

AMÉRICO JOSÉ CARVALHO VIANA

**O Fator de Transcrição bZIP AtbZIP63 interage com o relógio circadiano e afeta a
degradação do amido, impactando o crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis*
*thaliana***

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

AMÉRICO JOSÉ CARVALHO VIANA

“O fator de transcrição bZIP AtbZIP63 interage com o relógio circadiano e afeta a degradação do amido impactando o crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*”

Este exemplar corresponde à redação final da TESE defendida pelo candidato

Américo José Carvalho Viana

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

CAMPINAS,
2014

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

V654f Viana, Américo José Carvalho, 1984-
O fator de transcrição bZIP AtbZIP63 interage com o relógio circadiano e afeta a degradação do amido impactando o crescimento e o desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* / Américo José Carvalho Viana. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Arabidopsis. 2. Fatores de transcrição de zíper de leucina básica. 3. Amido - Degradação. 4. Relógios circadianos. I. Vincentz, Michel Georges Albert, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The transcription factor bZIP AtbZIP63 interacts with the circadian clock and affects the starch degradation impacting the growth and development of *Arabidopsis thaliana*

Palavras-chave em inglês:

Arabidopsis
Basic-leucine zipper transcription factors
Starch - Degradation
Circadian clocks

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Michel Georges Albert Vincentz [Orientador]
Carlos Takeshi Hotta
Daniel Scherer de Moura
Márcio Alves Ferreira
Camila Caldana

Data de defesa: 09-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 9 de junho de 2014

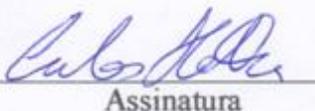
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz (orientador)



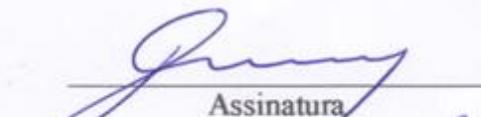
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta



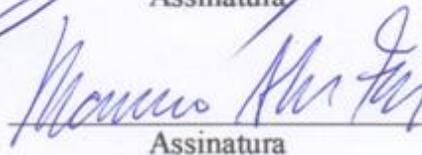
Assinatura

Prof. Dr. Daniel Scherer De Moura



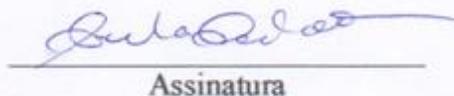
Assinatura

Prof. Dr. Márcio Alves Ferreira



Assinatura

Dra. Camila Caldana



Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena De Souza Goldman

Assinatura

Dr. Renato Vicentini Dos Antos

Assinatura

Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

RESUMO

O fator de transcrição do tipo *basic leucine leucine zipper* (bZIP) de *Arabidopsis thaliana* AtbZIP63 faz parte da via de resposta a carência energética coordenada pelas quinases KIN10/11, integradoras centrais dos sinais relacionados ao estado de privação de energia. O mutante de inserção de T-DNA *atbzip63-2* apresenta uma redução do crescimento e desenvolvimento das folhas assim como um atraso do florescimento em comparação ao tipo selvagem (TS, acesso Ws) quando cultivado em fotoperíodo de dia curto (10 h/14 h). Condições de fotoperíodo de dia longo ou luz contínua promoveram uma reversão parcial ou completa, respectivamente, do fenótipo mutante para o tipo selvagem, levantando a possibilidade de que este fenótipo seja o resultado de uma carência energética. Plantas silenciadas para expressão de *AtbZIP63* por RNAi apresentaram características similares a do mutante *atbzip63-2* confirmando o envolvimento deste fator de transcrição no crescimento. O perfil de expressão gênica e os níveis de alguns metabólitos do mutante *atbzip63-2* indicaram que *AtbZIP63* participa do controle da degradação do amido, pois a expressão de alguns genes centrais na degradação deste carboidrato de reserva está desregulada neste mutante. Mostramos que as oscilações no nível do transcrito *AtbZIP63* são reguladas pelo relógio circadiano e a fase da oscilação do *AtbZIP63* é aparentemente influenciada pela disponibilidade de carboidratos na célula. Além de estar sob o controle do relógio, AtbZIP63 também atua como um ativador direto da expressão de *PRR7*, que codifica um dos componentes chave do oscilador central do relógio. Portanto, evidenciamos uma interação recíproca entre o relógio e *AtbZIP63* que possivelmente está impactando o processo de degradação do amido à noite. Este conjunto de evidências revela novos aspectos do ajuste do relógio circadiano pelo status de açúcar na célula que estão de acordo com trabalhos recentes mostrando que os açúcares afetam diretamente o funcionamento do relógio. Nossa hipótese é que o *AtbZIP63* está agindo como um mediador entre a disponibilidade de

açúcar e o mecanismo oscilatório do relógio circadiano de *A. thaliana*. Adicionalmente, verificamos que o perfil de transcritos no final do dia no mutante *atbzip63-2* é diferente do observado no final da noite, sugerindo a participação do AtbZIP63 na regulação de genes envolvidos em redes regulatórias distintas em função do período do dia. Dentre os genes desregulados no *atbzip63-2* no final do dia, observamos um enriquecimento para genes relacionados com metabolismo secundário e síntese de trealose, o que sugere a participação do *AtbZIP63* na regulação da síntese destes compostos durante o dia, e possivelmente reflete a ocorrência de stress no mutante.

ABSTRACT

The *Arabidopsis thaliana* basic leucine zipper domain (bZIP) AtbZIP63 transcription factor is part of the response pathway to energy shortage coordinated by kinases KIN10/11. The T-DNA insertion mutant *atbzip63-2* shows a reduction in the growth and development of leaves, as well as a delay in flowering compared to wild type (WT; ecotype Ws), when grown in short-day conditions. Long day or continuous light conditions promoted a partial or complete reversion, respectively, of the mutant to wild-type phenotype, raising the possibility that this phenotype is the result of an energy shortage. Plants silenced for AtbZIP63 showed similar characteristics to the *atbzip63-2* mutant, confirming the involvement of this transcription factor in the growth. The gene expression profile and the levels of some metabolites of the *atbzip63-2* indicated that *AtbZIP63* takes part in the control of starch degradation, regulating the expression of some key genes in starch degradation. Diurnal *AtbZIP63* mRNA level fluctuation is regulated by the circadian clock, and the phase oscillation is influenced by the availability of carbohydrates. In addition, to be controlled by the circadian clock, *AtbZIP63* directly regulates the expression of *PRR7* which encodes one of the key regulators of the core clock. We have therefore identified a reciprocal interaction between the clock and *AtbZIP63* which is probably affecting the starch degradation process. This set of evidence reveals new aspects of the *entrainment* of the circadian clock by sugars, and is consistent with recent studies showing that sugars directly regulate the circadian clock. Our hypothesis is that *AtbZIP63* is acting as a mediator between the energy status (availability of sugar) and the oscillatory mechanism of the *A. thaliana* circadian clock. Additionally, we found that the profile of transcripts at the end of the day in *atbzip63-2* mutant is different from that observed in the end of the night, suggesting the involvement of AtbZIP63 in the regulation of genes involved in distinct regulatory networks according to the period of day. Among the genes deregulated in *atbzip63-2* at the end of the

day, an enrichment for genes related to secondary metabolism and trehalose biosynthesis was observed. Suggesting the involvement of AtbZIP63 in regulating the synthesis of these compounds during the day, and probably reflects the occurrence of stress in the mutant.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
INTRODUÇÃO.....	01
Controle da expressão gênica em eucariotos.....	01
A família dos fatores de transcrição do tipo <i>basic leucine zipper</i> (bZIP).....	07
O fator de transcrição bZIP AtbZIP63.....	08
Interação entre o relógio circadiano e o metabolismo das plantas.....	09
Influência do relógio circadiano na degradação do amido á noite.....	15
Controle da expressão gênica em resposta ao déficit energético em plantas.....	18
CAPÍTULO I: O Fator de Transcrição bZIP AtbZIP63 interage com o relógio circadiano e afeta a degradação do amido durante o período noturno impactando o crescimento e desenvolvimento de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	21
CAPÍTULO II: O Fator de Transcrição <i>AtbZIP63</i> regula a expressão de genes da biossíntese de flavonóides e trealose durante o dia.....	73
CONCLUSÕES.....	85
PERSPECTIVAS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICE.....	101

Para os meus pais Gonçalves e Terezinha, pelo apoio incondicional a todos os meus projetos de vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais e irmãos pelos incontáveis momentos de alegria compartilhada.

À minha maravilhosa noiva Karin Seger pelo interesse em compartilhar discussões que auxiliaram para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Michel Vincentz, pela orientação, pela inestimável contribuição na formação do meu conhecimento científico e pela prestimosa amizade.

Aos companheiros do Laboratório de Genética de Plantas (LAGEP) pelos momentos de descontração e pelas discussões científicas. Especialmente o Dr. Cleverson Matioli, pelas discussões científicas relacionadas a este projeto, por ter compartilhado seu conhecimento das técnicas de biologia molecular e pelas análises de *western blot*. E o Dr. David Newman pelas análises de *chromatin immuno precipitation*.

Ao Dr. Mark Stitt do Max Planck Institutes pela colaboração na quantificação dos metabólitos do mutante *atbzip63-2* e ecótipo Ws.

Ao Dr. Olivier Loudet do INRA-IJPB de Versailles pela contribuição na quantificação do fenótipo do mutante *atbzip63-2*, linhagem silenciada RNAi L9 e ecótipo Ws na plataforma *Phenoscope*.

À Dra. Marina Camara Martins do CTBE pela colaboração na quantificação do amido nas plantas do mutante *atbzip63-2* e ecótipo Ws.

Aos professores que fizeram parte do meu exame de qualificação: Prof. Renato Vicentini, Anete Pereira de Souza e Alexandra Alves de Souza pelas contribuições prestadas a este projeto.

Aos membros da banca examinadora pela leitura crítica e sugestões de melhorias desta tese.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade concedida.

À FAPESP por financiar este projeto e conceder minha bolsa de doutorado.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

bZIP: basic leucine zipper

ChIP: Chromatin Imuno Precipitation

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide

C_t: threshold cycle

Cq: cycle quantification

DEPC: diethylpyrocarbonate

FT: fator de transcrição

Gli: glicose

GFP: green fluorescent protein

GO: gene ontology

HA *Tag*: etiqueta da hemaglutinina

miRNA: micro RNA

Mnt: manitol

RNAi: RNA de interferência

RNAi Lx: linhagem contendo o cassete para o silenciamento do *AtbZIP63* via RNAi

35S Lx: linhagem contendo o cassete para a expressão desregulada da fusão HA::VP16::cDNA

AtbZIP63 sob controle do promotor 35S

qRT-PCR: reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real

TS: tipo selvagem

VP16: domínio de ativação da transcrição VP16 do vírus *Herpes simplex*

INTRODUÇÃO

Controle da expressão gênica em eucariotos

As unidades de informações necessárias para a síntese de RNAs codificantes e não codificantes estão contidas na sequência de DNA do genoma das células. O genoma da planta modelo *A. thaliana* contém aproximadamente 27 mil genes codificantes de proteínas (Gan et al., 2011), mais cerca de 6500 genes de RNAs longos não codificantes (Liu et al., 2012) e 337 genes de micro RNAs (mirBase R.20, Jun 2013) que exercem funções importantes na regulação do crescimento, desenvolvimento, respostas a estresses e defesa contra atividade de transposons (Guttman & Rinn, 2012; Creasey et al., 2014). Estas unidades de informação, ou genes, apesar de estarem presentes em todas as células de cada organismo, não são expressas ao mesmo tempo e em todos os órgãos e tecidos, sendo precisamente reguladas temporal e espacialmente. O conjunto de genes e o nível que cada um deles é expresso em cada estágio do ciclo de vida, órgão ou condição ambiental precisam ser propriamente regulados a fim de garantir o adequado crescimento e desenvolvimento. Os mecanismos que definem o momento, o local e a quantidade que cada gene será expresso são denominados controle da expressão gênica.

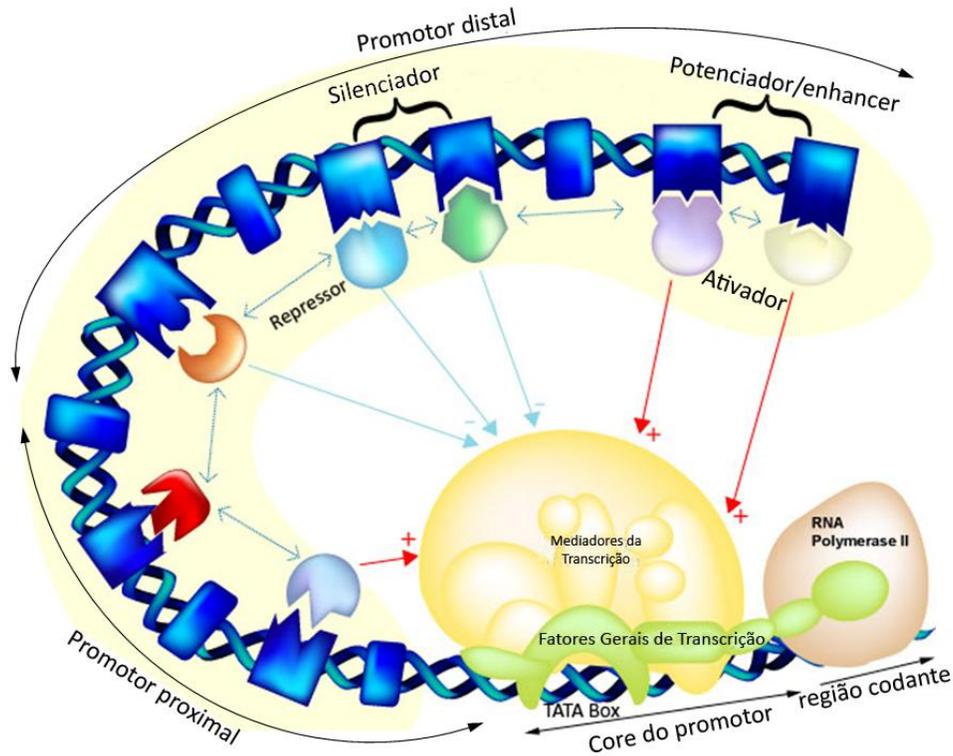
A regulação da expressão gênica pode ocorrer na transcrição (Kaufmann et al., 2010), no processamento e controle da estabilidade do RNA mensageiro (mRNA; Gutiérrez et al., 2002; Liu et al., 2014), na tradução do mRNA (Van der Kelen et al., 2009), e nas modificações pós-traducionais das proteínas como a multimerização em complexos protéicos (Alonso et al., 2009), controle da localização celular e regulação da estabilidade das proteínas (Sadanandom et al., 2012). Estes diferentes níveis de regulação operam de forma integrada a fim de garantir o ajuste adequado da expressão gênica.

A primeira etapa de controle da expressão gênica ocorre no nível transcricional, correspondendo essencialmente à regulação da taxa de iniciação da transcrição em função da organização da cromatina.

Este controle é oriundo da complexa interação entre as RNA polimerases, DNA, fatores de regulação da transcrição (FT) e co-reguladores (Mouchiroud et al., 2014). O genoma dos organismos eucariotos está compactado no núcleo de cada célula na forma de cromatina, uma combinação complexa de DNA e proteínas histonas (Cedar & Bergman, 2009). A compactação da cromatina apresenta funções estruturais, organizando a disposição do DNA no núcleo, e regulatórias, controlando a acessibilidade de proteínas ao DNA. Desta forma, a acessibilidade das RNA polimerases, FTs e co-reguladores de transcrição ao DNA é altamente regulada através do nível de metilação do DNA (Cedar & Bergman, 2009) assim como pela acetilação (Waterborg, 2011) e metilação de histonas (Liu *et al.*, 2010) e localização dos nucleossomos (Conaway, 2012). Os FTs e co-reguladores (elementos *trans*) interagem e modulam a atividade do complexo basal de transcrição que inclui as RNA polimerases e fatores basais de transcrição que se ligam a pequenas sequências de DNA (elementos *cis*) contidas na região promotora dos genes (Zou et al., 2011), aumentando ou suprimindo a taxa de iniciação de transcrição pela RNA polimerase (Juven-Gershon et al., 2008) (Figura 1). O controle da taxa de iniciação da transcrição pode ser baseado na estrutura e propriedades físico-químicas da cromatina, denominado regulação epigenética (To & Kim, 2014).

Em *A. thaliana* os FTs correspondem a aproximadamente 10% (~2500) dos genes codificantes (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009), um valor superior ao encontrado para metazoários com genoma de tamanho semelhante como a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* que possui cerca de 600 FTs (4,7%) e o nematelminto *Caenorhabditis elegans* também com cerca de 600 TFs (3,6%) (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009). Os FTs são divididos em famílias de acordo com os domínios que as formam principalmente o motivo de ligação ao DNA que é altamente conservado e define as diversas famílias (Riechmann et al., 2000). A presença destes motivos conservados torna possível a classificação dos mesmos em famílias multigênicas como a dos Homeodomínios (HD), dos *Zinc Fingers*, dos *Helix-Loop-*

Helix (HLH) e *Basic-Helix-Loop-Helix* (BHLH), dos *Helix-Turn-Helix*, que inclui as proteínas MYB, dos MADS-box, dos NACs, dos DOFs (*DNA Bindind with one finger*), dos *Basic-Leucine Zipper* (bZIP), entre outras (Feller *et al.*, 2011).



http://legacy.genwaybio.com/gw_file.php?fid=2081

Figura 1. Modelo do complexo de transcrição, contendo os fatores basais, os co-reguladores e os ativadores e repressores da transcrição (FT ou elementos trans) que ligam nos elementos *cis* presentes na sequência do promotor. (Retirado de http://legacy.genwaybio.com/gw_file.php).

A segunda etapa de controle da expressão gênica ocorre no nível pós-transcricional, e envolve o splicing, a modulação da estabilidade do mRNA e a taxa de tradução. O RNA inicial transcrito a partir do DNA ou pré-mRNA é processado antes de originar o mRNA maduro, que codificará proteínas. Uma das etapas do processamento do mRNA é o splicing, que envolve a remoção das sequências intrônicas do RNA transcrito (Patel & Steitz, 2003; Roy *et al.*, 2006). O splice do pré-mRNA pode ocorrer com diferentes combinações entre íntrons e éxons, gerando diversos mRNAs a partir do mesmo transcrito

inicial, num processo conhecido como splicing alternativo (Kadam et al., 2014). O splicing alternativo aumenta o tamanho do transcriptoma e proteoma, e também pode afetar a estabilidade e eficiência da tradução do mRNA (Syed et al., 2012). Estudos recentes de expressão gênica em larga escala via RNA-seq e a disponibilidade de bancos de dados de transcriptomas tem mostrado que o splicing alternativo em plantas tem uma significância muito maior do que se pensava, em *A. thaliana* do ano de 2003 para 2012 o número de transcritos descritos com splicing alternativo saltou de 1,2% para 61% de todos os genes (Zhu et al., 2003; Marquez et al., 2012).

Os componentes moleculares que controlam a estabilidade do mRNA podem ser alocados em duas categorias: 1. Componentes do sistema basal de degradação de mRNA que fazem parte do controle de qualidade da produção dos transcritos de cada locus; 2. Fatores (elementos *trans*) que se ligam a sequências específicas (elementos *cis*) no mRNA e controlam sua estabilidade em resposta a estímulos externos e/ou condições fisiológicas (Gutiérrez et al, 1999). Existem diversas vias que regulam a estabilidade do mRNA, a exemplo de: atividade de exonucleases que degradam o mRNA no sentido 5' – 3' após a remoção do *cap* 5'; atividade de exossomos que degradam o mRNA no sentido 3' - 5' após o processo de remoção da cauda poli-A; degradação mediada por miRNAs (*micro RNAs*), nat-siRNAs (*natural anti-sense small interference RNAs*) e ta-siRNAs (*trans-acting small interference RNAs*) (Belostotsky & Sieburth, 2009; Houseley & Tollervey, 2009). Importante salientar que pequenos RNAs também podem efetuar controle transcricional através da metilação de DNA dirigida por RNA (*RNA-directed DNA Methylation*), que levam a modificações epigenéticas e subsequente silenciamento dos genes metilados (Havecker et al., 2010). Outro mecanismo importante de controle da estabilidade do mRNA é o processo NMD (*Non-sense Mediated Decay*), no qual o mecanismo de vigilância da célula degrada mRNAs aberrantes contendo um códon de parada prematuro (Kurihara *et al.*, 2009).

Em plantas a regulação da taxa de tradução depende inicialmente do reconhecimento do cap 5' do mRNA pelo fator de iniciação da tradução (eIF4E Classe I) (Joshi et al., 2005), que se liga no cap 5' e inicia o recrutamento dos outros fatores de iniciação da tradução (eIF4E1B/E3, eIF4E1C/E2) (Patrick et al., 2014). Os pequenos RNAs também desempenham um importante papel no controle da tradução em plantas (Brodersen et al., 2008), miRNAs e siRNAs podem promover a repressão da tradução por um mecanismo diferente da clivagem endonucleolítica do mRNA guiada pela complementaridade entre o pequeno RNA e o mRNA alvo. A repressão traducional é afetada em parte pelas proteínas ARGONAUTE (AGO 1 e AGO10), e também requer a atividade da enzima KATANINA envolvida na separação dos microtúbulos, sugerindo que a dinâmica do citoesqueleto tem implicações na repressão traducional pelos miRNAs, embora não influencie a clivagem endonucleolítica do mRNA. As proteínas envolvidas na remoção do cap 5' VARICOSE/Ge-1 são também requeridas para a repressão traducional promovida pelos miRNAs (Brodersen et al., 2008).

Uma terceira etapa do controle da expressão gênica envolve a modulação da estabilidade das proteínas. Esta regulação requer a marcação específica das proteínas a serem degradadas com o peptídeo ubiquitina o qual sinaliza a maquinaria celular para destinar a proteína para degradação no proteassomo (Vierstra, 2009). Vários exemplos de regulação da estabilidade de proteínas modulando a resposta a açúcares e hormônios já foram descritos na literatura. Em *A. thaliana* o fator de transcrição EIN3 (*Ethylene Insensitive 3*) é um importante regulador das respostas induzidas por etileno e sua proteína é estabilizada na presença deste hormônio (Guo & Ecker, 2003). Na ausência de etileno, EBF1 e EBF2 (*EIN3-Binding F-Box Protein 1 e 2*) interagem com EIN3 e promovem sua ubiquitinação e degradação no proteassomo (Binder et al., 2007). Além disso, a glicose eleva a taxa de degradação de EIN3 de forma dependente da atividade sensora de glicose HXK1 (*Hexokinase 1*) (Rolland & Sheen, 2005) e coloca EIN3 como um ponto de convergência entre a sinalização por etileno e glicose. As respostas

transcricionais ao hormônio jasmonato dependem em grande parte dos fatores de transcrição do tipo bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) MYC2 (Dombrecht et al., 2007), MYC3 e MYC4 (Fernández-Calvo et al., 2011), que têm sua atividade reprimida por diversos membros da família de repressores transcricionais JAZ (*Jasmonate ZIM-Domain*) (Chini et al., 2007; Kazan & Manners, 2012). A forma mais ativa do hormônio ácido jasmônico JA-Ile, na qual o jasmonato é conjugado ao aminoácido isoleucina (Ile), liga-se a proteína do tipo F-Box COI1 (*Coronatine-Insensitive 1*) (Melotto et al., 2008) e induz a ubiquitinação das proteínas JAZ pelo complexo SCF^{COI1}, destinando-as para degradação no proteassomo e liberando a transcrição promovida pelos fatores MYC2, MYC3 e MYC4 da repressão pelas proteínas JAZ. A sinalização por giberelinas opera através de um mecanismo semelhante, na qual as proteínas repressoras transcricionais da família DELLA são ubiquitinadas e degradadas no proteassomo e liberando os fatores de transcrição das famílias YABBY e GRAS (*GAI- gibberellic acid insensitive*, *RGA- repressor of ga1*, *SCR- scarecrow*) que irão ativar a expressão dos genes responsivos a giberelina (Achard & Genschik, 2009). O hormônio auxina liga-se com a proteína F-Box TIR1 e promove a interação dos repressores transcricionais Aux/IAA com o complexo de ligação de ubiquitina SCF^{TIR1} e posterior degradação destes repressores via proteassomo, liberando os FTs da família ARF (auxin response factor) reguladores positivos da resposta a auxina (Dharmasiri et al., 2005; Parry & Estelle, 2006). Estes dados mostram que a regulação da estabilidade das proteínas é uma importante forma de controle das respostas a sinais de desenvolvimento e ambientais.

Além de permitir conhecer como cada processo do crescimento e desenvolvimento do organismo é estabelecido de acordo com o controle da expressão gênica, entender estes mecanismos envolvidos na regulação da atividade gênica, também nos permite alterar o balanço deste controle, aumentando ou diminuindo a atividade de determinado gene, com a finalidade de conhecer sua função biológica ou de usá-lo para processos biotecnológicos.

A família dos fatores de transcrição do tipo *basic leucine zipper* (bZIP)

A família dos FTs do tipo bZIP é caracterizada por um domínio de ligação ao DNA de 40 a 80 aminoácidos, conhecido como domínio bZIP. Este domínio é constituído por dois motivos: uma região básica, responsável pela ligação sítio/específica ao DNA e o zíper de leucina, que devido a sua característica hidrofóbica, é responsável por interações com outro motivo bZIP, sendo que a dimerização pode ocorrer entre subunidades idênticas, formando homodímeros, ou entre subunidades diferentes, formando heterodímeros funcionais (Walter et al., 2004, Ehlert et al., 2006). A formação de homo ou heterodímero entre os bZIPs permite diferentes níveis de controle da expressão gênica, uma vez que diferentes combinações alteram a afinidade e especificidade de ligação ao DNA (Ehlert et al., 2006). A formação destes heterodímeros ocorre de forma bastante precisa permitindo elaborar programas de expressão gênica diferenciados (Newman & Keating, 2003; Ehlert et al., 2006).

FTs de tipo bZIPs são encontrados em todos os organismos eucariotos (Wingender et al., 2000). Em plantas, os bZIPs atuam em uma ampla gama de processos como fotomorfogênese (Osterlund *et al.*, 2000; Ulm, *et al.*, 2005), desenvolvimento de órgãos (Chuang *et al.*, 1999), alongação celular (Yin *et al.*, 1997; Fukuzawa *et al.*, 2000), controle do balanço de carbono/nitrogênio (Ciceri *et al.*, 1999), mecanismos de defesa (Lee et al., 2006; Alves et al., 2013), sinalização de hormônios e sacarose (Rolland & Sheen, 2005; Matioli et al., 2011), resposta a estresse osmótico (Sato et al., 2004, Weltmeier *et al.*, 2006) e controle da floração (Xu et al., 2010).

Em angiospermas, estes fatores são atualmente inseridos em 13 grupos de genes homólogos que representam a classificação unificada dos bZIPs de *A. thaliana* (Corrêa et al., 2008). Entre os 13 grupos de genes homólogos de angiospermas, está o grupo C, constituído por quatro genes em *A. thaliana* (AtbZIP9, AtbZIP10, AtbZIP25 e AtbZIP63). O grupo C localiza-se filogeneticamente próximo do

grupo S (Corrêa et al., 2008), sendo observada uma heterodimerização preferencial entre membros destes dois grupos (Ehlert et al., 2006).

O fator de transcrição bZIP AtbZIP63

A expressão do fator de transcrição *AtbZIP63* é reprimida por glicose e por ácido abscísico (ABA) e a combinação dos sinais glicose e ABA reduzem de forma sinérgica a quantidade de mRNA *AtbZIP63* (Matiolli et al., 2011). A glicose é um indicador do status energético da planta (Ramon et al., 2008) e o ABA é considerado um hormônio de estresse (Baena-González & Sheen, 2008), portanto, as respostas coordenadas do *AtbZIP63* a glicose e ABA indicam que este regulador pode estar envolvido na canalização da energia disponível para crescimento ou adaptação á estresses abióticos. Estudos do nosso grupo confirmaram que *AtbZIP63* media parcialmente a resposta ao déficit energético ativado pela *Sucrose-Non-Fermenting-Related Kinase 1* (SnRK1) KIN10/11 (Baena-González et al., 2007, Matiolli et al., 2011). Recentemente foi descrito que o ABA amplifica a ativação por KIN10/11 dos genes de resposta ao déficit energético, através da inibição do PP2C (*2C protein phosphatases*) que desfosforila e inativa as KIN10/11 (Rodrigues et al., 2013). Entretanto, como o ABA tem efeito negativo sobre a expressão do *AtbZIP63* deduzimos que o efeito do ABA sobre o *AtbZIP63*, seja por uma via independente da KIN10/11.

Este regulador é expresso nas raízes, folhas jovens, botões florais e grãos de pólen de *A. thaliana* (Lara et al., 2003; Weltmeier et al., 2009). Em nível celular, na forma de homodímero o *AtbZIP63* está localizado exclusivamente no núcleo (Walter et al., 2004), entretanto o monómero desta proteína pode ser encontrado também no citoplasma, possivelmente no sistema de endomembranas do complexo de Golgi (dados do grupo não publicados) (Figura 2).

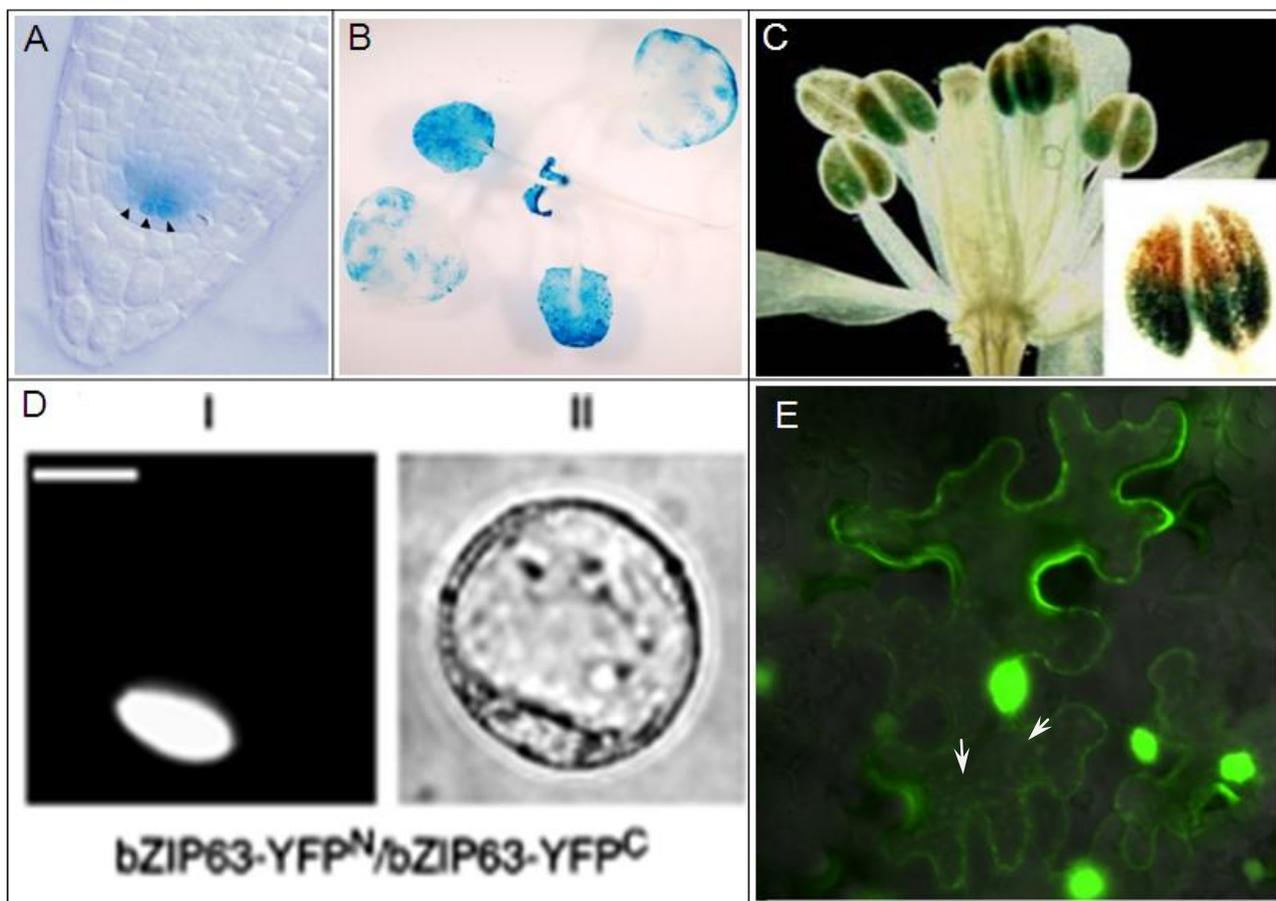


Figura 2. Localização *in situ* da atividade do AtbZIP63 fusionado aos genes reporteres GUS ou GFP. **A:** Expressão da proteína AtbZIP63 fusionada a GUS no centro quiescente da raiz. Fonte: Nawy et al. 2005. **B:** Expressão da proteína AtbZIP63 fusionada a GUS é mais forte nas folhas mais jovens. Fonte: dados do grupo não publicados. **C:** Expressão da proteína AtbZIP63 fusionada a GUS na antera. Fonte: Weltmeier et al. 2009. **D:** A forma de homodímero do AtbZIP63 é localizada exclusivamente no núcleo. Fonte: Walter et al., 2004. **E:** Na forma de monômero o AtbZIP63 fusionado a GFP é encontrado além do núcleo, também no citoplasma, possivelmente no sistema de endomembranas (setas). Fonte: dados do grupo não publicados.

Interação entre o relógio circadiano e o metabolismo das plantas

O relógio circadiano compreende uma estrutura de alças de regulação transcricionais e pós-transcricionais que proporciona aos organismos um mecanismo endógeno de medida do tempo, permitindo uma antecipação as mudanças cíclicas diárias do ambiente (Hotta et al., 2007; Haydon et al.,

2013a). As plantas que possuem a duração do período endógeno do seu relógio circadiano semelhante à duração do período do ambiente externo possuem um *fitness* superior, com maior fixação de carbono e maior adequação das respostas a estresses bióticos e abióticos do que aquelas plantas com duração do período endógeno diferente do período do ambiente (Dodd et al., 2005; Graf et al., 2010). O modelo atualmente aceito para o oscilador central do relógio circadiano de *A. thaliana* é composto pela repressão da transcrição dos genes *Circadian Clock-Associated 1* (*CCA1*) e *Late Elongated Hypocotyl* (*LHY*), pelos *Pseudo-Response Regulators 5, 7 e 9* (*PRR5*, *PRR7* e *PRR9*). Por meio da interação com *CCA1 Hiking Expedition* (*CHE*), o *Timing of Cab Expression 1* (*TOC1*) liga-se no promotor de *CCA1* reprimindo também sua transcrição durante a noite. *CCA1* e *LHY* são elementos do período diurno (morning genes), pois os seus picos de expressão ocorrem no começo do dia. As proteínas *CCA1* e *LHY* por sua vez reprimem a transcrição dos genes *Lux Arrhythmo*, *Early Flowering 3 e 4* (*ELF3* e *ELF4*) que formam o chamado *evening complex* (*EC*), ligando-se diretamente no sítio *EC* presente nos promotores destes genes. Os genes do *EC* se auto-inibem e também reprimem os genes *PRRs*, que são induzidos pelos genes *CCA1/LHY* durante o dia, fechando a alça de retro-regulação dos elementos do core do relógio (Pokhilko et al., 2012; Huang et al., 2012; Yamashino, 2013, Haydon et al., 2013a) (Figura 3). Novos estudos têm indicado que o relógio circadiano pode ser mais complexo e envolver outros componentes, que atuam principalmente como ativadores da expressão gênica. Um exemplo é o fator de transcrição *REVEILLE8* (*RVE8*), o qual contém um domínio de ligação ao DNA *MYB-like* similar ao *CCA1/LHY* (Rawat et al., 2009), e age como indutor da expressão dos genes do *EC* (Hsu et al., 2013). A descoberta de novos elementos envolvidos nas alças de regulação centrais do relógio circadiano exigirá mudanças no modelo descrito atualmente, e permitirá um melhor entendimento de como as interações entre os elementos do relógio resultam em um ritmo de 24 horas (Sanchez & Yanovsky, 2013).

O ajuste de fase do relógio ou *entrainment* é mantido por sinais do ambiente, chamados de *zeitgebers*, que funcionam como *inputs* no ajuste diário do mecanismo oscilatório do relógio circadiano. A alternância luz/escuro e as mudanças de temperatura são os *inputs* mais bem estabelecidos do relógio. O *input* da luz para o relógio ocorre através de múltiplos fotorreceptores. A exemplo do fotorreceptor ZTL que controla a estabilidade de TOC1 em função da faixa de luz azul (Devlin & Kay, 2000). Já o *Sensitivity To Red Light Reduced 1* (SRR1), é um regulador positivo de sinalização às faixas de luz vermelha e branca na configuração do ritmo do relógio (Staiger et al., 2003). Os fitocromos estão também envolvidos. A luz promove a degradação do mRNA *CCA1* e aumenta a taxa de tradução de *LHY* (Kim et al., 2003; Yakir et al., 2007). Por outro lado, as proteínas ELF3 e ELF4 regulam negativamente o *input* de luz para o relógio, e ajudam na manutenção do padrão oscilatório mesmo sob condição de luz constante (Covington et al., 1999; Doyle et al., 2002). Em suma, o *entrainment* do relógio pela luz ocorre por meio da modulação da atividade de vários genes do relógio e em múltiplos níveis de controle.

O mecanismo pelo qual a temperatura afeta o ajuste do relógio ainda é pouco compreendido, sabe-se que a transcrição dos genes *CCA1*, *LHY*, *TOC1* e *GI* é influenciada pelas oscilações de temperatura, mas o mecanismo exato é desconhecido (Gould et al., 2006). Dentre os componentes do relógio que respondem a temperatura, os genes *PRR7* e *9* são descritos como os elementos que sinalizam as mudanças de temperatura entre o dia e a noite para o ajuste do relógio (Salome & McClung, 2005).

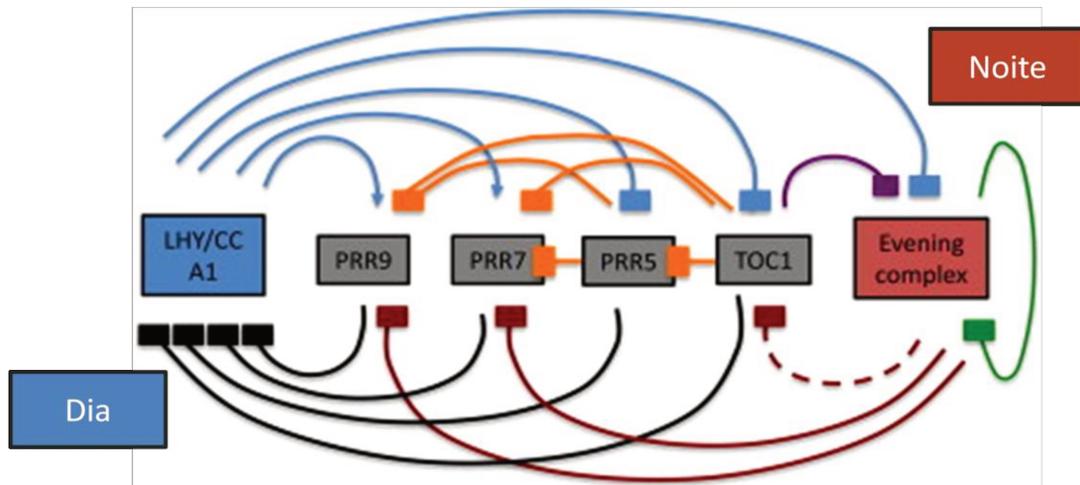


Figura 3. Modelo simplificado da estrutura de regulação transcricional do oscilador central do relógio circadiano de *A. thaliana*. *CCA1* e *LHY* são expressos simultaneamente ao amanhecer e agem reprimindo a expressão de *TOC1* e *PRR5* e indiretamente induzindo *PRR7* e *PRR9* (setas azuis). Subsequentemente a expressão de *CCA1* e *LHY* é inibida durante o restante do dia pelos *PRR5*, *PRR7*, *PRR9* e *TOC1* (setas pretas). Durante a noite a expressão dos *PRRs* é inibida pela ação dos genes do *evening complex* (*LUX*, *ELF3* e *ELF4*) (setas vermelhas), e isto permite novamente a ativação transcricional dos *CCA1/LHY* no próximo amanhecer. O loop de auto-regulação dos genes do EC e a repressão por *TOC1* assegura uma expressão transitente destes componentes (setas verde e púrpura). Interação de repressão a partir do *TOC1/PRR1* em relação aos outros *PRRs* gera um padrão de expressão consecutiva entre estes componentes, semelhante à geração de ondas (setas laranjas). Fonte: Adaptado a partir de Carré, 2013, Seminars in Cell & Developmental Biology.

