem W. 2004. Genevestigator: Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, 136: 2621-2632.

## Material Suplementar

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

| AGI       | Iniciador direto (5' → 3') | Iniciador reverso (5' → 3') | Eficiência |
|-----------|----------------------------|-----------------------------|------------|
| At1g04310 | GAAGGTGAAGAGAGTAGTAG       | ATGTTTTGGCAAGCGTTGAG        | 97%        |
| At1g03130 | TATCCAGAGAAAGCGAATCC       | TTAACCTCAATGGGACTAAC        | 102%       |
| At1g03870 | CCTGCCCCTAAATCTAAATC       | GTCCAAGACCAAACCCTAGT        | 98%        |
| At1g25550 | GGTGGATCACATGTTGCTAC       | TAGCTGGTCTTCTTGATGC         | 105%       |
| At1g27220 | AGAGGTGCTAGAAGCGGAAC       | CTTCCACAGTCCTGTTATC         | 92%        |
| At1g29910 | CTACAGAGTCGCAGGAAATG       | GCTCCTTCACCTTCAACTC         | 110%       |
| At1g29920 | TCGCTGAGTTGAAGGTAAAG       | CTATCGGTCCCTTACCAGTG        | 103%       |
| At1g32340 | ATGGAAAGGCGGGAAACAAC       | CAGATTTCTTCACCACTTTC        | 96%        |
| At1g34630 | TGCCTGGGCTTGACTTG          | GCTAAAGCCAGACCTGTTGG        | 99%        |
| At1g37130 | TACGCATATTCCGGAGGTGG       | GATGGTCAAGTGCACATACG        | 112%       |
| At1g48100 | GCAAGTCCGACTATGATTAG       | TTAACTCCTTGACATCCG          | 91%        |
| At1g48760 | AGATAGGTACGAGGGAAATC       | CTTCTTCTCTCTGAGTTCT         | 102%       |
| At1g54010 | GGAATCTTTGACTCTGAATCA      | CACTGACTTCTTCACGAAATC       | 94%        |
| At1g61340 | GACAATAAGAGAAGCTACAATG     | ATCATCCTCTACATCAAACG        | 90%        |
| At1g68520 | CATGGGTGAAAGTGGAGCAG       | TGAAACCCTAGCCTCTCTTC        | 100%       |
| At1g69500 | TCAGGCTGGACCAAGGATATG      | ATACTTGACAGGATGATTTGG       | 99%        |
| At1g73260 | GCAGCGATGTCGGGATATTC       | AACATAACCAAGAACGGCTTA       | 91%        |
| At1g76080 | ACACGAGGAAGAAGGTATTG       | GCTTGCCTCCAGTGCATTC         | 99%        |
| At1g77680 | TGGCATTGAACGGAGAATATAC     | AGCCTCTTCCACCTCTCTTG        | 95%        |
| At1g77760 | GGAACCTCATGGGGATGATG       | GGGTCTGGTCGGGTGTTC          | 98%        |
| At1g78070 | AAATAACATCTCCACCAGTC       | GAGTCCGTGGATCACTTTTC        | 94%        |
| At1g78080 | AAGTGAAGGCGGAGGAGAAT       | GGTCAGCGAACGTCAAGTC         | 91%        |
| At2g13320 | CATGTTCCAAACTCTTACCTG      | GTTCTCCACAACCGCTTGGT        | 95%        |
| At2g33380 | GGATGGCTTTCAAACAAAG        | TCAAAGCAACCTCTCACAGC        | 94%        |
| At2g37180 | GATGACCACTGGATATTCTG       | CTGAATGAACCGAGGGACTT        | 96%        |
| At2g39400 | CTTCACCAGGTATCAATTCC       | AGCTTGAATGTCTTGCCGA         | 99%        |
| At2g47450 | GATATGTCTGATGCCACTTG       | TCATTCATTGGTTGTTGTTG        | 94%        |
| At2g48130 | TTCAGGAGTTGGAGGTGGTT       | CACCAATACAGCAAACATAAG       | 100%       |
| At3g01310 | CACCGAGGTATCACTTGAAG       | TAAGGGAGACAAATCAGCTC        | 97%        |
| At3G02040 | G TTCAGGTCACCAGAGATG       | AAACCTCCGTGACCCTCTTC        | 103%       |

|           |                           |                          |      |
|-----------|---------------------------|--------------------------|------|
| At3g02870 | CGTGACAGAGGCGGGTAC        | ACGAACCACTCATCCTAAGG     | 90%  |
| At3g04760 | GGAATCAATGGTGGGAAATG      | TCATTTGCTAACTCCATTGC     | 92%  |
| At3g05640 | ACTGATGGGGTATGGGATGT      | CCCTAACTGCTTGCTGTAC      | 94%  |
| At3g10985 | CACTTCTCTCACCGTCACAC      | CAGCCCGACCCGAGAATTGG     | 102% |
| At3g11430 | CTTATCGTTATGTGAGGAGCA     | CCAAAGGAGGATGATGAGAG     | 97%  |
| At3g17390 | GAGGTAATGGTAGGTTCTTG      | TTAGACTTGAGTGGCTTGAC     | 95%  |
| At3g17790 | GGTACAGTGTGTTGGGAAAC      | GACAAATCCAACGGCTGTCTG    | 95%  |
| At3g19030 | GTAAGCCTCCACCGTCTCTTC     | TCACATGAATCCAACAAGAG     | 103% |
| At3g20370 | TCCAAGATACCGATGTGTG       | TGTCGGATCTTTGAATGTATC    | 98%  |
| At3g22370 | CAGAGGAGATATGGATGTCG      | GTGTAGTAACATTCTCCAAC     | 104% |
| At3g30180 | GTTACAAAATATAGATGGGAAGA   | CTAGTCAGTAAGGTGAACAC     | 110% |
| At3g47340 | AGGTGCGGACGAGATCTTTG      | GTGAAGAGCCTTGATCTTGC     | 92%  |
| At3g53420 | GGGATGACCACTGGATATTT      | CCAAGAGACTTAGAACCTGA     | 93%  |
| At3g54620 | GCTCAAGGCTCCATTGTGG       | CCATCAAGATCATCGTCATC     | 92%  |
| At3g55360 | GCCGTCTGAGAAAGATATTTG     | AGGAATGGAGGAAGTATCAC     | 98%  |
| At3g61630 | CAAGGAGAAAACGAACTGAAG     | AAGAGTGATGATGATGGTCG     | 106% |
| At4g00360 | ACCAGGACGTTGAGGCAAG       | AATTGTTCTGAGCCGTTTCG     | 97%  |
| At4g10150 | ACAATGTTCAGTGTGTCTTGG     | AGCCATAGATCAATACATTCC    | 92%  |
| At4g14130 | CGTCACTGCTTACTACTGTCTTCAC | CCATAAGCATTGAGCTCGGTTGCC | 99%  |
| At4g21870 | GTTGATCTTCTGGGTTAAG       | GGCTGATCCGAGGCGACA       | 90%  |
| At4g23060 | TTTCAAGAGGAATGGTTCG       | CTCGCATATAGCCTCATTGG     | 94%  |
| At4g26850 | TTAATGCCACAGTGTTACGC      | CCACACGGCTGGGTTCCT       | 96%  |
| At4g27440 | CAGGTGGTGAGTGATCCAAG      | CTTCTTCTGATAACTGGTTC     | 97%  |
| At4g28140 | CTTTGGGATGATTTGGATAG      | CATAGGACAAGAGAGAGGAG     | 91%  |
| At4g28240 | GACTCTCTCCCTTCGGAAG       | CCTTGAGCCCAGCAGTTGAG     | 90%  |
| At4g29190 | TGAGCTACGAGAAAAGATGC      | AGATACCCACCCGACATCAG     | 97%  |
| At4g30290 | AATTATTTTACCGTTGATGGG     | CTCGCATATAGCCTCATTGG     | 100% |
| At4g35770 | CAGAGTCGGATCAGGAATGG      | ATTATGATTTTCATCGTGTTC    | 93%  |
| At4g36010 | CTCCTAACCCAAGTGTAAG       | ACACGGCAGAAAGAGTTGGC     | 102% |
| At4g37540 | CTGCTTTGTTTCAGTCGTTG      | GTTCTGGTCCACAACATAC      | 95%  |
| At5g01220 | AGATCAGGAGGGAAAAACCG      | CTCGGTCTCTTCTTTGCC       | 89%  |
| At5g09440 | TATTCGGTTCGGGTGCTTAC      | GAGACCCAAAGCGTTGTAAC     | 97%  |
| At5g15350 | CGGAGACTGGCTCTATTTCTG     | GGCGATACATCCTTCATAGT     | 99%  |
| At5g18240 | ACAACGCAGAACCGAGAATC      | TATACTCACTGTTGTTGCTAC    | 92%  |
| At5g20150 | AACTGGATTGGTTAAGATAC      | GCTGAAGAAGTTTCTGGATG     | 94%  |

|           |                        |                       |      |
|-----------|------------------------|-----------------------|------|
| At5g20250 | TGTCAGTGATTCTCCTGGAA   | CACCATCACGGGCAGGATC   | 92%  |
| At5g20630 | CAAGGACTTCTTCATTTTCAGC | CAAACAGAGCAAATGGTAGAA | 93%  |
| At5g25350 | CAGATTTAGTGGTGATGAAGA  | TCGCAGCAACACGTAACCT   | 97%  |
| At5g28770 | CGCGTTAATAGGATGCTCTC   | GTTTGAGTTACATCAGTGAGA | 104% |
| At5g41040 | CATCAGTCCTGAAGGTAAACT  | GGTAATGTCACCAATCTCATC | 109% |
| At5g47220 | TCGTCGTCGTCCTCTTCTAC   | AACCAATAACTCATCAACACG | 96%  |
| At5g52780 | TTCGTCGGCTCTTGGGATTG   | TCCTCTTTCCACATCTCTAC  | 100% |
| At5g55090 | GTAACGAGGAAGAAGATGAG   | GTTGATCCCAGATCCAATTC  | 97%  |
| At5g55530 | TGACAGCCCAACAAAATCAG   | GCCTGCTCCCATAGAACACAC | 109% |
| At5g61240 | CTGACATACCTGTACCTTGA   | CTTTGAGGAATGGATGCTTG  | 94%  |
| At5g62470 | ACAGGTTTGAGAAGATGTAG   | TGTCTTCTCTTCATGCTCAG  | 108% |
| At5g65390 | AACTAGCCCCGACACCTTC    | GACAAGTGAACCGACGACG   | 90%  |

---



**Tabela Suplementar 2.** Genes especificamente ou preferencialmente regulados por manose validados por qRT-PCR.

| AGI                                                                                                          | CATMA<br>(Log2)* | Função                                                                                                                                          | qRT-PCR ( Log 2 ) |         |        |         | Sentido de<br>regulação |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------|--------|---------|-------------------------|
|                                                                                                              |                  |                                                                                                                                                 | glicose           | frutose | manose | manitol |                         |
| Categoria 1: Genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose. |                  |                                                                                                                                                 |                   |         |        |         |                         |
| AT4G36010                                                                                                    | -2.9             | pathogenesis-related thaumatin family protein                                                                                                   | 4,12              | 3,53    | 7,14   | 0,82    | gli +/man ++            |
| AT5G20150                                                                                                    | -2.7             | SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein                                                                                                 | 2,24              | 2,05    | 5,28   | 0,00    | gli +/man ++            |
| AT1G61340                                                                                                    | -2.9             | F-box family protein                                                                                                                            | 3,07              | 2,98    | 5,22   | 0,60    | gli +/man ++            |
| AT1G48100                                                                                                    | -1.5             | glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein                                                            | 3,08              | 2,87    | 5,15   | 0,713   | gli +/man ++            |
| AT5G09440                                                                                                    | -3.1             | phosphate-responsive protein, putative                                                                                                          | 1,02              | 1,04    | 4,67   | 1,33    | gli +/man ++            |
| AT3G17790                                                                                                    | -1.9             | ATACP5 (acid phosphatase 5); acid phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase                                                             | 2,27              | 2,01    | 4,58   | 0,64    | gli +/man ++            |
| AT2G37180                                                                                                    | -3.1             | RD28 (plasma membrane intrinsic protein 2;3); water channel                                                                                     | 2,97              | 1,39    | 4,38   | 1,55    | gli +/man ++            |
| AT3G05640                                                                                                    | -2.1             | protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative                                                                                               | 1,36              | 1,23    | 2,89   | 0,89    | gli +/man ++            |
| AT1G78070                                                                                                    | -2.6             | WD-40 repeat family protein                                                                                                                     | 1,06              | 0,99    | 2,63   | 0,22    | gli +/man ++            |
| AT3G53420                                                                                                    | -1.7             | PIP2A (plasma membrane intrinsic protein 2;1)                                                                                                   | 1,24              | 1,01    | 2,40   | 0,50    | gli +/man ++            |
| AT3G19030                                                                                                    | 1.9              | unknown protein                                                                                                                                 | -1,20             | -1,36   | -3,37  | -0,21   | gli -/man - -           |
| AT4G28240                                                                                                    | 1.7              | wound-responsive protein-related                                                                                                                | -1,25             | -1,01   | -3,07  | -0,24   | gli -/man - -           |
| Categoria 2: Genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos.                                       |                  |                                                                                                                                                 |                   |         |        |         |                         |
| AT3G02040                                                                                                    | -4.0             | SRG3 (senescence-related gene 3); glycerophosphodiester phosphodiesterase                                                                       | -2,56             | -1,63   | 3,48   | 0,88    | gli -/man +             |
| AT5G25350                                                                                                    | -1.5             | EBF2 (EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 2)                                                                                                             | -1,29             | -1,29   | 1,35   | 0,02    | gli -/man +             |
| AT3G11430                                                                                                    | 2.7              | ATGPAT5/GPAT5 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 5); 1acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase/ acyltransferase/ organic anion transporter | 2,30              | 1,60    | -3,61  | -0,83   | gli +/man -             |
| AT1G54010                                                                                                    | 2.4              | myrosinase-associated protein, putative                                                                                                         | 2,34              | 1,91    | -1,65  | -0,53   | gli +/man -             |
| AT3G17390                                                                                                    | 1.9              | MTO3 (S-adenosylmethionine synthase 3); methionine adenosyltransferase                                                                          | 1,21              | 1,03    | -1,53  | -0,31   | gli +/man -             |
| Categoria 3: Genes regulados por manose e não por glicose.                                                   |                  |                                                                                                                                                 |                   |         |        |         |                         |
| AT5G55090                                                                                                    | -1.7             | MAPKKK15 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15); kinase                                                                            | 0,15              | 0,22    | 3,46   | 0,03    | gli 0/man +             |

|           |      |                                                                                                                                      |       |       |       |       |             |
|-----------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| AT5G01220 | -2.3 | SQD2 (sulfoquinovosyldiacylglycerol 2); UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups | 0,84  | 0,55  | 2,22  | 0,69  | gli 0/man + |
| AT4G30290 | -2.3 | ATXTH19 (Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19); hydrolase, acting on glycosyl bonds                                          | 0,12  | 0,19  | 2,09  | 0,67  | gli 0/man + |
| AT1G78080 | -1.5 | RAP2.4 (related to AP2 4); DNA binding / transcription factor                                                                        | 0,36  | 0,54  | 1,88  | 0,12  | gli 0/man + |
| AT4G00360 | -1.7 | CYP86A2 (Aberrant Induction of type three genes 1); oxygen binding                                                                   | 0,33  | 0,28  | 1,83  | 0,09  | gli 0/man + |
| AT2G33380 | -2.1 | RD20 (responsive to dessication 20); calcium ion binding                                                                             | 0,94  | 0,89  | 1,66  | 0,23  | gli 0/man + |
| AT4G29190 | -1.7 | zinc finger (CCCH-type) family protein                                                                                               | 0,83  | 0,87  | 1,65  | 0,16  | gli 0/man + |
| AT1G77680 | -2.2 | ribonuclease II family protein                                                                                                       | 0,55  | 0,59  | 1,64  | 0,09  | gli 0/man + |
| AT3G22370 | -1.8 | AOX1A (alternative oxidase 1A); alternative oxidase                                                                                  | 0,71  | 0,75  | 1,32  | 0,69  | gli 0/man + |
| AT4G23060 | -2.3 | IQD22 (IQ-domain 22); calmodulin binding                                                                                             | 0,50  | 0,87  | 1,21  | 0,50  | gli 0/man + |
| AT5G55530 | -1.6 | C2 domain-containing protein                                                                                                         | 0,06  | 0,21  | 1,06  | 0,10  | gli 0/man + |
| AT4G21870 | 2.5  | 26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)                                                                              | -0,41 | -1,04 | -5,02 | -0,54 | gli 0/man - |
| AT3G30180 | 2.0  | BR6OX2/CYP85A2 (brassinosteroid-6-oxidase 2); monooxygenase/ oxygen binding                                                          | -0,53 | -1,0  | -4,22 | -0,66 | gli 0/man - |
| AT5G52780 | 2.3  | unknown protein                                                                                                                      | -0,42 | -0,58 | -3,67 | -0,36 | gli 0/man - |
| AT5G15350 | 2.5  | plastocyanin-like domain-containing protein                                                                                          | 0,00  | -0,50 | -3,49 | -0,26 | gli 0/man - |
| AT5G47220 | 1.8  | ATERF-2/ATERF2/ERF2 (Ethylene response factor 2); DNA binding / transcription factor/ transcriptional activator                      | -0,14 | -0,11 | -3,22 | -0,49 | gli 0/man - |
| AT3G04760 | 1.7  | pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein                                                                                    | -0,42 | -0,54 | -2,58 | -0,41 | gli 0/man - |
| AT5G61240 | 1.8  | protein binding                                                                                                                      | -0,56 | -0,49 | -2,34 | -0,55 | gli 0/man - |
| AT1G03130 | 2.1  | PSAD-2 (photosystem I subunit D-2)                                                                                                   | -0,62 | -0,7  | -2,23 | -0,41 | gli 0/man - |
| AT3G20370 | 2.2  | meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein                                                  | -0,77 | -0,73 | -1,91 | -0,08 | gli 0/man - |
| AT2G47450 | 1.6  | CAO (CHAOS); chromatin binding                                                                                                       | -0,21 | -0,33 | -1,87 | -0,22 | gli 0/man - |
| AT1G76080 | 1.6  | ATCDSP32/CDSP32 (chloroplastic drought-induced stress protein of 32 kd); thiol-disulfide exchange intermediate                       | -0,60 | -0,77 | -1,77 | -0,56 | gli 0/man - |
| AT3G01310 | -1.6 | acid phosphatase                                                                                                                     | -0,21 | -0,46 | -1,61 | -0,73 | gli 0/man - |

|                                                                                |     |                                                                                                                          |       |       |       |       |             |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| AT4G37540                                                                      | 1.9 | LOB domain protein 39 / lateral organ boundaries domain protein 39 (LBD39)                                               | -0,09 | -0,31 | -1,52 | -0,36 | gli 0/man - |
| AT1G68520                                                                      | 1.8 | zinc finger (B-box type) family protein                                                                                  | -0,77 | -0,89 | -1,27 | -0,17 | gli 0/man - |
| AT1G48760                                                                      | 1.9 | DELTA-ADR (DELTA-ADAPTIN); clathrin binding, protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein | -0,37 | -0,55 | -1,26 | -0,91 | gli 0/man - |
| AT5G20630                                                                      | 1.6 | GLP3 (germin-like protein 3); manganese ion binding / metal ion binding / nutrient reservoir                             | -0,57 | -0,85 | -1,17 | -0,85 | gli 0/man - |
| * Log2 = razão glicose/manose com valor $\log_2 \geq -1,5$ (nosso experimento) |     |                                                                                                                          |       |       |       |       |             |