Em *A. thaliana*, o relógio circadiano controla a expressão de cerca de 1/3 dos genes e, portanto, impacta diversos processos biológicos (*output* do relógio) como: taxa de alongamento do hipocótilo e haste da inflorescência, movimentação das folhas, abertura estomática (Harmer, 2009) e defesa contra patógenos (Bhardwaj et al., 2011; Shin et al., 2012). Muitos processos metabólicos como: fotossíntese (Dodd et al., 2005), homeostase redox (Lai et al., 2012), metabolismo do amido (Lu et al., 2005; Graf et al., 2010), síntese e resposta a hormônios, assimilação de nutrientes (Gutiérrez et al., 2008; Haydon et al., 2011), e metabolismo basal (Kerwin et al., 2011), são também regulados pelo relógio (Figura 4).

Além disto, análises de metabolômica de *A. thaliana*, têm revelado que os níveis de cerca de 30% dos metabólitos primários apresentam oscilação circadiana (Espinoza et al., 2010).

As plantas elaboraram um mecanismo sofisticado que estabelece uma taxa de degradação do amido compatível com um fornecimento regular de energia durante todo período noturno, permitindo evitar a escassez de energia nos períodos finais da noite e assim otimizar o crescimento. Este mecanismo envolve a interação entre o relógio circadiano (antecipação da duração da noite) e um "medidor", ainda hipotético, da quantidade de amido disponível no final do dia (Graf et al., 2010; Graf & Smith, 2011; Stitt & Zeeman, 2012).

Em adição ao bem estabelecido controle do metabolismo pelos *outputs* do relógio circadiano, trabalhos recentes tem demonstrado que os processos metabólicos podem atuar como um dos *inputs* do relógio, contribuindo para o seu ajuste diário (Figura 4). Os açúcares são um dos principais metabólitos de ajuste do relógio. Um trabalho recente mostrou que em plantas cultivadas com baixa disponibilidade de energia, a adição de sacarose exógena ao meio encurta o período endógeno do relógio em duas horas no ecótipo selvagem *Ws* de *A. thaliana*. Entretanto, no mutante *prr7-11*, a duração do período permanece inalterada após a adição da sacarose indicando que o componente do core do relógio PRR7 atua como o sinalizador entre a disponibilidade de açúcar no meio e o ajuste do período do relógio circadiano (Haydon et al., 2013b). A adição de sacarose exógena também restaura o padrão de oscilação diurno dos genes do relógio em plantas mantidas sob escuridão constante (Dalchau et al., 2011) dando mais uma evidencia do *entrainment* do relógio pelos açúcares.

Em animais, a ativação do sensor de status energético AMP-activated protein kinase (AMPK), conduz a fosforilação e desestabilização do CRY (componente central do relógio circadiano em mamíferos), e a inibição do AMPK, gera desestabilização do ritmo circadiano em células do fígado de camundongos (Lamia et al., 2009). Estes resultados sugerem que também em animais, o balanço

energético poderia influenciar o ajuste do relógio, uma vez que os principais reguladores metabólicos podem agir sobre os componentes centrais do relógio circadiano contribuindo para seu ajuste (Sancar & Brunner, 2014).

Espécies reativas de oxigênio (ROS), níveis de NAD^+ e poli (ADP-ribosilação) também podem interferir no ajuste do período do relógio (Panda et al., 2002; Nakahata et al., 2009; Lai et al., 2012). Em conjunto estes estudos sugerem uma interação entre o relógio circadiano e o metabolismo, e entender esta interação nas plantas é importante para a produção de culturas com maior produção de biomassa.

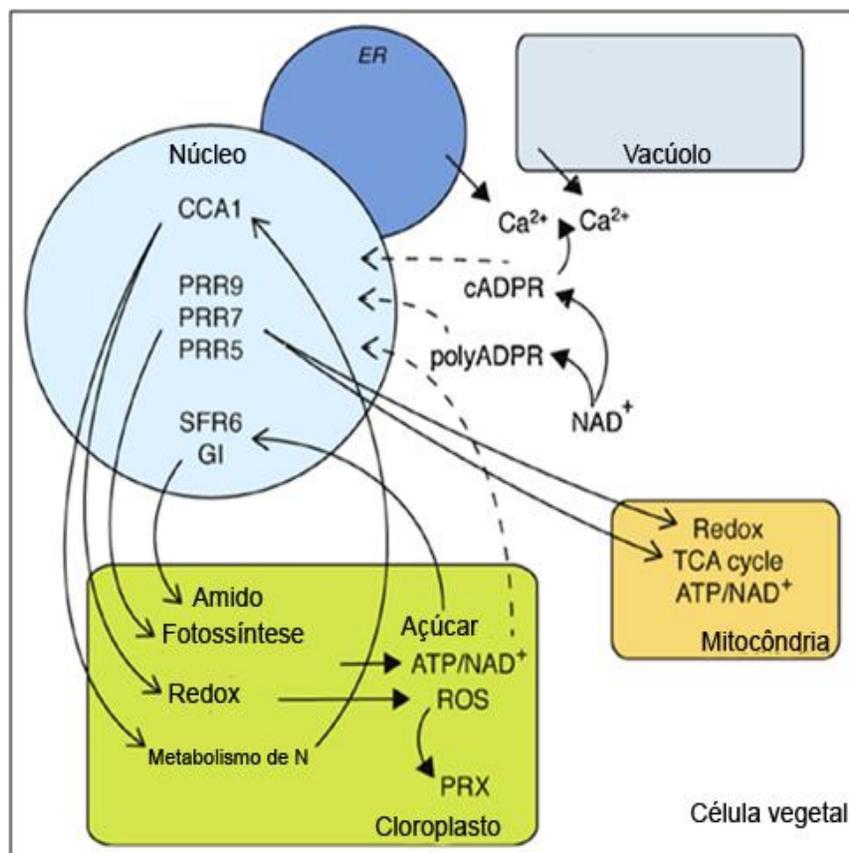


Figura 4. Interação entre o relógio circadiano e processos metabólicos. Diversos processos metabólicos como: fotossíntese, homeostase redox, metabolismo do amido, síntese e respostas a hormônios e assimilação de nutrientes são regulados pelo relógio. Muitos destes processos metabólicos podem atuar como um *input* do relógio, contribuindo para o seu ajuste diário. Fonte: Haydon et al., 2013a, Seminars in Cell & Developmental Biology.

Influência do relógio circadiano na degradação do amido á noite

O amido é o principal carboidrato não-estrutural das plantas. Ele funciona como um estoque de carbono para fornecer energia para os processos metabólicos e de crescimento da planta nos momentos do dia em que ela não estiver realizando fotossíntese. As folhas e outros tecidos verdes são os principais órgãos de armazenamento do amido durante o dia, mas o amido também pode ser armazenado nos tecidos heterotróficos, tais como raízes, sementes e tubérculos, onde é armazenado por período de tempo maior (Streb & Zeeman, 2012). O amido acumulado durante o dia é degradado durante a noite subsequente (Figura 5), proporcionando um fornecimento contínuo de carboidratos na ausência de fotossíntese. Desta forma, o amido das folhas funciona como um reservatório de carboidratos de curto prazo, sendo muitas vezes referido como "amido transitório" (Stitt & Zeeman, 2012).

A degradação do amido transitório á noite é iniciada pelas etapas de fosforilação e desfosforilação do grânulo de amido, em *A. thaliana*, as duas enzimas que participam desta etapa são a Glucan Water Dikinase (GWD) e Phosphoglucan Water Dikinase (PWD). A GWD transfere o γ -fosfato do ATP especificamente para a posição C6 dos resíduos glicosil nas cadeias de amilopectina, a PWD catalisa uma reação semelhante, mas com a diferença de que esta última fosforila apenas a posição C3 dos resíduos glicosil e requer que o substrato glucano já esteja fosforilado pela GWD (Stettler et al., 2009). O grânulo de amido fosforilado pela ação das PWD e GWD é então desfosforilado pelas duas enzimas fosfoglucono fosfatase SEX4 (Starch Excess 4) e LSF2 (Like Starch-excess Four 2) (Figura 5). Esta sequência de fosforilação e desfosforilação desfaz o empacotamento semicristalino da amilopectina e aumenta a hidrofiliabilidade da superfície do grânulo de amido, tornando-o mais acessível á ação das enzimas de degradação (Hejazi et al., 2010; Santelia et al., 2011).

1,6 dos ramos de glucanos do grânulo de amido), α -amilases (endo-amilases que liberam segmentos lineares e ramificados de glucanos) e enzimas de desproporcionamento (α -1,4-glucanotransferase) que desempenham um papel na liberação e metabolismo de malto-oligossacarídeos no estroma (Figura 5). A maltose liberada a partir da atividade das β -amilases é exportada para o citossol, onde será metabolizada pela Disproportionating Enzyme 2 (DPE2), liberando uma molécula de glicose e uma unidade glicosil para outro heteroglicano (Stitt & Zeeman, 2012).

Existem diversas evidências que indicam a participação do relógio circadiano na regulação da degradação do amido durante a noite. A expressão dos genes envolvidos na degradação do amido apresenta oscilação circadiana (Usadel et al., 2008). Além disto, a taxa de degradação de amido é imediatamente reduzida ou aumentada quando as plantas são expostas a um anoitecer antecipado ou tardio, respectivamente (Lu et al., 2005), sugerindo que o mecanismo de temporização do relógio pode ajustar a taxa de degradação do amido de acordo com o comprimento esperado da noite. Também foi mostrado que a taxa de degradação do amido em *A. thaliana* é ajustada de forma que as reservas de amido são quase exauridas próximo do final da noite, como antecipado pelo relógio (Graf et al., 2010). Quando plantas tipo selvagens de *A. thaliana* são cultivadas em dia com duração do período curto (8,5 h de luz/8,5 h de escuro) ou longo (14 h de luz/14 h de escuro), as reservas de amido são exauridas 24 horas após o último amanhecer, independente da duração do período que elas estiverem sendo cultivadas, indicando que a duração do período endógeno destas plantas tipo selvagem, que é de 24 horas, esteja regulando a taxa de degradação do amido. Por outro lado, no duplo mutante do relógio *cca/lhy*, que possui um período endógeno de 17 horas, o amido é prematuramente exaurido quando as plantas deste mutante são cultivadas em um período normal de 24 horas (Graf et al., 2010).

Controle da expressão gênica em resposta ao déficit energético em plantas

As duas proteínas Snf-Related Protein Kinase 10 e 11 (SnRK 10 e 11 também chamadas de KIN10/11) têm papel central na mudança do perfil de transcrição em resposta a condições que provocam deficiência energética em *A. thaliana* (Baena-González et al., 2007). As KIN10 e KIN11 são ortólogas da Sucrose non-fermenting 1 (SNF1) de levedura e AMP-activated protein kinase (AMPK) dos mamíferos (Hardie, 2007; Polge & Thomas, 2007; Halford & Hey, 2009). A sinalização do déficit energético disparado pelas KIN10/11 modula a expressão de mais de 1000 genes, induzindo genes relacionados ao catabolismo (degradação de parede celular, mobilização de amido, degradação de lipídios, proteínas e aminoácidos) e reprimindo genes relacionados ao anabolismo (síntese de parede celular, proteínas, aminoácidos) (Figura 6). Plantas superexpressando KIN10 são mais tolerantes ao déficit energético, por outro lado, plantas silenciando KIN10 falham em induzir a expressão de genes de resposta a stress energético, mesmo estando sob déficit nutricional (Baena-González, 2007). Plantas com atividade de KIN10/11 alteradas mostram diversas aberrações do desenvolvimento (Baena-González, et al., 2007; Lu et al., 2007). Estas observações colocam as KIN10 e 11 como moduladoras de diversos processos que influenciam o crescimento e desenvolvimento (Baena-González, 2010).

Os FT bZIPs do grupo S (bZIP1, bZIP2, bZIP11, bZIP44 e bZIP53) mais o bZIP63 fazem parte da cascata de sinalização ativada por KIN10/11. Em resposta a um sinal de stress energético, uma vez ativados estes bZIPs, regulam a expressão de um subgrupo de genes da via de regulação das KIN10/11 (Figura 6). Outros FT (pertencentes às famílias NAC e MYBS1) têm sido identificados como pertencentes à cascata de regulação ativada pelas KIN10/11 (Baena-González, 2010).

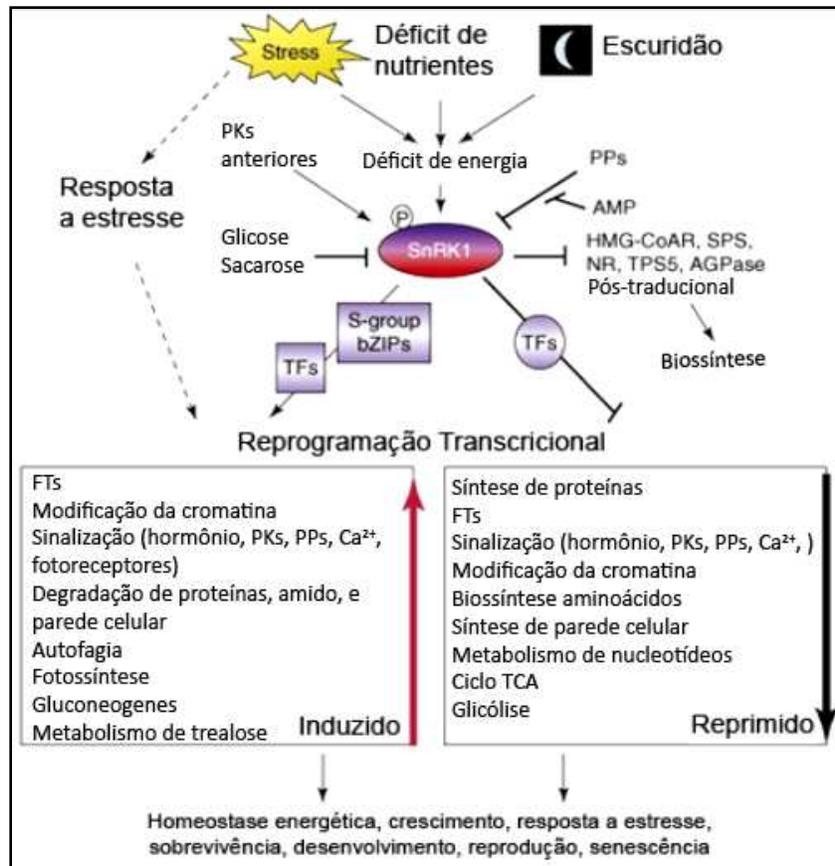


Figura 6. Regulação das respostas a privação energética em *A. thaliana* mediada pelas quinases SnRK1 KIN10 e KIN11. Diversas condições de estresse, privação de nutrientes e escuridão provocam um déficit energético que ativa as quinases KIN10 e 11, as quais disparam uma cascata de sinalização que culminam na reprogramação transcricional parcialmente mediada por bZIPs do grupo C e S que promovem a indução de genes relacionados ao catabolismo. Outros FT desconhecidos mediam a repressão de genes relacionados ao anabolismo. Fonte: adaptado de Baena-González & Sheen, 2008, Trends in Plant Science e Baena-González, 2010, Molecular Plant.

CAPÍTULO 1

O Fator de Transcrição bZIP AtbZIP63 interage com o relógio circadiano e afeta a degradação do amido durante o período noturno impactando o crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*

Resumo

O Fator de Transcrição do tipo bZIP, AtbZIP63 participa da regulação de genes envolvidos nas respostas à carência energética mediada por KIN10/11 e de maneira mais abrangente sugerimos que *AtbZIP63* está envolvido no controle da homeostase energética (Matiolli et al., 2011). O mutante de inserção de T-DNA *atbzip63-2* apresenta uma redução do crescimento e desenvolvimento das folhas assim como um atraso do florescimento em comparação ao tipo selvagem (TS, acesso Ws) quando cultivado em fotoperíodo de dia curto (10 h/14 h). Condições de fotoperíodo de dia longo ou luz contínua promoveram uma reversão parcial ou completa, respectivamente, do fenótipo mutante para o tipo selvagem, levantando a possibilidade de que este fenótipo seja o resultado de uma carência energética. Plantas silenciadas para expressão de *AtbZIP63* por RNAi apresentaram características fenotípicas similares a do mutante *atbzip63-2*, confirmando o envolvimento deste fator de transcrição no crescimento. Para entender a influência de *AtbZIP63* no crescimento e desenvolvimento, comparamos os perfis de RNAs do mutante *atbzip63-2* e o da linhagem silenciada RNAi L9 com o tipo selvagem no final do período noturno quando a expressão de *AtbZIP63* é maior. Os dados de expressão diferencial indicam que *AtbZIP63* está envolvido no controle da expressão de genes de resposta a estresse energético mediado por KIN10/11 (43 genes). Adicionalmente, três genes chaves da degradação do amido foram induzidos no mutante *atbzip63-2*, GWD1/SEX1 (α -Glucan Water Dikinase), PWD (*Phosphoglucan Water Dikinase*) e DPE2 (*Disproportionating Enzyme 2*). De acordo com a maior expressão destes genes no mutante, a degradação do amido durante o período noturno neste genótipo está acelerada com relação ao TS. A análise conjunta dos dados de expressão gênica, níveis de metabólitos (i.e., amido, maltose) e avaliação do fenótipo do *atbzip63-2*, levanta a hipótese de que, a taxa de degradação do amido seria acelerada no mutante, deixando a planta com restrição energética nas

últimas horas da noite. Esta hipótese foi consolidada pela observação de que genes marcadores de estresse energético foram mais expressos no mutante. Duas linhagens silenciadas para expressão de *AtbZIP63* por RNAi e duas linhagens expressando de maneira desregulada *AtbZIP63* fusionado ao domínio de ativação da transcrição VP16, apresentaram mudanças de expressão gênica compatíveis com as alterações de perfis de expressão do mutante *atbzip63-2*, consolidando a hipótese levantada. Além disto, experimentos de *Chromatin Imuno Precipitation* (ChIP), indicaram que *AtbZIP63* regula de maneira direta os genes *GWD1/SEX1* (degradação do amido), *ASN1* (estresse energético) e *XTH15 e 27* (parede). Mostramos que as oscilações diurnas do transcrito *AtbZIP63* são reguladas pelo relógio circadiano e a fase da oscilação do transcrito *AtbZIP63* é aparentemente influenciada pela disponibilidade de carboidratos. Além de estar sob o controle do relógio, *AtbZIP63* também atua como um ativador direto da expressão de *PRR7*, um dos componentes do oscilador central do relógio. Portanto, mostramos uma interação recíproca entre o relógio e *AtbZIP63*. Este conjunto de evidências revela novos aspectos do ajuste do relógio circadiano pelo status de açúcar na célula que estão de acordo com trabalhos recentes mostrando que os açúcares afetam diretamente o funcionamento do relógio. Em suma, sugerimos que *AtbZIP63* atua na interface entre sinais relacionados com o status energético e o mecanismo oscilatório do relógio circadiano de *A. thaliana*.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Foi utilizado um mutante de inserção de T-DNA no primeiro éxon de *AtbZIP63*, que foi nomeado *atbzip63-2* (FLAG_610A08, Wassilewskija, Ws como *background*; Matioli et al., 2011), o mutante *pgm* relacionado com o metabolismo do amido, (Gibon et al., 2004; Columbia-0, Col-0 como *background*), e um duplo mutante do relógio circadiano, o *cca1-1/lhy-21* (Graf et al., 2010; CS9380, Ws como *background*). Também utilizamos linhagens expressando de maneira desregulada o *AtbZIP63* por meio do promotor 35S ou silenciando o *AtbZIP63* via RNAi. As sementes do mutante FLAG_610A08 foram obtidas do SALK Institute (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), e as sementes do mutante *pgm* e *cca1/lhy* foram obtidas do laboratório do Dr. Mark Stitt do Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Alemanha.

Para o cultivo destes genótipos, as sementes foram plantadas em vasos contendo substrato para cultivo de hortaliças (Plantmax HT) e vermiculita expandida (Plantmax) na proporção de 2:1, respectivamente. Inicialmente as sementes plantadas foram colocadas por 72 h na escuridão a 4° C para quebra da dormência, depois transferidas para câmaras climatizadas ou salas de cultivo com temperatura de 22° C e intensidade de luz de 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Para os experimentos de quantificação da expressão gênica em larga escala usamos o fotoperíodo de 10 h luz/14 h escuro (dia curto) e fizemos a coleta na última hora da noite em plantas com 25 dias de cultivo após germinação. Para avaliação do fenótipo utilizamos os fotoperíodos 16 h luz/8 h escuro (dia longo), dia curto e luz contínua e avaliamos as plantas no estágio 3.90 do desenvolvimento, quando as plantas apresentam a roseta completamente expandida (Boyes et al., 2001).

Para a quantificação da expressão gênica ao longo do ciclo dia/noite, as plantas dos mutantes *atbzip63-2*, *pgm*, *cca1/lhy* e dos acessos Ws e Col-0 foram cultivadas em fotoperíodo de dia curto e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro, por 25 dias e então foram realizadas coletas a cada 3 h ao longo do ciclo dia/noite. Após estes tempos de coleta sob fotoperíodo, as plantas foram mantidas por 24 h horas sob luz contínua, e realizadas mais coletas a cada 3 h até completar 48 h de exposição á luz contínua. Para as coletas durante o período de escuridão, utilizamos luz de led verde.

Para os experimentos de avaliação da estabilidade do transcrito do *AtbZIP63* com cordicepina e resposta aos sinais de glicose (Gli), ácido abscísico (ABA) e manitol (Mnt), 10 mg de sementes foram esterilizadas (etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 1% por 20 min sob agitação, seguido por 4 lavagens com água milli-Q estéril) e incubadas em 10 mL de meio MS/2 líquido contendo 0,3% de Gli (m/v) por 72 h a 4° C para quebra da dormência. Em seguida as plântulas foram cultivadas por 5 dias sob luz contínua com temperatura de 22° C e agitação de 70 rpm. Passados 5 dias de cultivo, o meio de cultura foi trocado para MS/2 líquido livre de açúcar, após 24 h nesta condição as plântulas foram tratadas com adição de 120 mM de Gli ou 120mM de Mnt ou 100 µM de ABA ou com a combinação de Gli+ABA nas mesmas concentrações citadas. As amostras foram coletadas após 4 h de exposição aos tratamentos citados. Para a inibição da transcrição gênica as plântulas foram tratadas com 100 µg/mL de cordicepina (3-deoxyadenosine; Sigma) e coletadas após 1 e 2 h conforme descrito por Matioli et al. (2011). O cálculo da meia vida dos transcritos do *AtbZIP63* no mutante *atbzip63-2* e Ws foi realizado de acordo com Lam et al. (2001) e Gutiérrez et al. (2002). Sabendo que a taxa de degradação dos mRNA obedecem a uma cinética de primeira ordem, a diferença nos níveis entre 0 e 1 h foi usada para calcular a constante de decaimento (λ), a qual foi usada na equação $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda$ para estimar a meia vida do transcrito.

Construções gênicas para a expressão desregulada ou para o silenciamento do *AtbZIP63*

Para a expressão desregulada do *AtbZIP63* foi realizada uma construção gênica no vetor binário de transformação de plantas pFP101 (François Parcy, <http://www.isv.cnrs-gif.fr/jg/alligator/vectors.html>), modificado para conter um domínio de ativação forte da transcrição VP16 do vírus *Herpes simplex* (Parcy et al., 1998), e uma etiqueta da hemaglutinina (*HA Tag*, Bensmihen et al., 2004) localizados *downstream* ao promotor 35S de CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) e que foi denominado pFP101HAVP16. A sequência codificante completa do gene *AtbZIP63* foi obtida pela amplificação a partir do cDNA de Col-0, com os primers CbZIP63-f que insere um sítio XbaI na extremidade 5' e CbZIP63-r que insere um sítio BamHI na extremidade 3' do cDNA (Tabela suplementar 1). Após a amplificação, a sequência codificante completa do gene *AtbZIP63* foi inserida em pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI USA) e sequenciada para verificação da integridade da sequência codificante. Para montagem do cassete de expressão, o vetor pGEM-T Easy foi digerido com as enzimas XbaI e BamHI para retirada do cDNA *AtbZIP63*, estas mesmas enzimas foram utilizadas para digerir o vetor pFP101HAVP16, após a digestão, a sequência do *AtbZIP63* foi ligada neste vetor em fase com os domínios HA e VP16 e sob o controle do promotor 35S do CaMV e o sinal de poliadenilação do gene *Nos* de *Agrobacterium* (35S::HA::VP16::cDNA *AtbZIP63*::tNOS).

O cassete de expressão para obter o silenciamento do gene *AtbZIP63*, foi montado com uma parte da sequência codificante do *AtbZIP63* de 350 pb específica deste gene, inserida nos sentidos senso e antisenso no vetor pHANNIBAL (Wesley et al., 2001). A sequência de 350 pb do gene *AtbZIP63* foi obtida pela amplificação a partir do cDNA *AtbZIP63* do ecótipo Col-0, com os primers IbZIP63-f que insere os sítios de HindIII e KpnI na extremidade 5' e IbZIP63-r que insere os sítios de XhoI e XbaI na extremidade 3' (Tabela suplementar 1). Após a amplificação, a sequência de *AtbZIP63* foi inserida em pGEM-T Easy. A sequência inserida em pGEM-T Easy foi digerida com KpnI e XhoI e clonada em

pHANNIBAL digerido também com KpnI e XhoI, dando origem ao primeiro intermediário. Em seguida, este intermediário foi digerido com HindIII e XbaI, para inserção do fragmento de *AtbZIP63* na orientação antisenso. Esta construção está sob o controle do promotor 35S do CaMV e promove a expressão constitutiva de um RNA dupla fita capaz de gerar siRNA dirigidos contra o mRNA *AtbZIP63*. O cassete (35S::fragmento *AtbZIP63*sensio::íntron:: fragmento *AtbZIP63*anti-senso::tNOS) foi posteriormente retirado do vetor pHANNIBAL e clonado no vetor pFP100-LacZ, o qual contém o sistema de seleção dos transformantes via fluorescência de *green fluorescent protein* (GFP) nas sementes (Bensmihen et al., 2004).

Transformação in planta, seleção das plantas transgênicas e plantas segregantes do cruzamento *atbzip63-2* x Ws

Os vetores binários carregando as construções para a expressão desregulada ou o silenciamento do *AtbZIP63* foram transfetados em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 (Koncz & Schell, 1986) para transformação genética de *A. thaliana*. O cultivo, conservação e transformação de *A. tumefaciens* foram realizados conforme descrito por Brasileiro (1998). Após a transformação de *A. tumefaciens*, extraímos o DNA plasmidial e identificamos os clones positivos por meio de reação de PCR, utilizando os primers CbZIP63-fw, CbZIP63-rv, IbZIP63-fw e IbZIP63-rv, para verificação da presença da sequência codificante do *AtbZIP63* e parte da sequência senso e antisenso deste gene, respectivamente. A metodologia utilizada para transformação de *A. thaliana* foi a de transformação *in planta* descrita por Bechtold *et al.* (1993) modificada, na qual uma suspensão contendo *A. tumefaciens* carregando o vetor de interesse foi borrifada duas vezes com um intervalo de 7 dias sobre as plantas em estágio inicial do florescimento (Silveira et al., 2007).

Transformantes para expressão desregulada ou silenciamento do *AtbZIP63* foram identificados através da fluorescência de GFP na semente, utilizando-se estereomicroscópio Nikon SMZ1000 equipado com filtro GFP2. Transformantes primários (F1) foram selecionados para cada construção e autofecundados e as populações F2 com padrão de segregação 3:1 (teste estatístico $\chi^2 \leq 3,8$; $p < 0,05$) para fluorescência/sem fluorescência na semente foram selecionadas. Destas, 20 plantas individuais de cada população foram autofecundadas. Análise de segregação na população F3 permitiu identificar linhagens homozigóticas para um locus do transgene. Selecionamos linhagens homozigotas com expressão desregulada *AtbZIP63* no ecótipo selvagem Ws e no mutante *atbzip63-2* ou silenciando o *AtbZIP63* no ecótipo selvagem Ws.

Foi realizado um cruzamento entre o mutante *atbzip63-2* e o ecótipo Ws, e para a genotipagem das plantas oriundas deste cruzamento, foi utilizada a combinação dos primers *AtbZIP63gen-Fw*, *AtbZIP63gen-Rv* e *FlagRb4* (Tabela suplementar 1), que amplificam diferencialmente o alelo selvagem e o alelo mutante, permitindo assim identificar homozigotos e heterozigotos para a inserção do T-DNA. O padrão de segregação 1:2:1 (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutante) foi testado em 200 plantas F2 oriundas da autofecundação de uma planta F1 do cruzamento pelo teste estatístico $\chi^2 \leq 5,9$; $p < 0,05$.

Extração dos ácidos nucléicos e síntese de cDNA

O DNA total foi extraído das folhas pelo método CTAB de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), 0,1 g de tecido macerado em nitrogênio líquido foi misturado a 600 μ L de tampão de extração contendo: Tris-HCl 0,1 M pH 8; CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM pH 8; β -mercaptoetanol 0,2% e água e em seguida foi incubado em banho-maria durante 40 min a 67° C, invertendo a cada 10 min. Depois, foi adicionado 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e

centrifugado por 6 min a 13.000 rpm, após a centrifugação a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado mais 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 6 min a 13.000 rpm, após a centrifugação a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado 2/3 do volume do sobrenadante de álcool isopropanol gelado e mantido a -80° C por no mínimo 1 h ou -20° C *overnight*. Após este tempo, a amostra foi centrifugada por 10 min a 4° C com 13.000 rpm e o sobrenadante descartado, então o pellet foi lavado com 500 µL etanol 95% e ressuspenso em 50 µL de solução TE+RNase (199:1), e incubado em banho-maria por 30 min a 37° C. A integridade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v), e a quantificação foi realizada em NanoVue™ (GE Healthcare).

Para as análises de expressão gênica, o RNA total foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, (2008). No qual ± 0,5 g de tecido macerado em nitrogênio líquido foi misturado a 800 µL de tampão de extração contendo: Tris-HCl 0,2 M pH 8; LiCl 0,4 M; EDTA 25 mM pH 8; SDS 1%; β-mercaptoetanol 4,7% e água DEPC. Em seguida foi adicionado 800 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) gelado e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm, após a centrifugação a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado 500 µL de fenol ácido, vortexado vigorosamente por 10 s, adicionado 200 µL clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) gelado, agitado manualmente e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm, após a centrifugação a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado 1/3 do volume da fase superior de LiCl 8M misturado por inversão e mantido a -20° C por no mínimo 1 h. Após este tempo, a amostra foi centrifugada por 30 min a 4° C com 14.000 rpm e o sobrenadante descartado, então foi adicionado 500 µL de água DEPC para dissolver o pelet, e adicionado 50 µL de acetato de sódio (3 M pH 5,2) e 800 µL de etanol 100% misturado por inversão e mantido a -20° C por no mínimo 1 h. Após este tempo foi centrifugado por 30 min a 4° C com 14.000 rpm e o sobrenadante descartado, então o pelet de RNA foi

lavado com 500 µL de etanol 70% e 100% e secado em speed-vac por 10 min e ressuspensão em 20 µL de água DEPC. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com 5% de formaldeído, de acordo com Logemann et al (1987), e a quantificação foi realizada em NanoVue™ (GE Healthcare).

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizamos oligo-dT como iniciador e para a transcrição reversa utilizamos o kit ImPromII (Promega, Madison, WI USA). Inicialmente o RNA, o oligo-dT e a água foram incubados a 70° C por 10 min para desnaturação das moléculas de RNA, seguida de incubação no gelo. Em seguida os reagentes do kit foram adicionados a reação e incubados a 42° C por 40 min para transcrição reversa, por fim a enzima *reverse transcriptase* (RT) foi inativada a 65°C por 15 min.

PCR convencional

As reações de PCR convencional para amplificação das sequências codificantes e promotores usados nas construções gênicas, foram realizadas de acordo com Sambrook e Russel (2001), as sequências codificantes do *AtbZIP63* foram amplificadas a partir de cDNA e a sequência do promotor a partir de DNA genômico. O programa de amplificação continha os seguintes passos: 94° C por 3 min, seguido por ciclos de 94° C por 45 s, 55° C por 30 s, 72° C por 90 s, finalizando a reação com uma fase de extensão final a 72° C por 10 min.

Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

As reações foram realizadas no sistema de detecção 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando SYBR Green como fluoróforo. As reações foram realizadas em duplicatas, em volume total de 12,5 µl. Em cada reação utilizou-se 6,25 µl de Master Mix SYBR

Green (Invitrogen), 0,25 µl de ROX como referência passiva (Invitrogen), iniciador direto e reverso em concentração final de 10 µM, 0,5 µl de cDNA (± 60 ng de mRNA) e água para completar o volume. O programa utilizado continha os passos: 95° C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 s e anelamento e extensão a 60° C por 1 min, concomitantemente com uma leitura de fluorescência. Curvas de dissociação foram obtidas após cada reação através de elevação gradual da temperatura de 60 até 95° C, concomitantemente às medidas constantes de fluorescência, para comprovar a ausência de amplificação inespecífica ou formação de dímeros de primers. Todas as amplificações foram analisadas utilizando o *threshold* Rn em 0,02 para obtenção dos valores de *threshold cycle* (C_t) ou *cycle quantification* (C_q). O nível de expressão gênica foi quantificada em relação a um controle (ecótipo selvagem ou planta não tratada), utilizando como padronização o gene de controle endógeno *Pdf2/At1g13320* (Czechowski et al., 2005), e a equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta C_t = C_t$ do gene de interesse – C_t do controle endógeno) e $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ do tratamento - ΔC_t do não-tratado.

Os dados de expressão foram coletados a partir de três réplicas biológicas e submetidos ao teste T de Student para identificação de diferenças significativas na expressão dos genes analisados entre o genótipo mutante e selvagem, com nível de significância $p < 0,05$.

Para o desenho dos primers utilizados no qRT-PCR, foram adotados os seguintes critérios: (1) T_m : 60° C, (2) tamanho do amplicon entre 80-150 pb, (3) conteúdo de GC entre 35% e 50%, (4) quando possível (gene que possui íntron), abranger os dois últimos éxons de forma a evitar contaminação referente a amplificação de DNA genômico nas amostras de cDNA, (5) eficiência de amplificação entre 90-110%. Todos os primers foram comparados com sequências genômicas de *A. thaliana* usando a ferramenta Primer-BLAST no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a fim de avaliar sua especificidade. Desenhamos primers para validar por qRT-PCR alguns genes que apareceram com expressão diferencial no microarranjo do *atbzip63-2* e RNAi L9 (Tabela suplementar 1).

Avaliação fenotípica

A área individual de cada folha e a área total da roseta (cm²) das plantas foram obtidas com aparelho leaf area meter 3100 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, US). Também a área da roseta de plantas foi medida no *Phenoscope*, um sistema de fenotipagem em larga-escala desenvolvido pelo grupo do Dr. Olivier Loudet do INRA-IJPB de Versailles, França (Tisné et al., 2013).

Quantificamos o peso fresco/área foliar e o peso seco/área foliar da parte aérea, para tal, coletamos toda a parte aérea da planta e quantificamos seu peso fresco, em seguida a parte aérea de cada planta foi desidratada em estufa á 70° C, realizando pesagens a cada 24 h até as plantas atingirem peso seco constante. Para calcularmos o peso fresco e o seco/área foliar, dividimos o peso fresco e o peso seco pelo resultado do somatório das áreas das folhas de cada planta. Para estas análises utilizamos 30 plantas para cada genótipo. Também contamos o número de células/área (0,7 mm²), estimamos o número total de células e a área das células da 1° e da 3° folha de 12 plantas do mutante *atbzip63-2* e 12 do TS com 30 dias de idade. Para estimarmos o número total de células, multiplicamos o número de células na área fixa de 0,7 mm² pela área total da folha, e para o cálculo da área celular, dividimos a área de 0,7 mm² pelo número de células nesta área fixa. Esta área fixa de 0,7 mm² foi amostrada em 10 pontos ao longo da superfície da folha. Estes dados foram submetidos ao teste T de Student com nível de significância p<0,05.

Identificação dos genes alvos do AtbZIP63 via microarranjo de DNA, Gene Ontology e análises comparativas

O RNA total foi extraído das quatro folhas mais jovem de plantas do mutante *atbzip63-2* e da linhagem silenciando o *AtbZIP63* RNAi L9, e do TS com 25 dias de cultivo em terra sob fotoperíodo de dia curto. Cada amostra foi obtida a partir de cinco plantas. Para o microarranjo de DNA foram

utilizados 4 *chips* de DNA para cada genótipo (mutante *atbzip63-2*, linhagem RNAi L9 e ecótipo Ws). A marcação e hibridização do RNA foram realizadas conforme os protocolos da Affymetrix®, utilizando as instalações do Laboratório de Microarranjos do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas). O RNA foi convertido em cDNA, marcado com biotina, fragmentado (80 a 120 pb) e então hibridizados contra o *chip* de DNA (ATH1 Arabidopsis GeneChips, Affymetrix®). Após a hibridização estes *chips* foram lavados e a estreptavidina foi adicionada, em seguida foram escaneados com scanner GeneArray. Para o tratamento estatístico dos dados brutos utilizamos o software R 2.12.1 (R Development Core Team, 2008) com a interface gráfica de análise de microarranjos affyGUI (<http://www.bioconductor.org/packages/2.0/bioc/html/affyGUI.html>). Para a normalização entre as lâminas utilizamos o método RMA (“*Robust Multichip Average*”) no software Expression Console™ (Affymetrix®). O P-valor<0,05 foi utilizado como ponto de corte para seleção dos genes diferencialmente expressos. Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, estes foram analisados e classificados segundo o Gene Ontology, na base dos três critérios descritivos hierárquicos que são: (1) função molecular, (2) processo biológico e (3) localização celular (The Gene Ontology Consortium, 2001) e de acordo com informações nos bancos de dados GO de *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Os genes diferencialmente expressos foram comparados com outros experimentos de transcriptômica utilizando o software VennMaster 0.37.4 (<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/vennm/doc.html>), e a significância estatística destas sobreposições foram avaliadas pelo teste exato de Fisher com p-valor<0,05. O agrupamento dos genes diferencialmente expressos foi realizado no Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch/; Zimmermann et al., 2005). As interações com vias metabólicas foram analisadas no MapMan (Thimm et al., 2004).

Deteccção da proteína recombinante HA::VP16::AtbZIP63-CDS por Western Blot

Plantas expressando a fusão HA::VP16::AtbZIP63-CDS das linhagens 35S L5 e L15, assim como plantas selvagens do ecótipo Ws com 25 dias de idade foram coletadas no final da noite de fotoperíodo de dia curto, pesadas e maceradas em tampão de extração contendo: Tris-HCl 50 mM pH 6,8; SDS 2%; DTT (Dithiotreitol) 0,1 M, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,01%. Em seguida foram incubadas a 95° C durante 15 minutos, centrifugadas durante 10 min a 13.000 rpm, após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para microtubos e 15 µL de cada amostra foi usado para o SDS-PAGE (10% de bis-acrilamida no gel de resolução, corrida por 30 min a 40 V e 1 h 30 min a 140 V). A transferência foi efetuada por 30 min em membrana de nitrocelulose usando transferência semi-seca, com tampão de transferência Tris-Glicina contendo 20% de metanol e 0,1% de SDS. O bloqueio da membrana foi efetuado com 5% de leite desnatado em tampão T-TBS durante 1 h a temperatura ambiente sob agitação, lavada e incubada durante 16 h com o anticorpo primário anti-HA (Santa Cruz – Cat n. sc7922) diluído 1:2000 em 5% de solução de bloqueio a 4° C sem agitação. A membrana foi novamente lavada e incubada durante 2 h com anticorpo secundário anti-camundongo diluído 1:30000 em tampão de bloqueio a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada novamente e revelada utilizando o kit ECL Prime (GE Lifesciences Cat. N. RPN2232) segundo o protocolo do fabricante e visualizada em filme fotossensível (GE Hyperfilm Cat. N. 28-9068-40).

Quantificação do amido e maltose do mutante *atbzip63-2*

Os níveis de amido e maltose foram quantificados em folhas de plantas cultivados por 30 dias sob os fotoperíodos 12 h luz/ 12 h escuridão ou dia curto. Foi utilizado o método descrito por Stitt et al. (1989) e Hendriks et al. (2003). Neste método, 20 mg de amostra são macerados em nitrogênio líquido, em seguida adiciona-se 250 µL de etanol 80% e a amostra é incubada em banho-maria ou banho seco a

80° C por 20 min, depois centrifugada a 14.000 rpm por 3 min. Para a quantificação do amido o sobrenadante é descartado e esta etapa de lavagem com etanol é repetida mais duas vezes. Já para a quantificação da maltose o sobrenadante é recuperado e usado nas próximas etapas. Nas amostras para a determinação do amido, o pellet é ressuspenso em 400 µL de NaOH 0,1 M, e incubado a 95° C por 30 min, em seguida o pH da suspensão é neutralizado para pH 6 com mix neutralizador (HCl 0,5 M e acetato de sódio 0,1 M diluídos em água), e então 40 µL da suspensão de cada amostra é transferida em duplicata para placa elisa de 96 poços contendo 60 µL do mix de degradação do amido (0,17 U de amiloglicosidase, 0,24 U amilase em acetato de sódio 50 mM pH 4,9) e incubada por *overnight* a 37° C. Após este tempo, a placa é centrifugada a 4000 rpm por 2 min a 4° C, e foi retirado 40 µL do sobrenadante contendo glicose livre é retirado e adicionado a uma nova placa elisa contendo 160 µL do mix de determinação de glicose (Hepes-KOH 0,1 M; MgCl₂ 3 mM pH 7; 480 µL ATP 60 mg/mL; 480 µL NAD⁺ 36 mg/mL; 80 µL G6PDH 5,6 U/µL) e a OD é medida em 340 nM, fazendo leituras por 10 min a cada 35 s, até a OD da reação estabilizar-se. Depois que a OD da reação estabiliza, adiciona-se 2 µL da hexoquinase ressuspendida em Hepes-KOH 0,1 M, e a OD é medida em 340 nM, fazendo leituras por 50 min a cada 40 s, até a OD da reação estabilizar novamente. Os valores de OD da reação estabilizada são usados para a determinação da glicose e posteriormente convertido em conteúdo de amido ou de maltose.

Parte destas análises foi realizada no laboratório do Dr. Mark Stitt no Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Potsdam-Golm, Alemanha), e outra parte foi realizada com a colaboração da Dra. Marina Camara Mattos Martins do Laboratório de Ciência e Tecnologia do Bioetanol.

Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

Para os experimentos de ChIP foi utilizado o EpiQuik™ Chromatin Immunoprecipitation Kit (Epigentek #P-2014) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O Rat anti-HA (Santa Cruz Biotechnology Inc, Cat. Nº sc-7392) foi usado como anticorpo de interesse, o qual captura a proteína que estiver fusionada ao HA tag. Os anticorpos do EpiQuik Kit normal Mouse IgG foi usado como controle negativo, pois captura apenas a imunoglobulina do rato, e o antidimethyl H3-K9 foi usado como controle positivo, o qual captura os retrotransposons At4g03770 e At4g03800 localizados no knob heterocromático do cromossomo 4 de *A. thaliana*. Os fragmentos de DNA capturados na imunoprecipitação da cromatina foram utilizados para amplificação em qRT-PCR. Para tanto foram usados dois grupos de primers para as regiões promotoras dos genes de interesse. O grupo de primer 1 amplifica uma região do promotor que contém o motivo G-box (3'-CACGTG-5') característico de ligação dos fatores bZIP, e o grupo 2 amplifica uma região sem nenhum motivo de ligação conhecido. As médias do enriquecimento das regiões promotoras dos genes de interesse foram obtidas a partir de três experimentos independentes e diferença foi significativa quando o teste T de Student apresentou um p-valor <0,05.

Resultados e Discussão

***AtbZIP63* influencia o crescimento e desenvolvimento**

Observamos que as plantas de genótipos com expressão alterada do *AtbZIP63*, o mutante *atbzip63-2* e linhagens silenciadas ou expressando de maneira desregulada o *AtbZIP63* (*35S:HA:VP16:cDNA AtbZIP63*) (Figura 7), apresentam um crescimento e desenvolvimento reduzido

comparado ao TS (Ws). Em colaboração com a equipe do laboratório do Dr. Olivier Loudet no INRA, Versailles, as plantas do mutante *atbzip63-2*, da linhagem silenciada RNAi L9 e do TS foram cultivadas por 21 dias no *Phenoscope*, um sistema de fenotipagem em larga-escala que monitora o crescimento das plantas automática e diariamente, e observamos que as plantas do *atbzip63-2* e da RNAi L9 crescem menos que as plantas do TS (Figura 8).

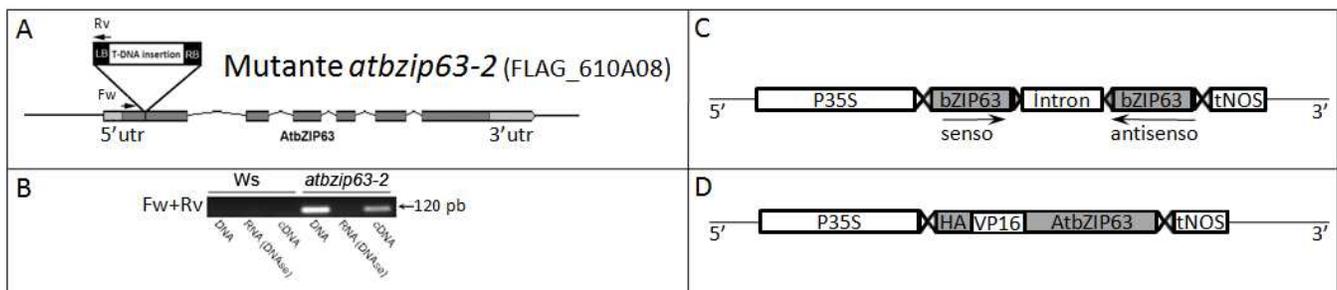


Figura 7. Descrição do alelo mutante *atbzip63-2* e das construções promovendo uma expressão alterada de *AtbZIP63*. **A:** Esquema do sítio de inserção do T-DNA do mutante *atbzip63-2*. LB, borda esquerda do T-DNA; RB, borda direita do T-DNA; Fw e Rv, são os primers usados para localizar a inserção do T-DNA e detectar o transcrito quimérico (ver sequência dos primers em Tabela suplementar 1). **B:** Produtos de amplificação a partir do DNA, RNA (tratado com DNase) e do cDNA de *atbzip63-2* e Ws usando os primers Fw e Rv e evidenciando o transcrito quimérico entre o *AtbZIP63* e o T-DNA. **C:** Esquema da construção para o silenciamento do *AtbZIP63* via RNAi. Uma sequência codificante de 350 pb específica do *AtbZIP63* inserida nos sentidos senso e antisenso espaçadas pelo íntron nativo do vetor pHANNIBAL. Este cassete está sob o controle do promotor 35S do CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) e promove a expressão constitutiva de um RNA dupla fita que originará um siRNA dirigido contra o mRNA *AtbZIP63*. **D:** Construção para a expressão desregulada do *AtbZIP63* fusionado ao domínio de ativação forte da transcrição VP16 do vírus *Herpes simplex* e uma etiqueta da hemaglutinina (HA Tag), sob controle do promotor 35S de CaMV.

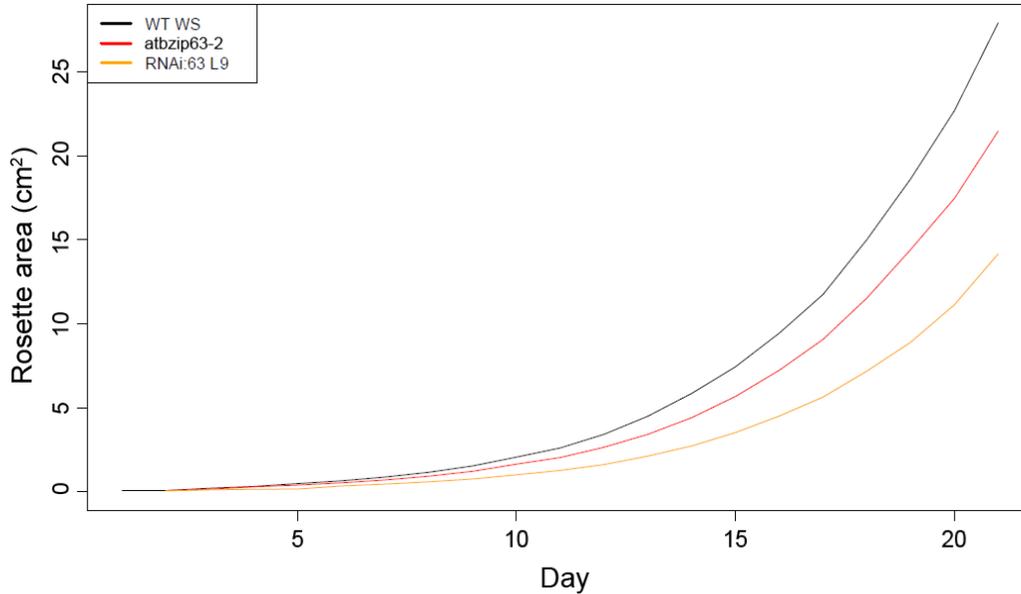


Figura 8. As plantas do mutante *atbzip63-2* e da linhagem silenciada RNAi L9 possuem crescimento reduzido comparado com o TS Ws. A área da roseta de plantas cultivadas por 21 dias no *Phenoscope*, foi registrada diariamente pelo sistema de fenotipagem em larga-escala.

Para obter uma caracterização mais precisa do fenótipo no mutante *atbzip63-2* nós realizamos uma análise comparativa detalhada do crescimento e desenvolvimento deste mutante comparado com o TS. Após 30 dias de cultivo em fotoperíodo de dia curto (10 h luz/14 h escuridão) a área de cada folha individualizada e a área total da roseta das plantas foram 30% menores no mutante *atbzip63-2* do que o TS (Figura 9A) e as plantas do mutante apresentam apenas 20 folhas, enquanto as plantas do TS apresentam 24 (Figura 9A). Quanto ao peso fresco/área foliar e peso seco/área foliar foram 28% e 23% menores, respectivamente, no mutante *atbzip63-2* em relação ao TS (Figura 9A). Observamos ainda que as plantas do mutante demoram em média 15 dias a mais para o início do florescimento (i.e., crescimento da haste floral). Quando cultivadas em fotoperíodo de dia longo (16 h luz/8 h escuridão), a área foliar e da roseta foi 20% menores no mutante com relação ao TS (Figura 9B) e o peso fresco/área foliar foi apenas 16% menor no mutante enquanto o peso seco/área foliar foi igual ao TS (Figura 9B) evidenciando uma reversão parcial do fenótipo nestas condições de fotoperíodo. Além disto, quando as

plantas do *atbzip63-2* foram cultivadas sob luz contínua, não houve diferença significativa de crescimento e desenvolvimento entre o mutante e o TS comparado ao cultivo sob fotoperíodo (Figuras 10 A e B). Estas observações sugerem que a duração do período de luz influencia o crescimento e o desenvolvimento das plantas mutantes, sugerindo que as plantas do tipo mutante sofrem carência energética quando cultivadas em dias curtos e que a disponibilidade de carboidratos (oriundos da atividade fotossintética) esteja envolvida neste processo.

Para termos um quadro mais preciso das possíveis causas do tamanho reduzido das folhas do mutante *atbzip63-2*, comparamos o número e o tamanho das células da superfície adaxial da 1ª e da 3ª folha emitidas após os cotilédones do mutante *atbzip63-2* e do TS com 30 dias de cultivo sob fotoperíodo de dia curto. Os resultados desta análise mostraram que as células do tipo mutante possuem um tamanho reduzido em comparação as do TS, indicando que o processo de expansão celular está prejudicado no mutante (Tabela 1).

Tabela 1: Quantidade e tamanho das células da face adaxial da 1ª e 3ª folha emitidas após o cotilédone em plantas do *atbzip63-2* e Ws com 30 dias de cultivo sob fotoperíodo de dia curto.

	Primeira folha			Terceira folha		
	AF (mm ²)	NC	AC (µm ²)	AF (mm ²)	NC	AC (µm ²)
Ws	29	13132	3,2	59,2	18301	3,2
<i>atbzip63-2</i>	26*	12962 ^{NS}	2,8*	45*	17315 ^{NS}	2,7*

AF: área da folha; NC: número total de células e AC: área celular. O cálculo do número total de células na face adaxial da folha foi obtido pela multiplicação do valor do número de células numa área de 0,7 mm² pela área total da folha, e para o cálculo da área celular, dividimos a área de 0,7 mm² pelo número de células nesta área fixa. Esta área fixa de 0,7 mm² foi amostrada em 10 pontos ao longo da superfície da folha. * A diferença entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um p < 0,05. ^{NS} Diferença não significativa pelo teste T de Student com p < 0,05.

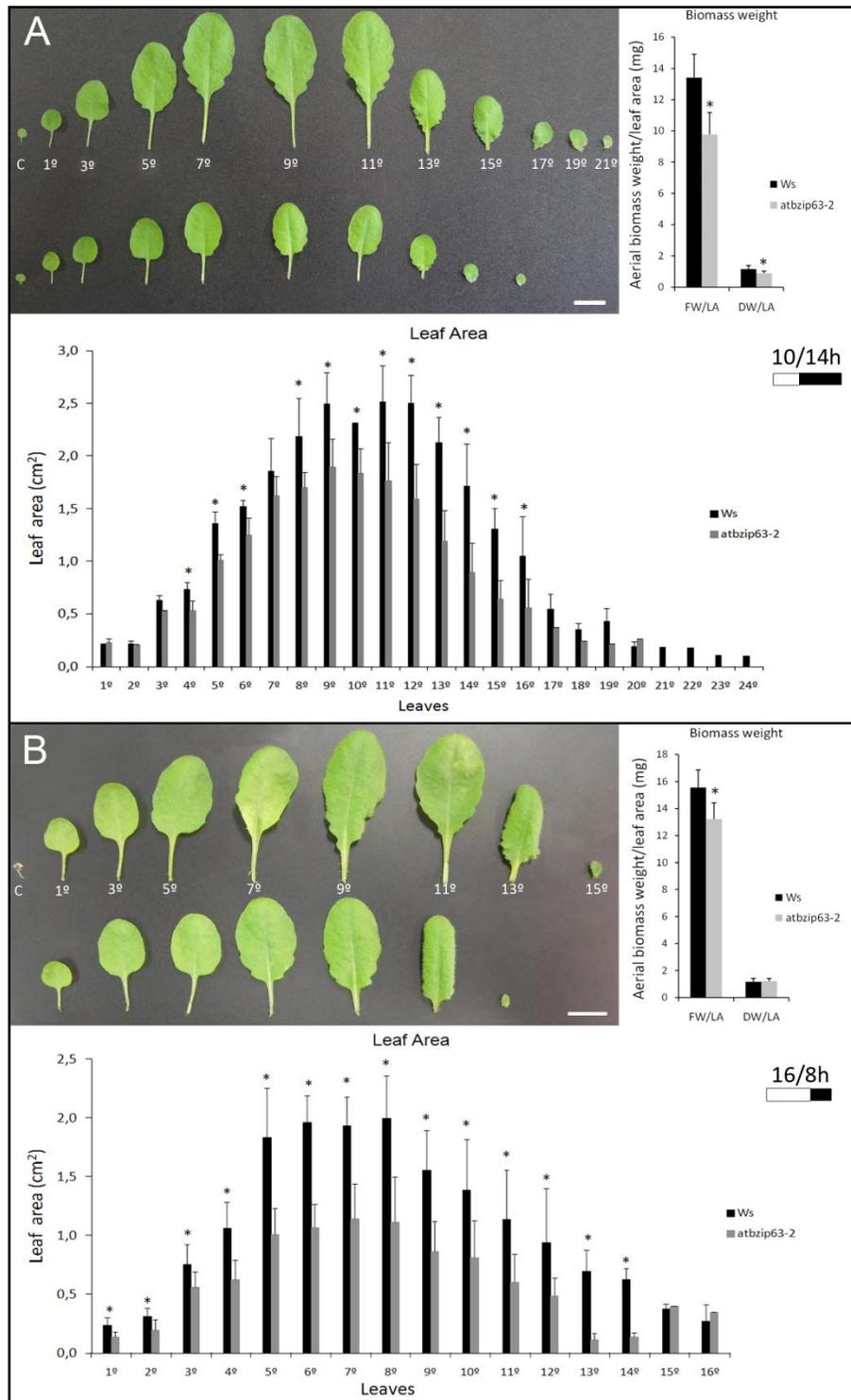


Figura 9. O desenvolvimento vegetativo do mutante *atbzip63-2* é mais lento comparado ao TS. **A-B:** O mutante apresenta redução na taxa de crescimento e desenvolvimento das folhas quando cultivado tanto em fotoperíodo de dias curtos, quanto em dias longos. **A:** Área foliar do mutante *atbzip63-2* é em média 30% menor. Com 30 dias de idade (estágio 3.90 de desenvolvimento) o mutante apresenta apenas 20 folhas enquanto o Ws apresenta 24 quando cultivado em fotoperíodo de dia curto (10/14). O peso

Medimos a área da roseta de plantas da linhagem silenciada RNAi L9 (média de 8 vezes de silenciamento do *AtbZIP63*; Figura S5), cultivadas por 30 dias em fotoperíodo de dia curto, e observamos que as plantas silenciadas apresentam um fenótipo de redução do crescimento idêntico a do mutante *atbzip63-2*, com a área da roseta 30% menor do que o TS (Figuras 10 C e E), reforçando a hipótese do envolvimento do *AtbZIP63* no crescimento. Entretanto, em plantas do mutante *atbzip63-2* transformadas com a construção para a expressão desregulada de *AtbZIP63* fusionado ao HA e VP16 (*35S::HA::VP16::cDNA AtbZIP63*) não foi capaz de complementar a mutação uma vez que não houve reversão do fenótipo de redução do crescimento para o fenótipo do TS. A linhagem 35S L12 (no contexto mutante *atbzip63-2*) com 2,5 vezes a expressão de *AtbZIP63* do tipo selvagem (Figura S5), apresentou um crescimento ainda mais reduzido do que as plantas *atbzip63-2*, com a área da roseta cerca de 62% menor comparada com o TS e 48% menor em relação ao *atbzip63-2* (Figuras 10 D e E). O fenótipo de crescimento reduzido também foi verificado nas linhagens expressando de maneira desregulada a fusão *HA::VP16::AtbZIP63* no contexto selvagem, a exemplo da linhagem 35S L5 que possui 2,0 vezes mais transcrito do *AtbZIP63* do que o TS, e a área da roseta também é 30% menor comparado com o TS. A redução no crescimento das linhagens expressando a fusão *HA::VP16::AtbZIP63*, corresponde a um efeito dominante negativo. Este efeito poderia estar relacionado à atividade do domínio de ativação da transcrição VP16 e/ou do efeito da expressão desregulada de *AtbZIP63* a partir do promotor 35S do CaMV e favorecendo a formação de heterodímeros entre *AtbZIP63* e outros FT do tipo bZIP do grupo S e C (Weltmeier et al., 2006).

Figura 9. Continuação. fresco/área foliar e peso seco/área foliar, foram 28% e 23% menores, respectivamente, no mutante *atbzip63-2* em relação ao TS. **B:** Em cultivo de dia longo (16/8) a área foliar do mutante *atbzip63-2* foi apenas 20% menor. O peso fresco/área foliar (FW/LA) foi apenas 16% menor no mutante enquanto o peso seco/área foliar (DW/LA) foi igual ao TS. Nas imagens estão representadas apenas as folhas de numeração ímpar a partir da primeira folha emitida. A diferença de expressão com o genótipo selvagem Ws foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*). Barra: 1 cm.

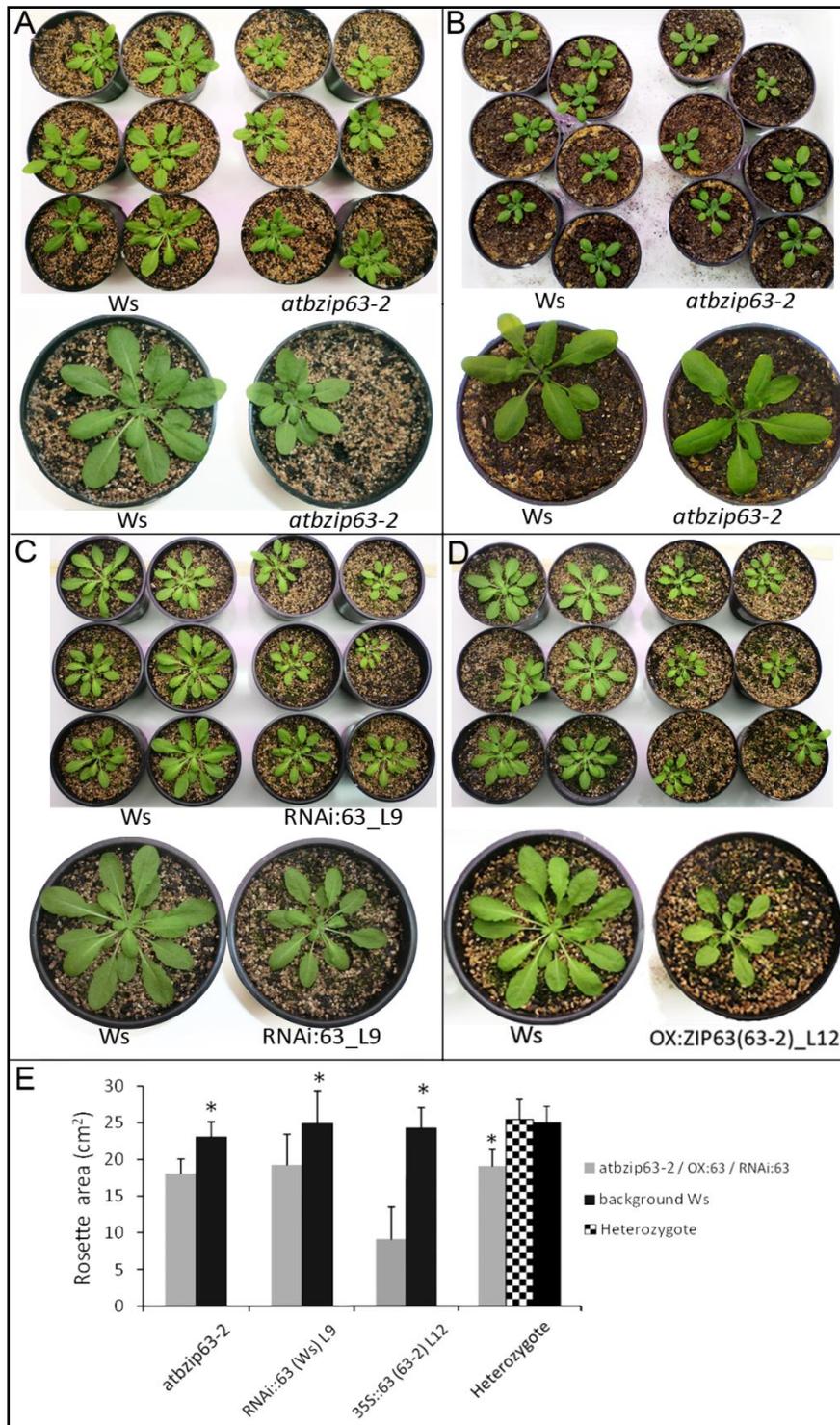


Figura 10. *AtbZIP63* influencia o crescimento e desenvolvimento das plantas. **A:** Plantas do mutante *atbzip63-2* possuem crescimento reduzido comparado ao TS quando cultivado sob fotoperíodo de dia curto. **B:** Quando cultivadas sob luz contínua, as plantas do mutante *atbzip63-2* crescem igual ao TS. **C:** Plantas de uma linhagem silenciando *AtbZIP63* via RNAi (RNAi L9, média de 8 vezes de silenciamento do *AtbZIP63*) também possuem crescimento reduzido comparado ao genótipo selvagem correspondente. **D:** Em plantas da linhagem L12 (transformadas com a construção 35S:HA:VP16:AtbZIP63 para a

Também analisamos o fenótipo “área da roseta” em plantas da geração F2 obtidas a partir da autofecundação de plantas F1 heterozigotas para o alelo selvagem *AtbZIP63* e o alelo mutante *atbzip63-2* que foram obtidas a partir do cruzamento entre o mutante *atbzip63-2* e o TS. Genotipamos e medimos o fenótipo área da roseta de 200 plantas F2 oriundas da autofecundação de uma planta F1 heterozigota (Tabela 2). Para a genotipagem utilizamos uma combinação de primers que amplificam diferencialmente o alelo selvagem e o alelo mutante *atbzip63-2* (Figuras 11 B e S2). Após a identificação dos genótipos, verificamos que o padrão de segregação segue a distribuição discreta 1:2:1 ($\chi^2 \leq 5,9$ com $p < 0,05$; Tabela 2). Em relação à área da roseta observamos uma dispersão nos valores dentro de cada genótipo, gerando desvios padrões altos (Figura 11 A). Para diminuir o erro e obter um valor médio mais preciso fizemos uma análise de *box plot* dos dados e descartamos todos os valores abaixo do 1º quartil e todos acima do 3º quartil. Após esta seleção restaram 148 plantas F2, dentre as heterozigotas não foi observado diferença de tamanho ou biomassa quando comparadas com as plantas F2 homozigotas para o alelo selvagem *AtbZIP63* (Figura 10 D). Entretanto, as plantas F2 homozigotas mutantes *atbzip63-2* continuam apresentando o fenótipo de redução de tamanho e biomassa previamente descrito.

Figura 10. Continuação. expressão desregulada de *AtbZIP63* no contexto mutante *atbzip63-2*, com 2,5 vezes a expressão de *AtbZIP63* do tipo selvagem), a área da roseta é cerca de 62% menor comparada com o TS. **E:** As plantas heterozigóticas para o alelo selvagem e mutante *atbzip63-2* obtidas a partir do cruzamento entre o mutante *atbzip63-2* e o TS, não apresentam diferença de tamanho comparadas com o TS, confirmando que um único alelo selvagem do gene *AtbZIP63* é suficiente para conferir um crescimento do tipo selvagem em plantas heterozigotas, e que o alelo mutante *atbzip63-2* é recessivo. A média da área da roseta foi obtida em aparelho leaf area meter a partir de 30 plantas para cada genótipo. Para a obtenção dos valores médios fizemos uma análise *box plot* dos dados e descartamos todos os valores abaixo do 1º quartil e todos acima do 3º quartil. O genótipo das plantas foi estabelecido por amplificação específica do alelo selvagem e do alelo mutante. Em **A**, **C**, **D** e **E**, as plantas foram cultivadas por 30 dias em fotoperíodo de dia curto (10 h/14 h) e em **B**, 25 dias sob luz contínua. A diferença na área da roseta entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Também analisamos o fenótipo área da roseta em outros dois experimentos independentes, um em fotoperíodo de dia curto e outro em dia longo. Observamos o mesmo resultado do experimento descrito acima, com as plantas F2 heterozigotas apresentando o mesmo fenótipo área da roseta que as plantas F2 homozigotas tanto em dia curto quanto em dia longo, entretanto nestes dois experimentos usamos apenas 30 plantas F2 para cada F1 autofecundada, e verificamos que o n de 30 plantas foi um número amostral baixo, pois devido ao elevado desvio padrão nas medidas da área da roseta muitas amostras foram descartadas na análise de *box plot*. Estes resultados indicam que o alelo mutante *atbzip63-2* é recessivo e sugere que a mutação no locus *AtbZIP63* é responsável pelo fenótipo observado.

Tabela 2. Teste da segregação de 200 plantas F2 oriundas da autofecundação de uma planta F1 heterozigota para o alelo selvagem *AtbZIP63* e o alelo mutante *atbzip63-2* proveniente do cruzamento entre o mutante *atbzip63-2* e o TS.

Genótipo	Antes da análise <i>box plot</i>				Após análise <i>box plot</i>			
	Esp	Obs	Qui.quadrado	Probabilidade χ^2	Esp	Obs	Qui.quadrado	Probabilidade χ^2
WS	50	53	0,34	2,16	37	39	0,52	1,30
Heterozigoto	100	106			74	78		
<i>atbzip63-2</i>	50	41			37	31		

No teste de *Qui quadrado* com grau de liberdade 2, se o valor da probabilidade χ^2 for menor que 5,9, aceita-se a hipótese de igualdade estatística, ou seja, os valores observados seguem o padrão de segregação 1:2:1 esperado com $p < 0,05$.

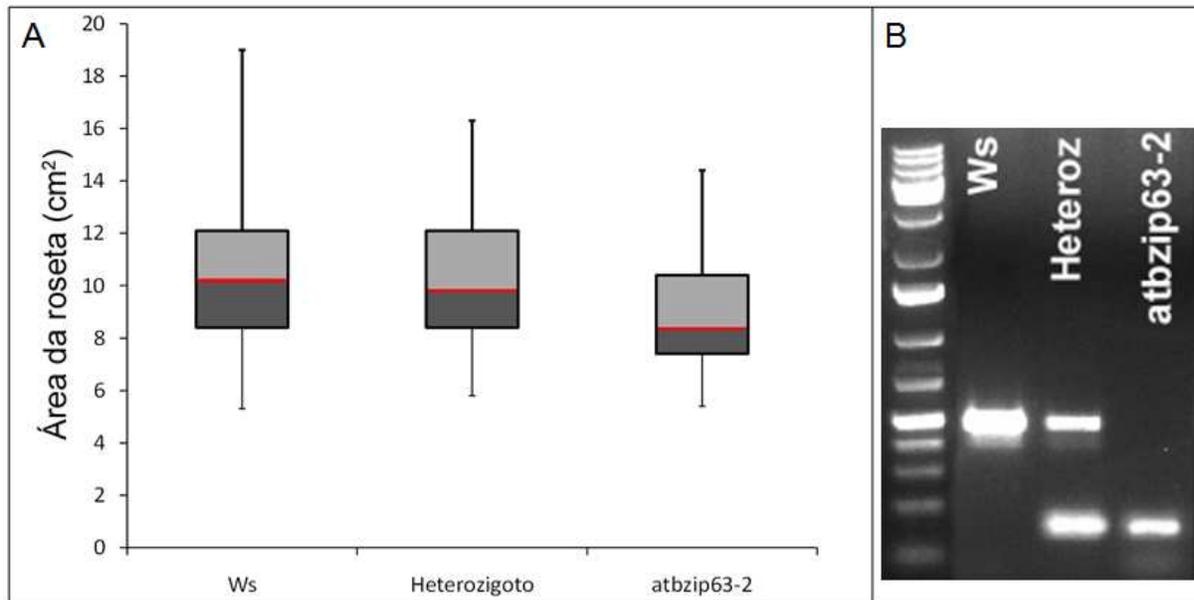


Figura 11. A: Análise fenotípica e genotipagem de plantas F2 oriundas da autofecundação de uma planta heterozigota do cruzamento entre o mutante *atbzip63-2* e o TS. A área da roseta foi obtida em aparelho leaf area meter a partir de 200 plantas F2 cultivadas em fotoperíodo de dia curto. A análise *box plot* revelou dispersão elevada nos valores da área da roseta em plantas da geração F2, então para a obtenção de um valor médio da área da roseta mais preciso nós descartamos todos os valores abaixo do 1º quartil e todos acima do 3º quartil na análise *box plot*, restando 148 plantas. B: Genotipagem das plantas F2 oriundas deste cruzamento, utilizando a combinação dos primers *AtbZIP63gen-Fw*, *AtbZIP63gen-Rv* e *FlagRb4* que amplificam diferencialmente o alelo selvagem e o alelo mutante, permitindo assim identificar homozigotos e heterozigotos. O padrão de segregação 1:2:1 foi testado em 200 plantas F2 oriundas da autofecundação de uma planta F1 do cruzamento pelo teste estatístico $\chi^2 \leq 5,9$; $p < 0,05$.

***AtbZIP63* influencia a taxa de degradação do amido durante o período noturno e participa da resposta ao déficit energético**

Para compreender como *AtbZIP63* estaria impactando o crescimento, comparamos os perfis de RNAs do mutante *atbzip63-2* e da linhagem RNAi L9 com o perfil do tipo selvagem Ws, usando o GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array. O RNA foi obtido a partir das quatro folhas mais jovens coletadas na última hora do período noturno de plantas cultivadas por 25 dias sob o fotoperíodo 10 h luz/14 h escuro. Esta escolha foi determinada pela observação de que nas folhas mais jovens e no final da noite a expressão de *AtbZIP63* é maior.

Dos cerca de 24000 genes representados no GeneChip ATH1, identificamos 348 genes diferencialmente expressos (p-valor < 0,05) entre o mutante *atbzip63-2* e Ws. Deste conjunto, 119 genes (34%) estão reprimidos e 229 (66%) induzidos em *atbzip63-2*. Verificamos que 50 (14%) genes diferencialmente expressos no *atbzip63-2* apresentam uma diferença de expressão superior a duas vezes com relação ao tipo selvagem. Já no array da linhagem RNAi L9 identificamos 1748 genes diferencialmente expressos (p-valor <0,05), sendo 870 (49%) induzidos e 878 (51%) reprimidos na linhagem L9, e destes, 181 (10%) apresentam uma diferença de expressão superior a duas vezes entre a linhagem L9 e o TS.

A ontologia dos genes diferencialmente expressos no transcriptoma do *atbzip63-2* revelou genes relacionados à resposta ao estresse energético, ao metabolismo do amido, ao ciclo circadiano, à modificação da parede celular e síntese e resposta á hormônios (Tabela suplementar 2). Nos genes diferencialmente expressos da linhagem RNAi L9 foram identificados genes relacionados à resposta ao estresse energético, ao ciclo circadiano, a modificação da parede celular e resposta a estímulos bióticos e abióticos foi observado (Tabela suplementar 3). Detectamos uma sobreposição significativa (teste exato de Fisher com p-valor 0,0028) entre os genes reprimidos no *atbzip63-2* e na linhagem RNAi L9 (Figura 12). Entretanto a sobreposição entre os genes que aparecem induzidos entre o *atbzip63-2* e na linhagem RNAi L9 não foi estatisticamente significativa (teste exato de Fisher com p-valor 0,0877) (Figura 12). Esta baixa sobreposição entre os genes que aparecem induzidos pode estar relacionada a redução da expressão dos genes dos FT bZIP do grupo S (AtbZIP1, 2 e 53) e o AtbZIP41, AtbZIP56 e AtbZIP18 na linhagem RNAi L9, possivelmente como consequência de um silenciamento cruzado destes genes. *AtbZIP63* heterodimeriza preferencialmente com bZIPs do grupo S, e estas formas heterodiméricas podem modular a interação com a sequência promotora do gene alvo (Ehlert et al., 2006). O fato de

termos outros bZIPs reprimidos na linhagem RNAi L9, possivelmente pode explicar a mudança do perfil de expressão gênica entre o mutante *atbzip63-2* e a linhagem RNAi L9.

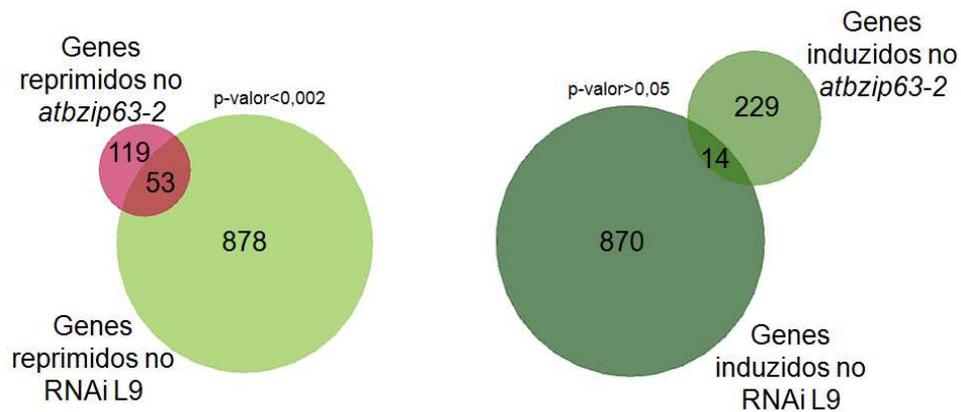


Figura 12. Sobreposição entre os genes diferencialmente expressos no mutante *atbzip63-2* e na linhagem RNAi L9. A sobreposição entre os genes reprimidos no *atbzip63-2* e na RNAi L9 foi significativa. Entretanto a sobreposição entre os genes que aparecem induzidos no *atbzip63-2* e na RNAi L9 não foi estatisticamente significativa. O p-valor foi obtido pelo teste exato de Fisher, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

Dentre os 504 genes ativados via KIN10/11 em condições de déficit energético, um conjunto de 43 genes são também desregulados no *atbzip63-2* (Baena-González et al., 2007; Confraria et al., 2013) (teste exato de Fisher com $p < 0,0001$), indicando que o *AtbZIP63* integra a via de resposta ao déficit energético ativado por KIN10/11. Destes 43 genes, 16 estão com expressão induzida no mutante, incluindo os genes marcadores de déficit energético *Dormancy-Associated Protein 1 (DRM1)* e *Beta-Galactosidase 4 (BGAL4)* (Confraria et al., 2013; Figura 13; Tabela 3 e Tabela suplementar 2), indicando que as plantas deste mutante estão sofrendo déficit energético no período da noite. Entretanto, os outros 27 genes deste conjunto de 43, incluindo os genes marcadores de déficit energético *At3g59940/Kiss me Deadly 4 (KMD4)* e *Asparagine Synthetase 1/Dark Inducible 6 (ASN1/DIN6)* (Graf et al., 2010; Hanson et al., 2009, Paparelli et al., 2013; Figura 14; Tabela 3 e Tabela suplementar 2), são

reprimidos em *atbzip63-2* no final da noite, sugerindo que a expressão destes genes depende, pelo menos em parte, do AtbZIP63.

Tabela 3. Genes desregulados em genótipos alterados para expressão de *AtbZIP63*.

Biological Process	Gene	AGI	Fold-change <i>atbzip63-2</i> /WT	Fold-change RNAi:63(Ws) L9	Fold-change RNAi:63(Ws) L7	Fold-change OX:63(Ws) L5	Fold-change OX:63(63-2) L12
Circadian clock	PRR7	AT5G02810	-1,5	-1,5	-1,5	1,6	2,0
Energetic stress- related genes	ASN1/DIN6	AT3G47340	-4,2	-5,9	-3,7	2,6	3,8
	BTB/POZ	AT2G30600	-7,4	-13,9	-3,0	2,0	6,0
	At3g59940	AT3G59940	-1,7	-1,7	-1,5	1,0	1,6
	DIN10	AT5G20250	-1,5	-3,5	-1,5	1,1	1,0
	BGAL	AT5G56870	5,3	-3,3	-1,7	-1,1	1,1
	DRM1		1,9	-1,8	-1,4	1,4	1,4
Starch-related genes	PGM	AT5G51820	1,6	1,5	1,7	-1,1	1,0
	GWD1/SEX1	AT1G10760	1,6	1,3	1,1	-2,0	-1,6
	PWD	AT5G26570	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0
	DPE2	AT2G40840	1,5	1,0	1,0	3,5	2,0
	BAM9	AT5G18670	-1,9	-3,5	-2,3	1,7	2,4
Cell wall expansion	XTH15/XTR7	AT4G14130	-8,0	-1,3	-1,1	4,6	1,7
	XTH27	At2g01850	-1,6	-2,2	-1,6	-1,2	1,1

Análise da expressão via qRT-PCR de genes marcadores das categorias de resposta a déficit energético, metabolismo do amido, expansão da parede celular e composição do relógio circadiano. Estes genes apareceram com expressão desregulada no array do *atbzip63-2* e foram validados por qRT-PCR em experimentos independentes no *atbzip63-2*, nas linhagens RNAi L9 e L7 e nas linhagens 35S L5 no contexto selvagem (OX:63(Ws)) e 35S L12 no contexto do mutante *atbzip63-2* (OX:63(63-2)) expressoras da fusão 35S:HA::VP16::AtbZIP63. A expressão diferencial é apenas considerada quando o fold-change for maior que 1,4 vezes.

Dentre os 43 genes desregulados no *atbzip63-2* e que são ativados via KIN10/11 em condições de déficit energético, 36 (83%) também aparecem reprimidos na linhagem RNAi L9 (Figura 14), entretanto cinco genes que aparecem induzidos no final da noite no *atbzip63-2*, estão reprimidos na linhagem RNAi L9. Como citado acima, esta discrepância pode estar relacionada à redução da expressão de outros bZIP, especialmente os do grupo S (AtbZIP1, 2 e 53) na linhagem RNAi L9, possivelmente como consequência de um silenciamento cruzado destes genes. Pois, foi mostrado que bZIP1, 2 e 53 também

atuam no controle da expressão de genes de resposta a estresse energético da via de KIN10/11 (Baena-González et al., 2007; Ehlert et al, 2006; Dietrich et al., 2011).