**Tabela Suplementar 3.** Análise da regulação por manose: transcricional/pós-transcricional.

| AGI                                                                              | Cordicepina      | Glicose           | Cordicepina + glicose | Manose             | Cordicepina + manose | Regulação Transcricional / Pós-transcricional |        |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------------------------|--------|
|                                                                                  |                  |                   |                       |                    |                      | glicose                                       | manose |
| Genes regulados por manose e por glicose com regulação mais acentuada por manose |                  |                   |                       |                    |                      |                                               |        |
| At4g36010                                                                        | 0,43 a<br>(0,01) | 13,24 b<br>(0,27) | 0,41 d<br>(0,00)      | 116,95 c<br>(0,05) | 0,56 e<br>(0,01)     | T                                             | T      |
| At5g20150                                                                        | 0,59 a<br>(0,01) | 3,69 b<br>(0,04)  | 0,59 d<br>(0,01)      | 30,75 c<br>(0,41)  | 1,31 e<br>(0,02)     | T                                             | T      |
| At3g19030                                                                        | 0,16 a<br>(0,01) | 0,45 b<br>(0,01)  | 0,07 d<br>(0,00)      | 0,12 c<br>(0,01)   | 0,07 e<br>(0,00)     | T e PT                                        | T e PT |
| At4g28240                                                                        | 0,05 a<br>(0,00) | 0,45 b<br>(0,01)  | 0,03 d<br>(0,00)      | 0,15 c<br>(0,00)   | 0,02 e<br>(0,00)     | T e PT                                        | T e PT |
| Genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos                         |                  |                   |                       |                    |                      |                                               |        |
| At3g02040                                                                        | 0,83 a<br>(0,01) | 0,21 b<br>(0,00)  | 0,73 d<br>(0,03)      | 7,84 c<br>(0,26)   | 2,01 e<br>(0,02)     | PT                                            | T e PT |
| At5g25350                                                                        | 0,08 a<br>(0,00) | 0,41 b<br>(0,01)  | 0,07 d<br>(0,00)      | 3,28 c<br>(0,04)   | 0,18 e<br>(0,01)     | PT                                            | T      |
| At3g11430                                                                        | 0,20 a<br>(0,00) | 3,83 b<br>(0,15)  | 0,32 d<br>(0,01)      | 0,2 1c<br>(0,00)   | 0,13 e<br>(0,00)     | T                                             | T e PT |

|                                                     |                  |                  |                  |                   |                  |   |        |
|-----------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|---|--------|
| <b>At1g54010</b>                                    | 0,37 a<br>(0,01) | 4,16 b<br>(0,09) | 0,45 d<br>(0,02) | 0,29 c<br>(0,00)  | 0,24 e<br>(0,01) | T | T e PT |
| <b>At3g17390</b>                                    | 0,39 a<br>(0,01) | 2,25 b<br>(0,08) | 0,42 d<br>(0,00) | 0,43 c<br>(0,01)  | 0,39 e<br>(0,01) | T | T      |
| <b>Genes regulados por manose e não por glicose</b> |                  |                  |                  |                   |                  |   |        |
| <b>At5g55090</b>                                    | 0,42 a<br>(0,01) |                  |                  | 14,79 c<br>(0,29) | 0,64 e<br>(0,03) |   | T      |
| <b>At5g01220</b>                                    | 0,69 a<br>(0,02) |                  |                  | 3,19 c<br>(0,10)  | 0,78 e<br>(0,01) |   | T      |
| <b>At4g30290</b>                                    | 0,78 a<br>(0,03) |                  |                  | 4,14 c<br>(0,06)  | 2,17 e<br>(0,08) |   | T      |
| <b>At4g21870</b>                                    | 0,19 a<br>(0,01) |                  |                  | 0,03 c<br>(0,00)  | 0,02 e<br>(0,00) |   | T      |
| <b>At3g30180</b>                                    | 0,03 a<br>(0,00) |                  |                  | 0,05 c<br>(0,00)  | 0,02 e<br>(0,00) |   | T      |
| <b>At5g15350</b>                                    | 0,39 a<br>(0,01) |                  |                  | 0,07 c<br>(0,00)  | 0,08 e<br>(0,00) |   | T      |

T (regulação transcricional); PT (regulação pós-transcricional). Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 100 µg/mL de cordicepina 1h antes dos tratamentos com 2% de glicose ou 110 mM de manose durante 2 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento (~ início do tratamento, t = 0). Os dados entre parênteses correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. Diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (tratado com cordicepina x não tratado com cordicepina), “b” (glicose x não tratado), “c” (manose x não tratado), “d” (cordicepina + glicose x cordicepina), “e” (cordicepina + manose x cordicepina).

**Tabela Suplementar 4.** A análise das redes de regulação gênica envolvendo genes regulados por manose.

| Grupo | Função dos grupos segundo critérios Mapman                        | Total de genes no grupo | Genes validados do microarranjo                  |                                     |
|-------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|
|       |                                                                   |                         | Induzidos por manose                             | Reprimidos por manose               |
| 19    | Fotossíntese                                                      | 44                      |                                                  | At5g52780<br>At3g04760<br>At1g68520 |
| 28    | Metabolismo de carboidrato, transporte, estresse e parede celular | 52                      | At1g48100<br>At2g37180<br>At1g78070<br>At3g53420 |                                     |
| 31    | Metabolismo de lipídeos                                           | 22                      | At4g00360                                        | At4g21870<br>At5g20630              |
| 95    | Glicólise, metabolismo de lipídeos, transporte e estresse         | 40                      | At5g20150<br>At3g17790<br>At3g02040<br>At5g01220 |                                     |
| 151   | Metabolismo de hormônios                                          | 20                      | At1g61340                                        | At5g47220                           |
| 187   | Estresse                                                          | 11                      | At5g55530                                        | At3g01310                           |

190

Estresse e parede celular

29

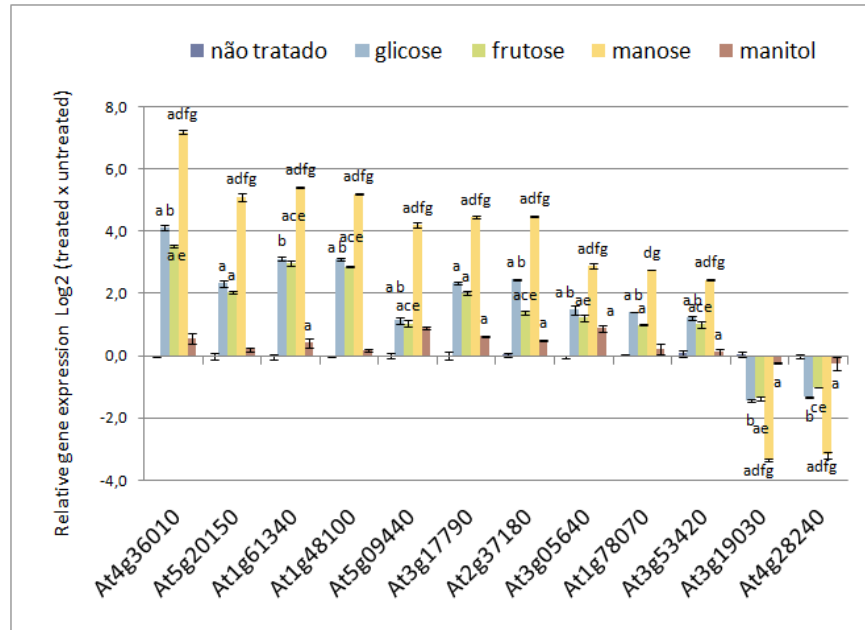
At3g17390

At5g15350

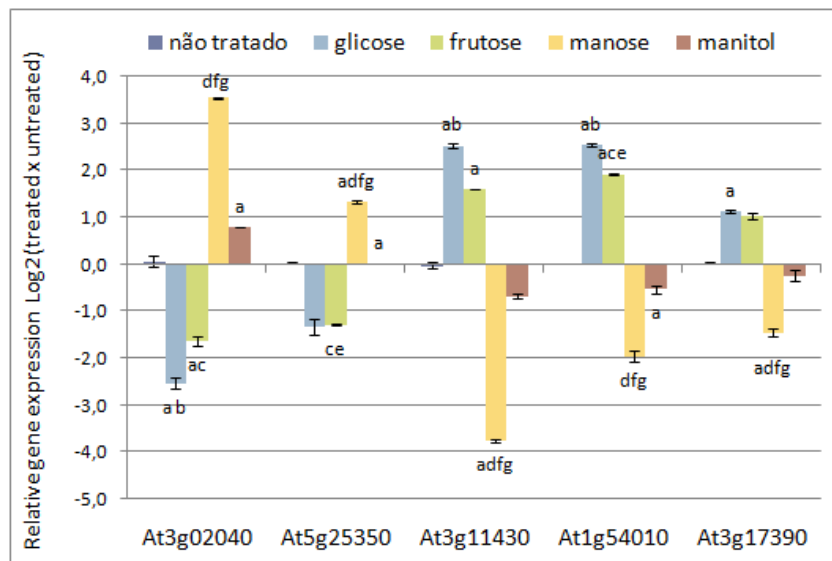
At5g61240

---

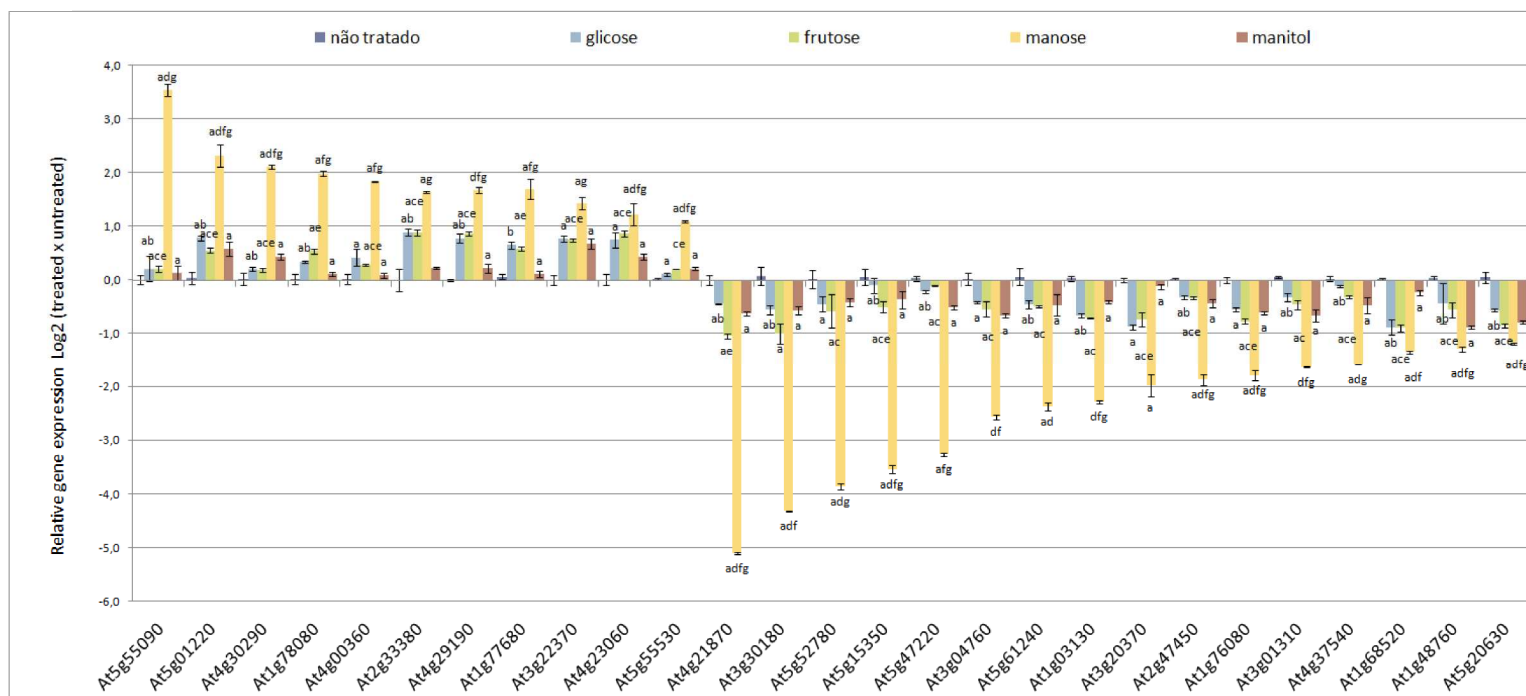
A



B



C

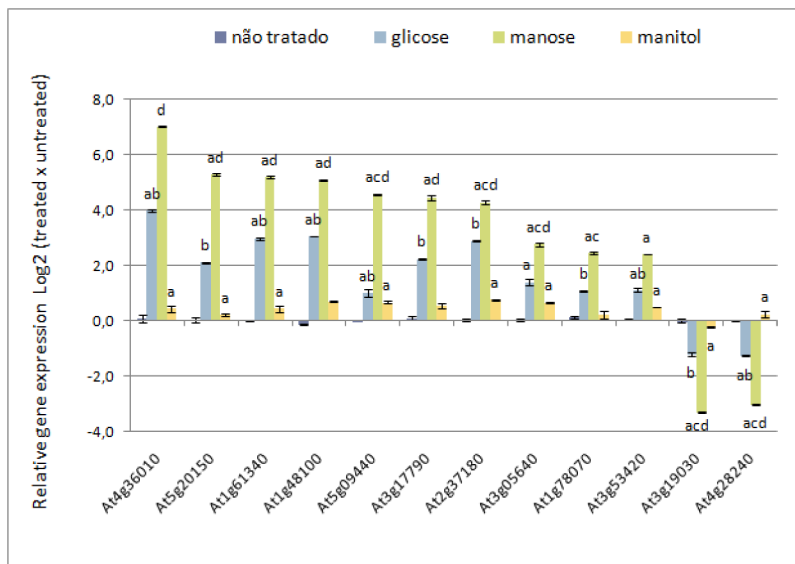


**Figura Suplementar 1.** Análise comparativa da expressão (qRT-PCR) de genes em resposta a glicose, frutose, manose e manitol. **A.** genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2 ), **B.** genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2) e **C.** genes regulados por manose e não por glicose (categoria 3, Tabela Suplementar 2) que confirmaram os resultados apresentados no nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com seis dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose ou 110 mM de frutose ou 110 mM de

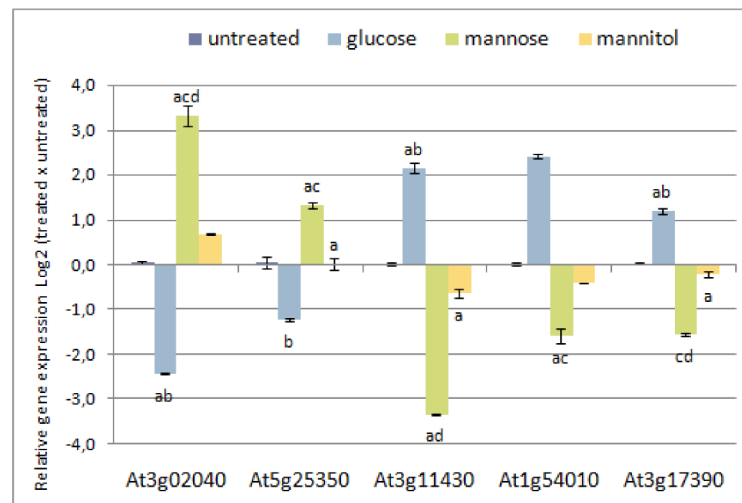


manose ou 110 mM de manitol durante 2 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pd12* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes para todos os tratamentos. As diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (tratado x não tratado), “b” (glicose x manitol), “c” (frutose x manitol), “d” (manose x manitol), “e” (frutose x glicose), “f” (manose x glicose) e “g” (manose x frutose) no gráfico.

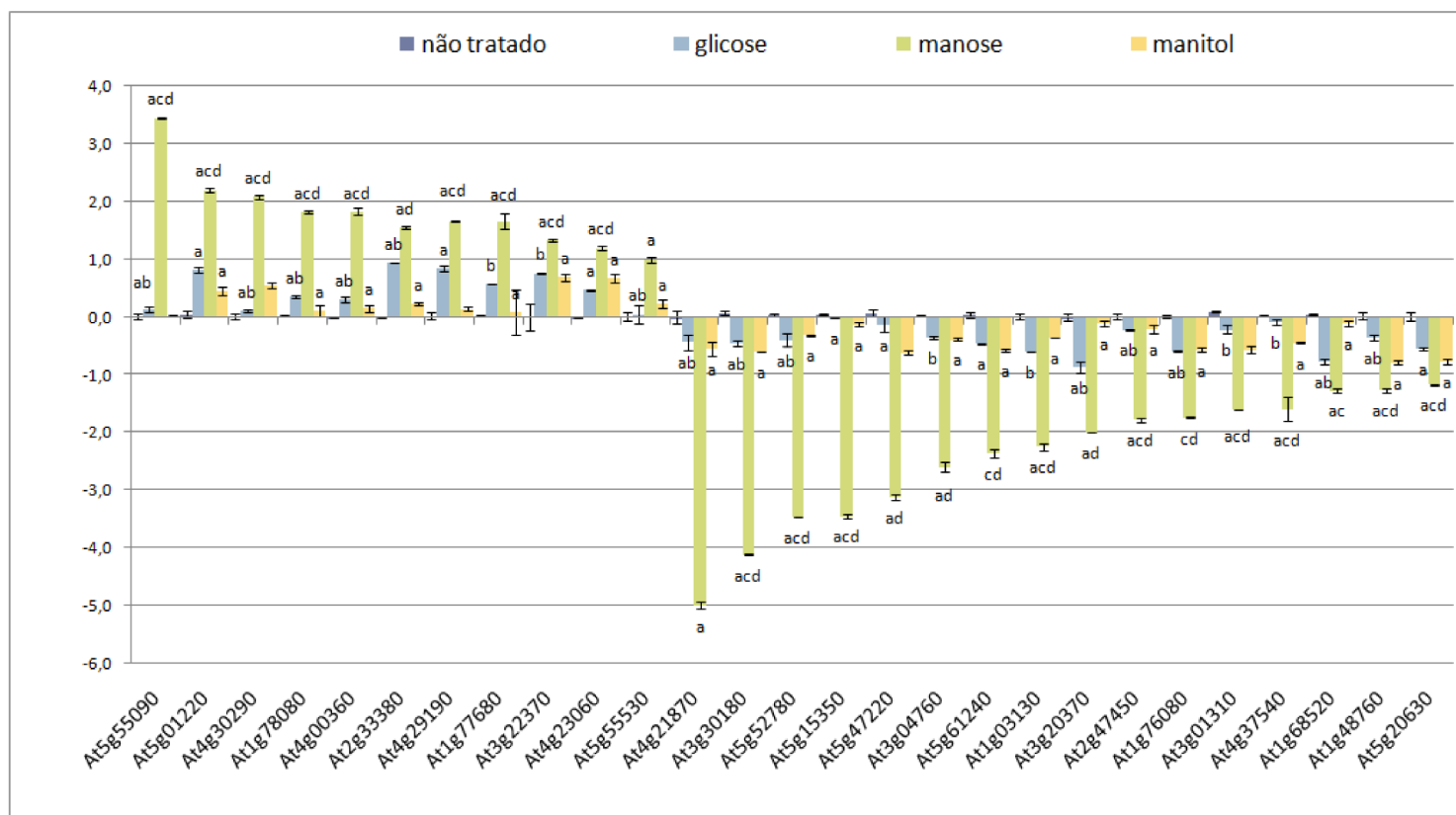
A



B



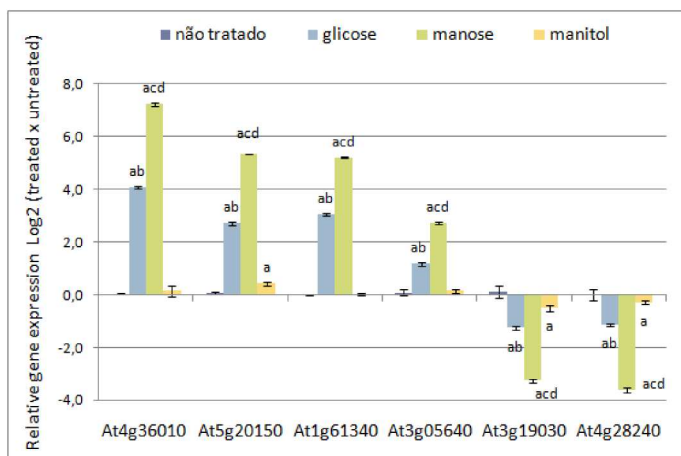
C



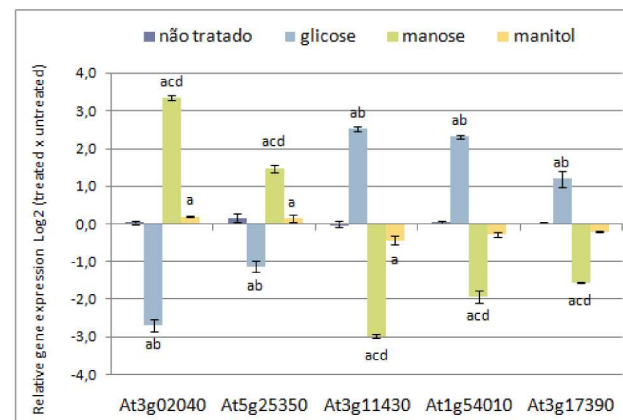
**Figura Suplementar 2.** Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão dos genes em condições experimentais não submetidas a estresse energético **A.** genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2), **B.** genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2), e **C.** genes regulados por manose e não por glicose (categoria 3, Tabela Suplementar 2) que confirmaram os resultados apresentados no

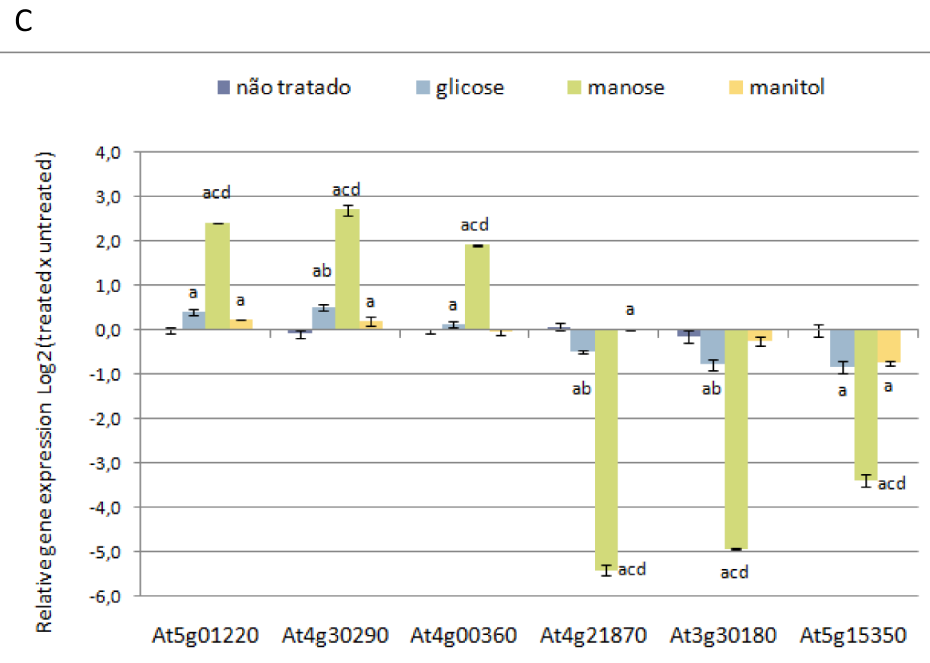
nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sem privação de açúcar no sexto dia após germinação, sob luz contínua com quantidade em torno de 100 - 150  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose e 110 mM de manitol durante 2 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento ( $\sim$  início do tratamento,  $t = 0$ ). Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. As diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (tratado x não tratado), “b” (glicose x manitol), “c” (manose x manitol) e “d” (manose x glicose) no gráfico.