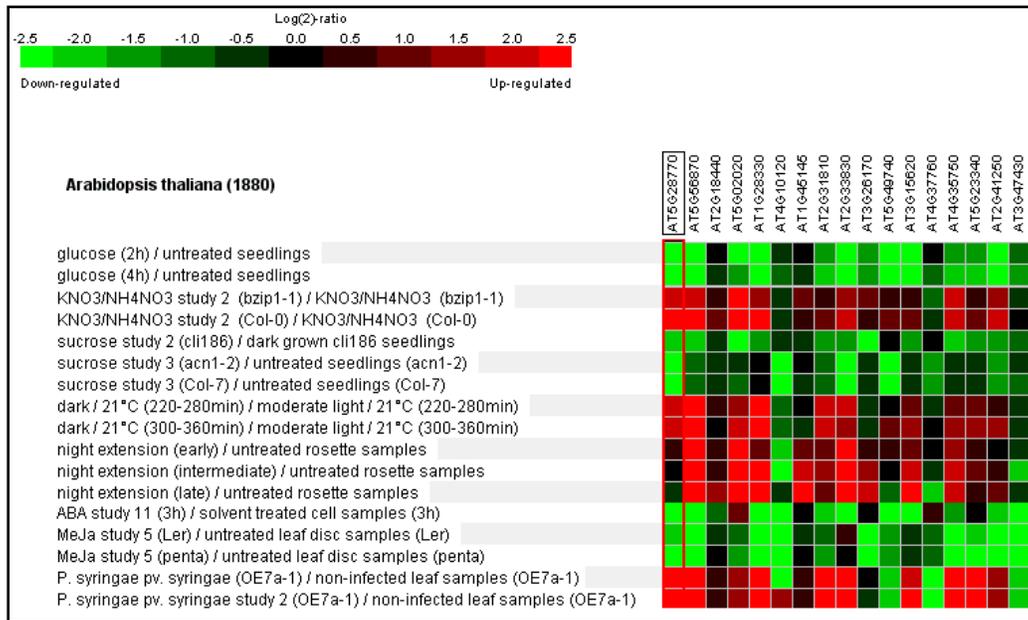


Figura 13. As plantas *atbzip63-2* sofrem déficit de energia no final da noite. Os 16 genes induzidos via KIN10/11 em resposta ao déficit energético e que estão induzidos no *atbzip63-2* no final da noite, são positivamente correlacionados entre si para os sinais de status energético (Exposição aos açúcares glicose e sacarose, ou exposição a uma condição de escuridão prolongada) e estresse biótico. A indução destes genes no final da noite no *atbzip63-2* evidencia que as plantas deste mutante passam por déficit energético neste período, e que a ativação destes genes é independente do *AtbZIP63*. Primeira coluna corresponde ao padrão de expressão do *AtbZIP63* (At5g28770) quando expostos aos sinais/condições descritos nas linhas. Estas comparações com dados públicos de microarranjos de *A. thaliana* foi realizada usando o servidor Genevestigator (Zimmermann, et al., 2005).

O fato de termos diversos genes que estão reprimidos no final da noite no *atbzip63-2* e na linhagem silenciada RNAi L9 e que são induzidos por KIN10/11 em resposta a déficit energético (Baena-González et al., 2007; Figura 14) indica que *AtbZIP63* atua como um ativador destes genes, reforçando o envolvimento deste FT nas respostas a carência energética mediada por KIN10/11. E a ligação direta da fusão HA::VP16::AtbZIP63 no promotor do gene *ASN1* revelado por *Chromatin Imuno Precipitation* (ChIP; Figura 15) indica que o FT *AtbZIP63* regula de maneira direta este gene de resposta a déficit energético. Além do *ASN1*, observamos que a expressão de outros dois genes de

reposta ao déficit energético (*At3g59940/KMD4* e *At2g30600*) está induzida em duas linhagens expressando a fusão HA::VP16::AtbZIP63 no contexto selvagem 35S L5 ou no contexto mutante *atbzip63-2* 35S L12 (Tabela 3), reforça a noção de que o *AtbZIP63*, regula diretamente a expressão destes genes.

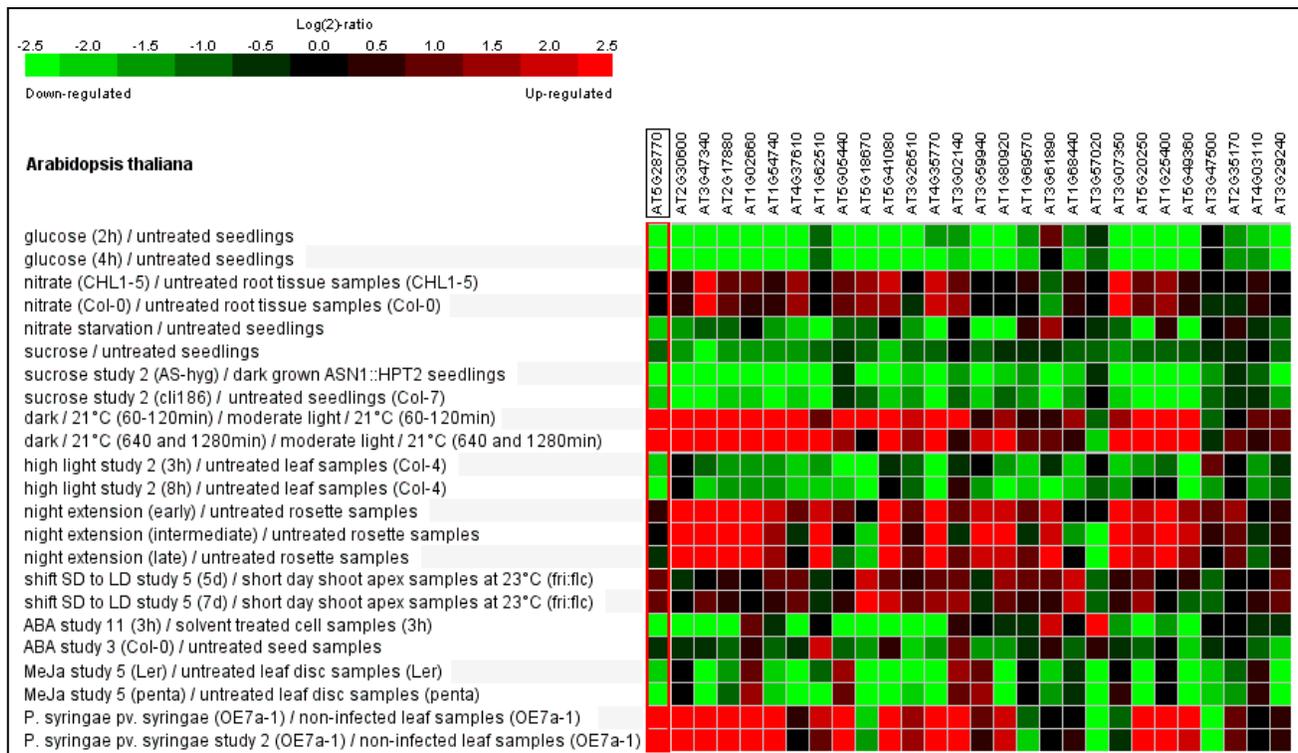


Figura 14. *AtbZIP63* participa da indução de genes de resposta a carência energética. Os 27 genes induzidos via KIN10/11 em resposta ao déficit energético e que estão reprimidos no *atbzip63-2* e RNAi L9 no final da noite, são positivamente correlacionados entre si para os sinais de status energético (Exposição aos açúcares glicose e sacarose, exposição a uma condição de alta intensidade luminosa ou escuridão prolongada) e estresse biótico. Este dado sugere que a indução destes genes é regulada por *AtbZIP63*, que participa da resposta ao déficit energético mediado pelas KIN10/11. Primeira coluna corresponde ao padrão de expressão do *AtbZIP63* (*At5g28770*) quando expostos aos sinais/condições descritos nas linhas. Estas comparações com dados públicos de microarranjos de *A. thaliana* foi realizada usando o servidor Genevestigator (Zimmermann, et al., 2005).

Por outro lado, notamos que a fusão HA::VP16::AtbZIP63 não liga no promotor do gene *DRM1*, um gene de estresse energético induzido no mutante. Este resultado confirma que este gene de resposta ao déficit energético não está diretamente sob o controle do FT *AtbZIP63*, e aparece induzido no

mutante *atbzip63-2* essencialmente como uma consequência indireta do estresse energético neste mutante (Figura 15). É razoável estender esta conclusão para os outros genes de resposta a déficit energético que estão induzidos no final da noite no *atbzip63-2*. Em conjunto, estes dados indicam que as plantas do mutante *atbzip63-2* passam por déficit energético no final da noite e que o *AtbZIP63* participa da indução de genes que são ativados via KIN10/11 em resposta a carência energética.

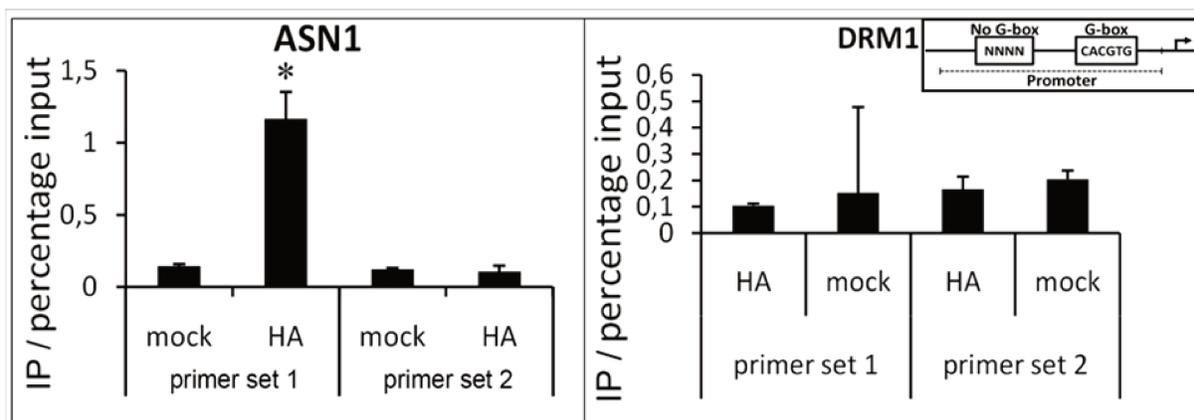


Figura 15. *AtbZIP63* liga no promotor de *ASN1* mas não no promotor de *DRM1* *in vivo*. Sequências específicas do promotor de *ASN1* e *DRM1* na linhagem expressando a fusão 35S:HA::VP16::AtbZIP63 foram capturadas e enriquecidas por imunoprecipitação da cromatina usando um anticorpo anti-HA. O anti-corpo anti-Mouse IgG foi usado como controle negativo (mock). Foram usados dois grupos de primers para as regiões promotoras. O grupo 1 amplifica a região do promotor que contém o motivo G-box (3'-CACGTG-5') característico de ligação dos fatores bZIP, e o grupo 2 amplifica uma região sem este motivo, conforme esquema no canto superior direito. Estes resultados representam a média de três experimentos independentes. A diferença foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Analisamos a expressão do *AtbZIP63* em plantas cultivadas em uma condição de baixa intensidade luminosa, que possivelmente pode limitar a produção de carboidratos pela fotossíntese, e assim resultar num déficit de energia na planta. Verificamos que em condição de baixa intensidade de luz (50% de sombra em relação á intensidade de luz ideal usada ($120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; Massonnet et al., 2010), a expressão do *AtbZIP63* está induzida tanto no final da noite, quanto no final do dia (Figura 16). Este resultado suporta a noção de que o status de energia (disponibilidade de carboidratos oriundos da fotossíntese)

influencia a expressão de *AtbZIP63*, que por sua vez, induz a expressão de um grupo de genes relacionados com a resposta à carência energética da via de KIN10/11. Muitos genes de resposta a déficit de energia são induzidos diariamente próximos do final da noite, mesmo numa condição de ciclo diurno normal (Bläsing et al., 2005), a regulação antecipada da expressão destes genes teria a função de prevenir a planta para uma possível carência de energia que venha a ocorrer na última parte da noite antes do amanhecer (Haydon et al., 2013b).

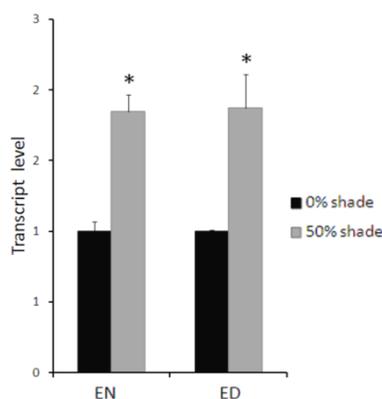


Figura 16. Baixa intensidade de luz induz a expressão do *AtbZIP63*. Em condição de baixa intensidade de luz (50% de sombra), *AtbZIP63* está induzido tanto no final do dia (ED), quanto no final da noite (EN) em plantas que foram expostas por um dia a esta condição. A média da expressão gênica foi obtida a partir de 3 réplicas biológicas e cada réplica foi composta da parte aérea de 6 plantas. A diferença entre os tratamentos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Três genes chaves na degradação do amido estão induzidos no mutante *atbzip63-2*, são eles, α -*Glucan Water Dikinase* (*GWD1/SEX1*, fold 1,7), *Phosphoglucan Water Dikinase* (*PWD*, fold 1,5) e *Disproportionating Enzyme 2* (*DPE2*, fold 1,5) (Tabela 3 e Tabela suplementar 2). Adicionalmente uma amilase está reprimida, *Beta-amylase 9* (*BAM9*, fold -2,0) (Tabela 3 e Tabela suplementar 2). Os genes *PWD* e *GWD1/SEX1* codificam as duas enzimas que fosforilam os resíduos glicosil do grânulo de amido, tornando-o acessível para a ação das beta-amilases (Edner et al., 2007), portanto a indução destes dois genes levanta a possibilidade de que a degradação do amido está mais acentuada no mutante *atbzip63-2*. De acordo com esta possibilidade, *atbzip63-2* retém 35% a menos de amido do que o TS no

final da noite (Figura 17 B). Além disto, 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 & Zeeman, 2012). A glicose liberada pode tanto ser usada no metabolismo da própria célula quanto na produção da sacarose que é exportada para 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). O maior nível de mRNA *DPE2* no *atbzp63-2* poderia acarretar um aumento na taxa de degradação da maltose e portanto uma redução dos níveis deste açúcar no final da noite. De acordo com esta hipótese, observamos uma redução de 30% do nível de maltose no mutante com relação ao TS no final da noite (Figura 17 D). Este resultado, em conjunto com o consumo mais pronunciado de amido (Figura 17 B), sugere uma coordenação entre a degradação da maltose e do amido e estão de acordo com a correlação inversa descritas anteriormente entre os níveis de maltose e a taxa de degradação de amido, ou seja, quantidade elevada de maltose no citossol sinaliza uma diminuição na taxa de degradação do amido, e um nível baixo de maltose no citossol sinaliza um aumento na taxa de degradação do amido, como forma de manter uma quantidade ideal no suprimento de maltose no citossol (Lu et al., 2005). Os níveis similares de maltose e amido no final do dia entre o mutante e o TS (Figuras 17 A e B) indicam que a degradação do amido no mutante deve está mais rápida do que no tipo selvagem.

Medições da cinética do acúmulo e degradação do amido mostraram que o tipo mutante e selvagem acumularam a mesma quantidade de amido durante o dia, mas o tipo mutante degradou mais rapidamente o amido do que o tipo selvagem ao longo do período noturno. Mais especificamente, esta

diferença foi mais acentuada nas três primeiras horas da noite quando até 50% da quantidade de amido nas plantas mutantes foi usada, enquanto no tipo selvagem apenas 25% foi degradado (Figura 17 E). Estes dados confirmam que a taxa de degradação do amido está acelerada no mutante.

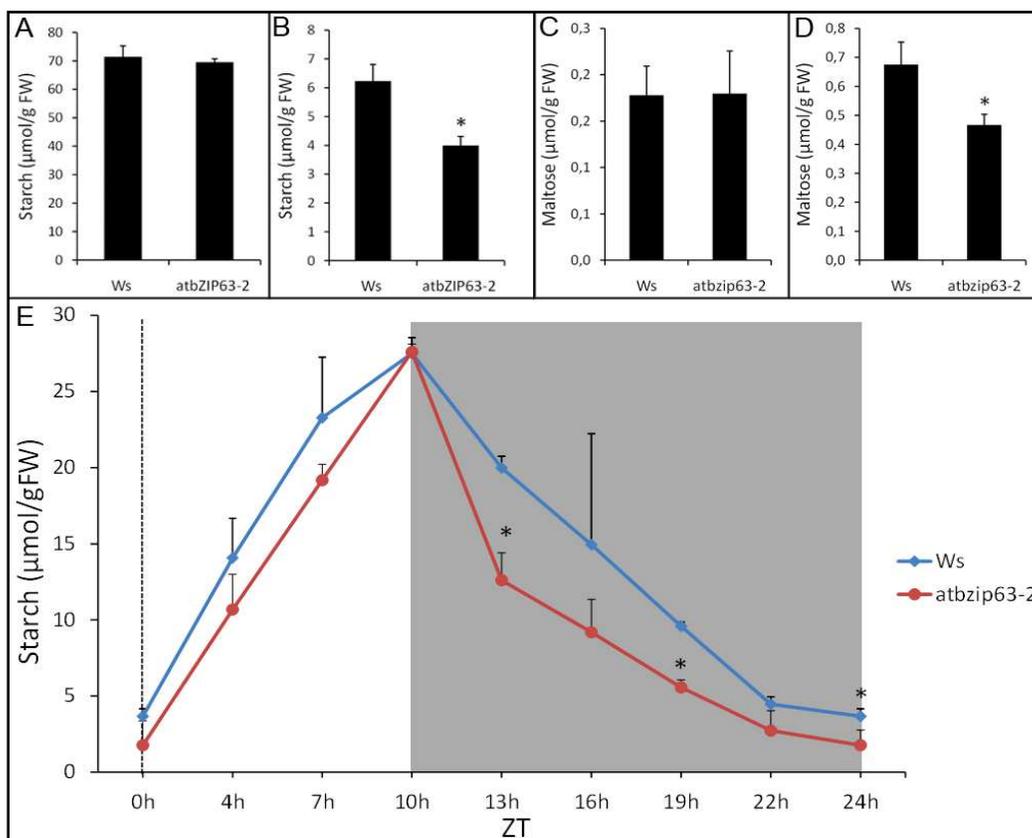


Figura 17. *AtbZIP63* regula a taxa de degradação do amido. **A:** Níveis de amido são iguais no mutante *atbzip63-2* no final do dia comparado com o TS. **B:** Níveis de amido estão 35% mais baixos no mutante *atbzip63-2* no final da noite comparado com o TS. **C:** Níveis de maltose são iguais no mutante *atbzip63-2* no final do dia comparado com o TS. **D:** Níveis de maltose estão 30% mais baixos no mutante *atbzip63-2* no final da noite comparado com o TS. **E:** Comparação da cinética do acúmulo e degradação do amido entre folhas de roseta do mutante *atbzip63-2* e do TS ao longo do ciclo diurno (10/14 h). A média da quantidade de amido em cada ponto de coleta foi obtida a partir de 3 réplicas biológicas e cada réplica foi composta da parte aérea de 6 plantas com 30 dias de cultivo. A diferença nos níveis do amido entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

A *BAM9* não apresenta atividade catalítica de degradação do amido *in vitro* (Monroe et al., 2010), portanto, o fato do gene *BAM9* estar reprimido no final da noite no mutante, não contradiz nossas observações de que a degradação do amido está acelerada no mutante. Experimentos de CHIP, revelaram

a interação direta de AtbZIP63 com o promotor dos genes *GWD1/SEX1* e *BAM9* (Figura 18), sugerindo a regulação direta destes genes por AtbZIP63. Além disto, a expressão destes dois genes também está desregulada em duas linhagens expressando de maneira desregulada a fusão 35S:HA::VP16::AtbZIP63, 35S L15 (no contexto do tipo selvagem) e 35S L12 (no contexto do mutante). Embora os experimentos de ChIP não tenham mostrado interação do AtbZIP63 com o promotor do *DPE2* (Figura 18), verificamos que a expressão do *DPE2* está induzida nas linhagens 35S L15 e 35S L12 (Tabela 3), indicando que o *AtbZIP63* influencia de maneira indireta a expressão do *DPE2*. Em conjunto, os dados reforçam a noção de que este FT controla a taxa de degradação do amido durante a noite, participando assim do processo de suprimento energético satisfatório durante todo o período noturno.

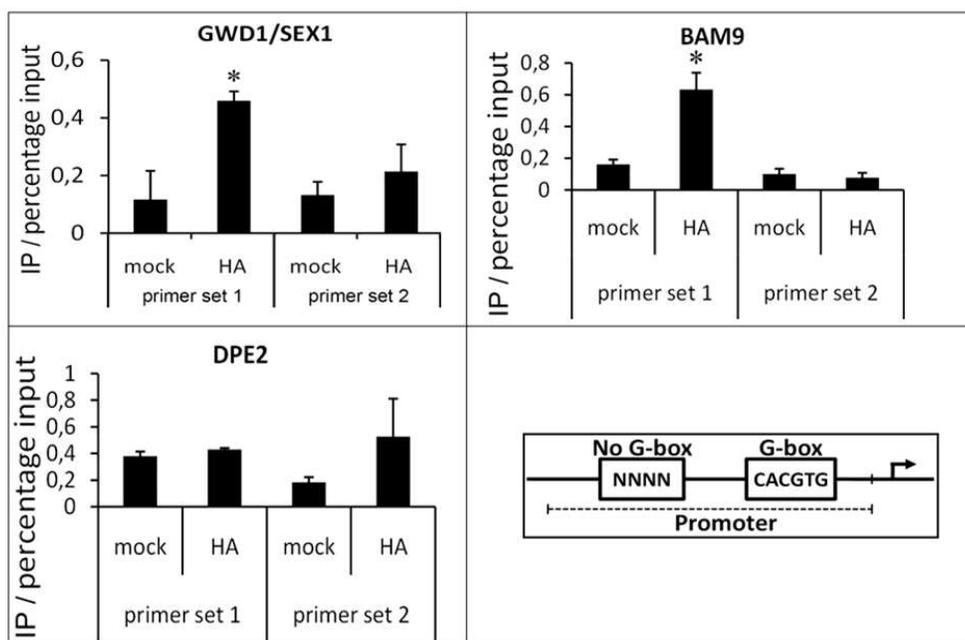


Figura 18. AtbZIP63 liga no promotor de *BAM9* e *GWD1/SEX1*, mas não no *DPE2* *in vivo*. Sequências específicas do promotor da *BAM9*, *GWD1/SEX1* e *DPE2* na linhagem expressando a fusão HA::VP16::AtbZIP63 na linhagem L15, foram capturadas e enriquecidas por imunoprecipitação da cromatina usando um anticorpo anti-HA e um anti-corpo anti-Mouse IgG como controle negativo (mock). Foram usados dois grupos de primers para as regiões promotoras. O grupo 1 amplifica a região do promotor que contém o motivo G-box (3'-CACGTG-5') característico de ligação dos fatores bZIP, e o grupo 2 amplifica uma região sem este motivo, conforme esquema no canto inferior direito. Estes resultados representam a média de três experimentos independentes. A diferença foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Com exceção do *BAM9*, na linhagem RNAi L9 os genes de degradação do amido não foram desregulados. A razão para isto não é clara mas pode estar relacionada ao silenciamento apenas parcial do *AtbZIP63* e/ou a repressão dos *bZIPs* citados anteriormente.

A degradação do amido mais acelerada no mutante *atbzip63-2*, implica uma exaustão das reservas de amido antes do final da noite e conseqüentemente na promoção de um déficit energético (Gibon et al., 2004). Esta hipótese é suportada pelos vários genes de resposta ao déficit energético que estão induzidos no *atbzip63-2* no final da noite. O déficit de energia sofrido pelas plantas do *atbzip63-2* pode ser a principal causa da redução do crescimento nas plantas deste genótipo. Esta conclusão está de acordo com as análises que mostraram que mutantes para a síntese (*pgm* e *adg1*; Caspar et al., 1985 e Wang et al., 1998, respectivamente) ou degradação do amido (*sex1* e *bam3*; Caspar et al., 1991 e Lao et al., 1999, respectivamente) apresentam significativo atraso do crescimento e florescimento comparado ao TS quando são cultivados em fotoperíodo de dia curto (Matsoukas et al., 2013). Além disto, mesmo um curto período de déficit de energia (baixo nível de açúcar), sinaliza uma redução no crescimento, que não é totalmente revertida quando o nível de açúcar volta a subir (Gibon et al., 2004).

A observação de que, em condição de cultivo em luz contínua no qual não há mais limitações energéticas, não há diferença significativa de crescimento entre o mutante *atbzip63-2* e o selvagem *Ws* (Figura 10 B), representa mais uma evidência do estresse energético no final da noite ser responsável para o déficit de crescimento do *atbzip63-2*. De maneira similar, o mutante *pgm* apresenta crescimento e biomassa reduzida comparado ao genótipo selvagem quando cultivado em fotoperíodo de dia curto, mas possui crescimento similar ao selvagem quando cultivado sob luz contínua (Gibon et al., 2004; Bläsing et al., 2005; Stitt et al., 2007).

No final da noite cinco *Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolases* estão reprimidas no *atbzip63-2* (*XTH15* fold -8,1; *XTH16* fold -2,1; *XTH33* fold -1,7; *XTH27* fold -1,6 e *XTH6* fold -1,5), e

experimentos de ChIP indicaram a interação direta de AtbZIP63 com o promotor dos genes *XTH15* e *XTH27* (Figura 19), sugerindo a regulação direta destes genes por AtbZIP63. Na linhagem RNAi L9 temos cinco XTHs reprimidas (*XTH25* fold -4,3; *XTH27* fold -2,2; *XTH22* fold -2,0; *XTH30* fold -1,5 e *XTH24* fold -1,5). Entretanto também verificamos que quatro XTHs são induzidas (*XTH8* fold 1,7; *XTH32* fold 1,6; *XTH19* fold 1,5 e *XTH17* fold 1,5) na linhagem RNAi L9, indicando que a indução deste grupo de XTHs é independente do AtbZIP63.

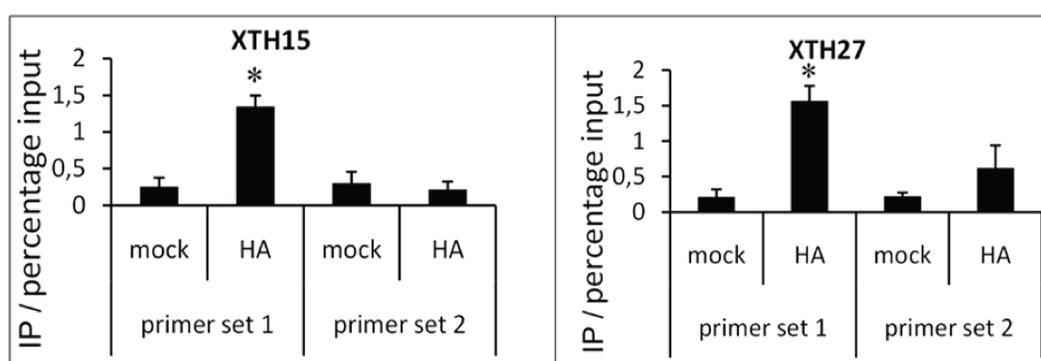


Figura 19. AtbZIP63 liga no promotor de *XTH15* e *XTH27* *in vivo*. As seqüências específicas do promotor de *XTH15* e *XTH27* nas linhagens expressando a fusão 35S:HA::VP16::AtbZIP63 na linhagem 35S L15. *AtbZIP63* fusionado a etiqueta de hemaglutinina (HA-tag) foram capturadas e enriquecidas por imunoprecipitação da cromatina usando um anticorpo anti-HA e um anti-corpo anti-Mouse IgG como controle negativo (mock). Foram usados dois grupos de primers para as regiões promotoras. O grupo 1 amplifica a região do promotor que contém o motivo G-box (3'-CACGTG-5') característico de ligação dos fatores bZIP, e o grupo 2 amplifica uma região sem este motivo. Estes resultados representam a média de três experimentos independentes. A diferença foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Uma das funções descritas para as XTHs é de atividade de endo-hidrolase dos xiloglucanos (XEH), promovendo a hidrólise específica dos xiloglucanos, que são reaproveitados para os outros processos metabólicos (Tabuchi et al., 2001; Eklöf & Brumer, 2010; Kaewthai et al., 2013). É possível que as XTHs desreguladas no *atbzip63-2* e na linhagem RNAi L9 no final da noite, participam da hidrólise da parede para promover a liberação de xiloglucanos de reserva, como uma forma de reaproveitar os nutrientes em resposta ao déficit energético sofrido por estas plantas durante a noite. Há

também a possibilidade de que estas XTHs reprimidas no *atbzip63-2* estejam relacionadas com a expansão da parede celular, pois algumas XTHs atuam como endo-transglicosilase dos xiloglucanos, tornando a parede mais extensível e facilitando assim o crescimento celular (Rose et al., 2002; Sasidharan e Pierik, 2010). As *XTH15* e *16* são induzidas em condição de sombreamento ou de baixa intensidade de luz vermelha, e o mutante *knockout* para a *XTH15* possui reduzido crescimento do pecíolo em resposta a sombra comparado com o TS (Sasidharam et al., 2010), indicando que esta XTH participa da resposta da planta para evitar a sombra. A repressão destas XTHs no *atbzip63-2* pode estar relacionado em parte a menor expansão da parede celular neste mutante, o que explicaria o tamanho reduzido das células do mesófilo deste mutante em comparação com o TS (Tabela 1).

O relógio circadiano controla a oscilação do nível de transcrito *AtbZIP63*

Sob fotoperíodo (condições de *entrainment*) os níveis do transcrito *AtbZIP63* no TS apresentam oscilação diária, com pico no final da noite e nível basal no final do dia. Este padrão de oscilação é mantido em ambiente de luz contínua (condições *free-running*; Figuras 20 A e B) sugerindo que a expressão de *AtbZIP63* está sob controle do relógio circadiano. Para confirmar esta possibilidade analisamos as oscilações do transcrito *AtbZIP63* no mutante duplo *cca1/lhy* que afeta dois genes do core do relógio e que possui um período endógeno de 17 h em vez de 24 h como no tipo selvagem (Graf et al., 2010). O gene *GBS1*, um gene marcador do relógio circadiano (Graf et al., 2010; Nakamichi et al., 2012) apresentou, como esperado, um período de aproximadamente 17 h no mutante *cca1/lhy* em condições *free-running* (Figura 20 D). Nestas mesmas condições, a oscilação do transcrito *AtbZIP63* acompanha o período de 17 h (Figura 20 B), confirmando que a expressão do *AtbZIP63* está sob controle do relógio circadiano. Em condições *entrainment*, a oscilação do transcrito do gene marcador *GBS1* mantém o período de 17 h (Figura 20 C), mas a flutuação do nível de mRNA *AtbZIP63*

apresentou um período de ~24 h com um pico de transcrito no final da noite (Figura 20 A). Por ter um período menor do que 24 h, as plantas *cca1/lhy* degradam sua reserva de amido numa taxa compatível com um dia (período) de 17 h gerando um esgotamento antecipado do amido antes do final da noite em condições de fotoperíodo de 24 h (Graf et al., 2010). Portanto, o provável déficit energético nas últimas horas da noite resultando da degradação desregulada do amido poderia influenciar a flutuação circadiana do transcrito *AtbZIP63*. A ocorrência do déficit energético nas últimas horas da noite foi confirmada pelo aumento na expressão do gene marcador de déficit energético *At3g59940/KMD4* (Figura 20 E) e consequentemente podemos concluir que a expressão do *AtbZIP63* no mutante *cca1/lhy* nas condições diurnas é determinada pela interação entre o relógio circadiano e a disponibilidade de carbono.

Para avaliar melhor o efeito do status de energia sobre o padrão de oscilação do transcrito *AtbZIP63*, analisamos a expressão de *AtbZIP63* no mutante *pgm* que é incapaz de sintetizar amido e portanto apresenta um déficit de carbono logo no início da noite (Gibon et al., 2004). Em condições de *entrainment* a fase da expressão do *AtbZIP63* está alterada no *pgm* com relação ao TS, com o pico de expressão do transcrito sendo adiantado para o meio da noite, ao invés do final da noite como no TS (Figura 21 A), e durante o dia o nível do transcrito *AtbZIP63* cai rapidamente atingindo um nível basal já nas primeiras horas do dia (Figura 21 A). Esta mudança de fase de expressão de *AtbZIP63* no mutante *pgm* provavelmente é resultado do rápido esgotamento das suas reservas de carbono no começo da noite e pelo maior nível de carboidratos no começo do dia quando comparado ao TS (Gibon, et al., 2004; Bläsing et al., 2005). A carência energética já no começo da noite no *pgm* foi confirmada pelo rápido aumento na expressão do gene marcador de estresse energético *At3g59940/KMD4* neste período (Figura 21 C). Entretanto quando o *pgm* é transferido para condições *free-running*, a expressão de *AtbZIP63* segue um padrão semelhante ao do TS, com um pico de expressão no final da noite virtual (Figura 21 B).

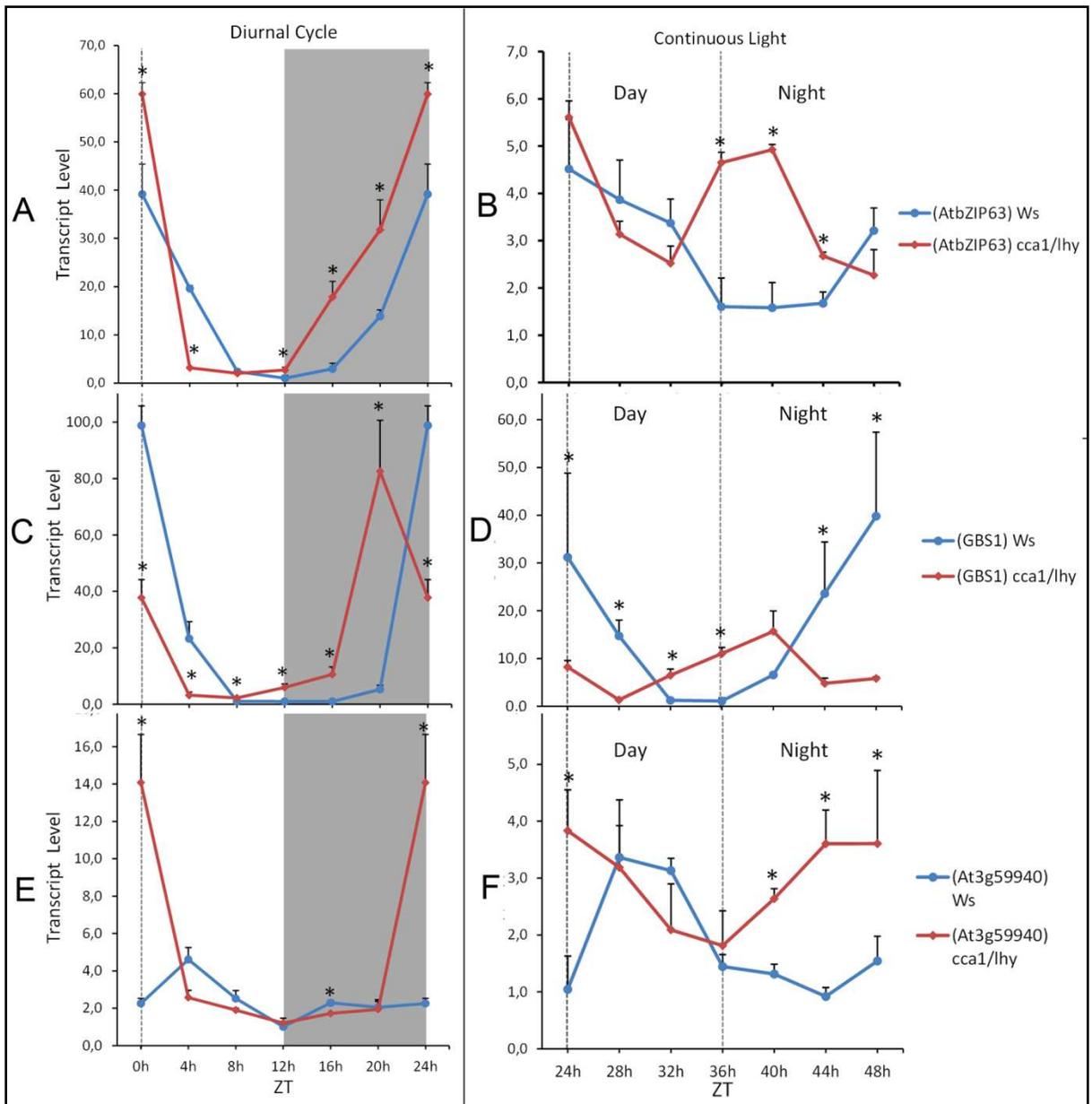


Figura 20. O relógio circadiano controla a expressão de *AtbZIP63*. **A:** O transcrito *AtbZIP63* oscila de uma maneira circadiana ao longo de 24 h sob condição de *entrainment* no TS (linha azul). No mutante duplo *cca1/lhy* (linha vermelha) apesar de diminuir mais rapidamente atingindo o nível basal antes do final do dia, no período noturno a expressão do *AtbZIP63* não segue o período do mutante duplo, assim como o gene marcador do relógio *GBS1*. **B:** Em condições *free running*, o transcrito *AtbZIP63* mantém o padrão de oscilação circadiana no TS e no *cca1/lhy* o padrão de oscilação acompanha o período curto de 17 h característico do duplo mutante. **C:** O gene *GBS1* que é controlado exclusivamente pelo relógio, acompanha o período encurtado do *cca1/lhy* comparado com o TS. **D:** Sob luz contínua *GBS1* continua oscilando em função do período encurtado do *cca1/lhy*. **E:** Em condição de *entrainment*, o gene marcador de déficit energético *At3g59940/KMD4* está 14 vezes induzido no *cca1/lhy* nas últimas horas da noite em comparação com o TS, demonstrando a escassez de energia sofrida pelas plantas do

Em condições *free-running*, a produção contínua de carboidratos pela fotossíntese anula a ocorrência de déficit de energia no período noturno, demonstrado pela falta de indução na expressão do *At3g59940/KMD4* (Figura 21 D) durante a noite subjetiva. Portanto na ausência de carência energética o relógio circadiano passa a ter um controle predominante na expressão do *AtbZIP63*. Estes resultados suportam a noção que o período da oscilação do transcrito *AtbZIP63* é definido pelo relógio circadiano, mas a fase da oscilação é influenciada pelo status energético (disponibilidade de carboidratos). O padrão de oscilação do gene marcador *GBS1* foi semelhante entre o *pgm* e o TS, tanto em condições *entrainment* quanto em *free running* o período da oscilação foi de 24 h, indicando que o relógio não está alterado no *pgm*.

Obtivemos fortes evidências de que o *AtbZIP63* faz parte da via de resposta a carência energética ativada pelas KIN10/11, e a regulação da expressão de *AtbZIP63* pelo relógio permite supor que este gene tem um papel na manutenção dos programas de expressão gênica relacionados á sinalização energética e controlados pelo oscilador circadiano. Para avaliar melhor esta possibilidade realizamos uma análise do padrão de oscilação diurna (DIURNAL, Mockler et al., 2007) dos 27 genes reprimidos no final da noite no *atbzip63-2* e na linhagem RNAi L9 e que são induzidos por KIN10/11 em resposta a déficit energético (Figura 14, Tabela suplementar 2). Destes 27 genes, 23 (85%) possuem oscilação

Figura 20. Continuação: *cca1/lhy* neste período da noite. **F:** Em condições de *free running* o *KMD4* no *cca1/lhy* não apresenta diferença significativa entre o final do dia e final da noite subjetiva. As coletas foram realizadas em plantas cultivadas por 30 dias sob fotoperíodo 12 h luz/12 h escuro (*entrainment*), em seguida, mantivemos as plantas por 24 h sob luz contínua (*free running*), e realizamos coletas nos tempos 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 horas de exposição á luz contínua. Os *zeitgebers* (ZTs) correspondem ao número de horas passadas desde o começo do último período de luz. As zonas em cinza correspondem ao período da noite/escuro real. Nos gráficos correspondentes á luz contínua, a linha tracejada divide o período diurno e noturno no qual as plantas foram cultivadas antes de serem mantidas sob luz contínua. A diferença entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*). Nas legendas, a identificação do gene cuja expressão está exibida nos gráficos á esquerda, está entre parênteses, e fora do parêntese está o background genético, sendo TS (linha azul) e mutante (linha vermelha).