A



B

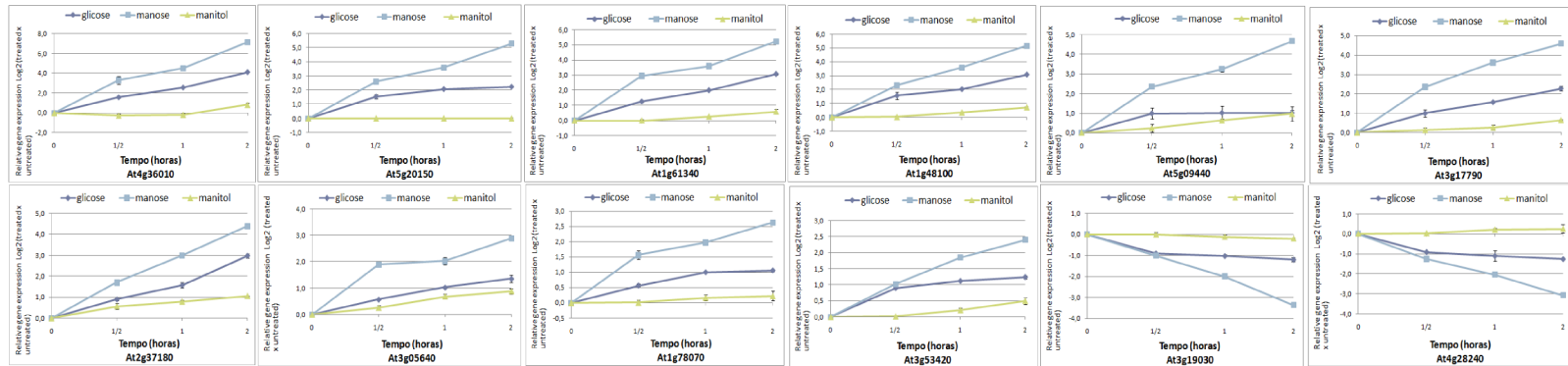




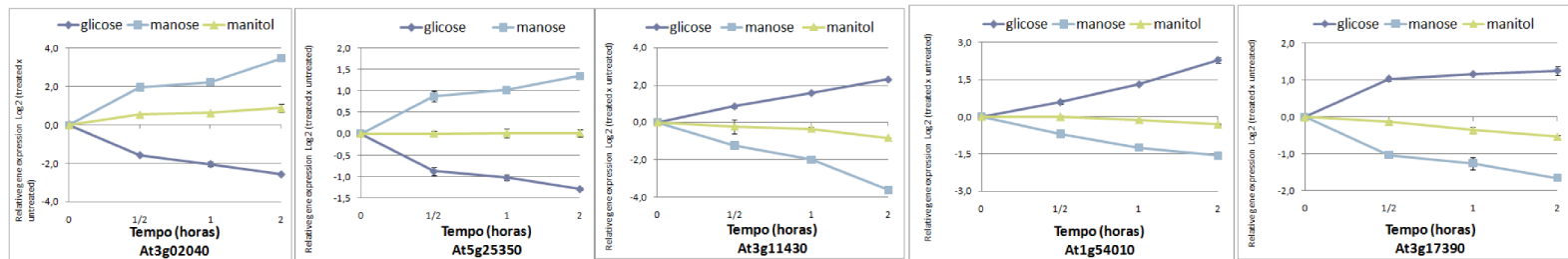
**Figura Suplementar 3.** Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão dos genes em condições experimentais sem fosfato **A.** *At4g36010*, *At5g20150*, *At1g61340*, *At3g05640*, *At3g19030* e *At4g28240* genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2), **B.** *At3g02040*, *At5g25350*, *At3g11430*, *At1g54010* e *At3g17390* genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2), e **C.**

*At5g01220*, *At4g30290*, *At4g00360*, *At4g21870*, *At3g30180* e *At5g15350* genes regulados por manose e não por glicose (categoria 3, Tabela Suplementar 2) que confirmaram os resultados apresentados no nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2 modificado (MS/2 sem fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose e 110 mM de manitol durante 2 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento (~ início do tratamento,  $t = 0$ ). Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. As diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (tratado x não tratado), “b” (glicose x manitol), “c” (manose x manitol) e “d” (manose x glicose) no gráfico.

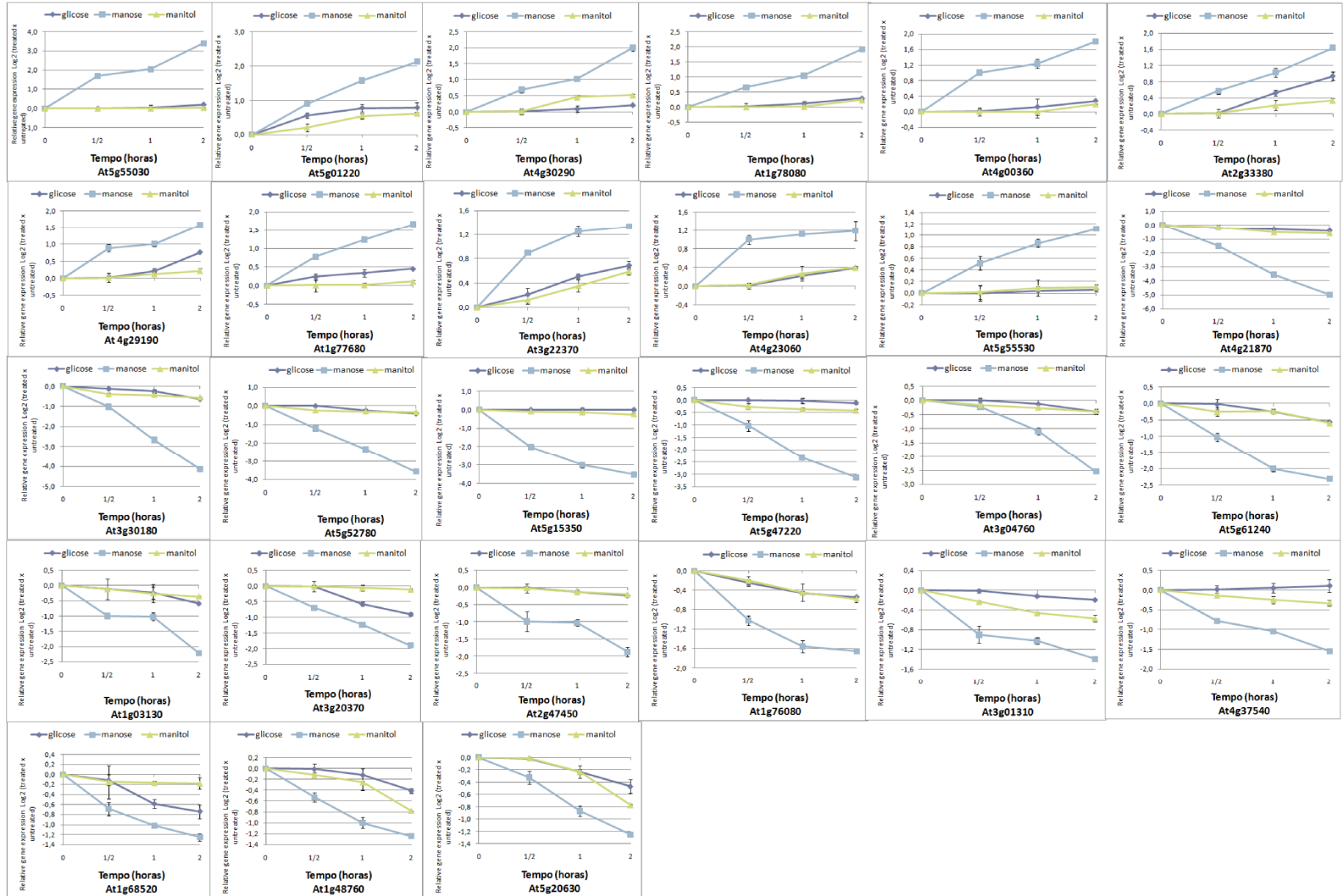
A



B

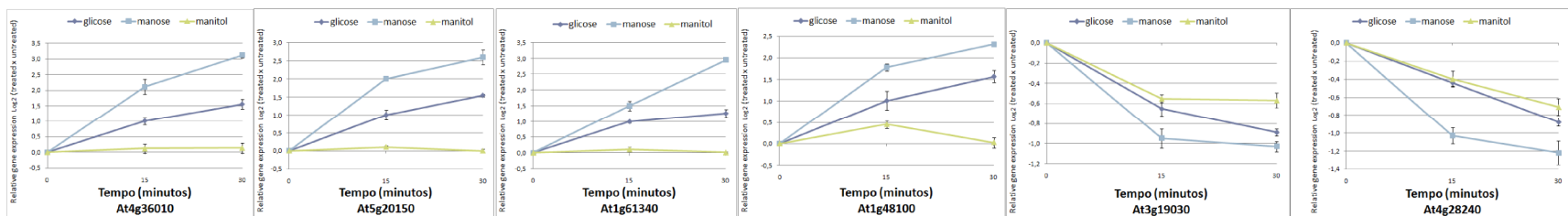


C



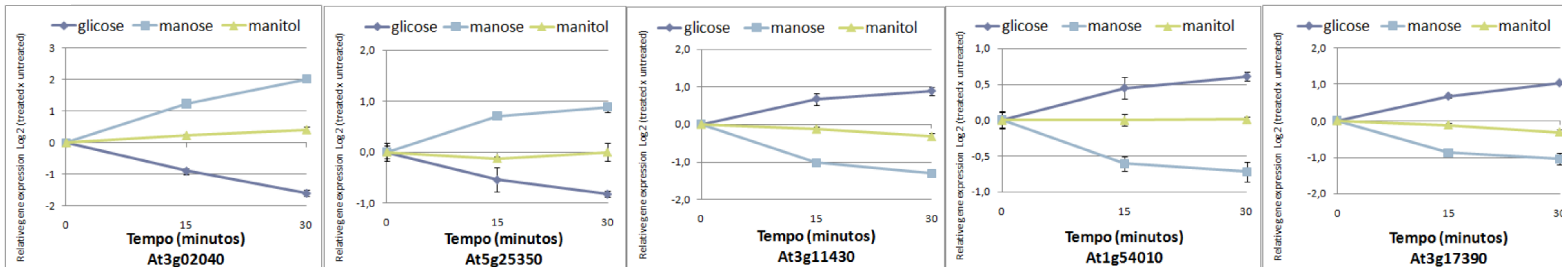
**Figura Suplementar 4.** Análise comparativa da cinética de regulação por manose versus glicose e manitol. Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão dos genes **A.** genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2), **B.** genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2), e **C.** genes regulados por manose e não por glicose (categoria 3, Tabela Suplementar 2) que confirmaram os resultados apresentados no nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose e 110 mM de manitol durante ½ h, 1 hora e 2 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento (~ início do tratamento,  $t = 0$ ). Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos.

**A**

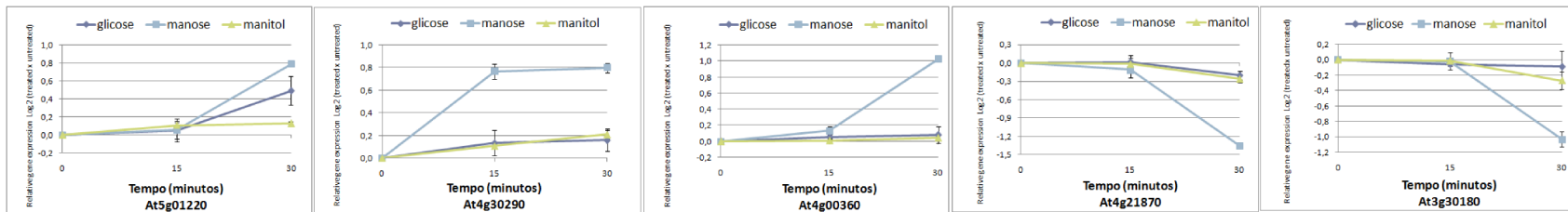




B



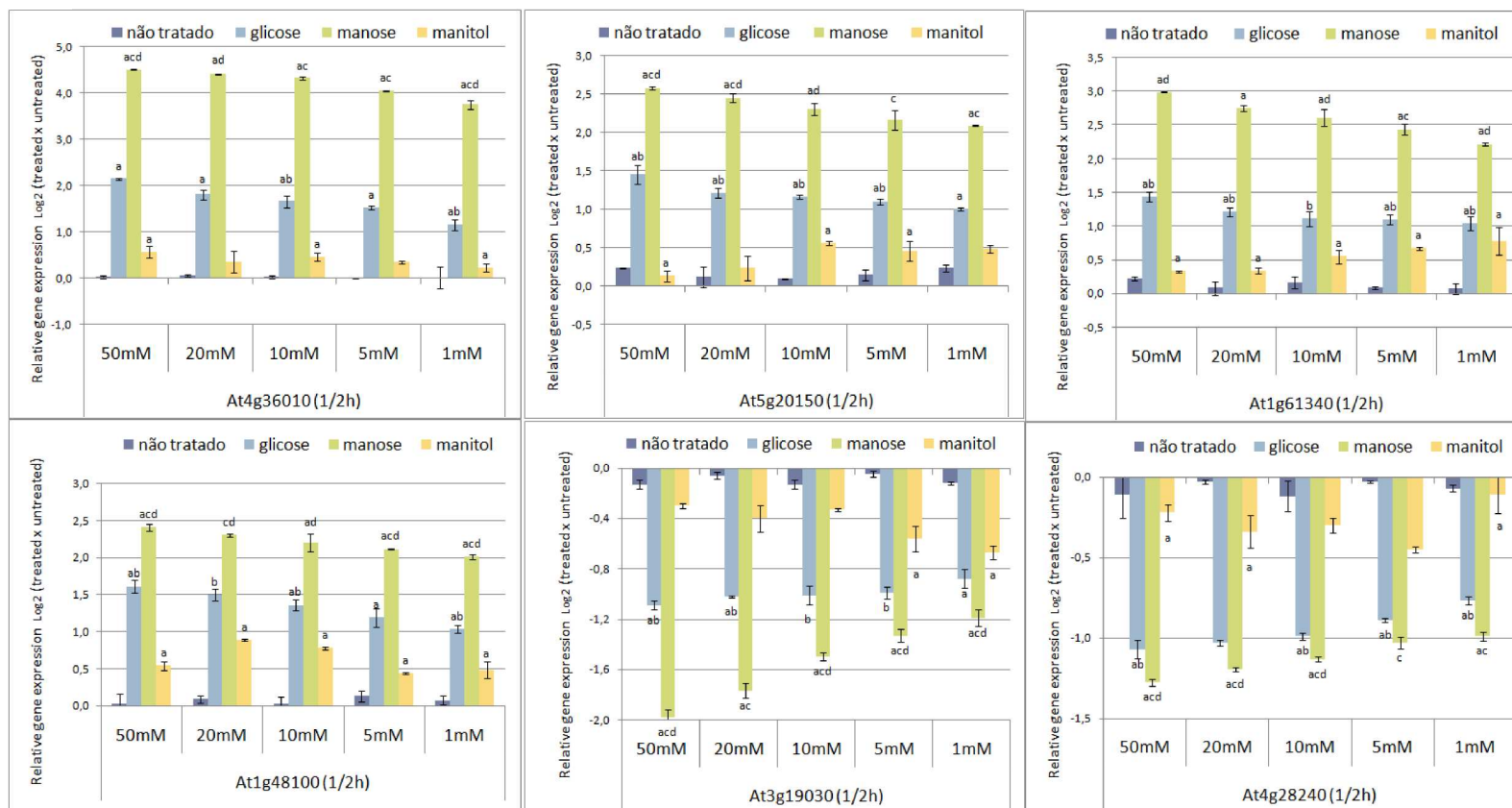
C



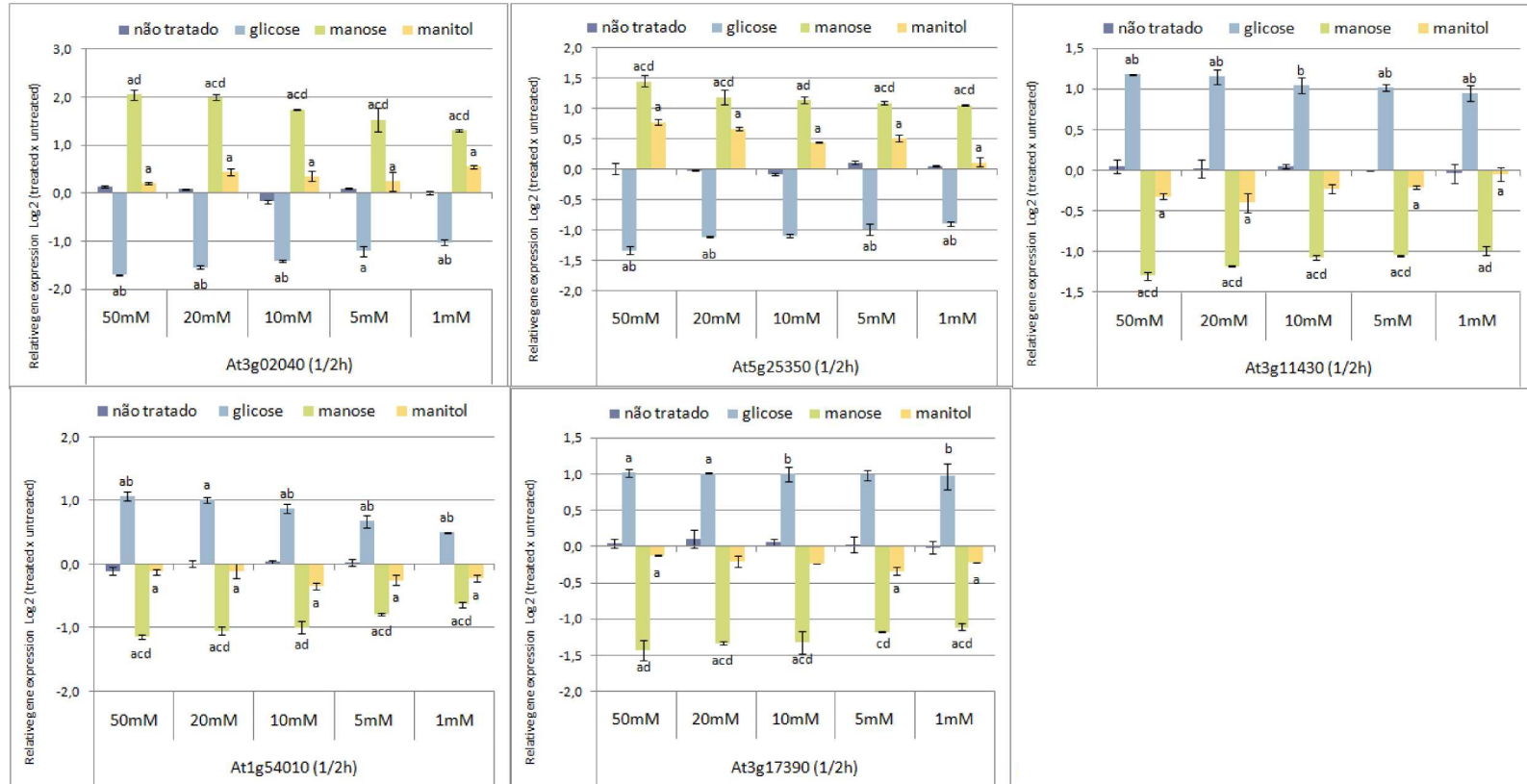
**Figura Suplementar 5.** Análise comparativa da cinética de regulação por manose versus glicose e manitol. Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão dos genes **A.** *At4g36010*, *At5g20150*, *At1g61340*, *At1g48100*, *At3g19030* e *At4g28240* genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2), **B.** *At3g02040*, *At5g25350*, *At3g11430*, *At1g54010* e *At3g17390* genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2), e **C.** *At5g01220*, *At4g30290*, *At4g00360*, *At4g21870* e *At3g30180* genes regulados por manose e não por glicose (categoria 3, Tabela Suplementar 2) que confirmaram os resultados apresentados no nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose e 110 mM de manitol durante 15 minutos e 30 minutos. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada

utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento (~ início do tratamento, t = 0). Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos.

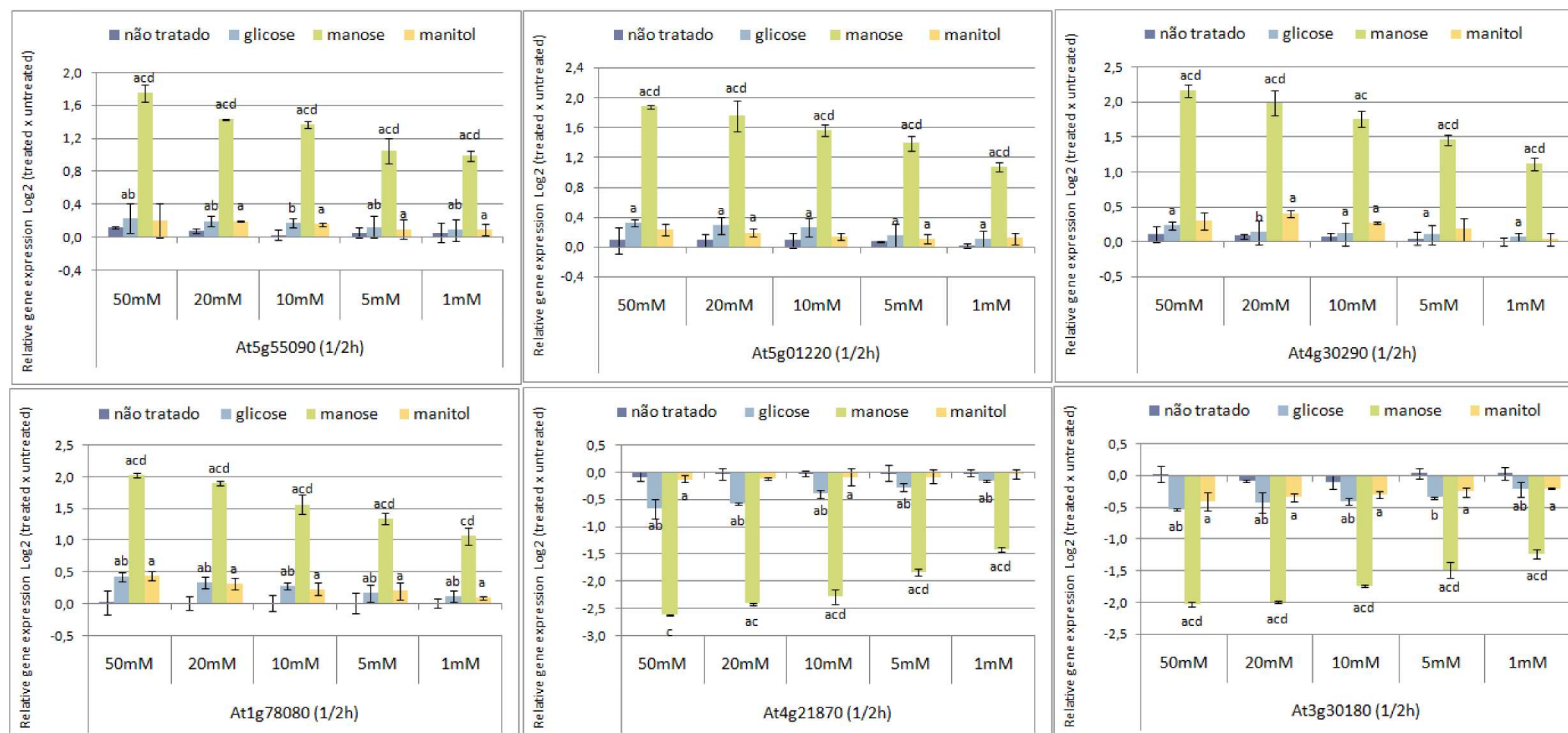
A



B



C

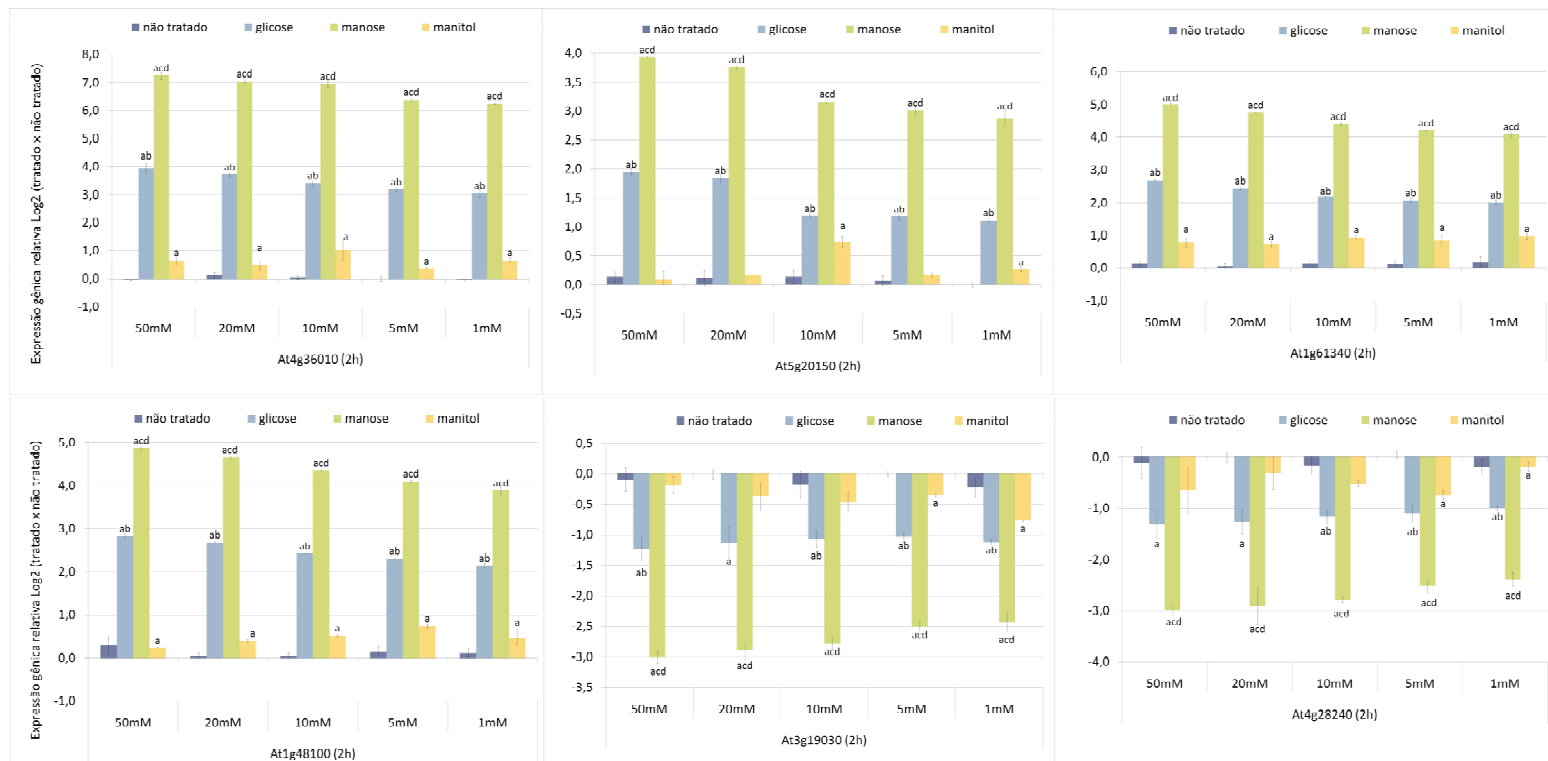


**Figura Suplementar 6.** Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão gênica medida em diferentes concentrações de manose (50, 20, 10, 5 e 1 mM). **A.** *At4g36010*, *At5g20150*, *At1g61340*, *At1g48100*, *At3g19030* e *At4g28240* genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2), **B.** *At3g02040*, *At5g25350*, *At3g11430*, *At1g54010* e *At3g17390* genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2), e **C.** *At5g55090*, *At5g01220*, *At4g30290*, *At1g78080*, *At4g21870* e *At3g30180* genes regulados por manose e não por glicose (categoria 3, Tabela

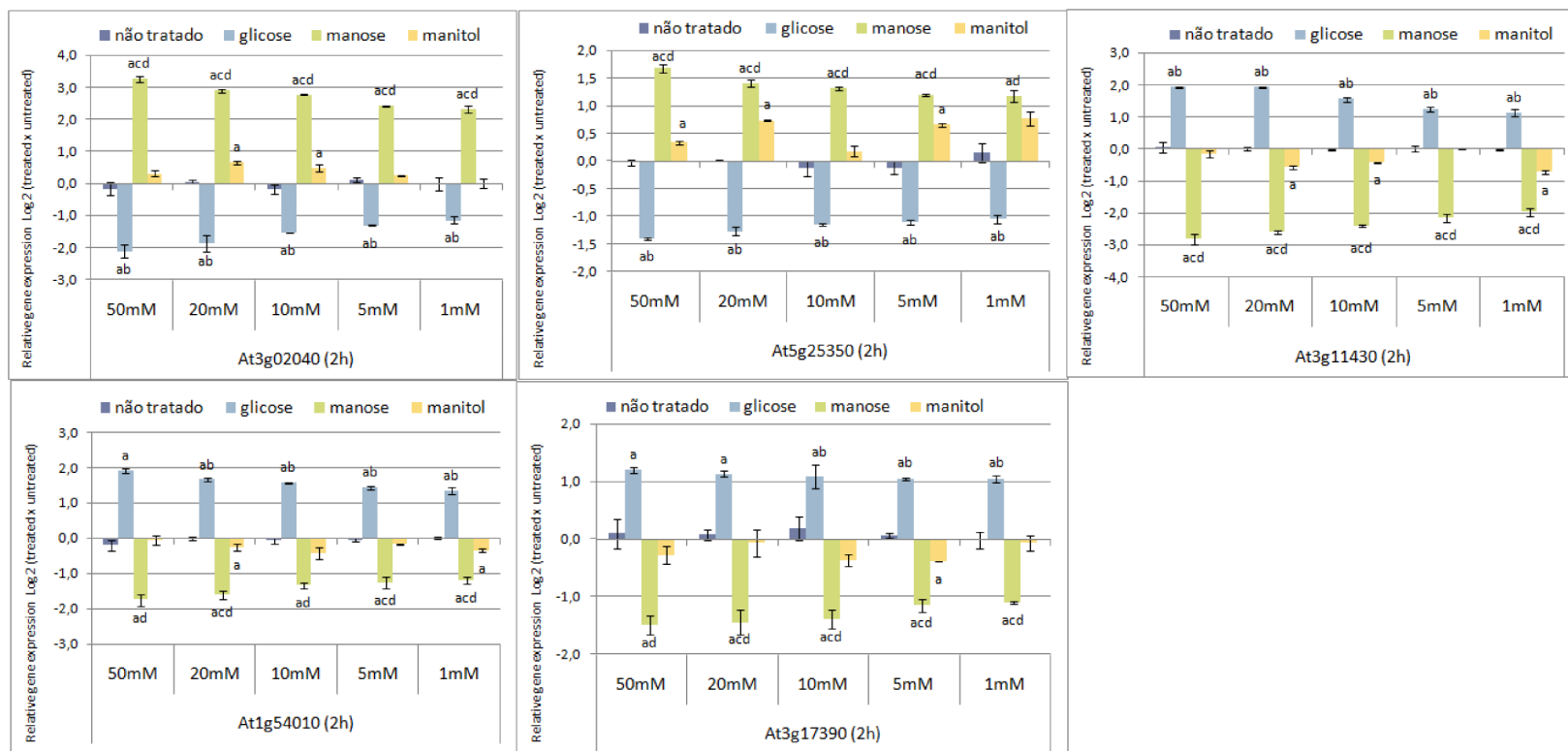
Suplementar 2) que confirmaram os resultados apresentados no nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2 modificado (MS/2 sem fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose e 110 mM de manitol durante ½ hora. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento (~ início do tratamento,  $t = 0$ ). Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. As diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (tratado x não tratado), “b” (glicose x manitol), “c” (manose x manitol) e “d” (manose x glicose) no gráfico.

1

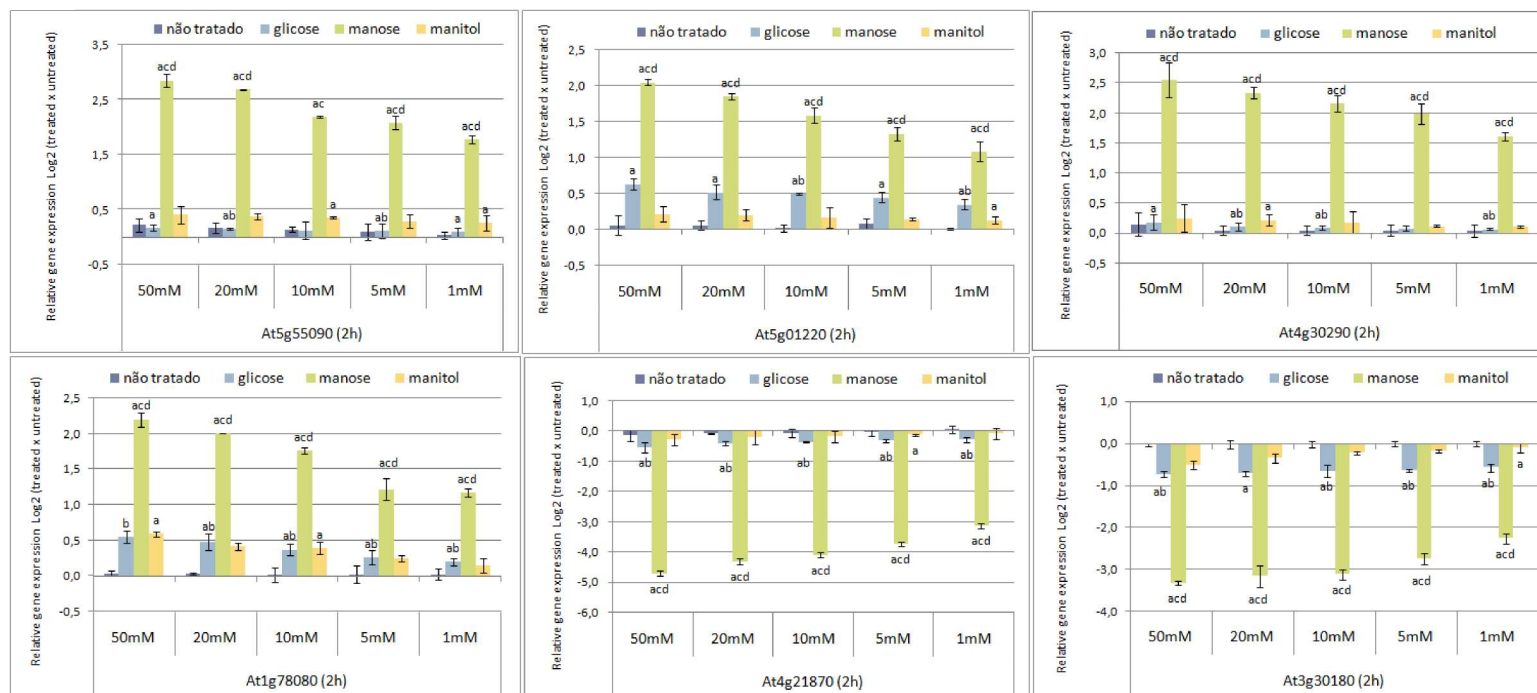
A



B



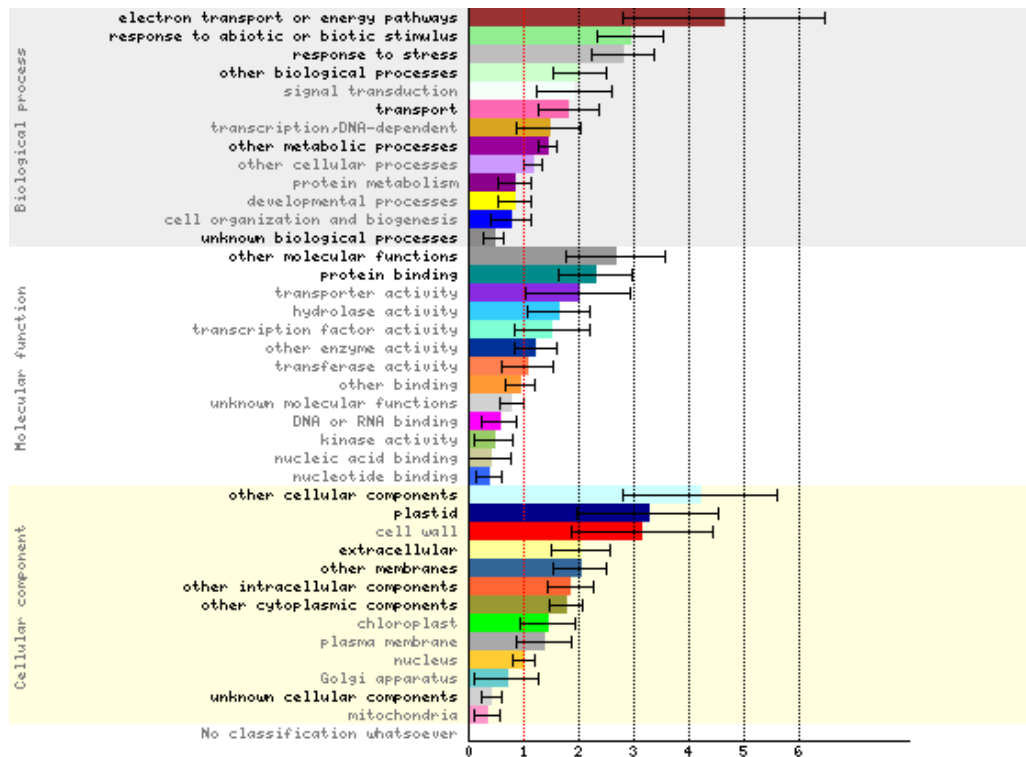
C



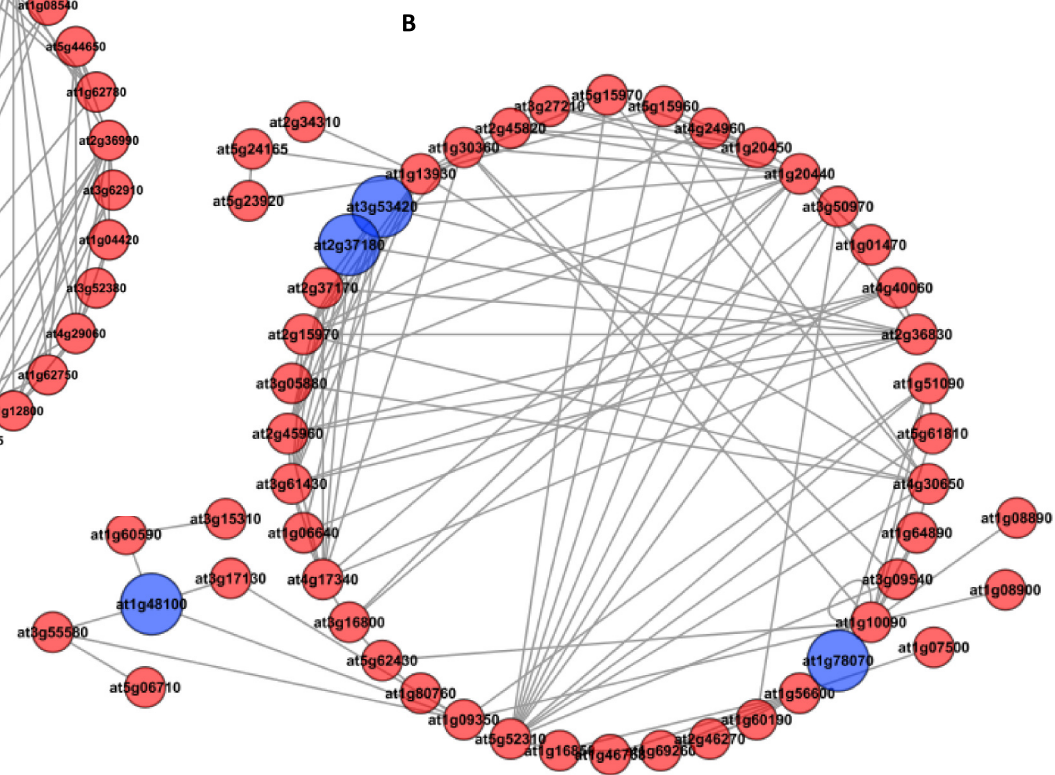
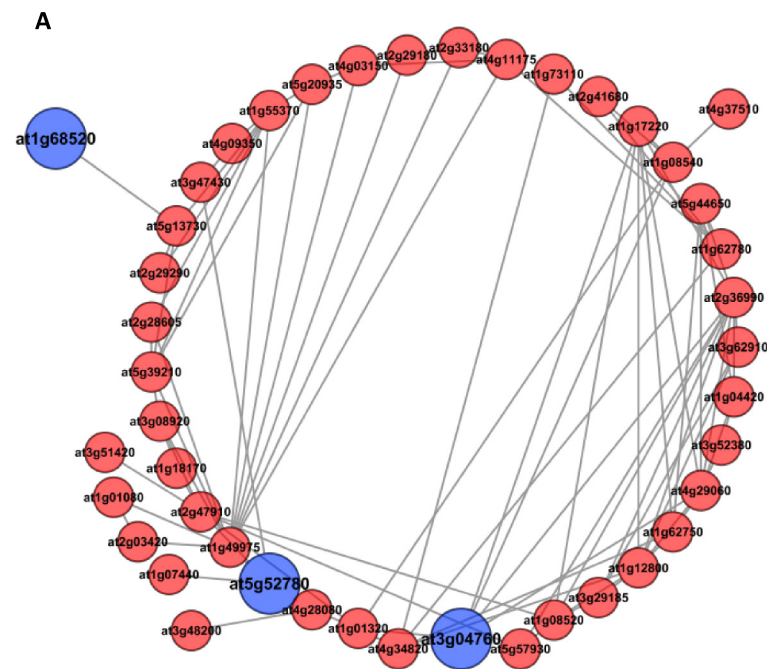
**Figura Suplementar 7.** Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão gênica medida em diferentes concentrações de manose (50, 20, 10, 5 e 1mM). **A.** *At4g36010*, *At5g20150*, *At1g61340*, *At1g48100*, *At3g19030* e *At4g28240* genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose (categoria 1, Tabela Suplementar 2), **B.** *At3g02040*, *At5g25350*, *At3g11430*, *At1g54010* e *At3g17390* genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2), e **C.** *At5g55090*, *At5g01220*, *At4g30290*, *At1g78080*, *At4g21870* e *At3g30180* genes regulados por manose e não por glicose (categoria