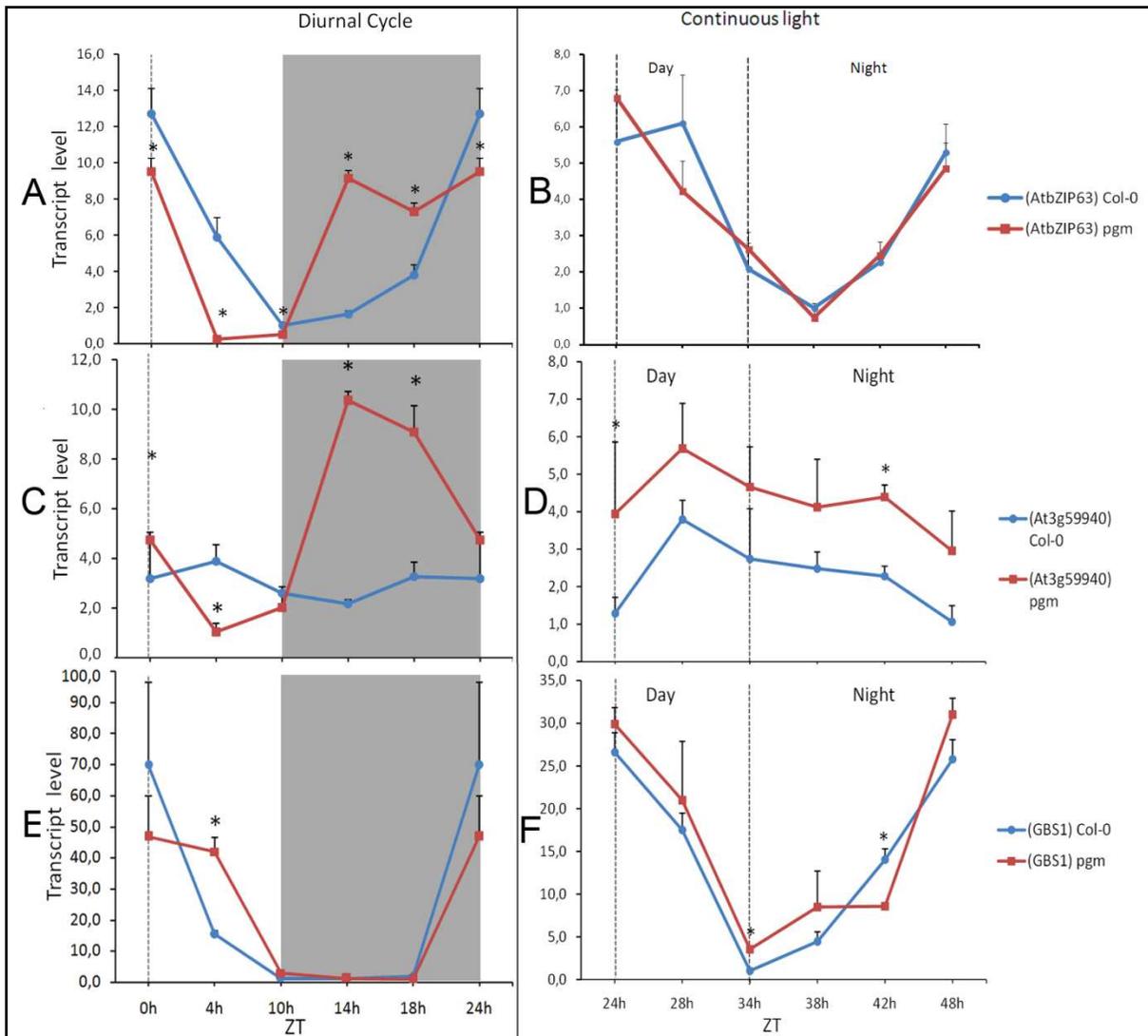


Figura 21. O status de energia (disponibilidade de carboidratos) influencia a expressão de *AtbZIP63*. **A:** Em condições de *entrainment* a fase da expressão do *AtbZIP63* está alterada no mutante *pgm* (incapaz de acumular amido; Gibon et al., 2004), com o pico de expressão do transcrito sendo adiantado para o meio da noite, ao invés do final da noite no TS. **B:** Quando o *pgm* é mantido em *free running*, a expressão do *AtbZIP63* no *pgm* segue aproximadamente a mesma fase do TS. **C:** Em condição de *entrainment*, o gene marcador de déficit energético *At3g59940/KMD4* é bastante induzido logo no começo da noite no *pgm* comparado com o TS. **D:** Em *free running* não observamos indução do *KMD4* durante a noite subjetiva no *pgm*. **E:** Mesmo em condição de *entrainment*, o padrão de oscilação do gene *GBS1* no *pgm* é semelhante ao observado no TS. **F:** Sob luz contínua o padrão de oscilação do *GBS1* no *pgm* é semelhante ao observado no TS. As coletas foram realizadas em plantas cultivadas por 30 dias sob fotoperíodo 10 h luz/14 h escuro (*entrainment*), em seguida, mantivemos as plantas por 24 h horas sob luz contínua (*free running*), e realizamos coletas nos tempos indicados. O número de amostras, a forma de análise e a organização dos dados foram realizadas como descrito anteriormente. A diferença entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

diurna dos níveis dos transcritos, dos quais 19 (70%) oscilam na mesma fase do *AtbZIP63* (Figura 22). Este resultado sugere que *AtbZIP63* atue como um output do relógio e/ou interage com o relógio para modular a expressão deste grupo de genes.

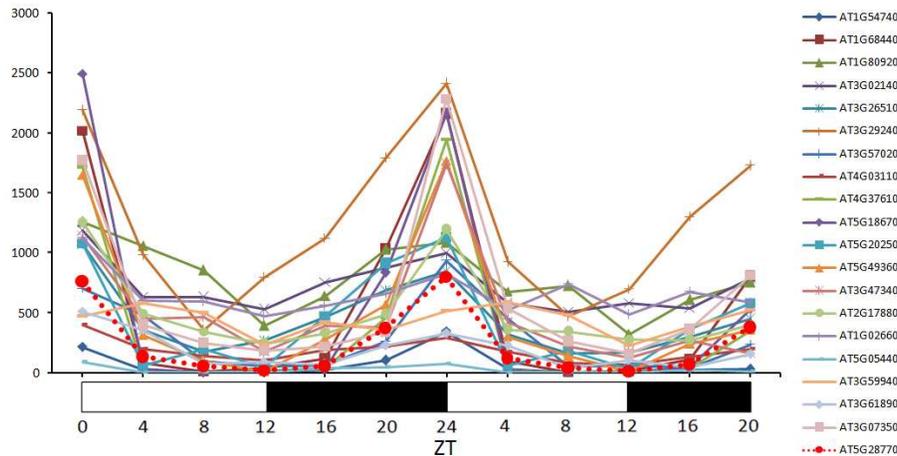


Figura 22. *AtbZIP63* interage com o relógio circadiano e modula a expressão de genes de resposta ao déficit energético. Dentre os genes reprimidos no final da noite no *atbzip63-2* e na linhagem RNAi L9 e que são induzidos por KIN10/11 em resposta ao déficit energético, 71% oscilam na mesma fase do *AtbZIP63* (linha pontilhada vermelha). Os dados foram obtidos a partir do banco de dados DIURNAL (Mockler et al., 2007), e o padrão de expressão destes genes foi detectado na condição LDHH_ST, no qual as plantas foram cultivadas por 5 semanas sob o fotoperíodo 12 h luz/12 h escuro e temperatura constante de 22° C (Bläsing et al., 2005). Barra branca indica período do dia e barra preta período da noite.

Para testar a hipótese de que *AtbZIP63* atua como um output do relógio e/ou interage com o relógio para modular a expressão de um grupo de genes relacionados com resposta à carência energética, analisamos, no mutante *atbzip63-2*, a expressão em condições *free running* de 5 genes marcadores de déficit de energia que oscilam em fase com *AtbZIP63* em condições diurnas. Na condição de *free running*, a síntese contínua de carboidratos pela fotossíntese anula, a princípio, qualquer efeito de déficit energético permitindo revelar a interação entre *AtbZIP63* e o relógio na regulação destes genes. Os cinco genes escolhidos podem ser divididos em três categorias: (1) Os genes *DIN10* e *BAM9* que estão reprimidos no final da noite no *atbzip63-2*, sugerindo dependência de indução pelo *AtbZIP63* e que

oscilam de uma maneira circadiana em *free running* (DIURNAL, Mockler et al., 2007) e portanto estão sobre controle do relógio; (2) O gene *ASN1/DIN6* reprimido no final da noite no *atbzip63-2*, sugerindo dependência de indução pelo *AtbZIP63*, oscila em condição diurna mas não oscila em *free running* (DIURNAL, Mockler et al., 2007) e portanto não está sob o controle do relógio; (3) E os genes *DRM1* e *BGAL4* que estão induzidos no final da noite no *atbzip63-2*, sugerindo independência de indução pelo *AtbZIP63* mas oscilam em *free running* (DIURNAL, Mockler et al., 2007) e portanto estão sob o controle do relógio.

Verificamos que os genes *DIN10* e *BAM9* continuam oscilando em condições *free running*, tanto no mutante quanto no TS, mas a amplitude da oscilação destes genes continua desregulada no *atbzip63-2*, indicando que a interação do *AtbZIP63* com o relógio modula a expressão destes genes. O *ASN1/DIN6* não oscila, mas continua desregulado nesta condição (Figuras 23 A-C), confirmando mais uma vez, que sua expressão é influenciada pelo *AtbZIP63*. Por outro lado, em condições *free running* os genes *DRM1* e *BGAL4* não apresentam desregulação significativa no mutante *atbzip63-2* comparado com o TS (Figuras 23 E e F), suportando nossas observações de que o *AtbZIP63* não regula diretamente estes genes (Figuras 13 e 15). Estes resultados suportam nosso modelo de o *AtbZIP63* interagir com o relógio circadiano para modular a expressão de um grupo de genes envolvidos na resposta a carência energética (Figura 23 D).

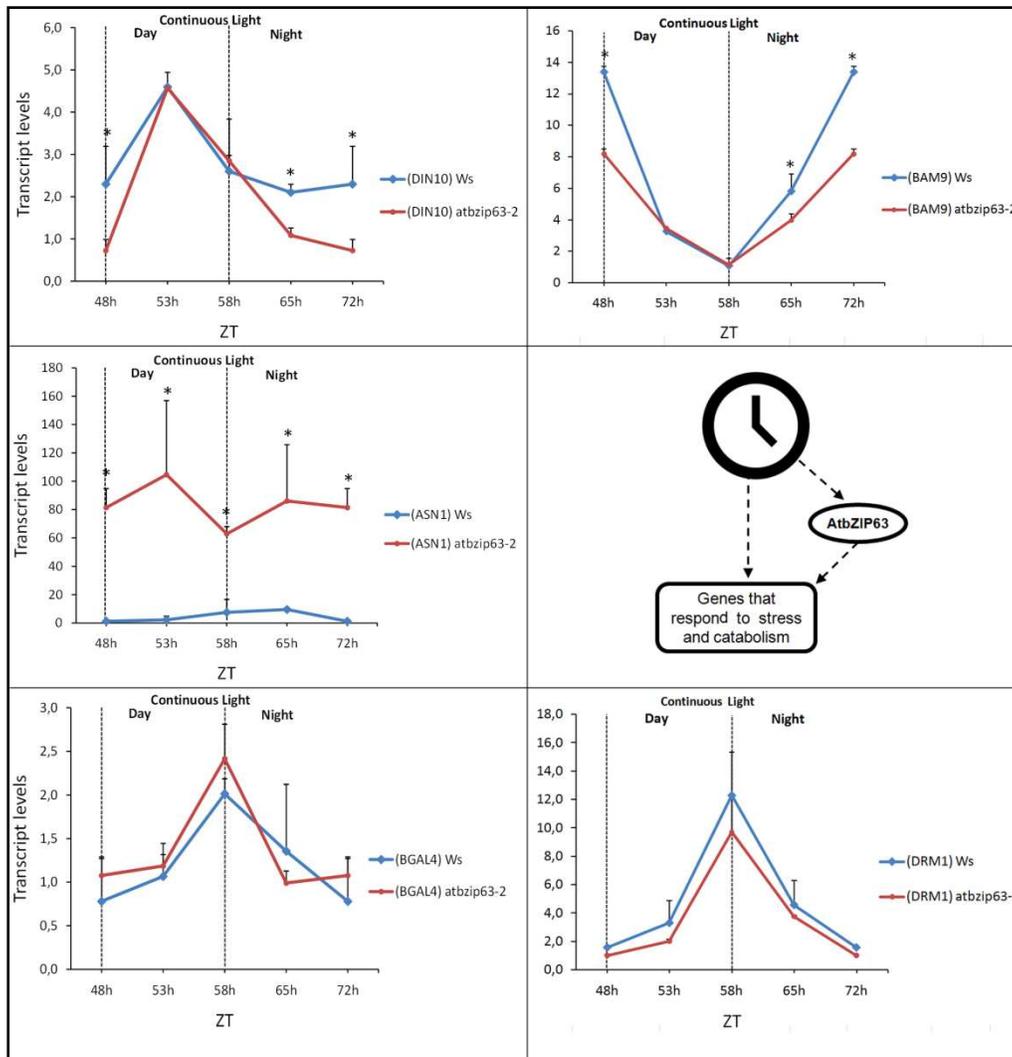


Figura 23. Padrão de expressão de genes marcadores de déficit energético em condições *free running* no mutante *atbzip63-2*. **A-C:** A amplitude da oscilação dos genes *DIN10*, *BAM9* e *ASN1/DIN6* continua desregulada no *atbzip63-2* mesmo em *free running* (ausência de déficit de energia). **E-F:** Os genes *DRM1* e *BGAL4* continuam oscilando de uma maneira circadiana, mas a amplitude não está desregulada no mutante *atbzip63-2* em *free running*. **D:** Modelo da interação entre o relógio circadiano e o FT AtbZIP63 no controle da expressão de genes de resposta a déficit de energia. Os elementos do relógio regulam a expressão do AtbZIP63 durante a noite, e este, por sua vez modula a expressão do grupo de genes relacionados com a resposta à carência energética, que estão reprimidos no final da noite no *atbzip63-2* e que oscilam de uma maneira circadiana em *free running*. Entretanto, o subgrupo de genes de resposta a carência energética, que estão induzidos no final da noite no *atbzip63-2*, e que oscilam em *free running*, tem sua expressão modulada pelo relógio, mas de uma maneira independente do AtbZIP63. As coletas foram realizadas em plantas cultivadas por 30 dias sob fotoperíodo 10 h luz/14 h escuro (*entrainment*), em seguida, mantivemos as plantas por 48 h horas sob luz contínua (*free running*), e realizamos coletas nos tempos indicados. O número de amostras, a forma de análise e a organização dos dados foram realizadas como descrito anteriormente. A diferença entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

AtbZIP63 tem um input sobre o relógio circadiano

O gene *PRR7*, um importante componente do funcionamento do relógio circadiano, aparece reprimido no final da noite tanto no mutante *atbzip63-2* (fold -2,5) quanto na linhagem silenciada RNAi L9 (fold -1,5), e está induzido em duas linhagens expressando de maneira desregulada o *AtbZIP63(35S:HA:VP16:cDNA AtbZIP63)*, uma no contexto Ws 35S *L15* (fold 1,6/TS; Tabela 3) e uma no contexto *atbzip63-2* 35S *L12* (fold 2,0/TS; Tabela 3). Observamos ainda que o promotor do *PRR7* possui um motivo *G-box* (CACGTG), um sítio característico de ligação de FT bZIPs, levantando a possibilidade do *AtbZIP63* regular diretamente a expressão de *PRR7*. Esta hipótese foi confirmada por experimentos de ChIP mostrando a ligação *in vivo* de *AtbZIP63* no promotor de *PRR7* (Figura 24). Portanto, *AtbZIP63*, além de oscilar sob controle do relógio circadiano, também retro-age sobre o relógio regulando a expressão de um dos seus principais componentes. Recentemente foi demonstrado que a expressão de *PRR7* é reprimida por açúcares resultando em um encurtamento na duração do período do relógio (Haydon et al., 2013b). Este resultado indica que as oscilações dos níveis dos açúcares oriundos da atividade fotossintética são um importante input para a manutenção da oscilação circadiana via *PRR7* (Haydon et al., 2013b). Desta forma, o aumento na expressão de *AtbZIP63* durante a noite, possivelmente em função da diminuição na disponibilidade de energia, pode representar um ponto de comunicação entre o status energético e o mecanismo oscilatório do relógio circadiano de *A. thaliana*, via indução do *PRR7* pelo *AtbZIP63* (Figura 26).

A desregulação do *PRR7* em genótipos alterados para expressão de *AtbZIP63* levanta a possibilidade de que outros elementos do oscilador central do relógio também possam estar desregulados. Portanto, comparamos a expressão dos genes do relógio *CCA1*, *LHY* e *PRR7* entre *atbzip63-2* e o TS em condição de *entrainment* e *free running*. Da mesma forma, analisamos a expressão de *TOC1* em condições de *free running*. Além da desregulação de *PRR7* que era esperada, também

verificamos que a amplitude da expressão dos genes *CCA1*, *LHY* e *TOC1* também está desregulada no *atbzip63-2* em condição de *free running* (Figura 25 A). Entretanto, em condição de *entrainment*, apenas o gene *PRR7* aparece, como esperado, reprimido no final da noite no *atbzip63-2* (Figura 25 B). A falta de desregulação do *CCA1* e *LHY* em condição de *entrainment* no mutante *atbzip63-2* possivelmente reflete a forte influencia da alternância luz/escuro no controle da expressão destes genes (Harmer et al., 2009; Haydon et al., 2013a). Por outro lado, em condições de *free running*, outros fatores passariam a ter uma maior influencia na expressão destes genes. Ainda assim, o fato da amplitude da expressão dos genes *PRR7*, *CCA1*, *LHY* e *TOC1* está desregulada no *atbzip63-2*, suporta a possibilidade do que o relógio circadiano esteja alterado neste mutante.

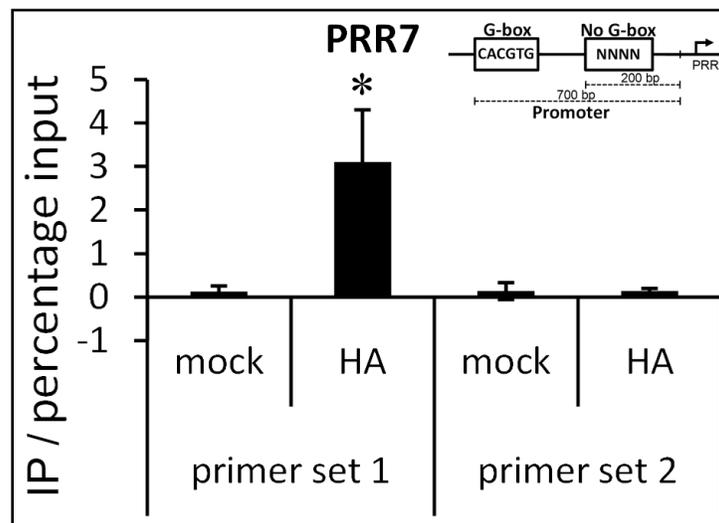


Figura 24. AtbZIP63 liga no promotor de *PRR7* *in vivo*. Sequências específicas do promotor *PRR7* nas linhagens 35S L15 expressando a fusão HA::VP16::AtbZIP63, foram capturadas e enriquecidas por imunoprecipitação da cromatina usando um anticorpo anti-HA e um anti-corpo anti-Mouse IgG como controle negativo (mock). Foram usados dois grupos de primers para a região promotora do *PRR7*. O grupo 1 amplifica a região do promotor que contém o motivo G-box (3'-CACGTG-5') característico de ligação dos fatores bZIP, e o grupo 2 amplifica uma região sem este motivo. Estes resultados representam a média de três experimentos independentes. A diferença foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

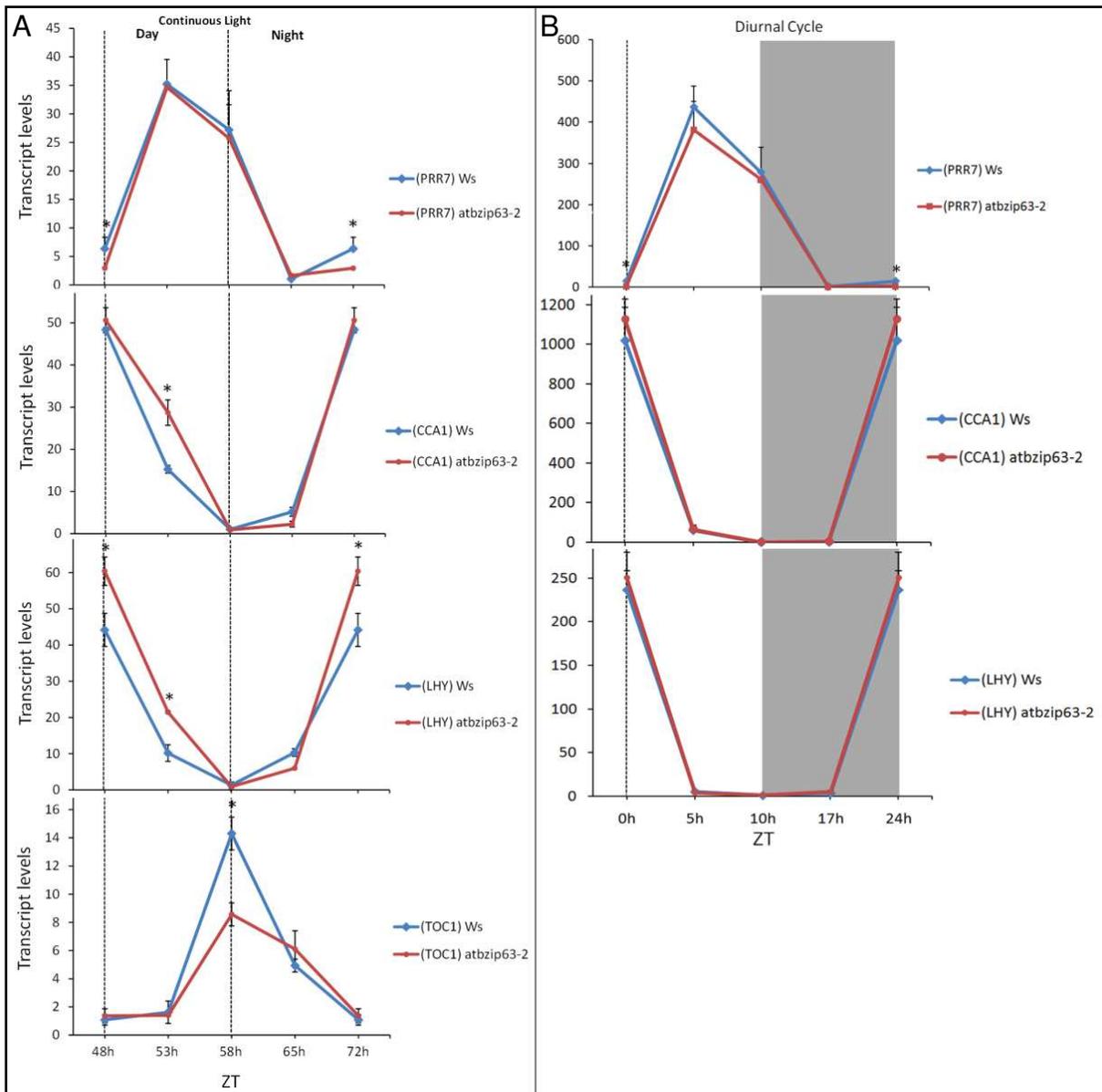


Figura 25. O relógio circadiano está alterado no mutante *atbzip63-2*. **A:** A expressão dos genes *CCA1*, *LHY*, *TOC1* e *PRR7* está desregulada neste mutante sob condição de luz contínua. **B:** Sob fotoperíodo os genes *CCA1* e *LHY* não apresentam diferença significativa de expressão entre *atbzip63-2* e o TS. As coletas foram realizadas em plantas cultivadas por 30 dias sob fotoperíodo 10 h luz/14 h escuro (*entrainment*), em seguida, mantivemos as plantas por 48 h horas sob luz contínua (*free running*), e realizamos coletas nos tempos 48, 53, 58, 65 e 72 horas de exposição á luz contínua (sendo 48 h e 58 h, fim da noite e fim do dia subjetivo, respectivamente). O número de amostras, a forma de análise e a organização dos dados foram realizadas como descrito anteriormente. A diferença entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Experimentos de *Yeast-two Hybrid* revelou que *AtbZIP63* pode interagir com CHE (*CCA1 Hiking Expedition*) (colaboração com C. Mاتيولli, pós-doutorando do grupo) um outro componente importante do core relógio circadiano envolvido no loop CCA1-LHY-TOC1, trazendo outra perspectiva da interação entre *AtbZIP63* e o relógio circadiano. O fator de transcrição CHE da família TCP, é reprimido por CCA1 e LHY por interação direta com seu promotor, e a proteína CHE diretamente reprime a transcrição de *CCA1*. Portanto, *AtbZIP63* interagindo com CHE poderia também regular *CCA1* (Figura 26).

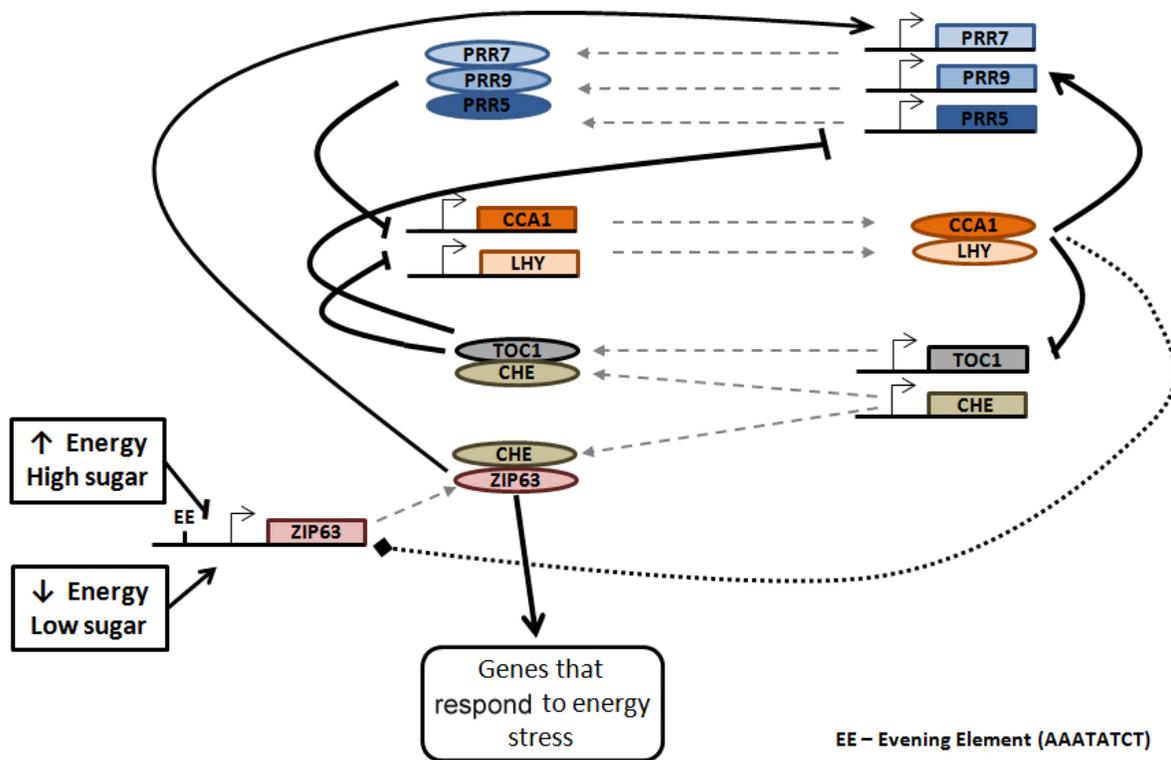


Figura 26. Modelo da interação entre *AtbZIP63* e o relógio circadiano de *A. thaliana*. O relógio mais a sinalização de carência energética promovem indução do *AtbZIP63* durante a noite. Este por sua vez, induz a expressão do *PRR7* pela ligação direta em seu promotor. A interação do relógio com *AtbZIP63* também modula a expressão de um grupo de genes de resposta ao déficit energético durante a noite. Com o input da luz no começo do dia, CCA1 e LHY reprimiriam diretamente *AtbZIP63* ligando no motivo *evening element* (EE) presente no seu promotor. Desta forma *AtbZIP63* pode atuar como um ponto de comunicação entre o status energético e o relógio, funcionando como um dos *inputs* que mantém o ajuste do relógio em adição a luz e temperatura.

Em conjunto, estes resultados permitem concluir que a expressão do *AtbZIP63* oscila sob controle do relógio circadiano, mas a amplitude e fase desta oscilação são influenciadas pela variação na disponibilidade de carboidratos ao longo do ciclo diurno. O *AtbZIP63* também atua como um ativador direto da expressão de *PRR7*, um dos componentes do oscilador central do relógio, que recentemente foi identificado com o alvo de regulações do relógio pelos açúcares. Portanto, evidenciamos uma interação recíproca entre o relógio e *AtbZIP63*. Uma hipótese interessante decorrente desta conclusão é que *AtbZIP63* poderia parcialmente mediar a regulação da expressão de *PRR7* pelos carboidratos e desta forma alterar o funcionamento do relógio.

Mostramos que *AtbZIP63* participa do controle da degradação do amido durante a noite. O ajuste da taxa de degradação do amido de acordo com o comprimento esperado da noite envolve a atuação do relógio circadiano e é fundamental para manter um suprimento energético adequado durante todo o período noturno (Smith e Stitt, 2007; Stitt e Zeeman, 2012). É provável que a interação entre *AtbZIP63* e o relógio seja importante no controle da degradação do amido, mas as modalidades mecânicas subjacentes ainda precisam ser desvendadas. A regulação da expressão de *AtbZIP63* via KIN10/11 em resposta a estresses bióticos e abióticos (déficit de energia), levanta a possibilidade de que este FT integra estes sinais para modular o relógio e o processo de fornecimento de carboidratos a partir da degradação do amido a noite.

Estamos propondo que uma condição ambiental energeticamente desfavorável (pouca incidência de luz; estresse hídrico) afetando a fotossíntese e portanto a síntese de carboidratos incluindo o amido, induz a expressão de *AtbZIP63* que por sua vez, em conjunto com o relógio, reduz a taxa de degradação do amido a noite (Figura 27), e desta forma a planta evitaria um déficit energético em função do menor acúmulo de amido no dia anterior. Por outro lado, se as condições ambientais forem energeticamente favoráveis, como um dia de pleno sol, o nível elevado de açúcares sintetizados a partir da atividade

fotossintética reprime a expressão do *AtbZIP63*, e conseqüentemente a taxa de degradação do amido ocorre num ritmo adequado (Figura 27).

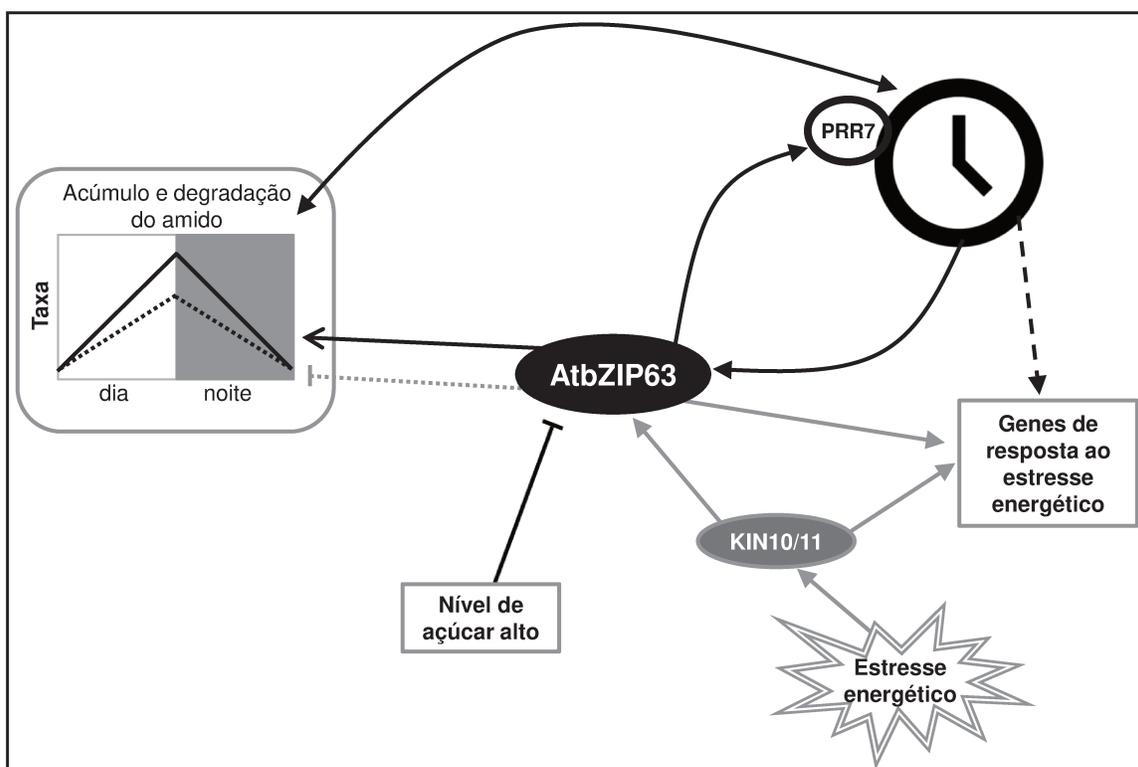


Figura 27. Modelo da regulação na taxa de degradação do amido a partir da interação do *AtbZIP63* com o relógio e KIN10/11. A expressão do *AtbZIP63* aumenta durante a noite possivelmente, devido ao relógio e/ou ativação via KIN10/11. *AtbZIP63* por sua vez, modula a expressão dos genes envolvidos na degradação do amido e também na resposta ao déficit de energia. Diante de uma condição de estresse energético, a expressão do *AtbZIP63* é induzida pela via ativada por KIN10/11, como consequência da indução do *AtbZIP63*, a taxa de degradação do amido é diminuída a noite (linha pontilhada no gráfico). Por outro lado, se as condições ambientais forem energeticamente favoráveis, o nível elevado de açúcares na célula reprime a expressão do *AtbZIP63* durante o dia, e conseqüentemente a taxa de degradação do amido ocorre no seu ritmo normal (linha contínua no gráfico). O *AtbZIP63* também pode influenciar o relógio por meio da ativação direta da expressão de *PRR7*, um dos componentes do oscilador central do relógio.

A falha nesta interação (*AtbZIP63* e relógio) no mutante *atbzip63-2* poderia estar impactando o processo de degradação do amido a noite, de forma que as reservas estão sendo exauridas antes do final do período noturno, resultando numa carência energética no final da noite. Esta carência energética estaria impactando negativamente o crescimento das plantas do *atbzip63-2*. A observação de que o

fenótipo do mutante *atbzip63-2* é decorrente da carência de energia nas últimas horas da noite foi também reforçada pelo fato de que, em cultivo sob luz contínua não há diferença significativa de crescimento entre o mutante *atbzip63-2* e o TS.

CAPÍTULO 2

O Fator de Transcrição *AtbZIP63* regula a expressão de genes da biossíntese de flavonóides e trealose durante o dia

Resumo

O perfil de expressão gênica no final do dia no mutante *atbzip63-2* evidenciou que, embora o transcrito *AtbZIP63* esteja em seu nível basal neste período do dia, o *AtbZIP63* modula a expressão de vários genes durante o dia. A comparação com o perfil de expressão entre o final do dia e final da noite, revelou uma baixa sobreposição (2,5%) entre os genes desregulados nestes dois momentos do dia, indicando que o fator de transcrição *AtbZIP63* participa da regulação de genes envolvidos em redes regulatórias distintas em função do período do dia. Entretanto, detectamos um grupo de sete genes reprimidos no final do dia e da noite no mutante *atbzip63-2* e que são induzidos por KIN10/11 reforçando a participação do *AtbZIP63* na rede ativada pelas KIN10/11 em resposta ao déficit energético. Entre os genes especificamente desregulados no final do dia, observamos um enriquecimento para genes relacionados com metabolismo secundário (flavonóides, alcalóides, fenilpropanóides e glucosinolatos), sendo três genes (Chalcone Synthase, Chalcone Isomerase e UDP-Glc:flavonoid 3-O-glucosyltransferase) envolvidos nas etapas iniciais da biossíntese de flavonóides em *A. thaliana*. Sugerindo, portanto, que o *AtbZIP63* poderia estar participando na regulação da síntese de compostos de metabolismo secundário durante o dia. Também verificamos que entre os genes reprimidos no final do dia há três envolvidos na biossíntese de trealose (*Trehalose-6-Phosphatase Synthase 8*; *TPS8*, *TPS9* e *TPS11*), sugerindo que a biossíntese de trealose esteja alterada no *atbzip63-2*. A quantificação dos níveis de trealose no final do dia e no final da noite nas plantas do *atbzip63-2* confirmou que as plantas do *atbzip63-2* possuem menos trealose nestes dois períodos. Esta menor quantidade de trealose e possivelmente também menos Tre6P nas plantas do *atbzip63-2* poderia contribuir para a aceleração na degradação do amido observado nestas plantas.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Foi utilizado o mutante de inserção de T-DNA *atbzip63-2* descrito no Capítulo 1. O cultivo das plantas foi realizado como descrito no Capítulo 1. Para a quantificação da trealose, as plantas foram cultivadas por 20 dias sob fotoperíodo 12 h luz/12 h escuro e as medições dos níveis de trealose foram realizadas no final da noite e no final do dia.

Microarranjo de DNA, Gene Ontology e análises comparativas

A extração, marcação e hibridização do RNA foram realizadas conforme os protocolos da Affymetrix® e o tratamento e a análise dos dados foi realizada como descrito no Capítulo 1.

Quantificação da trealose no mutante *atbzip63-2* e Ws

Para quantificar a trealose, foi usado o método descrito por Carillo et al. (2013). Esta análise foi realizada no laboratório do Dr. Mark Stitt no Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Potsdam-Golm, Alemanha).

Resultados e Discussão

***AtbZIP63* participa de diferentes redes regulatórias entre o final do dia e final da noite**

A expressão do *AtbZIP63* oscila ao longo do dia em função do relógio circadiano com um mínimo de expressão no final do dia levantando a pergunta de qual seria a sua atividade durante o dia. Portanto, realizamos uma análise do perfil de transcritos no mutante *atbzip63-2* comparado com o TS no final do período diurno, quando o nível do transcrito *AtbZIP63* está em seu nível basal.

Identificamos 333 genes diferencialmente expressos (p -valor $< 0,05$) entre o mutante *atbzip63-2* e Ws. Deste conjunto, 188 (56%) apresentam-se induzidos e 145 genes (44%) reprimidos em *atbzip63-2*. Notamos que 78 (23%) dos genes diferencialmente expressos apresentam uma diferença de expressão superior a duas vezes entre os dois genótipos. Estes dados indicam que apesar do nível basal do transcrito *AtbZIP63* no período diurno, *AtbZIP63* continua influenciando a expressão de vários genes durante este período.

Na sobreposição entre os 333 genes desregulados no *atbzip63-2* no final do dia e os 349 genes desregulados no *atbzip63-2* no final da noite, apenas dois e 14 são comuns entre os que estão induzidos e reprimidos, respectivamente (Figura 1 A e B). Curiosamente oito genes que aparecem reprimidos no final do dia, estão induzidos no mutante com relação ao TS no final da noite (*DRM1 e 2*, *BGALA*, *RPK1*, *Ferric Reduction Oxidase 7*, *Acyl-CoA Oxidase 2*, *At2g07180* e *At1g68520*; Figura 1 C). A causa desta discrepância ainda não está esclarecida, mas o fato destes genes estarem desregulados tanto no final do dia quanto no final da noite no *atbzip63-2*, reforça a observação de que o *AtbZIP63* participa da regulação destes genes.

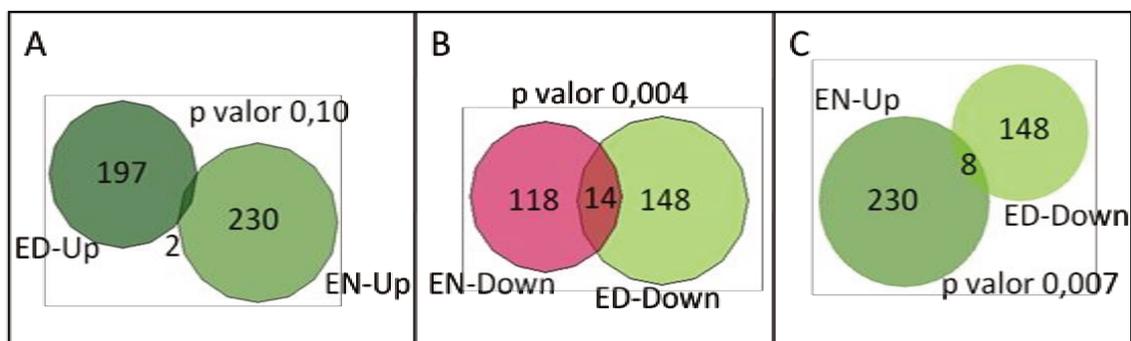


Figura 1. Sobreposição entre os genes diferencialmente expressos no mutante *atbzip63-2* entre o final do dia (ED) e o final da noite (EN). Poucos genes são comuns entre os diferencialmente expressos no final do dia e os do final da noite. **A:** Entre os genes induzidos nos dois períodos a sobreposição não foi estatisticamente significativa. **B:** Entre os genes reprimidos temos uma sobreposição estatisticamente significativa correspondente a 14 genes comuns. **C:** Oito genes que estão reprimidos no ED, aparecem induzidos no EN. O p-valor foi obtido pelo teste exato de Fisher, sendo considerado significativo p-valor<0,05.

Esta baixa sobreposição entre os genes diferencialmente expressos no *atbzip63-2* entre o final do dia e o final da noite, possivelmente reflete a participação do regulador AtbZIP63 em várias redes regulatórias com janelas temporais e de funções diferentes ao longo do dia.

AtbZIP63 participa das respostas á estresse energético via KIN10 (Baena-González et al., 2007; Matioli et al., 2011; Capítulo 1), portanto, procuramos avaliar a sobreposição entre os genes desregulados no *atbzip63-2* no final do dia e da noite com os 504 genes induzidos por KIN10 (Baena-Gonzales et al, 2007). Não há sobreposição dos genes induzidos no *atbzip63-2* versus TS, no final do dia e final da noite e que são induzidos por KIN10/11 (Figura 2 A). Entretanto, dentro dos genes reprimidos no *atbzip63-2* no final da noite e do dia, e que são induzidos por KIN10/11, sete são comuns (Figura 2 B). Como discutido no Capítulo 1, os genes induzidos via KIN10 em resposta ao déficit energético, que estão reprimidos no *atbzip63-2*, são provavelmente dependentes da ativação direta pelo AtbZIP63, enquanto os que aparecem induzidos no *atbzip63-2* não seriam diretamente regulados por AtbZIP63. A observação de que temos genes comuns entre os induzidos via KIN10/11 (Baena-González

et al., 2007) e os que aparecem reprimidos no final do dia e da noite no *atbzip63-2*, reforça a participação do *AtbZIP63* na rede ativada pelas KIN10/11 em resposta ao déficit energético.

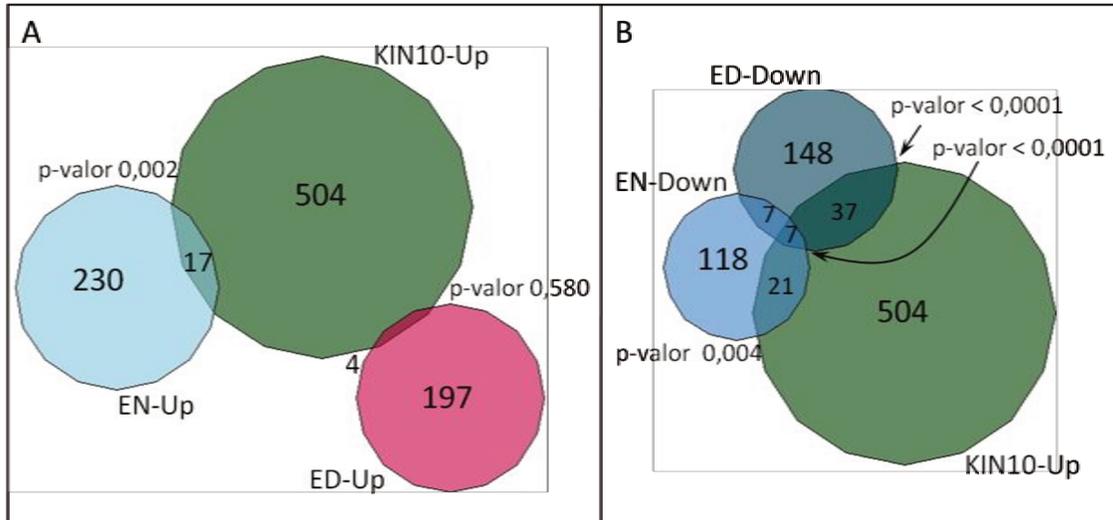


Figura 2. Sobreposição entre os genes diferencialmente expressos no mutante *atbzip63-2* entre o final do dia (ED) e o final da noite (EN) e os induzidos por KIN10. **A:** Não houve sobreposição entre os genes induzidos no *atbzip63-2* no final do dia e que sobrepõe com KIN10 com os genes induzidos no *atbzip63-2* no final da noite. **B:** Sete genes são comuns entre os reprimidos no *atbzip63-2* no final do dia e final da noite e que sobrepõe com KIN10. O p-valor foi obtido pelo teste exato de Fisher, sendo considerado significativo p-valor<0,05.

Realizamos uma análise para detecção dos motivos de ligação mais frequentes nos promotores dos genes diferencialmente expressos no *atbzip63-2* no final do dia (Athena; O'Connor et al., 2005). Observamos enriquecimento entre as sequências promotoras (1000 pb acima do sítio de iniciação da transcrição), para os motivos Evening Element (EE) AAAATATCT (p-valor < 10e-5), CACGTG-motif (p-valor 0,009) e ABRE-like motif BACGTGKM (p-valor 0,003) entre os genes reprimidos. E entre os genes induzidos houve enriquecimento para os motivos CACGTG-motif (p-valor < 10e-4), ABRE-like motif BACGTGKM (p-valor < 10e-3) e ACGT-ABRE motif ACGTGKC (p-valor < 10e-3).

Os motivos que possuem a sequência ACGT como os G-(CCACGTGG), C-(TGACGTCA), e ABRE-(PyACGTGGC)-*box* são sítios de ligação dos bZIPs (Lara et al., 2003; Deppmann et al., 2006; Song et al., 2008). O fator de transcrição AtbZIP63 liga-se nos motivos C e G-*box* (Kang et al., 2010). A

observação de que os promotores dos genes desregulados no *atbzip63-2* no final do dia possuem enriquecimento para os motivos baseados no core ACGT, sugere que estes genes podem ser alvos diretos do AtbZIP63. O motivo EE é um sítio de ligação característico dos fatores de transcrição centrais do relógio circadiano CCA1 e LHY (Harmer & Kay 2005), este motivo é frequente nos promotores dos genes controlados pelo relógio e que possuem pico de expressão no final da noite (Harmer & Kay 2005). O fato de termos enriquecimento para os motivos com sequência ACGT e motivo EE entre os genes desregulados no *atbzip63-2* sugere uma co-regulação destes genes pelo *AtbZIP63* e pelo relógio.

***AtbZIP63* modula a expressão de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários e trealose durante o dia**

A análise do perfil de transcritos do *atbzip63-2* usando a ferramenta Mapman, que permite a classificação de dados de expressão gênica em larga escala, revelou um enriquecimento para genes relacionados ao metabolismo secundário (flavonóides, alcalóides, fenilpropanóides e glucosinolatos; Figura 3; Tabela 1). A maioria dos genes (88%) relacionados metabolismo secundário estão com expressão induzida no final do dia no *atbzip63-2* (Tabela 1). Dentre estes, temos os genes da Chalcone Synthase (CHS; fold 2,4), Chalcone Isomerase (CHI; fold 1,5) e UDP-Glc:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UF3GT; fold 1,5), que fazem parte das etapas iniciais da biossíntese de flavonóides em *A. thaliana*. Nesta via a, fenilalanina é metabolizada para produzir cumaroil-CoA através de uma série de reações enzimáticas onde a CHS catalisa a produção de naringenina chalcona, combinando uma molécula de cumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA, a naringenina chalcona é então isomerizada a flavanona pela CHI, a partir desta etapa, esta via diverge para formar as diferentes classes de flavonóides (Patra et al., 2013).

Tabela 1. Genes desregulados no final do dia no *atbzip63-2* e que relacionados ao metabolismo secundário.

AGI	Fold	Classe MapMan	Anotação
AT3G19710	1,9	Secondary metabolism. Glucosinolates	BCAT4 BCAT4 (BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4); catalytic/ methionine-oxo-acid transaminase chr3:6846969-6849497
AT3G58990	2,5	Secondary metabolism. Glucosinolates	aconitase C-terminal domain-containing protein chr3:21797058-21798303
AT2G43100	2,1	Secondary metabolism. Glucosinolates	aconitase C-terminal domain-containing protein chr2:17920660-17921689
AT1G31180	1,5	Secondary metabolism. Glucosinolates	3-isopropylmalate dehydrogenase, chloroplast, putative
AT4G13770	1,6	Secondary metabolism. Glucosinolates	CYP83A1, REF2 CYP83A1 (CYTOCHROME P450 83A1); oxidoreductase, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NADH or NADPH as one donor, and incorporation of one atom of oxygen / oxygen binding
AT1G18590	2	Secondary metabolism. Glucosinolates	SOT17, ATSOT17, ATST5C SOT17 (SULFOTRANSFERASE 17); desulfoglucosinolate sulfotransferase/ sulfotransferase
AT1G74090	1,9	Secondary metabolism. Glucosinolates	SOT18, ATSOT18, ATST5B SOT18 (DESULFO-GLUCOSINOLATE SULFOTRANSFERASE 18); 3-methylthiopropyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase/ 4-methylthiobutyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase/ 5-methylthiopentyl-desulfoglucosinolate sulfotransferase
AT1G65860	1,8	Secondary metabolism. Glucosinolates	FMO GS-OX1 FMO GS-OX1 (FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE S-OXYGENASE 1); 3-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 4-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 5-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 6-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 7-methyl
AT4G39950	1,6	Secondary metabolism. Glucosinolates	CYP79B2 CYP79B2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
AT2G20610	1,5	Secondary metabolism. Glucosinolates	SUR1, HLS3, RTY, ALF1, RTY1 SUR1 (SUPERROOT 1); S-alkylthiohydroximate lyase/ carbon-sulfur lyase/ transaminase
AT5G07700	1,5	Secondary metabolism. Glucosinolates	MYB76, AtMYB76 MYB76 (myb domain protein 76); DNA binding / transcription factor
AT1G18570	-2,1	Secondary metabolism. Glucosinolates	MYB51, AtMYB51, BW51A, BW51B, HIG1 MYB51 (MYB DOMAIN PROTEIN 51); DNA binding / transcription factor
AT4G12030	1,9	Secondary metabolism. Glucosinolates	bile acid:sodium symporter family protein
AT5G67150	1,5	Secondary metabolism. Phenylpropanoids	transferase family protein
AT5G42830	-1,8	Secondary metabolism. Phenylpropanoids	transferase family protein
AT1G65060	1,5	Secondary metabolism. Phenylpropanoids	4CL3 4CL3; 4-coumarate-CoA ligase
AT4G27570	1,5	Secondary metabolism. Flavonoids	UDP-Glc:flavonoid 3-O-glucosyltransferase family protein
AT5G05270	1,5	Secondary metabolism. Flavonoids	CHI chalcone-flavanone isomerase family protein
AT5G13930	2,4	Secondary metabolism. Flavonoids	CHS Chalcone Synthase, ATCHS, TT4 (TRANSPARENT TESTA 4); naringenin-chalcone synthase
AT3G55120	1,5	Secondary metabolism. Flavonoids	TT5, A11, CFI (TRANSPARENT TESTA 5); chalcone isomerase
AT3G57020	1,5	Secondary metabolism. Alkaloid-like	strictosidine synthase family protein
AT2G29290	-1,5	Secondary metabolism. Alkaloid-like	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase

A rota da biossíntese das antocianinas é regulada por diversos sinais nutricionais como açúcares, nitrogênio e fósforo (Lillo et al., 2008) ou ambientais como a intensidade de luz (Loreti et al., 2008). Em plantas transgênicas expressando o gene *Trehalose-6-Phosphate Synthase (TPS)* de bactéria (*otsA*), no qual o conteúdo do açúcar trealose-6-fosfato (Tre6P) é duas vezes maior que nas plantas TS, também é observado grande acúmulo de antocianinas (Wingler et al., 2012). Por outro lado, em plantas expressando o *Trehalose-6-Phosphate Phosphatase (TPP)* de bactéria (*otsB*), no qual a quantidade de Tre6P é duas vezes inferior em comparação com plantas TS, o acúmulo de antocianinas também foi

reduzido. É importante destacar que nas plantas expressando o *otsB*, a quantidade dos açúcares glicose, sacarose e frutose foram pelo menos 20 vezes superior em comparação ao TS (Wingler et al., 2012), mesmo assim o acúmulo de antocianinas foi reduzido. Estes resultados indicam que a rota de biossíntese das antocianinas responde especificamente ao Tre6P.

O fato de termos três genes envolvidos na biossíntese de flavonóides induzidos no mutante *atbzip63-2*, sugere a participação do *AtbZIP63* na regulação da síntese destes compostos. E possivelmente reflete a ocorrência de stress nas plantas do mutante *atbzip63-2*, uma vez que, produtos do metabolismo secundário possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como deficiência nutricional, mudanças de temperatura, conteúdo de água e intensidade de luz (Patra et al., 2013; Trotta et al., 2014).

Também verificamos que há três genes para Trehalose-6-Phosphatase Synthase, o *TPS8* (-3,6 vezes), o *TPS9* (-2,1 vezes) e o *TPS11* (-3,3 vezes) reprimidos no final do dia no *atbzip63-2*. Estas três TPSs possuem ambos os domínios de trehalose-6-phosphate synthase (TPS-like) e trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP-like). As enzimas TPS e TPP cataliticamente ativas participam da biossíntese da trealose. A TPS catalisa a conversão da glicose-6-fosfato (Gli6P) em Tre6P, e este último é então convertido em trealose pela TPP. Embora não tenha sido detectado atividade catalítica em nenhuma destas três TPSs (Vandesteene et al., 2010), o fato delas estarem desreguladas no mutante *atbzip63-2*, sugere que a síntese de trealose esteja alterada.

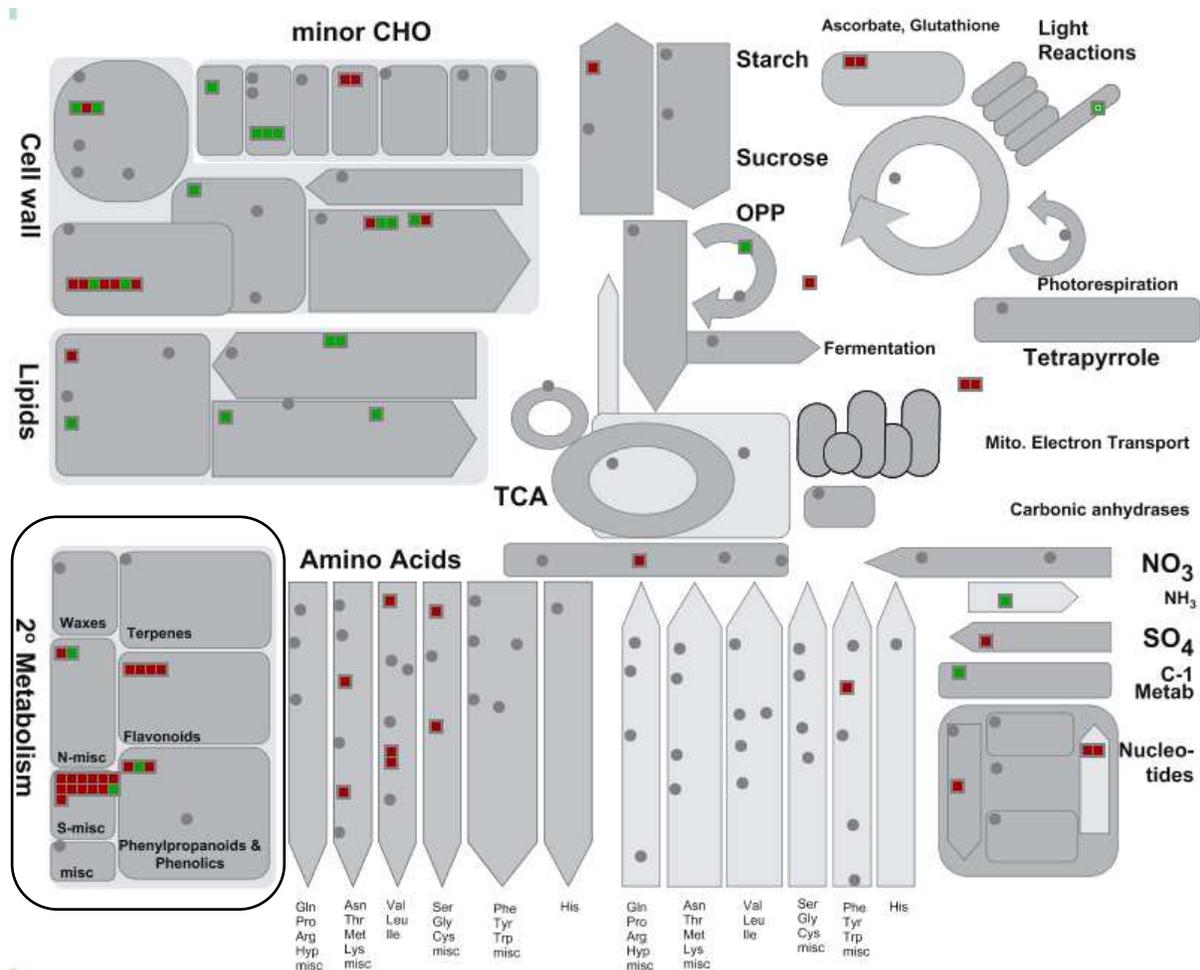


Figura 3. Mapeamento dos genes desregulados no final do dia no *atbzp63-2* em relação ao metabolismo. Observamos enriquecimento para genes relacionados com metabolismo secundário, especificamente para aqueles envolvidos na biossíntese de flavonóides. Quadrados vermelhos representam genes induzidos e quadrados verdes são genes reprimidos. A imagem foi gerada pela ferramenta MapMan no modo de visualização Metabolism_overview.

De acordo com estas observações, nós constatamos também que as plantas do *atbzp63-2* possuem menos trealose tanto no final do dia quanto no final da noite. No final da noite as plantas do mutante estão com um nível de trealose 30% menor que o TS (Figura 4 B). Entretanto a diferença nos níveis de trealose no final do dia entre o mutante e o TS foi pequena, não sendo considerado estatisticamente significativo (Figura 4 A).

A indução da expressão de genes *TPS* resulta em níveis elevados de Tre6P (Wingler et al., 2012; Martins et al., 2013). É razoável supor que a repressão dos genes *TPS*s resulte numa menor produção de Tre6P e consequentemente de trealose.

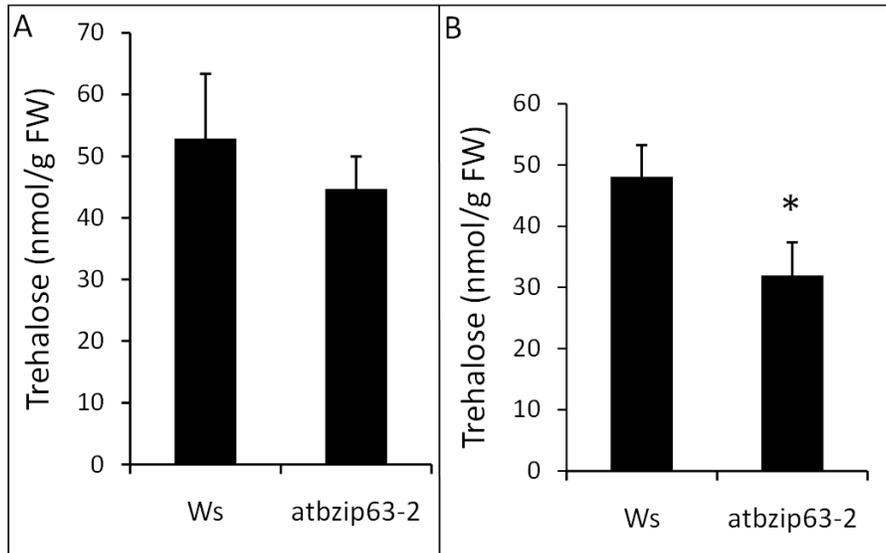


Figura 4. As plantas do mutante *atbzip63-2* possuem menos trealose que o TS. **A:** Nível de trealose no final do dia está mais baixo no mutante comparado com o TS. **B:** Nível de trealose está 30% mais baixo no mutante no final do dia comparado com o TS. A média da quantidade de trealose em cada período de coleta foi obtida a partir de 3 réplicas biológicas e cada réplica foi composta da parte aérea de 6 plantas com 20 dias de cultivo. A diferença nos níveis do trealose entre os genótipos foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

O dissacarídeo trealose é um importante sinal que regula vários aspectos do desenvolvimento como crescimento de raízes, florescimento e embriogênese (Grennan et al, 2007), e o seu intermediário Tre6P é um sinalizador do status de carboidrato na célula (Nunes et al., 2013). O Tre6P inibe a proteína KIN10 em tecidos em desenvolvimento (Delatte et al., 2011; Martínez-Barajas et al., 2011), possivelmente como uma forma de assegurar o desenvolvimento pleno do tecido, uma vez que a atividade de KIN10 tem efeito negativo sobre o crescimento (Baena-González et al., 2007). O Tre6P também sinaliza uma inibição nas primeiras etapas da degradação do amido, em plantas superexpressando *TPS* a quantidade de amido remanescente no final da noite é cerca de 6 vezes superior

as plantas do tipo selvagem (Martins et al., 2013). As plantas do *atbzip63-2* apresentam uma degradação do amido mais acelerada que as plantas TS (Capítulo 1), o fato de termos uma menor quantidade de trealose e possivelmente também menos Tre6P nas plantas do *atbzip63-2*, pode estar favorecendo a aceleração da degradação do amido á noite nestas plantas, já que, o nível elevado de Tre6P na célula inibe a degradação do amido, uma situação contrária, com nível baixo de trealose na célula poderia sinalizar uma aceleração na degradação.

A baixa sobreposição entre os genes desregulados no final da noite e no final do dia no mutante *atbzip63-2* sugeriu que o *AtbZIP63* participa da regulação de genes envolvidos em redes regulatórias distintas de acordo com o período do dia. Entretanto, a participação do *AtbZIP63* na rede ativada pelas KIN10/11 em resposta ao déficit energético foi reforçada, pois observamos um grupo comum de sete genes dentre os reprimidos no final do dia e da noite no mutante *atbzip63-2* e que são induzidos por KIN10/11. O enriquecimento para genes relacionados com metabolismo secundário, principalmente os envolvidos nas etapas iniciais da biossíntese de flavonóides, e também na biossíntese de trealose, sugere que o *AtbZIP63* participa da regulação da síntese destes compostos durante o dia.

Conclusões

O *AtbZIP63* participa da modulação da resposta á carência energética, coordenada pelas quinases KIN10/11, por meio da ativação de genes relacionados ao catabolismo como o *ANS1*, *SEN1*, *DIN10*, *KDM4* dentre outros. O perfil de expressão gênica e a cinética do acúmulo e degradação do amido no mutante *atbzip63-2*, revelaram que *AtbZIP63* participa do controle da degradação do amido durante a noite regulando a expressão de genes centrais neste processo como o *PWD*, *GWD* e *DPE2*. O *AtbZIP63* interage com o relógio circadiano, a oscilação diária no nível do transcrito *AtbZIP63* está sob controle do relógio circadiano, mas a amplitude da oscilação e o posicionamento do pico de expressão durante o período noturno do transcrito *AtbZIP63* é influenciado pela disponibilidade de amido e consequentemente de carboidratos na célula ao longo do ciclo dia/noite. Além de estar sob controle do relógio circadiano, o *AtbZIP63* também pode influenciar o ajuste do relógio por meio da indução do *PRR7*, que age como um repressor de *CCA1* e *LHY* que são os dois principais reguladores do mecanismo oscilatório do relógio circadiano. Supomos então que o *AtbZIP63* age como um mediador de sinais entre o status energético e o mecanismo oscilatório do relógio circadiano de *A. thaliana*. Desta forma o *AtbZIP63* interage com o relógio e regula a taxa de degradação do amido á noite, para manter um suprimento energético adequado a um crescimento regular durante todo o período noturno. Além destas observações, o perfil de transcritos do mutante *atbzip63-2* no final do dia, evidenciou genes relacionados com metabolismo secundário, envolvidos na síntese de flavonóides e também genes da síntese de trealose sugerindo a participação do *AtbZIP63* na regulação da síntese destes compostos durante o dia. Estas observações indicam que o *AtbZIP63* participa da regulação de genes envolvidos em redes regulatórias distintas em função do período do dia.

Perspectivas

As observações de que o *AtbZIP63* possivelmente atua como um intermediador entre a disponibilidade de carboidratos oriundas da degradação do amido á noite ou da fotossíntese durante o dia para ajustar o mecanismo oscilatório do relógio circadiano via *PRR7*, nos direciona a analisar mais especificamente a interação do *AtbZIP63* com o relógio. Para tanto pretendemos demonstrar de que maneira o *AtbZIP63* intermedeia o status energético (disponibilidade de carboidratos) com o ajuste do relógio circadiano por meio da regulação de *PRR7*.

Também pretendemos avaliar a participação de *AtbZIP63* na regulação de *PRR7* em função da disponibilidade de carboidratos no meio. Com isto pretendemos definir o impacto de *AtbZIP63* sobre o relógio circadiano.

Referências Bibliográficas

- Alonso, R. Oñate-Sanchez, L. Weltmeier, F. Ehlert, A. Diaz, I. Dietrich, K. Vicente-Carbajosa, J. Dröge-Laser, W. A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell*, 21: 1747–1761, 2009.
- Alves, M. A.; Dadalto, S. P.; Gonçalves, A. B.; De Souza, G. B.; Barros, V. A.; Fietto, L. Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 7815-7828, 2013.
- Achard, P., Genschik, P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, 60(4):1085-92, 2009.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., and Sheen, J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448:938–942, 2007.
- Baena-González, E., Sheen, J. Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, 13(9): 474–482, 2008.

- Baena-González. Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Molecular Plant*, 1–14, 2010.
- Bang, S.W. Characterization of the stress-inducible OsNCED3 promoter in different transgenic rice organs and over three homozygous generations, *Planta*, 237:211–224, 2013.
- Baulcombe D. Viruses and gene silencing in plants. *Archives of Virology, Supplement* , 15:189-201, 1999.
- Belostotsky, D.A., and Sieburth, L.E. Kill the messenger: mRNA decay and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 96–102, 2009.
- Bensmihen, S. To. A. Lambert, G. Kroj, T. Giraudat, J. Parcy F. Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Lett*, 561: 127-31, 2004.
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* 316:1194-1199, 1993.
- Bisht, N.C., Jagannath, A., Burma, P.K., Pradhan, A.K., Pental, D. Retransformation of a male sterile barnase line with the barstar gene as an efficient alternative method to identify male sterile–restorer combinations for heterosis breeding. *Plant Cell Reports*, 26:727–733, 2007.
- Binder BM1, Walker JM, Gagne JM, Emborg TJ, Hemmann G, Bleecker AB, Vierstra RD. The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*, 19(2):509-23, 2007.
- Bhattacharyya J1, Chowdhury AH, Ray S, Jha JK, Das S, Gayen S, Chakraborty A, Mitra J, Maiti MK, Basu A, Sen SK. Native polyubiquitin promoter of rice provides increased constitutive expression in stable transgenic rice plants. *Plant Cell Reports*, 31(2):271-9, 2012.
- Bhardwaj V, Meier S, Petersen LN, Ingle RA, Roden LC. Defence responses of Arabidopsis thaliana to infection by Pseudomonas syringae are regulated by the circadian clock. *PLoS One*, 6(10):e26968, 2011.
- Bläsing, O. E. et al. Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17:3257–3281, 2005.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N. E., Davis, K.R., Görlach, J. GroTSh Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell*, 13:1499–1510, 2001.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320:1185–1190, 2008.
- Carillo, P., Feil, R., Gibon, Y., Satoh-Nagasawa, N., Jackson, D., Bläsing, O.E., Stitt, M., Lunn, J.E. A fluorometric assay for trehalose in the picomole range. *Plant Methods*, 9:21, 2013.
- Caspar T., Huber S.C., Somerville C. Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology*, 79:11–17, 1985.
- Caspar T., Lin T.P., Kakefuda G., Benbow L., Preiss J., Somerville C. Mutants of Arabidopsis with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiology*, 95:1181–1188, 1991.
- Carré, I.; Veflingstad, S.R. Emerging design principles in the Arabidopsis circadian clock. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(5):393-8, 2013.

- Carpenter, J.L. Kopczak, S.D. Snustad, D.P. Silflow, C.D. Semi-constitutive expression of an *Arabidopsis thaliana* alpha-tubulin gene. *Plant Molecular Biology*, 21(5):937-42, 1993.
- Cedar, H. & Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 10:295-304, 2009.
- Ciceri, P. Locatelli, F. Genga, A. Viotti, A. Schmidt, R.J. The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiology*, 121: 1321–1328, 1999.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448:666–671, 2007.
- Comai, L.; P. Moran, D. Maslyar, Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements, *Plant Molecular Biology*, 15:373–381, 1990.
- Confraria, A. Martinho, C. Elias, A. Rubio-Somoza, I. Baena-González, E. miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 20 June, 2013.
- Corrêa, L.G. Riaño-Pachón, D.M. Schrago, C.G. dos Santos R.V. Mueller-Roeber, B. Vincenz, M. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *Plos One*, 3: 2944e, 2008.
- Covington, M.F. Panda, S. Liu X.L. Strayer, C.A. Wagner, D.R. Kay, S.A. ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:1305–15, 2001.
- Conaway, J. W. Introduction to theme "Chromatin, epigenetics, and transcription". *Annu Rev Biochem*, 81:61-64, 2012.
- Chuang, C.F. Running, M.P. Williams, R.W. Meyerowitz, E.M. The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Development*, 13: 334–344, 1999.
- Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., Messerli G., Chen J., Zeeman S.C., Smith S.M. & Smith A.M. A cytosolic glucosyltransferase is required for the conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant Journal*, 37:853–863, 2004.
- Creasey KM, Zhai J, Borges F, Van Ex F, Regulski M, Meyers BC, Martienssen RA. miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. *Nature*, 17;508(7496):411-5, 2014.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., Scheible, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139(1):5-17, 2005.
- Dalchau, N. Baek, S.J. Briggs, H.M. Robertson, F.C. Dodd, A.N. Gardner, M.J. et al. The circadian oscillator gene GIGANTEA mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:5104–9, 2011.
- Dharmasiri, N. Dharmasiri, S. Estelle, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435:441–445, 2005.
- Delatte, T.L. Sedijani, P. Kondou, Y. Matsui, M. de Jong, G.J. Somsen, G.W. Wiese-Klinkenberg, A. Primavesi, L.F. Paul, M.J. Schluepmann, H. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case

- of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiology*, 157:160–174, 2011.
- Devlin, P.F, Kay, S.A. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*, 12:2499–510, 2000.
- Deprost, D. Yao, L. Sormani, R. Moreau, M. Leterreux, G. Nicolai, M. Bedu, M. Robaglia, C. Meyer C. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*, 8: 864–870, 2007.
- Deppmann, C.D., Alvania, R.S., Taparowsky, E.J. Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: Insight into the evolution of closed interaction networks. *Molecular Biology Evolution*, 23(8):1480-92, 2006.
- Dietrich, K., Weltmeier, F., Ehlert, A., Weiste, C., Stahl, M., Harter K, Dröge-Laser W. Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell*. 23(1):381-95, 2011.
- Dodd, A.N. Salathia, N. Hall, A. Kévei, E. Tóth, R. Nagy, F. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, 309:630–3, 2005.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., et al. MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19:2225–2245, 2007.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15, 1990.
- Doyle MR, Davis SJ, Bastow RM, McWatters HG, Kozma-Bognar L, et al. The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 419:74–77, 2002.
- Edner, C. Li, J. Albrecht, T. Mahlow, S. Hejazi, M. Hussain, H. Kaplan, F. Guy, C. Smith, S.M. Steup, M. Ritte, G. Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial β -amylases. *Plant Physiology*, 145:17–28, 2007.
- Eklöf, J.M., Brumer, H. The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. *Plant Physiology*, 153: 456–466, 2010.
- Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C.S., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. Two-hybrid protein–protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *The Plant Journal*, 46:890–900, 2006.
- Espinoza, C., Degenkolbe, T., Caldana, C., Zuther, E., Leisse, A., Willmitzer, L., Hinch, D.K., Hannah, M.A. Interaction with diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in Arabidopsis. *PLoS One*, 23;5(11):e14101, 2010.
- Farré, E. M., Harmer, S. L., Harmon, F. G., Yanovsky, M. J., Kay, S. A. Overlapping and Distinct Roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Current Biology*, 15:47–54, 2005.
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant Journal*, 66(1):94-116, 2011.
- Fernández-Calvo, P. Chini, A. Fernández-Barbero, G. Chico, J.-M. Gimenez-Ibanez, S. Geerinck, J. Eeckhout, D. Schweizer, F. Godoy, M. Franco-Zorrilla, J.M. et al. The Arabidopsis bHLH Transcription

- Factors MYC3 and MYC4 Are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses. *Plant Cell*, 23:701–715, 2011.
- Fojtová, M. Peška, Y. Dobšáková, Z. Mozgová, I. Fajkus, J. Sýkorová, E. Molecular analysis of T-DNA insertion mutants identified putative regulatory elements in the *AtTERT* gene. *Journal of Experimental Botany*, 62(15):5531–5545, 2011.
- Fukazawa J1, Sakai T, Ishida S, Yamaguchi I, Kamiya Y, Takahashi Y. Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, 12(6):901-915, 2000.
- Gan, X., Stegle, O., Behr, J., Steffen, J.G., Drewe, P., Hildebrand KL, Lyngsoe R, Schultheiss SJ, Osborne EJ, Sreedharan VT, Kahles A, Bohnert R, Jean G, Derwent P, Kersey P, Belfield EJ, Harberd NP, Kemen E, Toomajian C, Kover PX, Clark RM, Rättsch G, Mott R. Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 28;477(7365):419-423, 2011.
- Gibon, Y. Bläsing, O. Palacios, N. Pankovic, D. Hendriks, J.H.M. Fisahn, J. Höhne, M. Günter, M. and Stitt, M. Adjustment of diurnal starch turnover to short days: A transient depletion of sugar towards the end of the night triggers a temporary inhibition of carbohydrate utilisation, leading to accumulation of sugars and post-translational activation of ADP glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant Journal*, 39:847–862, 2004.
- Gould, P.D. Locke, J.C. Larue, C. Southern, M.M. Davis, S.J. et al. The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 18:1177–87, 2006.
- Graf, A. Schlereth, A. Stitt, M. Smith, A.M. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:9458–63, 2010.
- Graf, A., Smith, A.M. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends in Plant Science*, 16(3):169-175, 2011.
- Guo, H.W. Ecker, J.R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 115:667–677, 2003.
- Gurr, S.J. Rushton, P.J. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? *Trends in Biotechnology*, 23:283–290, 2005.
- Gutiérrez, R.A. MacIntosh, G.C. Green, P.J. Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends in Plant Science*, 4:429–438, 1999.
- Gutiérrez, R.A. Ewing, R.M. Cherry, J.M. Green, P.J. Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17):11513-8, 2002.
- Gutiérrez, R.A. Stokes, T.L. Thum, K. Xu, X. Obertello, M. Katari, M.S. et al. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:4939–44, 2008.
- Guttman, M., Rinn, J.L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 15:339-346, 2012.

- Hardie, D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8:774–785, 2007.
- Harmer, S.L., Kay, S.A. Positive and Negative Factors Confer Phase-Specific Circadian Regulation of Transcription in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17:1926–1940, 2005.
- Harmer, S.L. The circadian system in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 60:357–77, 2009.
- Haydon, M.J. Bell, L.J. Webb, A.A.R. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *Journal of Experimental Botany*, 62:2333–48, 2011.
- Haydon, M.J. Hearn, T.J. Bell, L.J. Hannah, M.A. Webb, A.A. Metabolic regulation of circadian clocks. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(5):414-421, 2013a.
- Haydon, M.J. Mielczarek, O. Robertson, F.C. Hubbard, K.E. Webb, A.A. Photosynthetic *entrainment* of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature*, 502(7473):689-92, 2013b.
- Halford, N.G., and Hey, S.J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*, 419:247–259, 2009.
- Hanson, J., Smeekens, S. Sugar perception and signaling —an update. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:562–567, 2009.
- Havecker, E.R. Wallbridge, L.M. Hardcastle, T.J. Bush, M.S. Kelly, K.A. Dunn, R.M. Schwach, F. Doonan, J.H. Baulcombe, D.C. The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, 22(2):321-34, 2010.
- Hejazi, M. Fettke, J. Kottling, O. Zeeman, SC. Steup, M. The laforinlike dual-specificity phosphatase SEX4 from *Arabidopsis* hydrolyzes both C6- and C3-phosphate esters introduced by starch-related dikinases and thereby affects phase transition of α -glucans. *Plant Physiology*, 152:711-722, 2010.
- Hendriks, J.H. Kolbe, A. Gibon, Y. Stitt, M. Geigenberger, P. ADPglucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology*, 133: 838–849, 2003.
- Houseley, J. Tollervey, D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, 136:763–776, 2009.
- Hotta, C.T., Nishiyama, M.Y. Jr, Souza, G.M. Circadian rhythms of sense and antisense transcription in sugarcane, a highly polyploid crop. *PLoS One*, 6;8(8):e71847, 2013.
- Huang, W., Pérez-García, P., Pokhilko, A., Millar, A.J., Antoshechkin, I., Riechmann, J.L., Mas, P. Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*, 6;336(6077):75-79, 2012.
- Hsu, P.Y., Devisetty, U.K., Harmer, S.L. Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in *Arabidopsis*. *Elife*, 30;2:e00473, 2013.
- Jiang, Pugh B. F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature Reviews Genetics*, 10:161–172, 2009.
- Joshi, B. Lee, K. Maeder, D.L. Jagus, R. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evolutionary Biology*, 5:48, 2005.
- Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Current Opinion Cell Biology*, 20(3):253-9, 2008.

- Kaufmann, K., Pajoro, A., Angenent, G.C. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Natural Review Genetics*, 11(12):830-42, 2010.
- Kadam, U.S. Schulz, B. Lrudayaraj, J. Detection and quantification of alternative splice sites in *Arabidopsis* genes *AtDCL2* and *AtPTB2* with highly sensitive surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and gold nanoprobe. *FEBS Letters*, 588:1637–1643, 2014.
- Kaewthai, N. Gendre, D. Eklöf, J.M. Ibatullin, F.M. Ezcurra, I. Bhalerao, R.P. Brumer, H. Group III-A XTH genes of *Arabidopsis* encode predominant xyloglucan endohydrolases that are dispensable for normal growth. *Plant Physiology*, 161(1):440-54, 2013.
- Kang, S.G. Price, J. Lin, P.C. Hong, J.C. Jang, J.C. The *Arabidopsis* bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. *Molecular Plant*, 3(2):361-73, 2010.
- Kerwin, R.E. Jimenez-Gomez, J.M. Fulop, D. Harmer, S.L. Maloof, J.N. Kliebenstein, D.J. Network quantitative trait loci mapping of circadian clock outputs identifies metabolic pathway-to-clock linkages in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23:471–85, 2011.
- Kawakatsu, T. Takaiwa, F. Cereal seed storage protein synthesis: fundamental processes for recombinant protein production in cereal grains. *Plant Biotechnology Journal*, 8:939–953, 2010.
- Kim, J.Y. Song, H.R. Taylor, B.L. Carre, I.A. Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY. *EMBO Journal*, 22:935–44, 2003.
- Kurihara, Y. Matsui, A. Hanada, K. Kawashima, M. Ishida, J. Morosawa, T. Tanaka, M. Kaminuma, E. Mochizuki, Y. Matsushima, A. et al. Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:2453–2458, 2009.
- Lara, P. Onate-Sanchez, L. Abraham, Z. Ferrandiz, C. Diaz, I. Carbonero, P. Vicente-Carbajosa, J. Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by *ABI3* and two bZIPs related to OPAQUE2. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:21003-21011, 2003.
- Lai, A.G. Doherty, C.J. Mueller-Roeber, B. Kay, S.A. Schippers, J.H.M. Dijkwel, P.P. Circadian Clock-Associated 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109:17129–34, 2012.
- Lam, L.T. Pickeral, O.K. Peng, AC. Rosenwald A. Hurt EM. Giltneane JM. Averett LM. Zhao H. Davis RE. Sathyamoorthy M. et al. Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biology*, 2:1–11, 2001.
- Lamia, K.A. Sachdeva, U.M. DiTacchio, L. Williams, E.C. Alvarez, J.G. Egan, D.F. et al. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, 326:437–40, 2009.
- Lao N.T. Schoneveld O. Mould R.M. Hibberd J.M. Gray J.C. Kavanagh T.A. An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplasttargeted β -amylase. *Plant Journal*, 20:519–527, 1999.
- Lee, S.C.; Choi, H.W.; Hwang, I.S.; Choi, D.S.; Hwang, B.K. Functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor, CAbZIP1, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses. *Planta*, 224:1209–1225, 2006.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., and Cao, X. Histone Methylation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61:395–420, 2010.