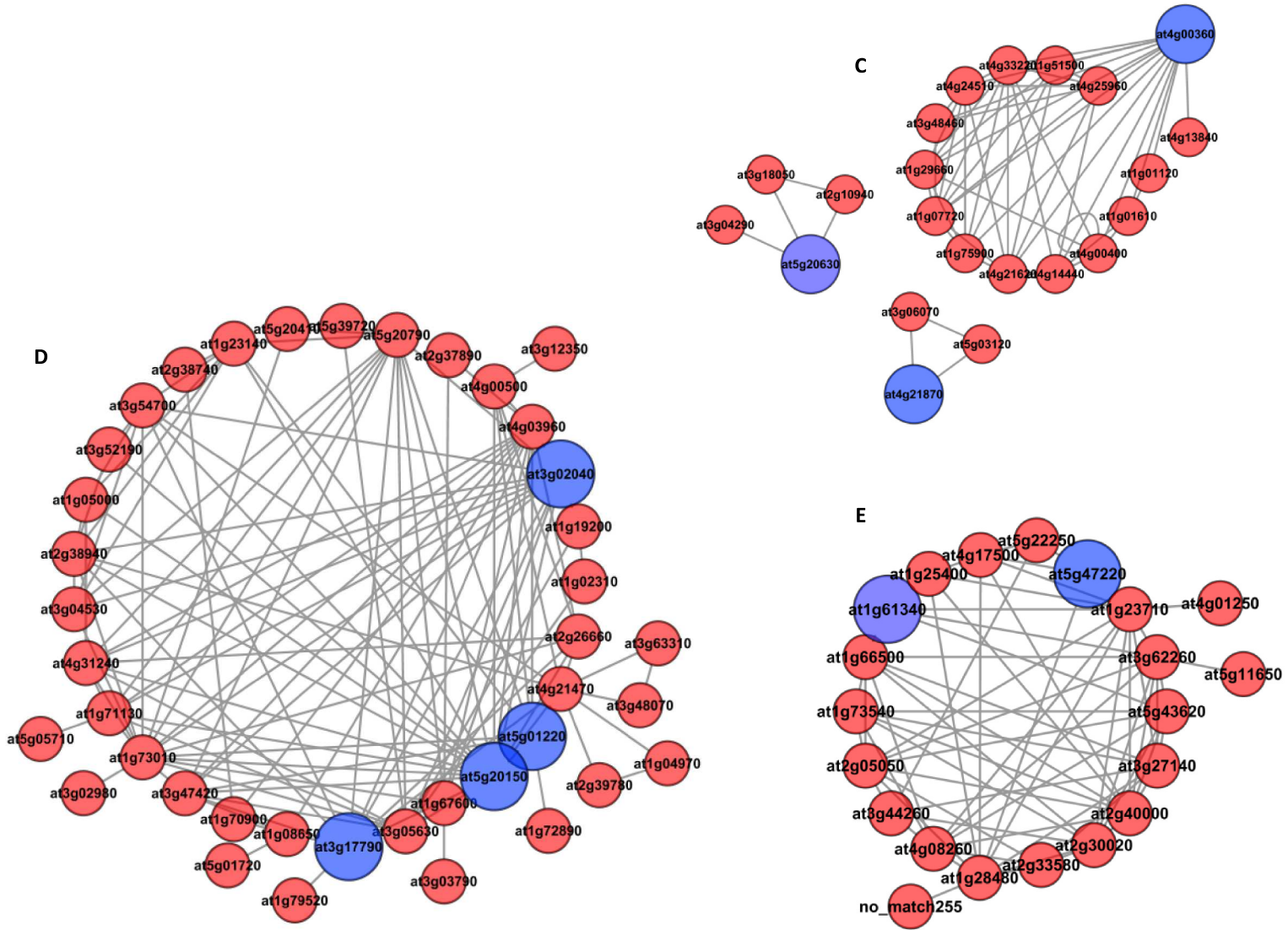


3, Tabela Suplementar 2) que confirmaram os resultados apresentados no nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2 modificado (MS/2 sem fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose e 110 mM de manitol durante 2 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento ( $\sim$  início do tratamento,  $t = 0$ ). Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. As diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (tratado x não tratado), “b” (glicose x manitol), “c” (manose x manitol) e “d” (manose x glicose) no gráfico.



**Figura Suplementar 8.** Classificação dos genes regulados por manose segundo os critérios do Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/GO>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) e Blast2GO ([http://blast2go.bioinfo.cipf.es/start\\_blast2go](http://blast2go.bioinfo.cipf.es/start_blast2go)).







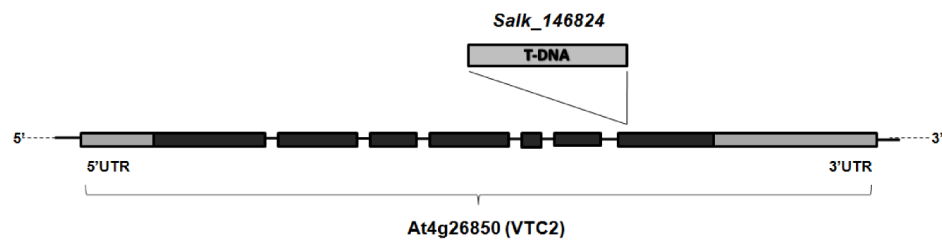


### 3.3 PARTE III

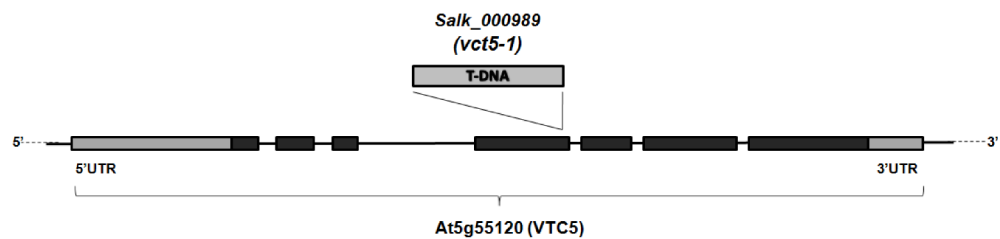
#### 3.3.1 Avaliação preliminar da importância da biossíntese do ácido L-ascórbico a partir da manose na sinalização por este açúcar.

Verificamos o envolvimento do metabolismo da manose como precursor da biossíntese do ácido L-ascórbico para sua sinalização. Os mutantes, por inserção de T-DNA (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) correspondente a *VTC2* (*At4g26850*, Figura 8 A) e *VTC5* (*At5g55120*, Figura 8 B) (GDP-L-galactose fosforilase; Linster *et al.*, 2007; Laing *et al.*, 2004) e *VTC4* (*At3g02870*, Figura 8 C) (L-Galactose-1-fosfato fosfatase; Conklin *et al.*, 1999 e Conklin *et al.*, 2006). Os resultados obtidos até o momento, embora não envolvam o bloqueio de todas as enzimas dessa via metabólica, mostraram que não houve alteração na expressão de genes candidatos em resposta a manose comparando mutantes versus selvagem, sugerindo que o fluxo metabólico da via de síntese da vitamina C não está envolvido na sinalização da manose (Figura 9). Porém, ainda é necessário definir de maneira mais precisa o efeito das inserções de T-DNA nestes genes da via de síntese da vitamina C bem como realizar novos experimentos com outros mutantes da via.

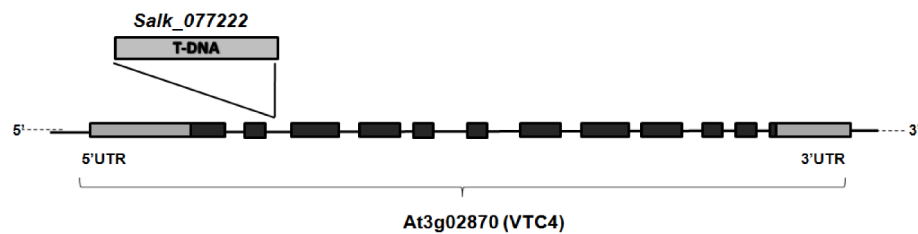
A



B



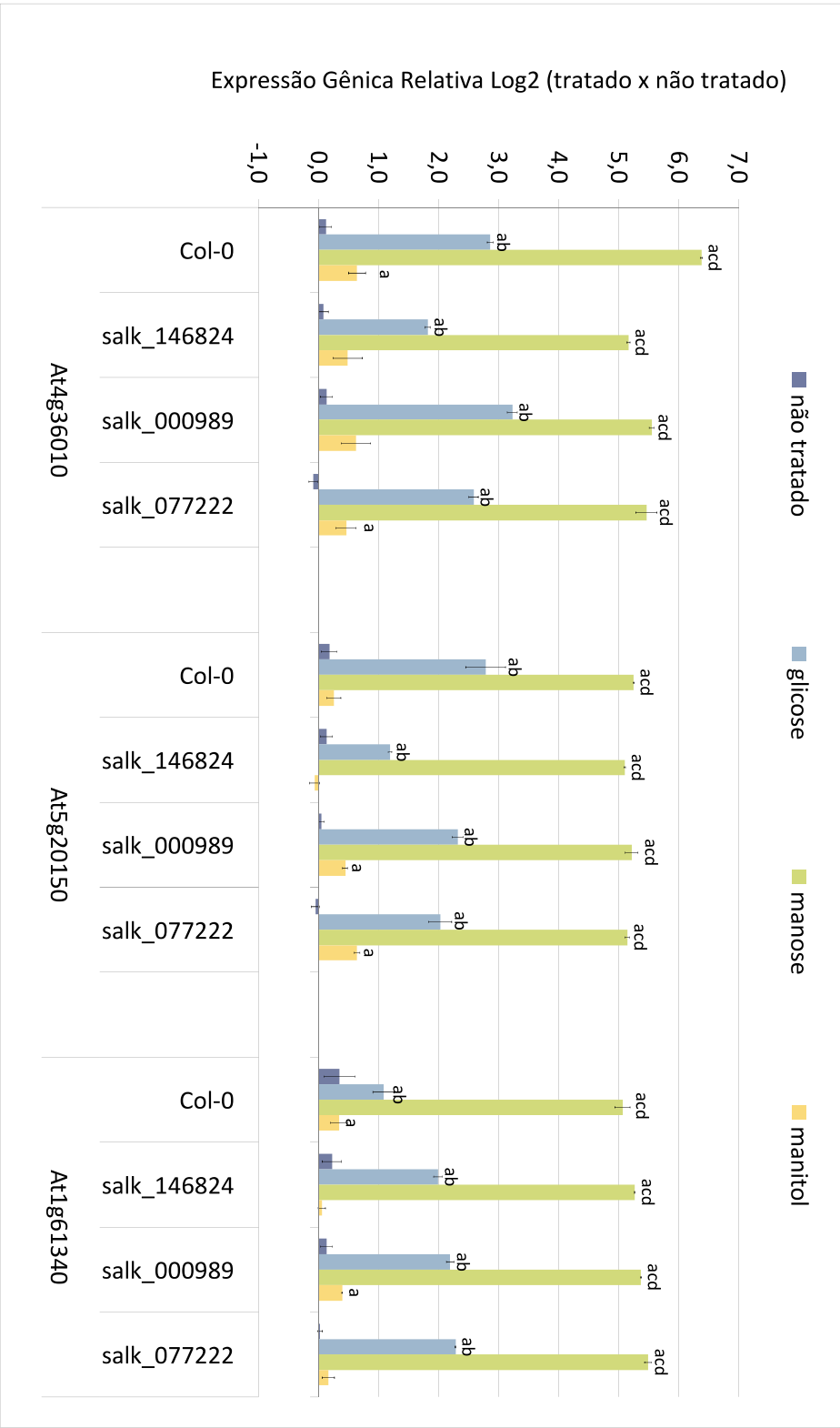
C

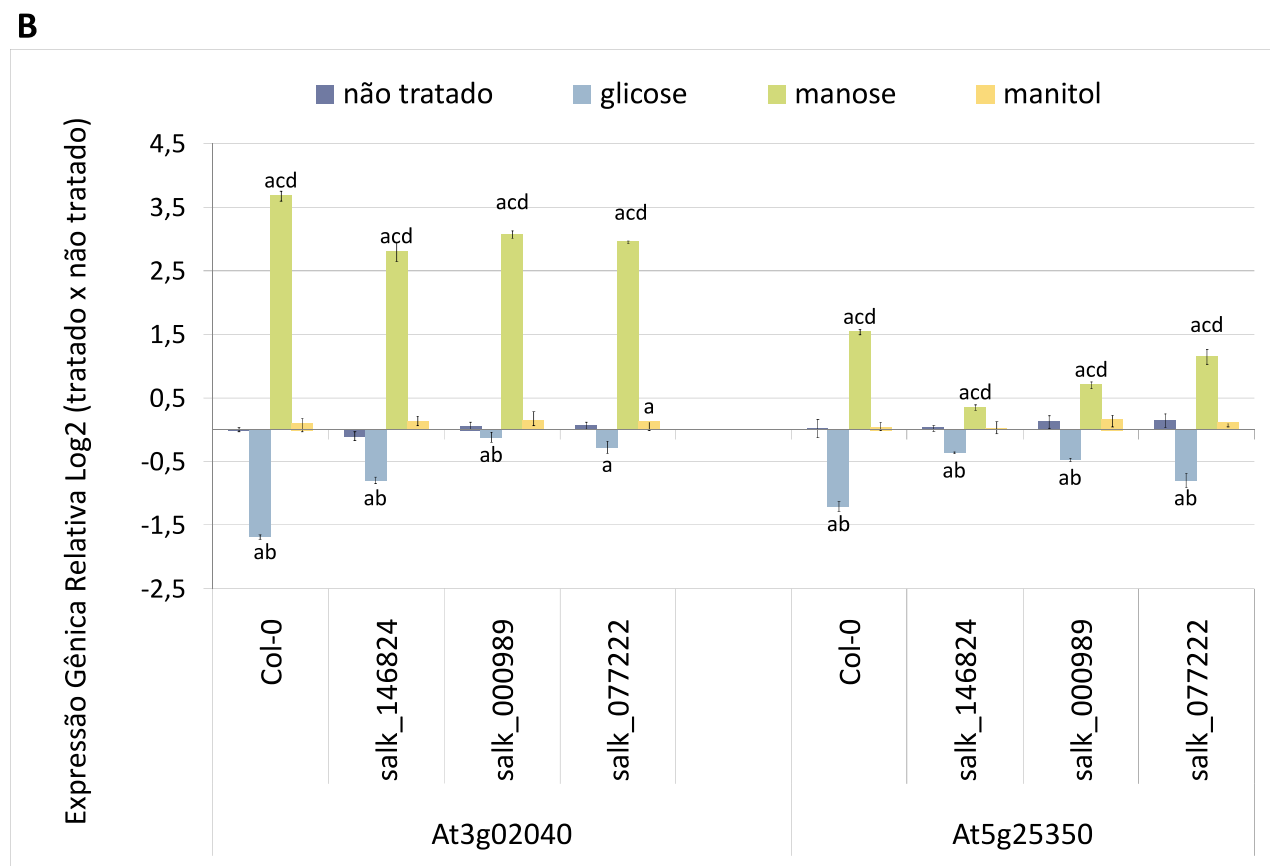


**Figura 8.** Representação da inserção T-DNA no gene *At4g26850* (A), *At5g55120* (B, Linster *et al.*, 2007) e *At3g02870* (C).



A



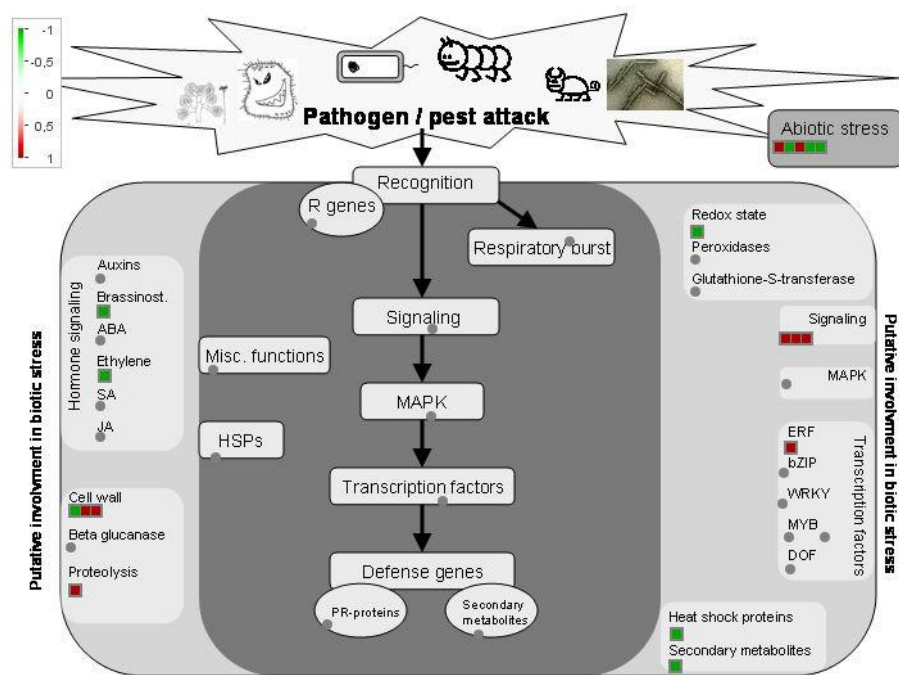


**Figura 9.** Análise quantitativa (qRT-PCR) da expressão dos genes em resposta a glicose, manose e manitol. A. *At4g36010*, *At5g20150* e *At1g61340*, genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação mais acentuada por manose

(categoria 1, Tabela Suplementar 2, página 57, manuscrito), B. *At3g02040* e *At5g25350*, genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (categoria 2, Tabela Suplementar 2, página 57, manuscrito) que confirmaram os resultados apresentados no nosso experimento de microarranjo. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), e dos mutantes *Salk\_146824* (*vtc2*, *At4g26850*), *Salk\_000989* (*vtc5*, *At5g55120*) e *Salk\_077222* (*vtc4*, *At3g02870*) com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sem privação de açúcar no sexto dia após germinação, sob luz contínua com quantidade em torno de 100 - 150  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 110 mM de glicose, 110 mM de manose e 110 mM de manitol durante 2 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de qRT-PCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Pdf2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento ( $\sim$  início do tratamento,  $t = 0$ ). Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. As diferenças significativas foram estabelecidas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,05$ ), indicados com “a” (tratado x não tratado), “b” (glicose x manitol), “c” (manose x manitol) e “d” (manose x glicose) no gráfico.

### 3.3.2 Perfis da expressão de genes regulados por manose: MapMan

Utilizando o software MapMan (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan>) que suporta a visualização de perfis de conjuntos de dados conhecidos oferecendo a possibilidade de analisar dados de microarranjo, proteínas, enzimas e metabólitos em diagramas de vias ou processos num contexto biológico, apoiado por uma ontologia específica da planta em que a redundância fica minimizada (Usadel *et al.*, 2008) analisamos a distribuição dos 44 genes regulados por manose, considerando os diferentes sentidos de regulação em diferentes vias metabólicas disponíveis e pudemos verificar que o maior percentual desses genes encontra-se envolvido com estresse abiótico e biótico (Figura 10).



**Figura 10.** Perfil de expressão dos 44 genes regulados por manose de acordo com o software MapMan (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan>).

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Após completarmos a validação de um conjunto de 44 genes especificamente ou acentuadamente regulados por manose usando qRT-PCR, classificarmos esta coleção de genes em 3 categorias de acordo com o sentido da regulação (indução versus repressão) e sua especificidade (restrito a manose versus manose preferencial com relação à glicose ou manitol) nos dedicamos a várias novas análises buscando melhor entendimento da rede de regulação controlada por este açúcar em *Arabidopsis thaliana*.

Completamos as análises comparativas das cinéticas de resposta (0h, 1/4h, 1/2h, 1h e 2h) à manose, glicose e manitol, assim como análises da regulação pela frutose nos 44 genes validados e verificamos para estes genes que a regulação mediada pela frutose é distinta daquela promovida pela manose. Nenhuma alteração da quantidade de ATP foi notada na presença de manose permitindo descartar a hipótese de um efeito indireto da manose de estresse energético por limitação de ATP resultando da fosforilação da manose por hexoquinases.

Em condições experimentais não submetidas a estresse energético e em condições experimentais sem fosfato verificamos que a regulação preferencial pela manose e a regulação por manose e glicose em sentidos opostos se mantêm constantes. Definimos também pela análise da regulação da expressão gênica em diferentes concentrações de manose (50, 20, 10, 5 e 1 mM) e em diferentes tempos (1/2h e 2h) que a sensibilidade da sinalização por manose não apresenta alterações nessa gama de concentrações. Para completar e finalizar a identificação de uma via de sinalização da manose definimos a parcela de envolvimento do metabolismo da manose nas regulações induzidas por este açúcar. Os resultados obtidos até o momento sugerem a existência de uma via de sinalização dedicada a manose. Os dados são inéditos e levantam a pergunta sobre o papel fisiológica destas regulações.



## 5. PERSPECTIVAS

---

- Quantificar os metabólitos intracelulares glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato, manose 6-fosfato, sacarose após tratamento por manose em *Arabidopsis* por espectrometria de massa para reforçar as conclusões sobre a sinalização desencadeada por manose.
- Identificação de seqüências de regulação responsivas a manose e comuns a genes co-regulados para elaborar um sistema de seleção de mutantes (mutagênese por etil metano sulfonato, EMS) apresentando respostas alteradas à manose com relação ao tipo selvagem.
- Avaliar a regulação dos promotores por manose num sistema de expressão transiente em protoplastos de mesófilos de *Arabidopsis thaliana* (Yoo *et al.*, 2007).
- Avaliação da conservação evolutiva da regulação por manose em angiospermas.





## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. 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.(4):506-19.
2. Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero J L, Munoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta, V. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase Nat Biotechnol, 21:177-181.
3. 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, 15, 14(16):2085-96.
4. Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein J M, Iturriaga G. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling Plant Physiol, 136(3):3649-59.
5. Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. Nature 448(7156):938-424.
6. Barth C, Moeder W, Klessig D F, Conklin P L. 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vitamin c-1 Plant Physiology, 134(4):1784–1792.
7. Black CC, Loboda T, Chen J, Sung S. 1995. Can sucrose cleavage enzymes serve as markers for sink strength and is sucrose a signal molecule during plant sink development? American Society of Plant Physiologists 1995: 49-64.
8. Bläsing, O E et al. 2005. Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis* The Plant Cell, Vol 17, 3257–3281.
9. Bonin CP, Potter I, Vanzin GF, Reiter W-D. 1997. The MUR1 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose Proceedings of the National

Academy of Sciences of the USA, Washington DC, 4:2085-2090.

10. Bonin CP, Reiter WD. 2000. A bifunctional epimerase reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the de novo synthesis of GDP-L-fucose in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 21:445-454.
11. 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(4):1533-43.
12. Brocard-Gifford I, Lynch TJ, Garcia ME, Malhotra B, Finkelstein PR .(2004) The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth *Plant Cell*, 16(2):406-21.
13. Buckeridge MS, Tiné MAS, Dos Santos HP, De Lima DU. 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos *R Bras Fisiol Veg*, 12 (Edição Especial):137-162.
14. Chen C, Dickman MB. 2004. Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplasttargeted herbicides *J Exp Bot*, 55:2617–2623.
15. Chen JG, Jones AM. 2004. AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana* *Methods Enzymol*, 389:338-50.
16. Chen J, Jones A, Ecker J. 2003. A reevaluation of the role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis* *Plant Physiology*, 131(4):1623-1627.
17. 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(1):302-10.
18. Cheng YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis* *Plant Physiol*, 129:661–677.
19. Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith AM. 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for the conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night *Plant Journal* 37, 853–863.

20. Cho YH, Yoo SD. 2011. Signaling Role of Fructose Mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genetics, 7 (1): e1001263.
21. Cho YH, Yoo SD, Sheen J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. Cell, 127: 579-589.
22. Cho YH, Yoo SD, Sheen J. 2007. Glucose signaling through nuclear hexokinase1 complex in Arabidopsis. Plant Signaling and Behavior 2: 123–124.
23. Colville L, Smirnoff N. 2008. Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana* vtc mutant. J Exp Bot, 59(14):3857-68.
24. Conklin PL, Gatzek S, Wheeler GL, Dowdle J, Raymond MJ, Rolinski S, Isupov M, Littlechild JA, Smirnoff N. 2006. *Arabidopsis thaliana* VTC4 Encodes L-Galactose-1-P Phosphatase, a Plant Ascorbic Acid Biosynthetic Enzyme. The Journal of Biological Chemistry, 23 (281):15662–15670.
25. Conklin PL, Williams EH, Last RL. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. Proc Natl Acad Sci USA, 93(18):9970–9974.
26. Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, Last RL. 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 96:4198-4203.
27. Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL. 2000. Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. Genetics, 154:847-856.
28. Conklin PL, Barth C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. Plant Cell Environ, 27:959–970.
29. De Pinto MC, De Gara L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. J Exp Bot, 55:2559–2569.
30. Dekkers BJ, Schuurmans JA, Smeekens SC. 2004. Glucose delays seed germination in Arabidopsis thaliana. Planta, 218(4):579-88.
31. Dobrenel T, Marchive C, Azzopardi M, Clément G, Moreau M, Sormani R, Christophe Robaglia C, Meyer C. 2013. Sugar metabolism and the plant target

- of rapamycin kinase: a sweet opera TOR? Plant Sci. 2013; 4: 93.
32. Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnoff N. 2007. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactosephosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. Plant J. Nov, 52(4):673-89.
  33. Filkowski J, Kovalchuk O, Kovalchuk I. 2004. Genome stability of vtc1, tt4, and tt5 *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in protection against oxidative stress Plant J, 38(1):60-9.
  34. Finkelstein, RR. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. Plant J, 5:765-771.
  35. Foissac S, Bardou P, Moisan A, Cros MJ, Schiex T. 2003. EUGENE'HOM: A generic similarity-based gene finder using multiple homologous sequences Nucleic Acids Res, 31(13):3742-5.
  36. Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell, 17(7):1866-75.
  37. Foyer CH, Kerchev P, Hancock RD. 2012. The ABA-INSENSITIVE-4 (ABI4) transcription factor links redox, hormone and sugar signaling pathways. Plant Signaling & Behavior 7:2, 276–281.
  38. Gao Y, Badejo AA, Shibata H, Sawa Y, Maruta T, Shigeoka S, Page M, Smirnoff N, Ishikawa T . 2011. Expression analysis of the VTC2 and VTC5 genes encoding GDP-L-galactosephosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana* Biosci Biotechnol Biochem 75(9):1783-8.
  39. Gatzek S, Wheeler GL, Smirnoff N. 2002. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. Plant J, 30:541-553.
  40. Geigenberger P. 2011. Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. Plant Physiology, vol. 155 no. 4 1566-1577.
  41. Gibon Y, Bläsing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JH, Fisahn J, Höhne M, Günther M, Stitt M. 2004. Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of

- carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADPglucosepyrophosphorylase in the following light period. *Plant J.* 39:847–862.
42. Gibson SI, Laby RJ, Kim D. 2001. The sugar-insensitive1 (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1* *BiochemBiophys Res Commun*, 280(1):196-203.
  43. Gibson S. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biology*, 8(1):93-102.
  44. Gilbert HR. 2010. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiology*. vol. 153 no. 2 444-455.
  45. Giorgini JF, Comoli E. 1996. Effect of embryo and exogenous GA3 on endospermic endo- $\beta$ -mannanase activity of *Coffea arabica* L. During germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 8:43-49.
  46. Halford NG, Byren E, Hey SJ. 2009. The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of Botany* Volume 105, Issue 2 Pp. 197-203.
  47. Halford NG, Purcell PP, Grahame D, Hardie DG. 1999. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends in Plant Science*, (4): 117-120.
  48. Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks M, Smeeckens S. 2008. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *The Plant Journal* 53(6):935-949.
  49. Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M and Geigenberger, P. 2003. ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species *PlantPhysiol* 133, 838–849.
  50. Herold A, Lewis D H .1977. Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol*, 79:1–40.
  51. Huang C, He W, Guo J, Chang X, Su P, Zhang L. 2005. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *J Exp Bot*, 56(422):3041-9.
  52. Huang J, Taylor JP, Chen J, Jones A. 2006. The plastid protein THYLAKOID FORMATION1 and the plasma membrane G-Protein GPA1 interact in a novel

- sugar-signaling mechanism in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18:1226-1238.
53. Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeeckens S. 2000. The *Arabidopsis* *Sucrose uncoupled-6* gene is identical to *Abscisic acid insensitive-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *The Plant Journal*, 23 (5):577-585.
  54. Jain AK, Nessler CL. 2000. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breeding*, 6:73-78.
  55. Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL. 2002. Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol*, 129,(2):440–450.
  56. Jang JC, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, 6: 1665–1679.
  57. Jang J-C, León P, Zhou L, Sheen J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants *Plant Cell*, 9: 5–19.
  58. Jang JC, Sheen J. 1997a. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.*, 2:208-214.
  59. Jang JC, Sheen J. 1997b. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, 9:5-19.
  60. Jin X, Ballicora MA, Preiss J, Geiger JH .2005. Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *EMBO Journal* 24: 694-704.
  61. Johnston M, Kim JH. 2005. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry Society Transcripts*, 33: 247-252.
  62. Keller R, Springer F, Renz A, Kossmann J. 1999. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence *Plant J*, 19:131-141.
  63. Koch KE. 1996 Carbohydrate-modulated gene expression in plants *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*,47:509-540.
  64. Kotting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M Ritte G. 2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiology* 137:242-252.
  65. Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J . 2007. Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression *Science*, 316:715-718 Laby *et al*, 2000.

66. 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(5):587-96.
67. Laing WA, Bulley S, Wright M, Cooney J, Jensen D, Barraclough D, MacRae E. 2004. A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(48):16976–16981.
68. Lavoie KL, Fleet RP, Lespérance F, Arsenault A, Laurin C, Frasure-Smith N, Bacon SL. 2004. Are exercise stress tests appropriate for assessing myocardial ischemia in patients with major depressive disorder? *Am Heart J*, 148(4):621-7.
69. León P e Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections *Trends in Plant Science*, 8(3):110-116.
70. Li Y, Lee K, Walsh S, Smith C, Bevan M. 2006. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine *Genome Research*, 16:414-427.
71. Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, Steven G Clarke SG. 2007. Arabidopsis VTC2 encodes a GDP-L-galactosephosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants *J Biol Chem*, 282(26):18879-85.
72. Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD. 2005. Day length and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism *Plant Physiol*, 138:2280–2291.
73. Lukowitz W, Nickle TC, Meinke DW, Last RL, Conklin PL, Somerville CR. 2001. Arabidopsis *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci U S A* 98(5):2262-7 Feb 20.
74. Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret 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(8): 2089-103.

75. Mahfouz M, Kim S, Delauney AJ and Verma DPS. 2006. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase in Response to Osmotic Stress Signals The Plant Cell February 2006 vol. 18 no. 2 477-490.
76. Mattioli CC et al. 2011. The Arabidopsis bZIP Gene AtbZIP63 Is a Sensitive Integrator of Transient Abscissic Acid and Glucose Signals Plant Physiology, vol 157, p 692–705.
77. Matsoukas IG, Massiah AJ, Thomas B . 2013. Starch Metabolism Has a Role in Juvenile-to-Adult Phase Transition in *Arabidopsis* Plant Cell Environ 2013 doi: 10.1111/pce.12088.
78. Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W, Liu Y, Jones T, Sheen J . 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient light and hormonal signaling Science,300(5617):332-336.
79. Muller-Moule P, Havaux M, Niyogi KK . 2003. Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of Arabidopsis Plant Physiol,133(2):748–60.
80. Murashige T, Skoog F . 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol Plant, 15:473-497.
81. Mutwil M, Usadel B, Schütte M, Loraine A, Ebenhöf O, Persson S. 2010. Assembly of an Interactive Correlation Network for the Arabidopsis Genome Using a Novel Heuristic Clustering Algorithm. Plant Physiology,152: 29-43.
82. Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, A-H-Mackerness S, Buchanan-Wollaston V. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress J Exp Bot, 54:2285–2292.
83. Nielsen TH, Krapp A, Roper-Schwarz U and Stitt M. 1998. The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen Plant Cell Environ 21, 443–454.
84. O'Hara LE, Paul MJ and Wingler A . 2013. How Do Sugars Regulate Plant Growth and Development? New Insight into the Role of Trehalose-6-Phosphate. Molecular Plant. Volume 6. Number 2 • Pages 261–274.



85. Pastori G M, Kiddle G, Antoniow J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer C H . 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling *Plant Cell*, 15:939–951.
86. Paul MJ, Foyer C. 2001. Sink regulation of photosynthesis *Journal Experimental of Botany*, v 52 n 360 p 1383-1400.
87. Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y. 2008. Trehalose metabolism and signaling *Annu Rev Plant Biol* 59: 417–441.
88. Pavet V, Olmos E, Kiddle G, Mowla S, Kumar S, Antoniow J, Alvarez ME, Foyer CH. 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis* *Plant Physiol* , Nov,139(3):1291-303 Epub 2005 Oct 21.
89. Pego JV, Kortsee AJ Huijser C, Smeekeens SCM. 2000. Photosynthesis sugars and the regulation of genes expression . *Journal Experimental of Botany* 51:407-416.
90. Pego JV, Kortsee AJ Huijser C, Smeekeens SCM. 2000. Photosynthesis sugars and the regulation of genes expression *Journal Experimental of Botany* 51:407-416.
91. Pego, JV, Weisbeek, PJ, Smeekeens, SCM. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step *Plant Physiology*, 119:1017–1023.
92. Pignocchi, C, Foyer, C H . 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling *Curr Opin Plant Biol* 6:379–389.
93. Popper ZA .2008. Evolution and diversity of green plant cell walls *Current Opinion in Plant Biology* Volume 11, Issue 3, June 2008, Pages 286–292.
94. Potters G, Horemans N, Bellone S, Caubergs J, Trost P, Guisez Y, Asard H . 2004. Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione independent reduction mechanism *Plant Physiol*, 134:1479–1487.
95. Preiss J (ed). 1988. Biosynthesis of starch and its regulation *In The Biochemistry of Plants*, Vol 14 San Diego, CA: Academic Press, pp 181–254.
96. Price J, Laxmi A, Martin S, Jang J . 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis* *Plant Cell*, 16(8):2128-50.

97. Ramon M, Rolland F, Thevelein JM, Van Dijck P, Leyman B. 2006. ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown. *Plant Mol Biol.* Jan;63(2):195-206.
98. Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar stress *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198-206.
99. Roitsch T, Bittner M, Godt DE. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation *Plant Physiol* 108(1):285-94.
100. Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants *Plant Cell*, 14(Supplement):S185-205.
101. Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms *Annual Rev of Plant B*, 57:675-709.
102. Rook F, Gerrits N, Kortstee A, Van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S. 1998. Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2bZIP transcription factor gene *The Plant Journal*, 5: 253-263.
103. Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression *Plant, Cell & Environment* 29:426-434.
104. 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(4):421-33.
105. Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M and Stitt M .1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco *Plant Cell*, 9, 783–798.
106. Schnarrenberger C . 1990. Characterization and compartmentation, in green leaves, of hexokinases with different specificities for glucose, fructose, and mannose and for nucleoside triphosphates. *Planta* May 1990, Volume 181, Issue 2, pp 249-255.
107. Seifert, GJ. 2004. Nucleotide sugars interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside *Current Opinion in Plant Biology*, 7:277-284.

108. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13:2498-2504.
109. Sheen J, Zhou L, Jang JC. 1999. sugar as signaling molecules *Current Opininnion in Plant Biology* v2, p 410-418.
110. Sheen J. 1990. Mebabolic repression of transcription in higher plants *The Plant Cell* October, vol 2 no 10 1027-1038.
111. Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol*, 51:49-81.
112. Smirnoff N, Wheeler, G l. 2000. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function *Critical Rev Biochem Mol Biol*, 35:291-314.
113. Smirnoff N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3(3):229-35.
114. Smirnoff, N, Conklin, PL, Loewus, FA. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A Renaissance *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52:437–467.
115. Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule *CurrOpin Plant Biol*, 3(3):229-35.
116. Smirnoff N. 2001. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm*,61:241-66.
117. Stitt M, Zeeman SC Starch turnover: pathways, regulation and role in growth *CurrOpin Plant Biol*. 15:282–292.
118. Tabata K, Oba K, Suzuki K, Esaka M . 2001. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase *Plant J*, 27:139-148.
119. Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre EM and Geigenberger, P . 2002. Starch synthesis in potatotubers is regulated by post-translational redox modification ofADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanismlinking starch synthesis to the sucrose supply *Plant Cell*, 14,2191–2213.
120. Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, Esaka M . 2005. Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for

- L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase *Planta* 220:854–863.
121. Toorop PE, Bewley JD, Hilhorst HWM . 1996. Endo-mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination *Planta*, 200:153-158.
  122. Torabinejad J, Donahue JL, Gunesequera BN, Allen-Daniels MJ, Gillaspay GE .2009. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants *Plant Physiol*, Jun,150(2):951-61.
  123. Ullah H, Chen J, Wang S, Jones A . 2002. Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination *Plant Physiology*, 129(2):897-907.
  124. 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.
  125. Valpuesta V, Botella M .2004. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant *TRENDS in Plant Science*, 9:573-577.
  126. Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10876–10880.
  127. Wagner D, Przybyla D, Op den Camp R, Kim C, Landgraf F, Lee KP, Würsch M, Laloi C, Nater M, Hideg E, et al . 2004. The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana* *Science*, 306:1183–1185.
  128. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N .1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393:365-369.
  129. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N .1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393:365-369.
  130. 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.
  131. Wolucka BA, Van Montagu M. 2003. GDP-Mannose 30, 50-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem*, 278:47483–47490.

132. Xiao W, Sheen J, Jang J. 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biology*, 44(4):451-461.
133. Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 425:521–525.
134. Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. 2002. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays *Genome Biology*, 3, 62.
135. Yoo SD, Cho YH, Sheen J. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis *Nat Protoc*, 2(7):1565-1572.
136. Yuan K, Wysocka-Diller J. 2006. Phytohormone signalling pathways interact with sugars during seed germination and seedling development. *J Exp Bot*, 57(12):3359-67.
137. Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, ap Rees, T. 1998. A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J* 15, 357–365.
138. Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Powers SJ, Schluepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ. 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol*. 149, 1860–1871.
139. Zhou L, Jang JC, Jones TL, Sheen J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucoseinsensitive mutant *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:10294–10299.
140. Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann, M, Gruissem, W. 2004. Genevestigator: *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 136: 2621-2632.