- Liu, J. Jung, C. Xu, J. Wang, H. Deng, S. Bernad, L. Arenas-Huertero C, Chua N.H. Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24(11):4333-45, 2012.
- Liu, H. Min, Luo, Ji-kai Wen. mRNA stability in the nucleus. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 5:444-454, 2014.
- Lillo, C. Lea, U.S. Ruoff, P. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ*, 31:587–601, 2008.
- Loreti, E. Povero, G. Novi, G. Solfanelli, C. Alpi, A. Perata, P. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in Arabidopsis. *New Phytologist*, 179:1004–1016, 2008.
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*, 163: 16-20, 1987.
- Lu, Y. Gehan, J.P. Sharkey, T.D. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiology*, 38:2280–91, 2005.
- Maeo, K. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato, *Plant Molecular Biology*, 46:627–637, 2001.
- Maizel, A. Weigel, D. Temporally and spatially controlled induction of gene expression in Arabidopsis thaliana, *Plant Journal*, 38:164–171, 2004.
- Marquez, Y. Brown, J.W. Simpson, C. Barta, A. and Kalyna, M. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*, 22:1184–1195, 2012.
- Matioli, C.C. Tomaz, J.P. Duarte, G.T. Prado, F.M. Del Bem, L.E. Silveira, A.B. Gauer, L. Corrêa, L.G. Drumond, R.D. Viana, A.J.C. Di Mascio, P. Meyer, C. Vincentz M. The Arabidopsis bZIP Gene AtbZIP63 Is a Sensitive Integrator of Transient Abscisic Acid and Glucose Signals. *Plant Physiology*, 157: 692–705, 2011.
- Matsoukas, I. G. Massiah, A. J. Thomas, B. Starch Metabolism Has a Role in Juvenile-to-Adult Phase Transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environment*, doi: 10.1111/ pce. 12088, 2013.
- Massonnet, C. Vile, D. Fabre, J. et al. Probing the reproducibility of leaf growth and molecular phenotypes: a comparison of three Arabidopsis accessions cultivated in ten laboratories. *Plant Physiology*, 152:2142–2157, 2010.
- Martins, M.C. Hejazi, M. Fettke, J. Steup, M. Feil, R. Krause, U. Arrivault, S. Vosloh, D. Figueroa, C.M. Ivakov, A. Yadav, U.P. Piques, M. Metzner, D. Stitt, M. Lunn, J.E. Feedback inhibition of starch degradation in Arabidopsis leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology*, 163(3):1142-63, 2013.
- Martínez-Barajas, E. Delatte, T. Schlupepmann, H. de Jong, G.J. Somsen, G.W. Nunes, C. Primavesi, L.F. Coello, P. Mitchell, R.A.C. Paul, M.J. Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiology*, 156:373–381, 2011.

- Meister, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Review Genetics*, 14(7):447-59, 2013.
- Melotto, M. Mecey, C. Niu, Y. Chung, H.S. Katsir, L. Yao, J. Zeng, W. Thines, B. Staswick, P. Browse, J. et al. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *The Plant Journal*, 55:979–988, 2008.
- miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Kozomara A, Griffiths-Jones S. *NAR*, 39(Database Issue):D152-D157, 2011.
- Mittal, V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 5(5):355-65, 2004.
- Mitsuda, N. Ohme-Takagu, M. Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, 50:1232-1248, 2009.
- Monroe, J. D. Investigation of the Role of Arabidopsis β -amylase9 in Starch Metabolism. Poster: P02072, *Biochemical Processes and Macromolecular Structures*, In: *Plant Biology*, 2010.
- Mouchiroud, L. Eichner, L.J. Shaw, R.J. Auwerx J. Transcriptional Coregulators: Fine-Tuning Metabolism. *Cell Metab*, 30:1550-4131(14)00161-2, 2014.
- Mockler, T.C. Michael, T.P. Priest, H.D. Shen, R. Sullivan, C.M. Givan, S.A. et al. The DIURNAL project: diurnal and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: Clocks and Rhythms*, 72:353–63, 2007.
- Nakahata, Y. Sahar, S. Astarita, G. Kaluzova, M. Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, 324:654–7, 2009.
- Nakamichi N1, Kiba T, Kamioka M, Suzuki T, Yamashino T, Higashiyama T, Sakakibara H, Mizuno T. Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proc National Academic Science*, 16;109(42):17123-8, 2012.
- Newman, J.R., Keating, A.E. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science*, 27;300(5628):2097-2101, 2003.
- Nunes, C. O'Hara, L.E. Primavesi, L.F. Delatte, T.L. Schlupepmann, H. Somsen, G.W. Silva, A.B. Fevereiro, P.S. Wingler, A. Paul, M.J. The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiology*, 162(3):1720-32, 2013.
- O'Connor, T.R. Dyreson, C. Wyrick, J.J. "Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of Arabidopsis promoter sequences". *Bioinformatics*, 2005.
- Osterlund, M.T. Hardtke, C.S. Wei, N. Deng, X.W. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, 405:462–466, 2000.
- Patra, B. Schluttenhofer, C. Wu, Y. Pattanaik, S. Yuan, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1829(11):1236-47, 2013.
- Patrick, R. M. Mayberry, L. K. Choy G. Woodard L. E. Liu J. S. White A. Mullen R. A. Tanavin T. M. Latz C. A. Browning K. S. Two Arabidopsis thaliana loci encode novel eIF4E isoforms that are functionally distinct from the conserved plant eIF4E. *Plant Physiology*, 6, 2014.

Panda S, Poirier GG, Kay SA. *tej* defines a role for poly(ADP-ribosyl)ation in establishing period length of the Arabidopsis circadian oscillator. *Developmental Cell*, 3:51–61, 2002.

Paparelli, E., Parlanti, S., Gonzali, S., Novi G, Mariotti L, Ceccarelli N, van Dongen JT, Kölling K, Zeeman SC, Perata P. Nighttime Sugar Starvation Orchestrates Gibberellin Biosynthesis and Plant Growth in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(10):3760-9, 2013.

Patel, A. A., & Steitz, J. A. Splicing double: Insights from the second spliceosome. *Nature*, 4:960–970 2003.

Parry, G. Estelle, M. Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 18:152–156, 2006.

Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I., Weigel, D. A genetic framework for floral patterning. *Nature*, 8;395(6702):561-566, 1998.

Polge, C. Thomas, M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Science*, 12:20–28, 2007.

Potenza, C. Aleman, L. Sengupta-Gopalan, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation, *In Vitro Cellular e Developmental Biology. Plant*, 40:1–22, 2004.

Pokhilko A1, Fernández AP, Edwards KD, Southern MM, Halliday KJ, Millar AJ. The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular System Biology*, 6;8:574, 2012.

Rawat, R., Schwartz, J., Jones, M.A., Sairanen, I., Cheng, Y., Andersson, C.R., et al. REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proceedings National Academy Science*, 106:16883–8, 2009.

Riechmann JL, Ratcliffe OJ. A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(5):423-434, 2000.

Rolland, F. and Sheen, J. Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochemical Society Transactions*, 33:269–271, 2005.

Roslan, H.A. Salter, M.G. Wood, C.D. White MR. Croft KP. Robson F. Coupland G. Doonan J. Laufs P. Tomsett AB. Caddick, M.X. Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 28:225-235, 2001.

Rodrigues, A. Adamo, M. Crozet, P. Margalha L. Confraria A. Martinho C. Elias A. Rabissi A. Lumbreras V. González-Guzmán M. Antoni R. Rodriguez PL. Baena-González, E. ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(10):3871-84, 2013.

Roy, S. W. & Gilbert, W. The evolution of spliceosomal introns: Patterns, puzzles, and progress. *Nature Reviews Genetics*, 7:211–221, 2006.

Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C., Nishitani, K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiology*, 43:1421, 2002.

- Rushton, P.J.; Reinstadler, A.; V. Lipka, B. Lippok, I.E. Somssich, Synthetic plantpromoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling, *Plant Cell*, 14:749–762, 2002.
- Salome, P.A. McClung, C.R. PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, 17:791–803, 2005.
- Sadanandom, A. Bailey, M. Ewan, R. Lee, J. Nelis, S. The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytology*, 196:13–28, 2012.
- Sambrook, J., Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 1, 2, 3. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 2001.
- Satoh, R. Fujita, Y. Nakashima, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity- responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, 45: 309-317, 2004.
- Sancar, G. Brunner, M. Circadian clocks and energy metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Feb 2014.
- Santelia, D. Kotting, O. Seung D. Schubert M. Thalmann M. Bischof S. Meekins DA. Lutz A. Patron, N. Gentry, M.S. et al. The phosphoglucan phosphatase Like Sex Four 2 dephosphorylates starch at the C3-position in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23:4096-4111, 2011.
- Sanchez, S.E., Yanovsky, M.J. Time for a change. *Elife*. 30;2:e00791, 2013.
- Sasidharan, R., Pierik, R. Cell wall modification involving XTHs controls phytochrome-mediated petiole elongation in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behavior*, 5(11):1491-2, 2010.
- Shin, J. Heidrich, K. Sanchez-Villarreal, A. Parker, J.E. Davis, S.J. TIME FOR COFFEE represses accumulation of the MYC2 transcription factor to provide time-of-day regulation of jasmonate signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24(6):2470-82, 2012.
- Smith, A.M., Stitt, M. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environment*, 30:1126–1149, 2007.
- Solfanelli, C. Poggi, A. Loreti, E. Alpi, A. Perata, P. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 140(2):637-46, 2006.
- Staiger, D. Allenbach, L. Salathia N. Fiechter V. Davis SJ. et al. The Arabidopsis SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes Development*, 17:256–68, 2003.
- Stitt, M. Lilley, R.Mc.C. Gerhardt, R. Heldt, H.W. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymology*, 174:518–552, 1989.
- Stitt, M. Gibon, Y. Lunn, J.E. Piques M. Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. *Funct. Plant Biology*, 34:526–549, 2007.
- Stitt, M. Zeeman, S.C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:282–292, 2012.

- Silveira, A.B., Gauer, L., Pires Tomaz, J., Ramos Cardoso P, Carmello-Guerreiro S, Vincentz M. The Arabidopsis AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. *Plant Science* 172, 1148-1156, 2007.
- Song, Y.H., Yoo, C.M., Hong, A.P., Kim, S.H., Jeong, H.J., Shin, S.Y., Kim, H.J., Yun, D.J., Lim, C.O., Bahk JD, Lee SY, Nagao RT, Key JL, Hong, J.C. DNA-binding study identifies C-box and hybrid C/G-box or C/A-box motifs as high-affinity binding sites for STF1 and LONG HYPOCOTYL5 proteins. *Plant Physiology*, 146(4):1862-77, 2008.
- Stettler, M. Eicke, S. Mettler, T. Messerli G. Hörtensteiner S. Zeeman, S.C. Blocking the metabolism of starch breakdown products in Arabidopsis leaves triggers chloroplast degradation. *Molecular Plant*, 2:1233–1246, 2009.
- Streb, S., Zeeman, S.C. Starch metabolism in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*. 2012;10:e0160.
- Syed, N.H. Kalyna, M. Marquez, Y. Barta, A. and Brown, J.W. Alternative splicing in plants – coming of age. *Trends in Plant Science*, 17:616–623, 2012.
- Tabuchi, A. Mori, H. Kamisaka, S. & Hoson T. A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls. *Plant and Cell Physiology*, 42:154–161, 2001.
- Tian, L. Analysis and use of the tobacco eIF4A-10 promoter elements for transgene expression, *Journal of Plant Physiology*, 162:1355–1366, 2005.
- Tisné, S. Serrand, Y. Bach, L. Gilbault E. Ben Ameer R. Balasse H. Voisin R. Bouchez D. Durand-Tardif M. Guerche P. Chareyron, G. Da Rugna, J. Camilleri, C. Loudet, O. Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant Journal*, 74(3):534-44, 2013.
- Thimm, O., Blaesing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y. Stitt, M. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal*, 37(6):914-39, 2004.
- To, T. K., Kim, J. M. Epigenetic regulation of gene responsiveness in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 4, 2014.
- Trotta, A. Rahikainen, M. Konert, G. Finazzi, G. Kangasjärvi, S. Signalling crosstalk in light stress and immune reactions in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 369(1640):20130235, 2014.
- Usadel, B. Bläsing, O.E. Gibon, Y. Retzlaff, K. Hohne, M. Gunther, M. Stitt, M. Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes. *Plant Physiology*, 146:1834–1861, 2008.
- Ulm, R. Baumann, A. Oravec, A. Mate, Z. Adam, E. et al. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:1397–1402, 2004.
- Van Der Kelen, K., Beyaert, R., Inzé, D., De Veylder, L. Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 44(4):143-68, 2009.
- Vandesteene, L., Ramon, M., Le Roy, K., Van Dijck, P., Rolland, F. A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 3(2):406-19, 2010.

- Vierstra, R.D. The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10:385–397, 2009.
- Wang, Y. Zhang, W. Cao, J. McElroy D, Wu R. Characterization of cis-acting elements regulating transcription from the promoter of a constitutively active rice actin gene, *Molecular and Cellular Biology*, 12:3399–3406, 1992.
- Wang, S.M. Lue, W.L. Yu, T.S. Long, J.H. Wang, C.N. Eimert, K. & Chen J. Characterization of ADG1, an Arabidopsis locus encoding for ADPG pyrophosphorylase small subunit, demonstrates that the presence of the small subunit is required for large subunit stability. *The Plant Journal*, 13:63-70, 1998.
- Waterborg, J.H. Plant histone acetylation: in the beginning. *Biochim Biophys Acta*, 1809(8):353-9, 2011.
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*, 40(3):428-438, 2004.
- Wei, s. Gruber, M.Y. Yu, B. Gao, M-J. Khachatourians, G.G. Hegedus, D.D. Parkin, I.A.P. Hannoufa, A. Arabidopsis mutant sk156 reveals complex regulation of SPL15 in a miR156-controlled gene network. *BMC Plant Biology*, 12:169, 2012.
- Weltmeier, F. Ehlert, A. Mayer, C.S. Dietrich, K. Wang X. et al. Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO Journal*, 25:3133–3143, 2006.
- Weltmeier, F. Rahmani, F. Ehlert, A. Dietrich, K. Schütze K. Wang X. Chaban C. Hanson J. Teige M. Harter K. Vicente-Carbajosa J. Smeekens S. Dröge-Laser, W. Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Molecular Biology*, 69:107–119, 2009.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*, 27(6):581-90, 2001.
- Wingender, E. Chen, x. Hehl, R. Karas, H. Liebich, I. Matys, V. Meinhardt, T. Prub, M. Reuter I. Schacherer, F. Transfac: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Research*, 28:316-319, 2000.
- Wingler, A. Delatte, T.L. O'Hara, L.E. Primavesi, L.F. Jhurrea, D. Paul, M.J. Schlupepmann, H. Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiology*, 158(3):1241-51, 2012.
- Xu, M. Hu, T. McKim, S.M. Murmu, J. Haughn, G.W. Hepworth SR. Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 promote floral meristem fate and determinacy in a previously undefined pathway targeting APETALA1 and AGAMOUS-LIKE24. *Plant Journal*, 63(6):974-89, 2010.
- Yamashino, T. From a repressilator-based circadian clock mechanism to an external coincidence model responsible for photoperiod and temperature control of plant architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience Biotechnology Biochemist*, 77(1):10-6, 2013.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses, *Annual Review of Plant Biology*, 57:781–803, 2006.

- Yong-Qiang A, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant Journal*, 10(1):107-21, 1996.
- Yi, N. Analysis of the Wsi18, a stress-inducible promoter that is active in the whole grain of transgenic rice, *Transgenic Research*, 20:153–163, 2011.
- Yin, Y. Zhu, Q. Dai, S. Lamb, C. Beachy, R.N. RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *EMBO Journal*, 16:5247–5259, 1997.
- Yakir, E. Hilman, D. Hassidim, M. Green, R.M. *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1* transcript stability and the *entrainment* of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145:925–32, 2007.
- Zimmermann, P. Hirsch-Hoffmann, M. Hennig, L. Gruissem, W. GENEVESTIGATOR: Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, 136:2621–2632, 2005.
- Zimmermann, P. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 1–5, 2008.
- Zou, C. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:14992–14997, 2011.
- Zourelidou, M. Torres-Zabala, M. Smith, C. Bevan, M.W. Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression, *Plant Journal*, 30:489–497, 2002.
- Zhu, W. Schlueter, S. D. Brendel, V. Refined annotation of the Arabidopsis genome by complete expressed sequence tag mapping. *Plant Physiology*, 132:469–484, 2003.

Apêndice

Caracterização do transcrito do *AtbZIP63* no mutante *atbzip63-2*

A quantidade de mRNA *AtbZIP63* no mutante *atbzip63-2* está cerca de 8 vezes mais abundante no final da noite em plantas cultivadas sob fotoperíodo (Figura S1 A), e cerca de 64 vezes em plântulas submetidas a condições que resultam em estresse energético, como 24 h de cultivo em meio sem fonte de carbono e na escuridão (Figura S1 B) em comparação com o ecótipo Ws. Inicialmente levantamos a hipótese de que este maior acúmulo do transcrito poderia refletir um mecanismo transcricional de autorregulação negativa, que teria sido perdido no mutante *atbzip63-2*. Para avaliar esta hipótese quantificamos o mRNA do *AtbZIP63* em plantas da geração F2 oriundas da autofecundação de plantas da geração F1 do cruzamento entre o *atbzip63-2* e Ws. Observamos que a presença de um alelo selvagem nos heterozigotos não foi capaz de restaurar o nível de expressão do *AtbZIP63* ao nível do homozigoto selvagem (Figura S1 C). Este resultado mostra que o acúmulo de mRNA *AtbZIP63* no mutante *atbzip63-2* não envolve a perda de um mecanismo transcricional de autorregulação negativa.

O acúmulo do mRNA do *AtbZIP63* no mutante, pode também ser devido a alteração de uma regulação pós-transcricional que levaria a uma maior estabilidade do transcrito do alelo mutante. Sabemos que neste mutante o acúmulo de mRNA apenas está detectado para transcritos produzidos *downstream* à inserção do T-DNA que está localizado na posição 120 a partir do ATG (Figura S2 A). A obtenção de um amplicon com a combinação de primers para a sequência do T-DNA e parte do *AtbZIP63* a partir do cDNA indica a formação de um transcrito quimérico entre parte do T-DNA e parte do *AtbZIP63*.(Figura 7 B). É possível que este transcrito quimérico tenha perdido alguma informação em cis que seria importante para o controle da estabilidade do transcrito (Matiolli et al., 2011).

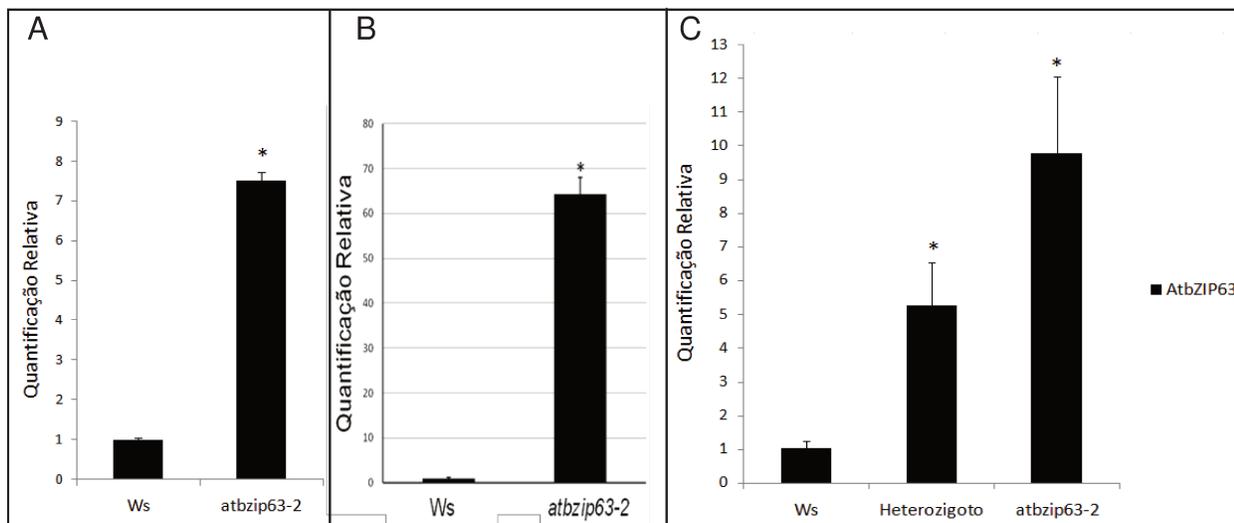


Figura S1. Acúmulo do mRNA do *AtbZIP63* no mutante *atbzip63-2*. **A:** O mRNA *AtbZIP63* está 8 vezes mais abundante em plantas do *atbzip63-2* comparado ao Ws no final da noite. **B:** Em plântulas mantidas por 24 h em condição de carência energética, o acúmulo do transcrito *AtbZIP63* é cerca de 64 vezes maior no mutante. **C:** Em plantas da geração F₂ oriundas da autofecundação de um F1 proveniente do cruzamento entre o mutante *atbzip63-2* e o ecótipo Ws, a presença de um alelo selvagem nos heterozigotos não promoveu a restauração no nível de expressão do *AtbZIP63* ao nível do selvagem, mostrando que a regulação da expressão de *AtbZIP63* não envolve a perda de um mecanismo de autorregulação negativa. A expressão de *AtbZIP63* foi quantificada por qRT-PCR. A diferença de expressão com o genótipo selvagem Ws foi considerada significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Para avaliar a estabilidade do transcrito quimérico *AtbZIP63* medimos a meia vida deste mRNA usando cordicepina para inibir a transcrição (Matiolli et al., 2011). A meia vida do transcrito do alelo selvagem *AtbZIP63* em Ws foi de 96 minutos (Figura S3), valor muito próximo ao observado no ecótipo Col-0 (95 min; Matiolli et al., 2011). Entretanto o transcrito *AtbZIP63* no mutante *atbzip63-2* apresentou uma meia vida bem superior, cerca de 18 h (Figura S3). Este resultado indica que o transcrito quimérico *AtbZIP63* do alelo *atbzip63-2* é mais estável que o transcrito do alelo selvagem. Possivelmente alguma sequência de regulação em *cis* na região 5' do mRNA *AtbZIP63* foi perdida no transcrito mutante. Este acúmulo de mRNA *downstream* à inserção do T-DNA, também foi observado em outros mutantes Flag em outros laboratórios (Fujtová et al., 2011), entretanto as causas do acúmulo do transcrito nestes mutantes Flag são pouco entendidos (Wei et al., 2012; Fujtová et al., 2011).

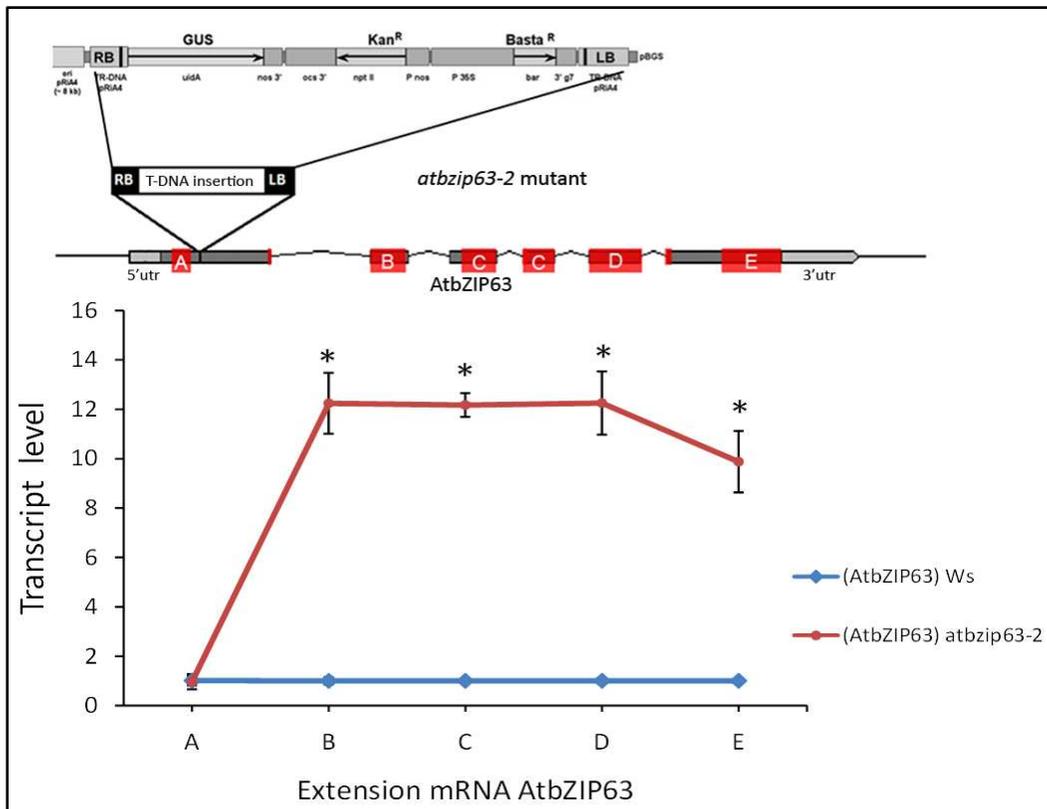


Figura S2. Perfil de expressão do alelo mutante *atbzip63-2*. **A:** Nível do transcrito *AtbZIP63* em diferentes localizações do gene *AtbZIP63* no mutante comparado com o TS. Verificamos que o nível do transcrito *upstream* à inserção do T-DNA (primer A) é igual no mutante e no TS. O acúmulo maior de mRNA começa *downstream* à inserção do T-DNA. O primer A ancora entre o 13° e 112° nucleotídeo do primeiro éxon, na região 5' *upstream* à inserção do T-DNA que está inserido no nucleotídeo 120° a partir do ATG. O primer B ancora entre a junção éxon-éxon do primeiro e segundo éxon até o final do segundo éxon. O primer C ancora entre o meio do terceiro éxon até a junção éxon-éxon do terceiro e quarto éxon. O primer D ancora entre a junção éxon-éxon do quarto e quinto éxon e começo do último éxon. E o primer E ancora entre o meio do último éxon até os últimos nucleotídeos antes do códon de terminação conforme está esquematizado na figura do gene acima. A diferença de expressão com o genótipo selvagem Ws foi significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

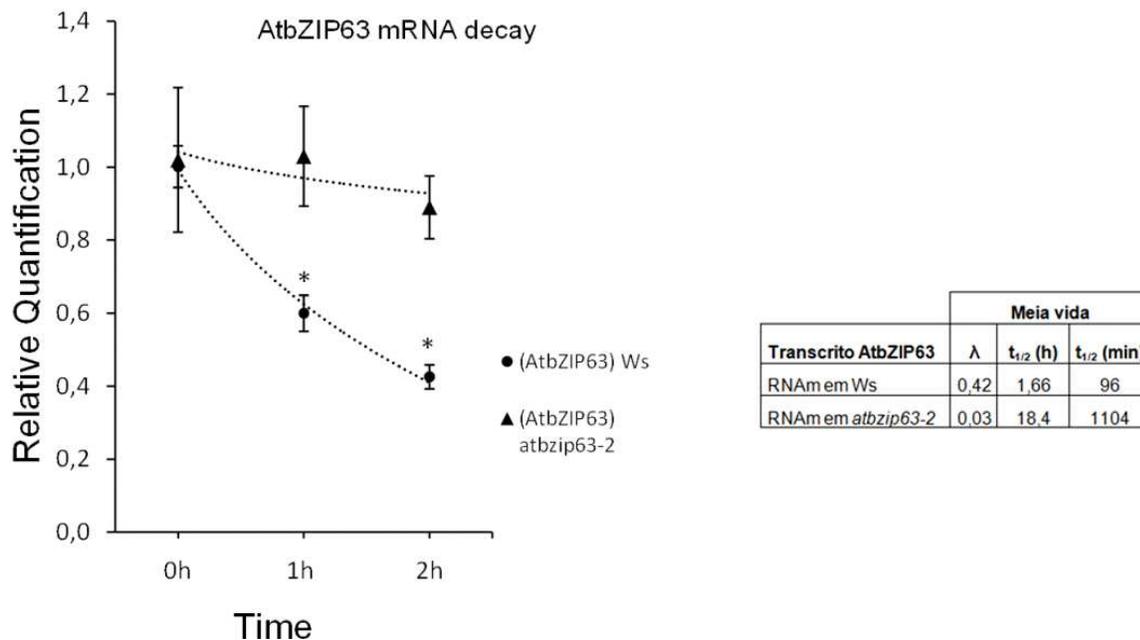


Figura S3. Cinética do decaimento e meia vida do mRNA *AtbZIP63* no mutante *atbzip63-2* e no TS. O transcrito mutante *atbzip63-2* apresenta uma maior estabilidade, possivelmente devido a alteração de alguma sequência de regulação em *cis* na parte da região 5' do mRNA. λ : constante de decaimento, $t_{1/2}$ (h): meia vida em horas, $t_{1/2}$ (min): meia vida em minutos.

Sabemos que Gli e ABA reprimem tanto a transcrição quanto a estabilidade do mRNA do alelo selvagem do *AtbZIP63*, e a combinação destes dois sinais promovem uma repressão sinérgica da expressão do *AtbZIP63* (Matiolli et al., 2011). Com o objetivo de verificar a influencia destes sinais na expressão do alelo mutante *atbzip63-2*, tratamos as plântulas do mutante e do TS com Gli, ABA, Mnt e a combinação de Gli+ABA. A repressão por Gli foi menos eficiente no mutante *atbzip63-2* comparado ao selvagem (fold -3 e -7 respectivamente, Figura S4). É importante destacar que apesar da perda na eficiência da repressão do alelo mutante, a Gli ainda apresenta um controle negativo sobre este alelo, indicando que a repressão transcricional pela Gli no mutante continua ativa.

Já a repressão por ABA nas plântulas do mutante *atbzip63-2* não foi estatisticamente diferente entre as amostras tratadas e o controle (Figura S4), indicando que no alelo *atbzip63-2* a resposta ao ABA

foi perdida. Devido a repressão por ABA ter sido praticamente anulada no alelo mutante *atbzip63-2*, a repressão sinérgica de *AtbZIP63* por Gli+ABA não foi reproduzida no mutante, sendo observado apenas a contribuição da Gli na repressão do alelo mutante no tratamento Gli+ABA (fold -3), enquanto que em Ws a repressão sinérgica da Gli+ABA foi mantida (fold -16, Figura S4).

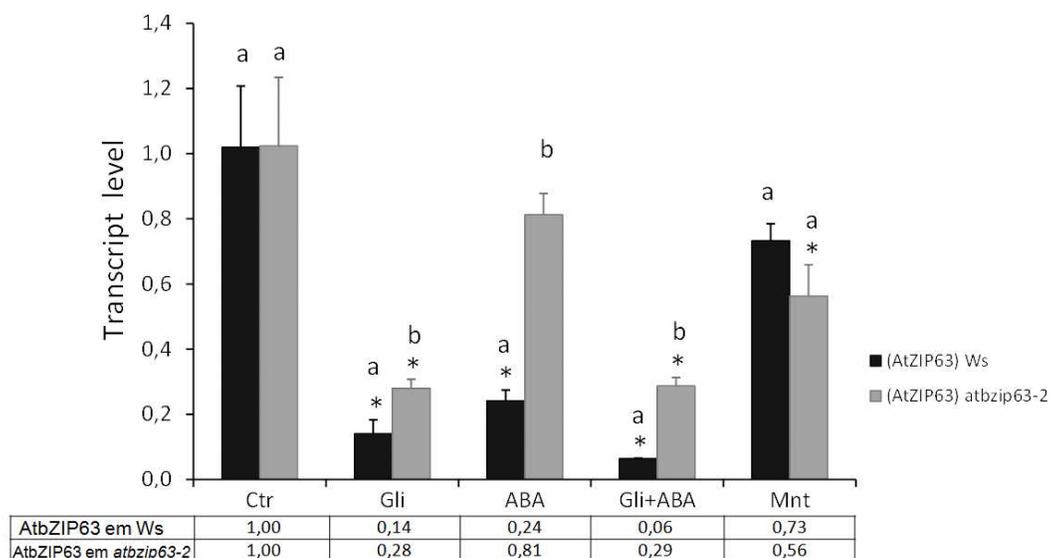


Figura S4. Resposta do alelo mutante *atbzip63-2* aos sinais Gli, ABA, Gli+ABA e Mnt. A repressão por Gli foi menos eficiente no mutante comparado ao selvagem. A repressão por ABA foi estatisticamente insignificante e a repressão sinérgica de *AtbZIP63* por Gli+ABA não foi reproduzida no mutante *atbzip63-2*. Os dados correspondem à média de três réplicas biológicas. * Corresponde a diferença estatística pelo teste T de Student ($p < 0,05$) das amostras tratadas em relação ao controle. Letras diferentes dentro de cada tratamento correspondem a diferença estatística significativa pelo teste T de Student ($p < 0,05$) entre o mutante e o TS. Mesma letra dentro de cada tratamento corresponde a diferença estatística não-significativa pelo teste T de Student ($p < 0,05$) entre o mutante e o TS.

Caracterização das linhagens silenciando ou expressando a fusão HA::VP16::AtbZIP63 e detecção da proteína fusão 35S:HA:VP16:AtbZIP63 por Western Blot

Obtivemos três linhagens expressando a fusão 35S:HA::VP16::AtbZIP63 sob controle do promotor 35S, no ecótipo selvagem Ws e duas no contexto mutante *atbzip63-2* com aumento na expressão do *AtbZIP63* variando entre uma a quatro vezes o nível do tipo selvagem (Figura S5 A e B),

e conseguimos detectar a proteína AtbZIP63 composta pela fusão traducional HA::VP16::AtbZIP63 em duas linhagens superexpressoras independentes (35S L5 e L15) por meio de *Western blot* com anticorpo específico que liga-se as etiquetas de HA (anti-HA F7, Santa Cruz Biotechnology Inc, Cat. N° sc-7392). Quanto as linhagens silenciando para o *AtbZIP63* por RNAi, obtivemos 12 linhagens em *Ws* com nível de silenciamento do *AtbZIP63* maior que 6 vezes (fold < -6) (Figura S5 B).

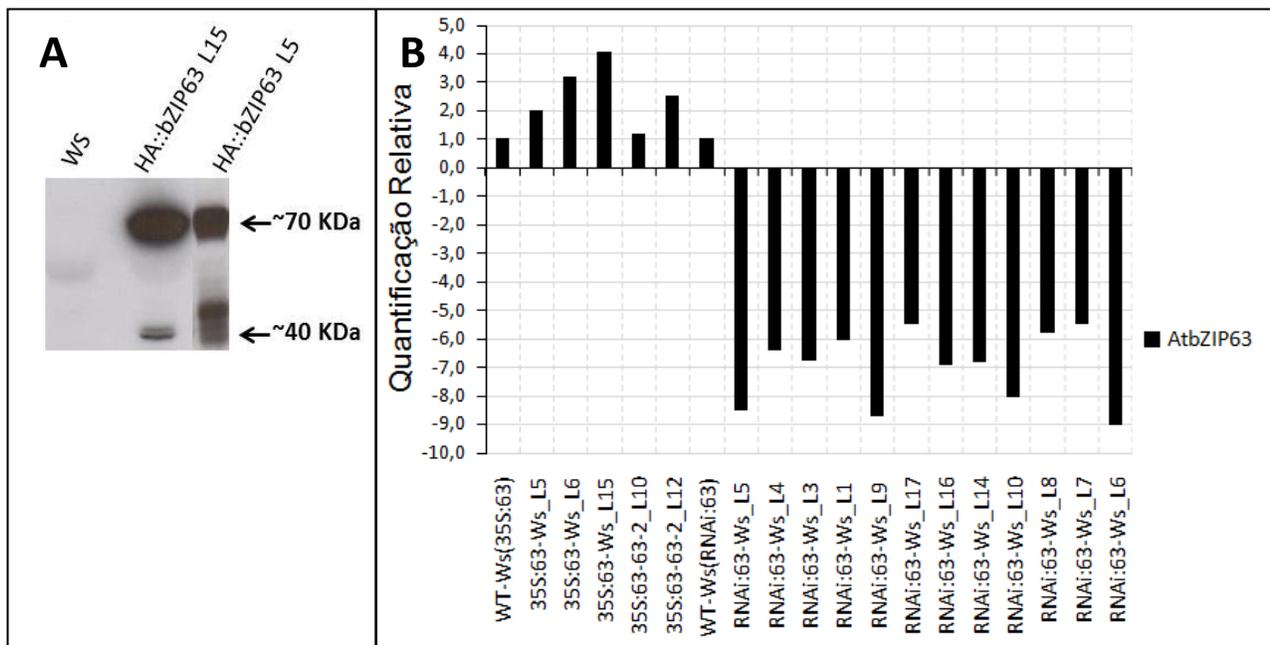


Figura S5. Quantificação do transcrito *AtbZIP63* em linhagens alteradas para o *AtbZIP63* e detecção da proteína fusão HA::VP16::AtbZIP63 em duas linhagens independentes (35S L5 e L15). **A.** Confirmação da expressão da fusão traducional HA::VP16::AtbZIP63 por meio de *Western blot* com anticorpo específico que liga-se as etiquetas de HA (anti-HA F7, Santa Cruz Biotechnology Inc, Cat. N° sc-7392). As bandas com tamanhos próximos de 40 KDa podem representar a forma monomérica da fusão traducional de AtbZIP63, enquanto a banda ao redor de 70 KDa poderia representar a forma dimérica. As diversas bandas observadas podem representar modificações pós-traducionais, enquanto a banda correspondente a 70 KDa poderia representar a forma dimérica da fusão traducional (possivelmente mediada por pontes dissulfeto) e/ou modificações pós-traducionais como sumoilação ou ubiquitinação (*Ws*: ecótipo selvagem *Wassilewskija* usado na geração das linhagens 35S L5 e L15). **B.** Nível do transcrito *AtbZIP63* em três linhagens no ecótipo *Ws* e duas linhagens no mutante *atbzip63-2* (linhagem complementada), expressando a fusão HA::VP16::AtbZIP63 sob controle do promotor 35S, detectado por qRT-PCR usando um primer para o VP16 e 12 linhagens silenciando para o *AtbZIP63* em *Ws*. A diferença de expressão com o genótipo selvagem *Ws* foi considerada significativa quando o teste T de Student apresentou um $p < 0,05$ (*).

Tabela Suplementar 1. Lista de primers utilizados para amplificação de sequências codificantes e regulatórias utilizadas nas construções gênicas, e para quantificar a expressão gênica via qRT-PCR.