## 7. MATERIAL SUPLEMENTAR

| <b>Tabela Suplementar 1.</b> Genes sem ID Affymetrix correspondente ao CATMA. |             |                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>AGI</b>                                                                    | <b>Log2</b> | <b>Função</b>                                                           |
| AT2G16586                                                                     | -2,5        | unknown protein                                                         |
| AT4G32480                                                                     | -2,4        | unknown protein                                                         |
| AT2G17036                                                                     | -2,3        | F-box family protein                                                    |
| AT3G42722                                                                     | -2,1        | pseudogene                                                              |
| AT2G01021                                                                     | -2,1        | unknown protein                                                         |
| AT5G01715                                                                     | -2,0        | pseudogene, F-box family protein (FBL3)                                 |
| AT1G30320                                                                     | -2,0        | remorin family protein                                                  |
| AT5G41300                                                                     | -1,9        | receptor-like protein kinase-related                                    |
| AT4G25672                                                                     | -1,9        | unknown protein, unknown protein                                        |
| AT4G15990                                                                     | -1,8        | unknown protein                                                         |
| AT2G47485                                                                     | -1,7        | binding                                                                 |
| AT1G07900                                                                     | -1,7        | LOB domain protein 1 / lateral organ boundaries domain protein 1 (LBD1) |
| AT1G03106                                                                     | -1,7        | unknown protein                                                         |
| AT5G48160                                                                     | -1,7        | protein binding / zinc ion binding                                      |
| AT2G43445                                                                     | -1,6        | unknown protein                                                         |
| AT1G17940                                                                     | -1,6        | unknown protein                                                         |
| AT2G37170                                                                     | -1,5        | PIP2B (plasma membrane intrinsic protein 2;2); water channel            |
| AT3G03010                                                                     | -1,5        | unknown protein                                                         |
| AT1G36730                                                                     | 1,5         | eukaryotic translation initiation factor 5, putative / eIF-5, putative  |
| AT1G45063                                                                     | 1,5         | copper ion binding / electron carrier                                   |
| AT4G06744                                                                     | 1,6         | leucine-rich repeat family protein / extensin family protein            |
| AT1G68238                                                                     | 1,6         | unknown protein                                                         |
| AT1G45201                                                                     | 1,7         | triacylglycerol lipase                                                  |
| AT3G55340                                                                     | 1,8         | RNA recognition motif (RRM)-containing protein                          |
| AT3G49330                                                                     | 1,8         | invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein                |
| AT4G03540                                                                     | 1,9         | integral membrane family protein                                        |
| AT1G59359                                                                     | 2,0         | 40S ribosomal protein S2 (RPS2B)                                        |
| AT1G26810                                                                     | 3,0         | galactosyltransferase family protein                                    |
| Log2 = razão glicose/manose com valor $\log_2 \geq -1,5$ (nosso experimento)  |             |                                                                         |

| <b>Tabela Suplementar 2.</b> Genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação preferencial por glicose (gli+/man+ e gli-/man-). |             |                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------|
| <b>AGI</b>                                                                                                                                          | <b>Log2</b> | <b>Função</b>                                         |
| AT2G41660                                                                                                                                           | 1.5         | unknown protein                                       |
| AT5G19900                                                                                                                                           | 1.5         | PRLI-interacting factor, putative                     |
| AT5G15960                                                                                                                                           | 1.5         | KIN1                                                  |
| AT2G48140                                                                                                                                           | 1.6         | EDA4 (embryo sac development arrest 4); lipid binding |

|                                                                                    |      |                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------------------------------|
| AT3G25640                                                                          | 1.6  | unknown protein                                                     |
| AT3G50970                                                                          | 1.6  | LTI30/XERO2 (LOW TEMPERATURE-INDUCED 30)                            |
| AT3G12580                                                                          | 1.6  | HSP70 (heat shock protein 70); ATP binding                          |
| AT5G42650                                                                          | 1.7  | AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE); hydro-lyase/ oxygen binding            |
| AT5G56030                                                                          | 1.8  | HSP81-2 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 8); ATP binding            |
| AT5G09530                                                                          | 1.9  | hydroxyproline-rich glycoprotein family protein                     |
| AT1G80440 <sup>+</sup>                                                             | -2,9 | kelch repeat-containing F-box family protein                        |
| AT5G41080 <sup>+</sup>                                                             | -2,7 | glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein          |
| AT4G35770 <sup>+</sup>                                                             | -2,3 | SEN1 (DARK INDUCIBLE 1)                                             |
| AT1G35140                                                                          | -1,9 | PHI-1 (PHOSPHATE-INDUCED 1)                                         |
| AT1G08630                                                                          | -1,9 | THA1 (THREONINE ALDOLASE 1)                                         |
| AT4G01030                                                                          | -1,8 | pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein, unknown protein  |
| AT4G30270                                                                          | -1,7 | MER15B (MERISTEM-5); hydrolase, acting on glycosyl bonds            |
| AT3G45730                                                                          | -1,7 | unknown protein                                                     |
| AT5G54080 <sup>+</sup>                                                             | -1,7 | HGO (HOMOGENITISATE 1,2-DIOXYGENASE); homogentisate 1,2-dioxygenase |
| AT3G59350                                                                          | -1,6 | kinase                                                              |
| AT2G39980                                                                          | -1,6 | transferase family protein                                          |
| AT5G18170                                                                          | -1,6 | GDH1 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 1); oxidoreductase                    |
| AT5G17300                                                                          | -1,5 | myb family transcription factor                                     |
| AT3G15450 <sup>+</sup>                                                             | -1,5 | unknown protein                                                     |
| Log2 = razão glicose/manose com valor log2 ≥   -1,5   (nosso experimento)          |      |                                                                     |
| + = sobreposição com gene induzido por KIN10 (Baena-González <i>et al.</i> , 2007) |      |                                                                     |

**Tabela Suplementar 3.** Genes regulados por manose e glicose no mesmo sentido, com regulação preferencial por manose (gli+/man++ e gli-/man--).

| AGI       | Log2 | Função                                                                                                         |
|-----------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AT1G26220 | 1.5  | GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein                                                         |
| AT4G36670 | 1.5  | mannitol transporter, putative                                                                                 |
| AT5G48490 | 1.5  | protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein                                    |
| AT5G23920 | 1.6  | unknown protein                                                                                                |
| AT2G47450 | 1.6  | CAO (CHAOS); chromatin binding                                                                                 |
| AT1G29200 | 1.6  | unknown protein                                                                                                |
| AT1G01430 | 1.6  | unknown protein                                                                                                |
| AT1G76080 | 1.6  | ATCDSP32/CDSP32 (CHLOROPLASTIC DROUGHT-INDUCED STRESS PROTEIN OF 32 KD); thiol-disulfide exchange intermediate |
| AT3G04760 | 1.7  | pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein                                                              |
| AT4G28240 | 1.7  | wound-responsive protein-related                                                                               |
| AT2G44500 | 1.8  | unknown protein                                                                                                |
| AT1G68520 | 1.8  | zinc finger (B-box type) family protein                                                                        |
| AT4G37540 | 1.9  | LOB domain protein 39 / lateral organ boundaries domain protein 39 (LBD39)                                     |
| AT3G19030 | 1.9  | unknown protein                                                                                                |
| AT4G27440 | 1.9  | PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE B); oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase                     |
| AT1G03130 | 2.1  | PSAD-2 (photosystem I subunit D-2)                                                                             |
| AT5G52780 | 2.3  | unknown protein                                                                                                |



|            |      |                                                                                                                                      |
|------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AT2G38310  | 2.3  | unknown protein                                                                                                                      |
| AT1G54010* | 2.4  | myrosinase-associated protein, putative                                                                                              |
| AT5G15350  | 2.5  | plastocyanin-like domain-containing protein                                                                                          |
| AT4G21870  | 2.5  | 26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)                                                                              |
| AT1G03870  | 2.7  | FLA9 (FLA9)                                                                                                                          |
| AT1G34630  | 2.9  | unknown protein                                                                                                                      |
| AT4G28140  | -4.4 | AP2 domain-containing transcription factor, putative                                                                                 |
| AT2G37180* | -3.1 | RD28 (plasma membrane intrinsic protein 2;3); water channel                                                                          |
| AT1G20070  | -2.9 | unknown protein                                                                                                                      |
| AT4G36010  | -2.9 | pathogenesis-related thaumatin family protein                                                                                        |
| AT1G61340  | -2.9 | F-box family protein                                                                                                                 |
| AT3G56260  | -2.9 | unknown protein                                                                                                                      |
| AT5G44120* | -2.9 | CRA1 (CRUCIFERINA); nutrient reservoir                                                                                               |
| AT4G36500  | -2.8 | unknown protein                                                                                                                      |
| AT5G20150  | -2.7 | SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein                                                                                      |
| AT1G23650  | -2.7 | unknown protein                                                                                                                      |
| AT5G06530* | -2.6 | ABC transporter family protein                                                                                                       |
| AT5G62470* | -2.6 | MYB96 (myb domain protein 96); DNA binding / transcription factor                                                                    |
| AT1G78070  | -2.6 | WD-40 repeat family protein                                                                                                          |
| AT5G01220  | -2.3 | SQD2 (SULFOQUINOVOXYLDIACYLGLYCEROL 2); UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups |
| AT4G30290  | -2.3 | ATXTH19 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 19); hydrolase, acting on glycosyl bonds                                          |
| AT4G23060  | -2.3 | IQD22 (IQ-domain 22); calmodulin binding                                                                                             |
| AT1G77680  | -2.2 | ribonuclease II family protein                                                                                                       |
| AT3G23170  | -2.1 | unknown protein                                                                                                                      |
| AT3G05640  | -2.1 | protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative                                                                                    |
| AT2G20880  | -2.1 | AP2 domain-containing transcription factor, putative                                                                                 |
| AT4G30470  | -2.1 | cinnamoyl-CoA reductase-related                                                                                                      |
| AT2G33380  | -2.1 | RD20 (RESPONSIVE TO DESSICATION 20); calcium ion binding                                                                             |
| AT3G56880  | -2.0 | VQ motif-containing protein                                                                                                          |
| AT4G38810* | -1.9 | calcium-binding EF hand family protein                                                                                               |
| AT2G46600  | -1.9 | calcium-binding protein, putative                                                                                                    |
| AT3G17790  | -1.9 | ATACP5 (acid phosphatase 5); acid phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase                                                  |
| AT3G22370  | -1.8 | AOX1A (alternative oxidase 1A); alternative oxidase                                                                                  |
| AT4G10150  | -1.8 | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein                                                                                  |
| AT3G61630* | -1.8 | CRF6 (CYTOKININ RESPONSE FACTOR 6); DNA binding / transcription factor                                                               |
| AT5G55090* | -1.7 | MAPKKK15 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15); kinase                                                                 |
| AT4G12000  | -1.7 | unknown protein                                                                                                                      |
| AT4G00360  | -1.7 | CYP86A2 (ABERRANT INDUCTION OF TYPE THREE GENES 1); oxygen binding                                                                   |
| AT3G05960  | -1.6 | sugar transporter, putative                                                                                                          |
| AT5G55530* | -1.6 | C2 domain-containing protein                                                                                                         |
| AT1G02400  | -1.6 | ATGA2OX6/DTA1 (GIBBERELLIN 2-OXIDASE 6); gibberellin 2-beta-dioxygenase                                                              |
| AT5G28300  | -1.6 | trihelix DNA-binding protein, putative                                                                                               |

|           |      |                                                                                      |
|-----------|------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| AT1G78080 | -1.5 | RAP2.4 (related to AP2 4); DNA binding / transcription factor                        |
| AT1G73390 | -1.5 | unknown protein                                                                      |
| AT4G35550 | -1.5 | homeobox-leucine zipper protein (HB-2) / HD-ZIP protein                              |
| AT2G38640 | -1.5 | unknown protein                                                                      |
| AT1G48100 | -1.5 | glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein |

Log2 = razão glicose/manose com valor  $\log_2 \geq -1,5$  (nosso experimento)

\* = genes classificados apenas conforme o valor  $\log_2$  para glicose 2 horas/não tratado (Li *et al.*, 2006)

**Tabela Suplementar 4.** Genes regulados por manose e glicose em sentidos opostos (gli+/man- e gli-/man+).

| AGI         | Log2 | Função                                                                                                                                                                      |
|-------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AT1G05450   | 1.6  | protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)-related                                                                                                        |
| AT1G33800   | 1.6  | unknown protein                                                                                                                                                             |
| AT1G44960   | 1.7  | unknown protein                                                                                                                                                             |
| AT3G55360   | 1.7  | ATTSC13/CER10/ECR/TSC13 (ENOYL-COA REDUCTASE); 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase/ fatty acid elongase/ trans-2-enoyl-CoA reductase (NADPH)                              |
| AT5G09520   | 1.8  | hydroxyproline-rich glycoprotein family protein                                                                                                                             |
| AT5G61240   | 1.8  | protein binding                                                                                                                                                             |
| AT3G17390   | 1.9  | MTO3 (S-adenosylmethionine synthase 3); methionine adenosyltransferase                                                                                                      |
| AT2G48130   | 1.9  | protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein                                                                                                 |
| AT5G65390   | 1.9  | AGP7 (Arabinogalactan protein 7)                                                                                                                                            |
| AT3G30180   | 2.0  | BR6OX2/CYP85A2 (BRASSINOSTEROID-6-OXIDASE 2); monooxygenase/ oxygen binding                                                                                                 |
| AT3G11430   | 2.7  | ATGPAT5/GPAT5 (GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE 5); 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase/ acyltransferase/ organic anion transporter transferase family protein |
| AT5G41040   | 2.8  |                                                                                                                                                                             |
| AT3G02040   | -4.0 | SRG3 (SENESCENCE-RELATED GENE 3); glycerophosphodiester phosphodiesterase                                                                                                   |
| AT5G09440   | -3.1 | phosphate-responsive protein, putative                                                                                                                                      |
| AT1G69500*  | -2.5 | oxygen binding                                                                                                                                                              |
| AT3G10985   | -2.1 | wound-responsive protein-related                                                                                                                                            |
| AT2G39400 + | -2.0 | hydrolase, alpha/beta fold family protein                                                                                                                                   |
| AT2G36630   | -1.9 | unknown protein                                                                                                                                                             |
| AT1G25550   | -1.7 | myb family transcription factor                                                                                                                                             |
| AT4G29190   | -1.7 | zinc finger (CCCH-type) family protein                                                                                                                                      |
| AT3G01310   | -1.6 | acid phosphatase                                                                                                                                                            |
| AT1G32340   | -1.6 | NHL8 (NDR1/HIN1-like 8); protein binding / zinc ion binding                                                                                                                 |
| AT2G15830   | -1.6 | unknown protein                                                                                                                                                             |
| AT1G27220   | -1.5 | paired amphipathic helix repeat-containing protein                                                                                                                          |
| AT1G04310   | -1.5 | ERS2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2); receptor                                                                                                                                 |
| AT5G25350   | -1.5 | EBF2 (EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 2)                                                                                                                                         |

Log2 = razão glicose/manose com valor  $\log_2 \geq -1,5$  (nosso experimento)

+ = sobreposição com gene induzido por KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007)

\* = genes classificados apenas conforme o valor  $\log_2$  para glicose 2 horas/não tratado (Li *et al.*, 2006)

**Tabela Suplementar 5.** Genes regulados apenas por manose (gli0/man- ou gli0/man+).

| AGI       | Log2 | Função                                                                                       |
|-----------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| AT5G20630 | 1.6  | GLP3 (GERMIN-LIKE PROTEIN 3); manganese ion binding / metal ion binding / nutrient reservoir |

|            |      |                                                                                                                          |
|------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AT4G30450  | 1.7  | glycine-rich protein                                                                                                     |
| AT5G23530  | 1.8  | unknown protein                                                                                                          |
| AT5G47220  | 1.8  | ATERF-2/ATERF2/ERF2 (Ethylene response factor 2); DNA binding / transcription factor/ transcriptional activator          |
| AT5G57180* | 1.8  | CIA2 (CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS 2)                                                                                    |
| AT1G48760  | 1.9  | DELTA-ADR (DELTA-ADAPTIN); clathrin binding, protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein |
| AT3G20370  | 2.2  | meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein                                      |
| AT1G68250* | -2.6 | unknown protein                                                                                                          |
| AT3G53420  | -1.7 | PIP2A (plasma membrane intrinsic protein 2;1)                                                                            |
| AT5G18240* | -1.7 | MYR1 (MYB-RELATED PROTEIN 1)                                                                                             |

Log2 = razão glicose/manose com valor  $\log_2 \geq -1,5$  (nosso experimento)

\* = genes classificados apenas conforme o valor  $\log_2$  para glicose 2 horas/não tratado (Li *et al.*, 2006)

**Tabela Suplementar 6.** Valores das razões (Genevestigator) usados como critério para agrupar os 3074 genes diferencialmente expressos entre glicose e manose.

| AGI       | Log2 | A    | B    | C    | D        | E    | F    |
|-----------|------|------|------|------|----------|------|------|
| AT4G28140 | -4,4 |      | 1,4  | 0,1  |          | -3,9 | #N/D |
| AT3G02040 | -4,0 | #N/D |      |      | -435     | -3,7 | #N/D |
| AT2G37180 | -3,1 |      | 0,5  | -0,3 |          | -4,2 | #N/D |
| AT5G09440 | -3,1 | -1,7 |      |      | #N/D     | -2,4 | #N/D |
| AT1G20070 | -2,9 |      | 4,5  | 3,1  |          | -2,6 | #N/D |
| AT4G36010 | -2,9 |      | 3,8  | 3,2  |          | -3,6 | #N/D |
| AT1G61340 | -2,9 |      | 3,3  | 1,9  |          | -2,3 | #N/D |
| AT3G56260 | -2,9 |      | 3,6  | 3,1  |          | -2,7 | #N/D |
| AT1G80440 | -2,9 | -4,5 |      |      | -5990,7  | 1,9  | 2,7  |
| AT3G47340 | -2,9 | -2,9 |      |      | -10527,7 | 2,1  | 5,2  |
| AT5G66530 | -2,9 |      | 0,1  | 0,1  |          | #N/D | #N/D |
| AT5G44120 | -2,9 |      | 0,2  | -2,8 |          | -1,0 | #N/D |
| AT4G36500 | -2,8 |      | 1,0  | 0,5  |          | -1,6 | #N/D |
| AT5G20150 | -2,7 |      | 1,8  | 0,7  |          | -2,1 | #N/D |
| AT5G41080 | -2,7 | -4,2 |      |      | -876,2   | -0,9 | 3,1  |
| AT1G23650 | -2,7 |      | 1,7  | 1,7  |          | -2,2 | #N/D |
| AT3G15620 | -2,7 | -3,0 |      |      | -535,1   | #N/D | #N/D |
| AT5G06530 | -2,6 |      | 0,6  | -0,2 |          | -2,5 | #N/D |
| AT1G68250 | -2,6 |      | 0,5  | -0,5 |          | -0,8 | #N/D |
| AT5G62470 | -2,6 |      | 0,8  | 0,0  |          | -1,5 | #N/D |
| AT1G78070 | -2,6 |      | 2,5  | 1,3  |          | -2,6 | #N/D |
| AT2G16586 | -2,5 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT4G16000 | -2,5 |      | -4,6 | -5,2 |          | #N/D | #N/D |
| AT1G69500 | -2,5 |      | -1,5 | 1,1  |          | -3,4 | #N/D |
| AT1G62860 | -2,4 |      | 0,5  | 1,0  |          | #N/D | #N/D |
| AT4G31290 | -2,4 | -1,7 |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT4G32480 | -2,4 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G21680 | -2,4 |      | -0,5 | -0,8 |          | #N/D | #N/D |
| AT5G02020 | -2,4 | -2,5 |      |      | #N/D     | #N/D | 2,4  |
| AT1G02820 | -2,3 |      | -0,2 | -1,3 |          | #N/D | #N/D |
| AT5G01220 | -2,3 |      | 0,8  | 0,0  |          | -3,4 | #N/D |
| AT2G17036 | -2,3 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |

|           |      |      |      |      |          |      |      |
|-----------|------|------|------|------|----------|------|------|
| AT4G35770 | -2,3 | -4,6 |      |      | -14355,2 | 2,7  | 3,8  |
| AT4G30290 | -2,3 |      | 1,5  | 1,4  |          | -2,9 | #N/D |
| AT4G23060 | -2,3 |      | 1,0  | 0,3  |          | -1,4 | #N/D |
| AT2G39570 | -2,2 | -3,6 |      |      | #N/D     | #N/D | 2,0  |
| AT5G24800 | -2,2 | -2,0 |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G77680 | -2,2 |      | 1,3  | 0,7  |          | -2,6 | #N/D |
| AT5G52190 | -2,2 |      | -0,2 | -0,3 |          | #N/D | #N/D |
| AT5G16110 | -2,2 | -2,4 |      |      | -6408,4  | #N/D | #N/D |
| AT3G42722 | -2,1 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT2G01021 | -2,1 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT2G07180 | -2,1 | -1,7 |      |      | -1430,5  | #N/D | #N/D |
| AT3G23170 | -2,1 |      | 0,7  | 0,7  |          | -2,1 | #N/D |
| AT3G05640 | -2,1 |      | 0,8  | 1,0  |          | -1,8 | #N/D |
| AT2G20880 | -2,1 |      | 2,2  | 0,1  |          | -2,1 | #N/D |
| AT4G30470 | -2,1 |      | 2,6  | 1,9  |          | -1,6 | #N/D |
| AT2G33380 | -2,1 |      | 1,0  | 1,1  |          | -1,3 | #N/D |
| AT3G10985 | -2,1 |      | -0,8 | -1,1 |          | -0,9 | #N/D |
| AT2G15960 | -2,1 | -3,0 |      |      | -7984,2  | #N/D | #N/D |
| AT2G38400 | -2,0 | -2,6 |      |      | -4911,4  | #N/D | 2,4  |
| AT4G02380 | -2,0 | -1,4 |      |      | -8523,6  | #N/D | #N/D |
| AT5G42900 | -2,0 | -2,9 |      |      | -932,4   | #N/D | #N/D |
| AT3G56880 | -2,0 |      | 0,8  | 0,5  |          | -1,2 | #N/D |
| AT5G01715 | -2,0 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT2G39400 | -2,0 | -1,8 |      |      | -950,6   | 0,9  | 1,7  |
| AT1G30320 | -2,0 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT5G41300 | -1,9 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G35140 | -1,9 | #N/D |      |      | -1045,8  | 1,7  | #N/D |
| AT1G75830 | -1,9 |      | -1,8 | -3,4 |          | #N/D | #N/D |
| AT4G38810 | -1,9 |      | 0,1  | -0,7 |          | -1,3 | #N/D |
| AT2G46600 | -1,9 |      | 0,9  | 0,4  |          | -1,9 | #N/D |
| AT4G25672 | -1,9 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G21130 | -1,9 | -1,8 |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G76680 | -1,9 |      | 1,7  | 1,9  |          | #N/D | #N/D |
| AT3G17790 | -1,9 |      | 4,5  | 3,3  |          | -1,9 | #N/D |
| AT1G08630 | -1,9 | -3,8 |      |      | -3668,6  | 1,2  | #N/D |
| AT2G36630 | -1,9 | -1,4 |      |      | #N/D     | -1,5 | #N/D |
| AT4G15990 | -1,8 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT5G47330 | -1,8 |      | 3,9  | 3,0  |          | #N/D | #N/D |
| AT5G09220 | -1,8 |      | -0,8 | -0,9 |          | #N/D | #N/D |
| AT4G20070 | -1,8 | -1,5 |      |      | -501,7   | #N/D | #N/D |
| AT3G22370 | -1,8 |      | 1,8  | 1,6  |          | -1,4 | #N/D |
| AT4G01030 | -1,8 |      | -2,2 | -1,6 |          | -0,8 | #N/D |
| AT4G10150 | -1,8 |      | 0,7  | 0,4  |          | -1,6 | #N/D |
| AT3G61630 | -1,8 |      | 0,4  | -1,2 |          | -1,6 | #N/D |
| AT3G60530 | -1,8 | -3,0 |      |      | -2121,75 | #N/D | #N/D |
| AT1G28330 | -1,8 | -3,9 |      |      | -4754,18 | #N/D | 4,3  |
| AT2G47485 | -1,7 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT3G60300 | -1,7 | -1,9 |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G25550 | -1,7 | -1,6 |      |      | -698,93  | -0,7 | #N/D |
| AT3G53420 | -1,7 |      | 0,2  | 0,0  |          | -1,2 | #N/D |

|           |      |      |      |      |         |      |      |
|-----------|------|------|------|------|---------|------|------|
| AT4G30270 | -1,7 | -2,4 |      |      | -15606  | 1,0  | #N/D |
| AT5G55090 | -1,7 |      | 1,0  | -1,9 |         | -1,7 | #N/D |
| AT1G69430 | -1,7 |      | 1,1  | 0,5  |         | #N/D | #N/D |
| AT1G07900 | -1,7 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT4G26400 | -1,7 | -1,6 |      |      | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT3G14990 | -1,7 |      | 0,2  | 0,1  |         | #N/D | #N/D |
| AT5G18240 | -1,7 |      | 0,3  | -0,5 |         | -1,2 | #N/D |
| AT1G64230 | -1,7 | -1,7 |      |      | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT4G15760 | -1,7 |      | -0,9 | 0,1  |         | #N/D | #N/D |
| AT1G03106 | -1,7 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT5G66540 | -1,7 |      | 1,2  | 1,3  |         | #N/D | #N/D |
| AT4G12000 | -1,7 |      | 1,0  | 0,3  |         | -1,2 | #N/D |
| AT3G45730 | -1,7 | -2,1 |      |      | -347,2  | 0,8  | #N/D |
| AT4G29190 | -1,7 | -1,4 |      |      | #N/D    | -0,8 | #N/D |
| AT5G48160 | -1,7 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT1G55050 | -1,7 |      | 0,2  | 0,0  |         | #N/D | #N/D |
| AT5G54080 | -1,7 | -2,3 |      |      | -6699,9 | 0,7  | 2,3  |
| AT4G00360 | -1,7 |      | 1,5  | 0,6  |         | -1,4 | #N/D |
| AT2G43445 | -1,6 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT2G36900 | -1,6 |      | -1,2 | -1,4 |         | #N/D | #N/D |
| AT3G59350 | -1,6 | -1,8 |      |      | #N/D    | -0,7 | #N/D |
| AT2G39980 | -1,6 | -2,6 |      |      | -1521,7 | -1,6 | #N/D |
| AT4G23870 | -1,6 |      | 0,4  | 0,6  |         | #N/D | #N/D |
| AT1G17940 | -1,6 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT3G05960 | -1,6 |      | 0,3  | 0,7  |         | -1,1 | #N/D |
| AT5G55530 | -1,6 |      | 0,1  | -0,5 |         | -1,4 | #N/D |
| AT2G42890 | -1,6 | #N/D |      |      | -1326,3 | #N/D | 1,9  |
| AT2G20130 | -1,6 |      | -1,1 | -1,0 |         | #N/D | #N/D |
| AT3G01310 | -1,6 |      | -0,3 | -0,7 |         | -0,8 | #N/D |
| AT1G02400 | -1,6 |      | 1,9  | 1,2  |         | -1,3 | #N/D |
| AT4G25910 | -1,6 | -1,6 |      |      | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT4G37300 | -1,6 | -1,4 |      |      | -2698,6 | #N/D | #N/D |
| AT1G19540 | -1,6 | -2,6 |      |      | -1333,8 | #N/D | #N/D |
| AT5G03240 | -1,6 | -1,8 |      |      | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT1G32340 | -1,6 |      | -0,1 | -0,6 |         | -1,0 | #N/D |
| AT5G18170 | -1,6 | -2,0 |      |      | -1478,2 | 1,5  | #N/D |
| AT2G15830 | -1,6 | #N/D |      |      | -582,9  | -1,4 | #N/D |
| AT4G01870 | -1,6 |      | 0,0  | 0,5  |         | #N/D | #N/D |
| AT4G19880 | -1,6 |      | 0,8  | 0,8  |         | #N/D | #N/D |
| AT2G28910 | -1,6 |      | -0,7 | -1,1 |         | #N/D | #N/D |
| AT5G28300 | -1,6 |      | 1,3  | 0,7  |         | -2,0 | #N/D |
| AT4G17730 | -1,5 | -1,5 |      |      | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT2G37170 | -1,5 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT1G33050 | -1,5 | -1,8 |      |      | -633,9  | #N/D | #N/D |
| AT5G20520 | -1,5 | -1,7 |      |      | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT5G17300 | -1,5 | -3,3 |      |      | #N/D    | 1,2  | #N/D |
| AT5G53970 | -1,5 | -1,6 |      |      | #N/D    | #N/D | #N/D |
| AT1G78080 | -1,5 |      | 0,6  | 0,1  |         | -2,0 | #N/D |
| AT2G38470 | -1,5 |      | 1,2  | 0,8  |         | #N/D | #N/D |
| AT4G32910 | -1,5 |      | -1,1 | -0,9 |         | #N/D | #N/D |

|           |      |      |      |      |          |      |      |
|-----------|------|------|------|------|----------|------|------|
| AT1G27220 | -1,5 |      | 0,0  | -0,8 |          | -1,5 | #N/D |
| AT4G28040 | -1,5 | -1,4 |      |      | -1216,1  | #N/D | 4,6  |
| AT1G73390 | -1,5 |      | 1,1  | 0,8  |          | -1,3 | #N/D |
| AT3G03010 | -1,5 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT4G35550 | -1,5 |      | 1,2  | 0,4  |          | -2,1 | #N/D |
| AT1G04310 | -1,5 |      | -1,0 | -0,5 |          | -0,7 | #N/D |
| AT5G25350 | -1,5 |      | -1,3 | -1,1 |          | -1,1 | #N/D |
| AT2G18290 | -1,5 |      | -0,8 | -0,7 |          | #N/D | #N/D |
| AT2G38640 | -1,5 |      | 1,0  | 0,9  |          | -1,0 | #N/D |
| AT5G45490 | -1,5 |      | -0,8 | -1,0 |          | #N/D | #N/D |
| AT3G15450 | -1,5 | -5,8 |      |      | -14993,3 | 2,2  | 4,1  |
| AT1G48100 | -1,5 |      | 2,7  | 2,6  |          | -1,5 | #N/D |
| AT5G11740 | 1,5  | 1,3  |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G36730 | 1,5  | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT3G13940 | 1,5  | 1,5  |      |      | 516,53   | #N/D | -1,2 |
| AT2G41660 | 1,5  | #N/D |      |      | 262,83   | 1,5  | #N/D |
| AT5G19900 | 1,5  |      | 3,0  | 0,7  |          | 1,1  | #N/D |
| AT1G26220 | 1,5  |      | -0,5 | -0,6 |          | 1,4  | #N/D |
| AT4G36670 | 1,5  |      | -3,2 | -2,7 |          | 2,1  | #N/D |
| AT1G07790 | 1,5  | 1,6  |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT5G15960 | 1,5  | #N/D |      |      | 2061,4   | 0,7  | #N/D |
| AT3G46560 | 1,5  | 1,5  |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT5G48490 | 1,5  |      | -2,6 | -1,4 |          | 1,1  | #N/D |
| AT1G66070 | 1,5  |      | 0,7  | 1,0  |          | #N/D | #N/D |
| AT4G04610 | 1,5  | 3,1  |      |      | 959,4    | #N/D | #N/D |
| AT1G45063 | 1,5  | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT3G09440 | 1,6  | 1,7  |      |      | 5607,0   | #N/D | #N/D |
| AT4G06744 | 1,6  | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT1G68238 | 1,6  | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT2G48140 | 1,6  |      | 1,7  | 2,8  |          | 1,3  | #N/D |
| AT1G05450 | 1,6  |      | 0,3  | 1,3  |          | 1,5  | #N/D |
| AT5G60960 | 1,6  | 1,5  |      |      | #N/D     | #N/D | -1,9 |
| AT5G06550 | 1,6  | 1,6  |      |      | #N/D     | #N/D | -2,0 |
| AT5G23920 | 1,6  |      | -0,6 | -0,9 |          | 1,2  | #N/D |
| AT2G47450 | 1,6  |      | -0,6 | -0,6 |          | 1,0  | #N/D |
| AT3G03780 | 1,6  |      | 0,6  | 1,0  |          | #N/D | #N/D |
| AT1G29200 | 1,6  |      | -0,9 | -0,1 |          | 1,3  | #N/D |
| AT1G70230 | 1,6  |      | 0,4  | -0,1 |          | #N/D | -1,8 |
| AT3G25640 | 1,6  | 1,8  |      |      | #N/D     | 1,1  | #N/D |
| AT2G17230 | 1,6  |      | -1,0 | -0,6 |          | #N/D | #N/D |
| AT1G33800 | 1,6  |      | 0,6  | 0,6  |          | 0,9  | #N/D |
| AT1G01430 | 1,6  |      | -0,6 | -0,7 |          | 1,0  | #N/D |
| AT1G62180 | 1,6  | 2,5  |      |      | #N/D     | #N/D | #N/D |
| AT2G34620 | 1,6  |      | -0,6 | -0,3 |          | #N/D | #N/D |
| AT1G44750 | 1,6  |      | 0,4  | -0,1 |          | #N/D | #N/D |
| AT3G50970 | 1,6  |      | 2,2  | 2,0  |          | 1,8  | #N/D |
| AT5G20630 | 1,6  |      | -0,4 | -0,5 |          | 2,0  | #N/D |
| AT3G12580 | 1,6  | 3,2  |      |      | 2768,3   | -0,7 | #N/D |
| AT1G76080 | 1,6  |      | -0,4 | -1,0 |          | 1,6  | #N/D |
| AT2G01420 | 1,6  |      | -0,6 | -0,7 |          | #N/D | #N/D |

|           |     |      |      |      |        |      |      |
|-----------|-----|------|------|------|--------|------|------|
| AT1G64640 | 1,6 | 1,6  |      |      | #N/D   | #N/D | #N/D |
| AT1G22630 | 1,6 |      | -1,7 | -2,0 |        | #N/D | #N/D |
| AT1G56110 | 1,7 | 2,1  |      |      | 1224,7 | #N/D | -2,3 |
| AT5G59850 | 1,7 |      | 0,8  | 1,1  |        | #N/D | -1,8 |
| AT2G36870 | 1,7 | 1,8  |      |      | 2739,7 | #N/D | #N/D |
| AT3G04770 | 1,7 | 1,5  |      |      | #N/D   | #N/D | -1,4 |
| AT1G10850 | 1,7 |      | 0,9  | 0,8  |        | #N/D | #N/D |
| AT3G07770 | 1,7 | 2,1  |      |      | 1098,8 | #N/D | -1,7 |
| AT1G44960 | 1,7 |      | 0,9  | 0,9  |        | 1,7  | #N/D |
| AT2G38360 | 1,7 | 1,4  |      |      | 1264,8 | #N/D | #N/D |
| AT3G04760 | 1,7 |      | -0,5 | -0,6 |        | 1,5  | #N/D |
| AT4G28240 | 1,7 |      | -1,4 | -1,2 |        | 2,2  | #N/D |
| AT5G42650 | 1,7 | 2,7  |      |      | 1433,3 | 0,7  | #N/D |
| AT1G45201 | 1,7 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D   | #N/D | #N/D |
| AT4G35630 | 1,7 | 1,4  |      |      | #N/D   | #N/D | -1,4 |
| AT3G15540 | 1,7 |      | 0,1  | 0,6  |        | #N/D | #N/D |
| AT3G55360 | 1,7 |      | 1,3  | 1,1  |        | 0,9  | #N/D |
| AT4G30450 | 1,7 |      | -0,2 | -0,1 |        | 1,6  | #N/D |
| AT2G41650 | 1,8 |      | 0,8  | 1,2  |        | #N/D | #N/D |
| AT3G49220 | 1,8 |      | 0,6  | 0,7  |        | #N/D | -1,3 |
| AT5G23530 | 1,8 |      | 0,3  | 0,3  |        | 1,3  | #N/D |
| AT1G66940 | 1,8 |      | 0,2  | -0,2 |        | #N/D | #N/D |
| AT3G55340 | 1,8 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D   | #N/D | #N/D |
| AT5G09520 | 1,8 | 1,4  |      |      | #N/D   | 1,5  | #N/D |
| AT2G44500 | 1,8 |      | -0,7 | -0,7 |        | 1,7  | #N/D |
| AT5G61240 | 1,8 |      | 0,9  | 0,9  |        | 0,9  | #N/D |
| AT5G47220 | 1,8 |      | -0,3 | -0,2 |        | 1,7  | #N/D |
| AT3G12610 | 1,8 |      | 0,4  | 1,0  |        | #N/D | #N/D |
| AT1G68520 | 1,8 |      | -1,1 | -1,0 |        | 1,4  | #N/D |
| AT4G25630 | 1,8 | 2,6  |      |      | 1955,0 | #N/D | -3,2 |
| AT5G42020 | 1,8 |      | 2,2  | 2,3  |        | #N/D | #N/D |
| AT3G61820 | 1,8 | 2,0  |      |      | 2071,3 | #N/D | -2,7 |
| AT2G26440 | 1,8 |      | 0,8  | 0,9  |        | #N/D | #N/D |
| AT3G49330 | 1,8 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D   | #N/D | #N/D |
| AT5G56030 | 1,8 | 2,0  |      |      | 4856,9 | -0,6 | #N/D |
| AT5G57180 | 1,8 |      | -0,3 | 0,1  |        | 1,5  | #N/D |
| AT3G17390 | 1,9 |      | 0,5  | 0,6  |        | -0,9 | #N/D |
| AT3G49670 | 1,9 |      | 0,8  | 0,3  |        | #N/D | #N/D |
| AT4G37540 | 1,9 |      | -0,4 | -0,7 |        | 1,4  | #N/D |
| AT2G40330 | 1,9 |      | -1,0 | -1,3 |        | #N/D | #N/D |
| AT3G18130 | 1,9 | 1,8  |      |      | 1724,5 | #N/D | -2,7 |
| AT2G48130 | 1,9 | #N/D |      |      | 417,1  | 1,8  | #N/D |
| AT5G65390 | 1,9 |      | 0,1  | 0,8  |        | -1,0 | #N/D |
| AT4G03540 | 1,9 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D   | #N/D | #N/D |
| AT3G19030 | 1,9 |      | -1,3 | -1,2 |        | 2,6  | #N/D |
| AT1G48760 | 1,9 |      | -0,1 | -0,4 |        | 0,8  | #N/D |
| AT4G27440 | 1,9 |      | -1,0 | -0,3 |        | 0,9  | #N/D |
| AT5G09530 | 1,9 | 4,6  |      |      | #N/D   | 1,5  | #N/D |
| AT4G17280 | 1,9 | 1,9  |      |      | #N/D   | 1,5  | #N/D |
| AT3G30180 | 2,0 |      | 0,8  | 0,4  |        | 1,2  | #N/D |

|           |     |      |      |      |        |      |      |
|-----------|-----|------|------|------|--------|------|------|
| AT3G25700 | 2,0 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D   | #N/D | #N/D |
| AT1G59359 | 2,0 |      | 0,5  | 0,8  |        | #N/D | #N/D |
| AT1G03130 | 2,1 |      | -0,7 | -0,6 |        | 1,4  | #N/D |
| AT2G40610 | 2,1 |      | -0,8 | 0,1  |        | #N/D | #N/D |
| AT1G14980 | 2,1 | 1,8  |      |      | 3186,3 | #N/D | #N/D |
| AT2G36880 | 2,1 | 1,5  |      |      | 7007,0 | #N/D | #N/D |
| AT3G50340 | 2,2 |      | 1,0  | 0,7  |        | #N/D | #N/D |
| AT3G20370 | 2,2 |      | 0,1  | 0,4  |        | 1,3  | #N/D |
| AT3G22600 | 2,3 | #N/D |      |      | 1769,1 | #N/D | #N/D |
| AT5G52780 | 2,3 |      | -0,8 | -0,5 |        | 2,5  | #N/D |
| AT2G38310 | 2,3 |      | -0,9 | -1,2 |        | 0,8  | #N/D |
| AT1G54010 | 2,4 |      | 0,0  | 0,6  |        | 0,9  | #N/D |
| AT5G15350 | 2,5 |      | -1,8 | -0,9 |        | 1,3  | #N/D |
| AT4G21870 | 2,5 |      | -2,0 | -2,7 |        | 1,4  | #N/D |
| AT5G56010 | 2,5 |      | 2,1  | 2,1  |        | #N/D | #N/D |
| AT1G03870 | 2,7 |      | -2,7 | -1,4 |        | 1,4  | #N/D |
| AT3G11430 | 2,7 |      | 1,9  | 3,1  |        | 2,2  | #N/D |
| AT5G41040 | 2,8 | 1,4  |      |      | #N/D   | 2,8  | #N/D |
| AT1G34630 | 2,9 |      | -0,7 | -0,4 |        | 2,6  | #N/D |
| AT1G26810 | 3,0 | #N/D | #N/D | #N/D | #N/D   | #N/D | #N/D |
| AT4G33610 | 3,9 |      | -2,1 | 0,4  |        | #N/D | #N/D |

---

Log2 = razão wt glicose/ wt manose (nosso experimento)

A = razão glicose / não tratado (Li *et al.*, 2006)

B = razão glicose 2h / não tratado (Li *et al.*, 2006 e Genevestigator)

C = razão glicose 4h / não tratado (Li *et al.*, 2006 e Genevestigator)

D = razão glicose/ não tratado (Price *et al.*, 2004)

E = razão wt manitol/ wt manose (nosso experimento)

F = genes reprimidos (-) ou induzidos (+) por KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007)

---



## ANEXO

---

### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Sinalização por manose 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: IB.

( ) 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: Juliana Cristina Baptista

Orientador: Michel Georges Albert Vincentz

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI  
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança  
Instituto de Biologia - UNICAMP