Primer	Sequência	Função
PbZIP63-fw	gcggccgctctagaGTTTATGCAAGCTCAATG	Amplificar o promotor do <i>AtbZIP63</i> e inserir amplificado no vetor 999 ou pBI101 pelo sítio NotI/XbaI
PbZIP63-rv	actagtggatccCTTCTTATCCGATTGGGC	Amplificar o promotor do <i>AtbZIP63</i> e inserir amplificado no vetor 999 ou pBI101 pelo sítio SpeI/BamHI
IbZIP63-fw	aagcttggatccTCACTGGTCGGTAAATGG	Amplificar parte da sequência do <i>AtbZIP63</i> e inserir no vetor pHANNIBAL pelos sítios HindIII e KpnI
IbZIP63-rv	tctagactcgagCACTTGTATAGCACTGC	Amplificar parte da sequência do <i>AtbZIP63</i> e inserir no vetor pHANNIBAL pelos sítios XhoI e XbaI
CbZIP63-fw	tctagaATGGAAAAGTTTTCTCC	Amplificar o cDNA do <i>AtbZIP63</i> e inserir no vetor pBKS35HAVP16 pelo sítio XbaI
CbZIP63-rv	ggatccCTACTGATCCCCAACGCT	Amplificar o cDNA do <i>AtbZIP63</i> e inserir no vetor pBKS35HAVP16 pelo sítio BamHI
AtbZIP63gen-Fw	ATCTCCGGTAACCATCACTG	Genotipagem pela amplificação de parte do <i>AtbZIP63</i> . Ancora no 1º éxon do <i>AtbZIP63 upstream</i> á inserção do T-DNA.
AtbZIP63gen-Rv	CACCATTGTCAGATCTACCA	Genotipagem pela amplificação de parte de <i>AtbZIP63</i> . Ancora no 2º éxon do <i>AtbZIP63 downstream</i> á inserção do T-DNA.
FlagRb4	GGGTTGGGGTTTCTACAGAC	Genotipagem pela amplificação do local da inserção do T-DNA. Ancora na borda direita do T-DNA do Flag.
AtbZIP63a-Fw	TCTCCGACGAAGAAATCTCC	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora no 1º éxon do <i>AtbZIP63 upstream</i> á inserção do T-DNA.
AtbZIP63a-Rv	GTATGAAACGATTGAATGCCC	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora no 1º éxon do <i>AtbZIP63 upstream</i> á inserção do T-DNA.
AtbZIP63b-Fw	GGAACCTTTCATCAAACCTCAG	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora entre a junção éxon-éxon do primeiro e segundo éxon.
AtbZIP63b-Rv	CACTGCTCATCATTGGTGTAG	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora no final do segundo éxon.
AtbZIP63c-Fw	TGAACCCTACTAATGTAAACG	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora no meio do 3º éxon.
AtbZIP63c-Rv	CTGTGAAACTTGTGTCTCTAG	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora na junção éxon-éxon do 4º e 5º éxon.
AtbZIP63d-Fw	CTAGAGACACAAGTTTCACAG	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora na junção éxon-éxon do 4º e 5º éxon.
AtbZIP63d-Rv	CTTCACTGTCTCTTCAGCCAT	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora no começo do último éxon.
AtbZIP63e-Fw	GCAAGGCCTTGATAGGGTG	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora no meio do último éxon.

Tabela Suplementar 1. Continuação.

AtbZIP63e-Rv	CTGATCCCCAACGCTTCGAA	Quantificar expressão do <i>AtbZIP63</i> via qRT-PCR-PCR. Ancora no final do último éxon
XTH15/XTR7 Fw	AACACATCATATTCTTGGTGGA	Quantificar expressão do XTH15 via qRT-PCR-PCR.
XTH15/XTR7 Rv	AGTAGATCCTCATGGGTTGAC	Quantificar expressão do XTH15 via qRT-PCR-PCR.
XTH16 Fw	CCACAACACATCATATTTATGG	Quantificar expressão do XTH16 via qRT-PCR
XTH16 Rv	GTAGCCCAATCATCTGCAT	Quantificar expressão do XTH16 via qRT-PCR
XTH33 Fw	CTCCCACCATACTGTATTTTTG	Quantificar expressão do XTH33 via qRT-PCR
XTH33 Rv	GTTGACGGGGTACTTACCAC	Quantificar expressão do XTH33 via qRT-PCR
XTH27 Fw	CTCACATCATATTCTTTGTAGAC	Quantificar expressão do XTH27 via qRT-PCR
XTH27 Rv	GTTGCCCATTTAGAACCGTC	Quantificar expressão do XTH27 via qRT-PCR
XTH6 Fw	CACATTGTTTTTTACGTAGACG	Quantificar expressão do XTH6 via qRT-PCR
XTH6 Rv	CAGTCATCTGCTTCCCATAAT	Quantificar expressão do XTH6 via qRT-PCR
AT4G15620 Fw	ATGGAACACGAGGGCAAG	Quantificar expressão do AT4G15620 via qRT-PCR
AT4G15620 Rv	TAAGGAAGCTTAATAGCGTC	Quantificar expressão do AT4G15620 via qRT-PCR
ATEXLA2 Fw	ATACAGGAGAGTTCCTTGCG	Quantificar expressão do ATEXLA2 via qRT-PCR
ATEXLA2 Rv	TGTAAATGGCTACCACTTCAG	Quantificar expressão do ATEXLA2 via qRT-PCR
PRR7 Fw	TTCCGAAAGAAGGTACGATAC	Quantificar expressão do PRR7 via qRT-PCR
PRR7 Rv	GCTATCCTCAATGTTTTTTATGT	Quantificar expressão do PRR7 via qRT-PCR
PGM Fw	ACCTTTAATCGATCTTGCATTG	Quantificar expressão do PGM via qRT-PCR
PGM Rv	CATGTAATGACAGTGGGCTTC	Quantificar expressão do PGM via qRT-PCR
SEX1 Fw	CCTCTACGACAGTGACCAA	Quantificar expressão do GWD1/SEX1 via qRT-PCR
SEX1 Rv	TCCAGCGCGTGCAATGTCT	Quantificar expressão do GWD1/SEX1 via qRT-PCR
NCED4 Fw	GCGTTTCTCGGGAGATGTAG	Quantificar expressão do NCED4 via qRT-PCR
NCED4 Rv	TTACCAGGATCCCTAGCTAC	Quantificar expressão do NCED4 via qRT-PCR
PYL5 Fw	GAGGCTCGAGATCTTGGACG	Quantificar expressão do PYL5 via qRT-PCR
PYL5 Rv	CGCGTGTAGTGTCTCACC	Quantificar expressão do PYL5 via qRT-PCR
PYL8 Fw	CTCCTGTTTCATATTGTGTGGT	Quantificar expressão do PYL8 via qRT-PCR
PYL8 Rv	ACTGTACCAATCTCCATGTTTC	Quantificar expressão do PYL8 via qRT-PCR
BAM9 Fw N	GAGACCAATCACCTGAATC	Quantificar expressão do BAM9 via qRT-PCR
BAM9 Rv N	CGACTCCTTGTTTCTTGCAG	Quantificar expressão do BAM9 via qRT-PCR
At4G15620 Fw	TGTCGGCATTGTGTACAACA	Quantificar expressão do At4G15620 via qRT-PCR
At4G15620 Rv	TCTTGCTTCTTCTCCCCTG	Quantificar expressão do At4G15620 via qRT-PCR
At2g30600 Fw	AAAGCCTATGCGGGTACTTC	Quantificar expressão do At2g30600 via qRT-PCR
At2g30600 Rv	CTGATGTTCTTCGCCTAAGTC	Quantificar expressão do At2g30600 via qRT-PCR
At2G17880 Fw	AGAAACGCGCCGTTTATGAT	Quantificar expressão do At2G17880 via qRT-PCR
At2G17880 Rv	CTGATCGGTTTCCCAATTCC	Quantificar expressão do At2G17880 via qRT-PCR

Tabela Suplementar 1. Continuação.

BGAL4 Fw	TTAACCTGGTACAAGTCTACG	Quantificar expressão do BGAL4 via qRT-PCR
BGAL4 Rv	GACGTCCAATATTTCTACCG	Quantificar expressão do BGAL4 via qRT-PCR
At2G36130 Fw	CCTTGGATGGAAAACACACAA	Quantificar expressão do At2G36130 via qRT-PCR
At2G36130 Rv	CTGTCCGGTGTATCGGTTTG	Quantificar expressão do At2G36130 via qRT-PCR
WRKY33 Fw	CCAAATCCAAGAAGCTACTAC	Quantificar expressão do WRKY33 via qRT-PCR
WRKY33 Rv	GTTTCCCTTCGTAGGTTGTG	Quantificar expressão do WRKY33 via qRT-PCR
At4G24570 Fw	AAGACGGTTAAAGCGGAAGGA	Quantificar expressão do At4G24570 via qRT-PCR
At4G24570 Rv	CTTCCTAAGTCTGCTCCAACG	Quantificar expressão do At4G24570 via qRT-PCR
CBF2 Fw	GATGTTGGGGATGTCTAGTTT	Quantificar expressão do CBF2 via qRT-PCR
CBF2 Rv	ACGTCATCATCTCCCTCGA	Quantificar expressão do CBF2 via qRT-PCR
At4G27280 Fw	GTGCGTTGAATCAGATGGAG	Quantificar expressão do At4G27280 via qRT-PCR
At4G27280 Rv	TGAAGCCAAACTCCTCCTCAA	Quantificar expressão do At4G27280 via qRT-PCR
RT_PDF2 Fw	CATGTTCCAAACTCTTACCTG	Quantificar expressão do PDF2 via qRT-PCR
RT_PDF2 Rv	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	Quantificar expressão do PDF2 via qRT-PCR
Actin2 Fw	CGTACAACCGGTATTGTGCTGG	Quantificar expressão da Actina via qRT-PCR
Actin2 Rv	CTCTCTCTGTAAGGATCTTCATG	Quantificar expressão da Actina via qRT-PCR
ACS6 Fw	CGGGATGGTTTAGAGTATGTT	Quantificar expressão do ACS6 via qRT-PCR
ACS6 Rv	GCCATCATAGTTGTTGCAGC	Quantificar expressão do ACS6 via qRT-PCR
TMAC2 Fw	ATTCAGGAATGGAGAAGGCG	Quantificar expressão do TMAC2 via qRT-PCR
TMAC2 Rv	CTTGTTCCCTCCGTACCAGT	Quantificar expressão do TMAC2 via qRT-PCR
PAL2 Fw	AGCAAGTGTTACGTATGTG	Quantificar expressão do PAL2 via qRT-PCR
PAL2 Rv	AGATCGAAGTCACTGCATTC	Quantificar expressão do PAL2 via qRT-PCR
PWD Fw	AGAAACAATCAACAGCATAAGC	Quantificar expressão do PWD via qRT-PCR
PWD Rv	GATTGATTCATAGAGTCCTGC	Quantificar expressão do PWD via qRT-PCR
DPE2 Fw	ACTGGAGATACCGGTACA	Quantificar expressão do DPE2 via qRT-PCR
DPE2 Rv	CATTAGCAGGAACAGATCTTC	Quantificar expressão do DPE2 via qRT-PCR
AtSPS4F Fw	ACAAGCACTCAGGTATCTTTC	Quantificar expressão do AtSPS4F via qRT-PCR
AtSPS4F Rv	GAATGATGGTTTTGTGGAGGC	Quantificar expressão do AtSPS4F via qRT-PCR
AtSPS1F Fw	AGCTCTGAGGTATTTGTTTCG	Quantificar expressão do AtSPS1F via qRT-PCR
AtSPS1F Rv	TGCACGACACTCCCTTTAG	Quantificar expressão do AtSPS1F via qRT-PCR
At3G59940 Fw	GGAAGGTAATTATGGATACGAT	Quantificar expressão do At3G59940 via qRT-PCR
At3G59940 Rv	CGTCGTCTTCACCATCATC	Quantificar expressão do At3G59940 via qRT-PCR
At1G76410 Fw	ACATGGTTTCCACGTATCGT	Quantificar expressão do At1G76410 via qRT-PCR
At1G76410 Rv	GTAACCCGCCACATTTATGA	Quantificar expressão do At1G76410 via qRT-PCR
ATPK1 Fw	CAATACTGAAAGGGCTGCTG	Quantificar expressão do ATPK1 via qRT-PCR
ATPK1 Rv	CTTCTTCCAGTTTATCCCTTG	Quantificar expressão do ATPK1 via qRT-PCR

Tabela Suplementar 1. Continuação.

PDK1 Fw	TGATTCAAGATGGCAACAGTTT	Quantificar expressão do PDK1 via qRT-PCR
PDK1 Rv	CGGGTCGACATAGATCAGC	Quantificar expressão do PDK1 via qRT-PCR
PIF4 Fw	CACTGCAGTAAACTGATAAAG	Quantificar expressão do PIF4 via qRT-PCR
PIF4 Rv	ACTGCTGAGGTTGAACTCCG	Quantificar expressão do PIF4 via qRT-PCR
LHY Fw	AGAGGGTCGTATAGCGTTTC	Quantificar expressão do LHY via qRT-PCR
LHY Rv	GCAGCACAAGAATCCTGGC	Quantificar expressão do LHY via qRT-PCR
CCA1 Fw	GTCTGACGAGGGTCGAATT	Quantificar expressão do CCA1 via qRT-PCR
CCA1 Rv	CTGAGCTGTGAAGTTAAGATC	Quantificar expressão do CCA1 via qRT-PCR
PIP1A Fw	TGGGATGACCACTGGGTGT	Quantificar expressão do PIP1A via qRT-PCR
PIP1A Rv	TCTGGACTTGAAGGGGATG	Quantificar expressão do PIP1A via qRT-PCR
At4g26150 Fw	GGTCCCAAGTCTCTTTGTAA	Quantificar expressão do At4g26150 via qRT-PCR
At4g26150 Rv	CTTCTTCTTCATGACCGGTG	Quantificar expressão do At4g26150 via qRT-PCR
AtCKX7 Fw	CAAATCAAAGTGGGACAATCA	Quantificar expressão do AtCKX7 via qRT-PCR
AtCKX7 Rv	TGCTTCAACCCTATCCCTG	Quantificar expressão do AtCKX7 via qRT-PCR
CDF1 Fw	GAAGAAAAGAACCAAAACAAGA	Quantificar expressão do CDF1 via qRT-PCR
CDF1 Rv	GGTCCAATATCTCTGACAAG	Quantificar expressão do CDF1 via qRT-PCR
GBS1 Fw	TGATCACTGCTGGAGCTGAC	Quantificar expressão do GBS1 via qRT-PCR
GBS1 Rv	CCATATCTCATTGCGTGCAG	Quantificar expressão do GBS1 via qRT-PCR
KS Fw	CATACAAGGTTTTAAGAGAGAA	Quantificar expressão do KS via qRT-PCR
KS Rv	TCCCTCTTCTCTCTGCTAA	Quantificar expressão do KS via qRT-PCR

Tabela suplementar 2. Lista de genes diferencialmente expressos no mutante *atbzip63-2* no final da noite, classificados de acordo com a função biológica.

AGI	Fold	p. value	Anotação
Core central do relógio circadiano			
AT5G02810	-1,50	2,2E-02	PRR7 (<i>Pseudo-Response Regulator 7</i>), central core of the circadian clock, acts as transcriptional repressor of <i>CCA1</i> and <i>LHY</i>
Genes que respondem á estresse energético via KIN10 (reprimidos no <i>atbzip63-2</i>)			
AT1G02660	-2,99	1,20E-02	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G25400	-1,49	3,10E-02	Unknown protein [Arabidopsis thaliana]
AT1G54740	-2,95	2,30E-03	similar to structural constituent of ribosome [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G22110.1)
AT1G62510	-2,28	3,50E-02	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
AT1G68440	-1,63	4,44E-03	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G25400.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO42150.1)
AT1G69570	-1,68	2,30E-02	Dof-type zinc finger domain-containing protein, regulation of transcription
AT1G80920	-1,69	5,90E-03	DNAJ8; heat shock protein binding / unfolded protein binding, A nuclear encoded soluble protein found in the chloroplast stroma
AT2G17880	-3,08	6,00E-04	DNAJ heat shock protein, putative, photosynthetic efficiency, protein folding
AT2G30600	-7,36	8,20E-06	BTB/POZ domain-containing protein INVOLVED IN: cell adhesion
AT2G35170	-1,39	1,60E-02	Histone H3 K4-specific methyltransferase SET7/9 family protein
AT3G02140	-1,74	9,10E-03	TMAC2 (Two or More Abres-Containing Gene 2), Encodes a protein that acts in the nucleus and is an important negative regulator of ABA and salt stress responses, and could play a critical role in controlling root elongation, floral initiation and starch degradation
AT3G07350	-1,52	2,40E-03	unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G25240.1)
AT3G26510	-1,76	1,91E-02	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein
AT3G29240	-1,35	3,20E-02	Unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G33780.1)
AT3G47340	-4,21	4,40E-03	ASN1 (glutamine-dependent asparagine synthase 1)
AT3G47500	-1,44	8,00E-03	CDF3 (Cycling Dof Factor 3); DNA binding /transcription factor. Dof-type zinc finger domain-containing protein, identical to H-protein promoter binding factor-2a
AT3G57020	-1,56	9,13E-03	strictosidine synthase family protein
AT3G59940	-1,70	3,30E-02	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT3G61890	-1,65	3,10E-02	ATHB-12 (Arabidopsis Thaliana Homeobox Protein 12); transcription factor. Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein
AT4G03110	-1,38	2,98E-02	AtRBP-DR1_RBP-DR1_RNA-binding protein-defense related 1

Tabela Suplementar 2. Continuação.

AT4G35770	-1,76	2,20E-02	SEN1 (Dark Inducible 1), Senescence-associated gene that is strongly induced by phosphate starvation
AT4G37610	-2,69	6,30E-05	BT5 (BTB and TAZ domain protein 5); protein binding / transcription regulator
AT5G05440	-2,07	1,60E-02	PYL5 (Pyrabactin resistance1-Like 5), respond to ABA
AT5G18670	-2,00	6,71E-04	BAM9/BMY3 (Beta-Amylase 9); beta-amylase. Cellulose biosynthetic process
AT5G20250	-1,50	3,30E-02	DIN10 (Dark Inducible 10); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds. Encodes a member of glycosyl hydrolase family 36
AT5G41080	-1,86	3,20E-02	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein. Lipid metabolic process
AT5G49360	-1,47	3,40E-02	BXL1 (Beta-Xylosidase 1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds. Encodes a bifunctional {beta}-D-xylosidase/{alpha}-L-arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification
Genes que respondem á estresse energético via KIN10 (induzidos no <i>atbzip63-2</i>)			
AT1G28330	1,94	1,01E-02	DRM1_DYL1_dormancy-associated protein-like 1
AT1G45145	1,68	3,74E-02	ATH5_ATTRX5_LIV1_TRX5_thioredoxin H-type 5
AT2G18440	2,23	3,93E-03	Encodes a noncoding RNA, a member of an emerging class of transcripts that lack significant open reading frames and encode RNA as their final product.
AT2G31810	1,65	5,88E-03	ACT domain-containing small subunit of acetolactate synthase protein
AT2G33830	1,62	2,79E-02	Dormancy/auxin associated family protein
AT2G41250	1,37	2,46E-02	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT3G15620	1,47	2,24E-02	UVR3_DNA photolyase family protein
AT3G26170	1,60	1,70E-02	CYP71B19_cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 19
AT3G47430	1,36	4,83E-02	PEX11B_peroxin 11B
AT4G10120	1,87	1,27E-02	ATSPS4F_Sucrose-phosphate synthase family protein
AT4G35750	1,42	3,75E-02	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein
AT4G37760	1,46	3,52E-02	SQE3_squalene epoxidase 3
AT5G02020	2,04	1,45E-02	SIS_Encodes a protein involved in salt tolerance, names SIS (Salt Induced Serine rich).
AT5G23340	1,37	3,79E-02	RNI-like superfamily protein
AT5G56870	5,30	1,59E-03	BGAL4_beta-galactosidase 4
AT4G35750	1,43	3,75E-02	Rho-GTPase-activating protein-related
Genes relacionados ao metabolismo do amido			
AT5G51820	1,64	2,8E-03	PGM (<i>Phosphoglucomutase</i>)
AT1G10760	1,66	9,1E-03	SEX1 (<i>Starch Excess 1</i>)
AT5G18670	-2,00	6,7E-04	BAM9, BMY3 (<i>Beta-Amylase 9</i>); beta-amylase. Cellulose biosynthetic process
AT2G40840	1,48	5,9E-03	DPE2 (<i>Disproportionating Enzyme 2</i>); 4-alpha-glucanotransferase/ heteroglycan binding

Tabela Suplementar 2. Continuação.

AT5G20280	1,59	3,7E-02	ATSPS1F (<i>Sucrose Phosphate Synthase 1f</i>); sucrose-phosphate synthase/ transferase, transferring glycosyl groups
AT4G10120	1,87	1,3E-02	ATSPS4F; sucrose-phosphate synthase/ transferase, transferring glycosyl groups
AT1G32900	1,35	4,3E-02	GBSS1 (<i>Granule Bound Starch Synthase 1</i>)
AT5G26570	1,52	2,3E-02	PWD (<i>Phosphoglucan Water Dikinase</i>); catalytic
Extensão da parede celular			
AT4G14130	-8,04	1,40E-04	XTH15, (<i>Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase 15</i>) acting on glycosyl bonds, cell wall modification
AT3G23730	-2,07	4,70E-02	XTH16, (<i>Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase 16</i>) acting on glycosyl bonds, cell wall modification
AT1G10550	-1,69	2,2E-02	XTH33, (<i>Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase 33</i>), acting on glycosyl bonds cell wall modification
AT2G01850	-1,62	4,3E-02	XTH27, (<i>Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase 27</i>), acting on glycosyl bonds, cell wall modification
AT5G65730	-1,50	2,2E-02	XTH6, (<i>Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase 6</i>), acting on glycosyl bonds, cell wall modification
AT4G38400	-1,65	2,7E-03	ATEXLA2 (<i>Arabidopsis Thaliana Expansin-Like A2</i>), cell wall modification
AT1G69530	1,51	4,2E-02	ATEXPA1 (<i>ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1</i>), cell wall modification
AT2G37640	1,46	1,1E-02	ATEXPA3 (<i>ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A3</i>), cell wall modification
Genes de síntese e resposta a ABA			
AT4G19170	1,79	2,8E-03	NCED4 (<i>Nine-Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase 4</i>)
AT5G05440	-2,07	1,6E-02	PYL5 (<i>Pyrabactin resistance1-Like 5</i>), respond to ABA
AT5G53160	2,02	2,8E-03	PYL8 (<i>Pyrabactin resistance1-Like 8</i>), Encodes RCAR3, a regulatory component of ABA receptor. Interacts with protein phosphatase 2Cs ABI1 and ABI2, stimulates ABA signaling
AT3G02140	-1,74	9,1E-03	TMAC2 (<i>Two or More Abres-Containing Gene 2</i>), Encodes a protein that acts in the nucleus and is an important negative regulator of ABA and salt stress responses, and could play a critical role in controlling root elongation, floral initiation and starch degradation
AT5G62470	1,54	1,7E-02	MYB96 (myb domain protein 96); DNA binding / transcription factor
Genes de síntese e resposta a etileno			
AT4G11280	3,01	4,1E-02	ACS6 (<i>1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Synthase 6</i>)
AT1G62960	1,50	3,2E-02	ACS10 (<i>ACC Synthase 10</i>); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
AT5G51190	2,59	2,4E-02	AP2 domain-containing transcription factor, putative
AT2G38230	-2,66	6,3E-05	PDX1L4 (<i>Pyridoxine biosynthesis 1-like 4</i>), Encodes a protein involved in vitamin B6 biosynthesis

Tabela Suplementar 2. Continuação.

Genes de resposta a auxinas			
AT2G42620	-1,70	4,4E-03	MAX2 (<i>More Axillary Branches 2</i>); ubiquitin-protein ligase
AT2G46990	-1,34	3,2E-02	IAA20 (indoleacetic acid-induced protein 20); transcription factor. Encodes a member of the Aux/IAA family of proteins implicated in auxin signaling
AT1G28330	1,94	1,0E-02	DRM1 (<i>Dormancy-Associated Protein 1</i>)
Genes de resposta a citocininas			
AT4G26150	-1,90	2,3E-03	CGA1 (<i>Cytokinin-Responsive Gata Factor 1</i>); transcription factor
AT3G63440	-1,43	3,2E-02	ATCKX6/ATCKX7/CKX6 (<i>Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase 6</i>); cytokinin dehydrogenase
AT2G40670	1,61	2,2E-02	ARR16 (<i>Response Regulator 16</i>); transcription regulator/ two-component response regulator
Genes de resposta a Brassinosteróides			
AT3G30180	-2,00	1,3E-02	BR6OX2 (<i>Brassinosteroid-6-Oxidase 2</i>); monooxygenase/ oxygen binding. Encodes a cytochrome p450 enzyme that catalyzes the last reaction in the production of brassinolide.
AT1G76090	-2,30	4,3E-04	SMT3 (<i>s-adenosyl-methionine-sterol-c-methyltransferase 3</i>); S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, an enzyme in the sterol biosynthetic pathway
Gene de resposta a patógenos			
AT2G38470	3,99	2,2E-02	WRKY33 (<i>Wrky DNA-Binding Protein 33</i>); transcription factor
AT5G62470	1,54	1,7E-02	MYB96 (<i>Myb Domain Protein 96</i>); DNA binding / transcription factor
AT2G22540	1,53	8,80E-03	AGL22_SVP_K-box region and MADS-box transcription factor family protein

Tabela complementar 3. Lista de genes diferencialmente expressos na Linhagem RNAi L9 no final da noite, classificados de acordo com a função biológica.

AGI	Fold	p. value	Anotação
Core central do relógio circadiano			
AT5G02810	-1,49	2,6E-02	PRR7 (<i>Pseudo-Response Regulator 7</i>), central core of the circadian clock, acts as transcriptional repressor of <i>CCA1</i> and <i>LHY</i>
Genes que respondem á estresse energético via KIN10 (reprimidos na linhagem RNAi L9)			
AT4G35770	-15,29	7,4E-07	ATSEN1_DIN1_SEN1_SEN1_Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
AT3G47340	-14,52	3,1E-07	ASN1_AT-ASN1_DIN6_glutamine-dependent asparagine synthase 1
AT2G30600	-13,92	1,0E-06	BTB/POZ domain-containing protein
AT5G28770	-12,74	1,8E-06	AtbZIP63_BZO2H3_bZIP transcription factor family protein
AT4G37610	-11,07	1,8E-06	BT5_BTBT and TAZ domain protein 5
AT3G57520	-9,20	2,0E-06	AtSIP2_RS2_SIP2_seed imbibition 2
AT2G17880	-6,40	2,2E-06	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT1G54740	-5,76	6,9E-06	Protein of unknown function (DUF3049)
AT5G15190	-4,39	1,9E-05	unknown protein
AT1G02660	-3,77	6,9E-06	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT3G15450	-3,70	1,8E-05	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs
AT3G61060	-3,61	4,3E-05	AtPP2-A13_PP2-A13_phloem protein 2-A13
AT2G38210	-3,6	7,6E-06	PDX1L4_putative PDX1-like protein 4
AT5G22920	-3,56	1,9E-05	CHY-type/CTCHY-type/RING-type Zinc finger protein
AT5G20250	-3,47	8,4E-06	DIN10_RS6_Raffinose synthase family protein
AT3G48360	-3,44	1,1E-04	ATBT2_BT2_BTBT and TAZ domain protein 2
AT2G32150	-3,36	2,3E-05	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT5G56870	-3,34	1,8E-05	BGAL4_beta-galactosidase 4
AT5G41080	-3,26	6,3E-05	AtGDPD2_GDPD2_PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
AT3G30775	-3,23	9,7E-04	AT-POX_ATPDH_ATPOX_ERD5_PDH1_PRO1_PRODH_Methylenetetrahydrofolate reductase family protein
AT2G15890	-3,22	1,4E-04	MEE14_maternal effect embryo arrest 14
AT3G15630	-3,19	2,2E-05	unknown protein
AT2G40000	-3,15	8,4E-06	ATHSPRO2_HSPRO2_ortholog of sugar beet HS1 PRO-1 2
AT3G61890	-3,11	2,3E-05	ATHB-12_ATHB12_HB-12_homeobox 12
AT4G28040	-3,08	2,5E-04	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT1G03090	-3,08	1,1E-04	MCCA_methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial / 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1 (MCCA)
AT1G68440	-3,00	4,3E-05	unknown protein
AT1G80920	-2,89	1,9E-05	AtJ8_AtToc12_J8_Toc12_Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT5G16340	-2,9	2,3E-05	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
AT3G26740	-2,86	4,1E-05	CCL_CCR-like

Tabela Suplementar 3. Continuação.

AT2G38400	-2,79	6,8E-05	AGT3_alanine:glyoxylate aminotransferase 3
AT5G49360	-2,71	4,9E-05	ATBXL1_BXL1_beta-xylosidase 1
AT2G33830	-2,67	5,7E-05	Dormancy/auxin associated family protein
AT3G62550	-2,63	1,2E-04	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
AT5G06690	-2,62	7,0E-05	WCRKC1_WCRKC thioredoxin 1
AT1G79700	-2,59	2,5E-05	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT1G25400	-2,54	3,3E-02	unknown protein
AT5G21170	-2,53	9,3E-05	AKINBETA1_5'-AMP-activated protein kinase beta-2 subunit protein
AT4G27450	-2,52	4,9E-05	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs
AT3G13750	-2,48	1,8E-04	BGAL1_BGAL1_beta galactosidase 1
AT1G11260	-2,41	4,6E-05	ATSTP1_STP1_sugar transporter 1
AT5G19120	-2,41	8,0E-05	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT1G69570	-2,41	5,3E-05	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein
AT4G03510	-2,40	1,1E-04	ATRMA1_RMA1_RING membrane-anchor 1
AT2G35170	-2,39	1,7E-04	Histone H3 K4-specific methyltransferase SET7/9 family protein
AT2G25200	-2,37	1,8E-04	Plant protein of unknown function (DUF868)
AT3G47160	-2,36	1,6E-03	RING/U-box superfamily protein
AT5G18670	-2,28	1,2E-04	BAM9_BMY3_beta-amylase 3
AT5G59960	-2,25	5,1E-04	unknown protein
AT2G39400	-2,25	1,8E-03	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G23870	-2,24	5,7E-05	ATTPS9_TPS9_TPS9_trehalose-phosphatase/synthase 9
AT4G19420	-2,21	1,2E-03	Pectinacetyltransferase family protein
AT1G07040	-2,20	8,7E-04	unknown protein
AT3G49790	-2,17	8,9E-04	Carbohydrate-binding protein
AT3G15500	-2,15	2,1E-02	ANAC055_ATNAC3_NAC055_NAC3_NAC domain containing protein 3
AT3G52070	-2,14	3,3E-04	unknown protein
AT3G29240	-2,14	1,7E-04	Protein of unknown function (DUF179)
AT5G05440	-2,04	6,5E-04	PYL5_RCAR8_Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT3G13450	-2,02	1,9E-03	DIN4_Transketolase family protein
AT1G10140	-2,01	1,3E-02	Uncharacterised conserved protein UCP031279
AT3G21870	-2,01	2,2E-04	CYCP2;1_cyclin p2;1
AT1G53580	-2,01	1,9E-03	ETHE1_GLX2-3_GLY3_glyoxalase II 3
AT1G62510	-2,00	1,1E-03	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT5G52120	-2,00	1,4E-03	AtPP2-A14_PP2-A14_phloem protein 2-A14
AT2G40420	-2,00	4,2E-04	Transmembrane amino acid transporter family protein
AT1G80440	-1,98	4,3E-04	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein

AT5G49450	-1,98	7,5E-04	AtbZIP1_bZIP1_basic leucine-zipper 1
AT3G57020	-1,97	8,8E-04	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
AT3G14770	-1,97	4,9E-04	AtSWEET2_SWEET2_Nodulin MtN3 family protein
AT5G57560	-1,96	3,9E-02	TCH4_XTH22_Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family protein
AT1G58180	-1,95	3,4E-03	ATBCA6_BCA6_beta carbonic anhydrase 6
AT3G13710	-1,95	2,9E-04	PRA1.F4_prenylated RAB acceptor 1.F4
AT1G77210	-1,94	6,9E-03	AtSTP14_STP14_sugar transporter 14
AT4G38470	-1,94	2,7E-03	STY46_ACT-like protein tyrosine kinase family protein
AT2G44130	-1,92	2,1E-03	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT4G28290	-1,90	5,0E-04	unknown protein
AT5G55970	-1,90	3,2E-03	RING/U-box superfamily protein
AT1G35670	-1,90	2,5E-04	ATCDPK2_ATCPK11_CDPK2_CPK11_calcium-dependent protein kinase 2
AT3G45300	-1,90	1,1E-03	ATIVD_IVD_IVDH_isovaleryl-CoA-dehydrogenase
AT1G06570	-1,89	1,0E-03	HPD_HPPD_PDS1_phytoene desaturation 1
AT1G12780	-1,87	4,2E-04	ATUGE1_UGE1_UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 1
AT5G17300	-1,87	3,1E-04	RVE1_Homeodomain-like superfamily protein
AT1G60140	-1,85	2,0E-03	ATTPS10_TPS10_TPS10_trehalose phosphate synthase
AT2G20670	-1,85	5,4E-04	Protein of unknown function (DUF506)
AT4G38060	-1,84	9,7E-04	unknown protein
AT5G56100	-1,84	4,7E-04	glycine-rich protein / oleosin
AT2G03730	-1,83	4,3E-04	ACR5_ACT domain repeat 5
AT2G39980	-1,83	1,6E-02	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT3G06080	-1,83	5,0E-03	TBL10_Plant protein of unknown function (DUF828)
AT4G11360	-1,83	5,3E-04	RHA1B_RING-H2 finger A1B
AT1G28330	-1,82	3,2E-02	DRM1_DYL1_dormancy-associated protein-like 1
AT1G64500	-1,82	1,8E-03	Glutaredoxin family protein
AT1G03850	-1,81	8,7E-03	ATGRXS13_GRXS13_Glutaredoxin family protein
AT1G05340	-1,80	1,2E-02	unknown protein
AT4G28085	-1,79	2,7E-02	unknown protein
AT3G26510	-1,78	4,2E-03	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein
AT2G18700	-1,78	9,1E-04	ATTPS11_ATTPSB_TPS11_TPS11_trehalose phosphatase/synthase 11
AT3G02140	-1,77	5,1E-04	AFP4_TMAC2_AFP2 (ABI five-binding protein 2) family protein
AT1G03400	-1,77	4,0E-03	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G03610	-1,76	4,9E-04	Protein of unknown function (DUF789)
AT1G74840	-1,75	1,1E-03	Homeodomain-like superfamily protein
AT1G71030	-1,73	7,0E-04	ATMYBL2_MYBL2_MYB-like 2
AT3G10020	-1,73	3,9E-03	unknown protein;

AT4G28270	-1,72	2,4E-03	ATRMA2_RMA2_RING membrane-anchor 2
AT3G13062	-1,72	2,4E-03	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT1G69890	-1,72	7,7E-03	Protein of unknown function (DUF569)
AT1G70290	-1,71	1,7E-03	ATTPS8_ATTPSC_TPS8_trehalose-6-phosphatase synthase S8
AT3G07350	-1,70	2,9E-02	Protein of unknown function (DUF506)
AT4G13830	-1,69	1,3E-03	J20_DNAJ-like 20
AT3G51840	-1,69	2,3E-03	ACX4_ATG6_ATSCX_acyl-CoA oxidase 4
AT1G23390	-1,69	1,4E-03	Kelch repeat-containing F-box family protein
AT3G59940	-1,69	1,3E-03	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT5G45310	-1,69	5,8E-03	unknown protein
AT2G24550	-1,66	2,0E-03	unknown protein
AT2G45170	-1,66	1,9E-03	ATATG8E_ATG8E_AUTOPHAGY 8E
AT4G17080	-1,66	2,5E-03	Histone H3 K4-specific methyltransferase SET7/9 family protein
AT2G19800	-1,66	2,3E-02	MIOX2_myo-inositol oxygenase 2
AT5G52250	-1,66	6,6E-03	EFO1_RUP1_Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT3G06850	-1,65	2,2E-03	BCE2_DIN3_LTA1_2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein
AT2G39570	-1,63	8,0E-03	ACR9_ACT domain-containing protein
AT5G54080	-1,63	9,5E-03	HGO_homogentisate 1,2-dioxygenase
AT1G28260	-1,61	5,9E-03	Telomerase activating protein Est1
AT4G02075	-1,61	3,6E-03	PIT1_RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein
AT3G06780	-1,60	2,5E-03	glycine-rich protein
AT1G43670	-1,59	2,1E-03	AtcFBP_FBP_FINS1_Inositol monophosphatase family protein
AT5G04770	-1,58	6,5E-03	ATCAT6_CAT6_cationic amino acid transporter 6
AT5G18170	-1,58	2,3E-03	GDH1_glutamate dehydrogenase 1
AT5G24490	-1,58	1,5E-03	30S ribosomal protein, putative
AT5G04040	-1,57	1,9E-03	SDP1_Patatin-like phospholipase family protein
AT1G55510	-1,57	9,0E-03	BCDH BETA1_branched-chain alpha-keto acid decarboxylase E1 beta subunit
AT4G32870	-1,56	5,8E-03	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT1G63800	-1,56	7,6E-03	UBC5_ubiquitin-conjugating enzyme 5
AT5G57655	-1,55	5,4E-03	xylose isomerase family protein
AT4G25940	-1,55	1,0E-02	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
AT3G19580	-1,55	9,3E-03	AZF2_ZF2_zinc-finger protein 2
AT1G33055	-1,55	2,4E-02	unknown protein
AT5G59750	-1,54	8,0E-03	DHBP synthase RibB-like alpha/beta domain;GTP cyclohydrolase II
AT2G19810	-1,54	1,1E-02	AtOZF1_OZF1_CCCH-type zinc finger family protein
AT2G13360	-1,54	3,5E-03	AGT_AGT1_SGAT_alanine:glyoxylate aminotransferase
AT1G10150	-1,53	6,3E-03	Carbohydrate-binding protein

AT5G51390	-1,53	3,3E-02	unknown protein
AT2G38820	-1,52	2,4E-03	Protein of unknown function (DUF506)
AT5G23340	-1,52	4,3E-03	RNI-like superfamily protein
AT3G52060	-1,52	2,1E-02	Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
AT1G22890	-1,52	3,3E-03	unknown protein
AT2G40620	-1,52	3,4E-02	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
AT2G14170	-1,51	9,8E-03	ALDH6B2_aldehyde dehydrogenase 6B2
AT1G11530	-1,51	4,4E-03	ATCXXS1_CXXS1_C-terminal cysteine residue is changed to a serine 1
AT1G29760	-1,51	5,3E-03	Putative adipose-regulatory protein (Seipin)
AT5G51970	-1,50	3,6E-03	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
AT5G64240	-1,50	2,5E-03	AtMC3_AtMCP1a_MC3_MCP1a_metacaspase 3
AT5G02230	-1,50	1,7E-02	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT1G15740	-1,50	4,2E-03	Leucine-rich repeat family protein
AT3G03870	-1,49	6,8E-03	unknown protein;
AT2G04690	-1,49	1,5E-02	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein
AT1G22930	-1,49	3,9E-03	T-complex protein 11
AT1G42550	-1,49	4,9E-03	PMI1_plastid movement impaired1
AT5G63620	-1,48	1,0E-02	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
AT1G12240	-1,47	2,5E-02	ATBETAFRUCT4_VAC-INV_Glycosyl hydrolases family 32 protein
AT4G10925	-1,46	4,0E-03	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein
AT5G02020	-1,45	7,6E-03	SIS_Encodes a protein involved in salt tolerance, names SIS (Salt Induced Serine rich).
AT1G32170	-1,44	1,7E-02	XTH30_XTR4_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 30
AT5G24890	-1,44	6,5E-03	unknown protein
AT1G02816	-1,44	8,6E-03	Protein of unknown function, DUF538
AT5G57660	-1,43	1,4E-02	ATCOL5_COL5_CONSTANS-like 5
AT4G34030	-1,43	7,8E-03	MCCB_3-methylcrotonyl-CoA carboxylase
AT4G16520	-1,43	1,1E-02	ATG8F_Ubiquitin-like superfamily protein
AT3G49160	-1,43	1,3E-02	pyruvate kinase family protein
AT2G29340	-1,42	1,2E-02	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein
AT4G35750	-1,42	1,1E-02	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein
AT5G47390	-1,42	8,4E-03	myb-like transcription factor family protein
AT3G56140	-1,41	1,4E-02	Protein of unknown function (DUF399 and DUF3411)
AT2G35680	-1,41	8,5E-03	Phosphotyrosine protein phosphatases superfamily protein
AT1G34760	-1,41	1,0E-02	GF14 OMICRON_GRF11_RHS5_general regulatory factor 11
AT4G39070	-1,41	4,5E-02	B-box zinc finger family protein
AT2G46550	-1,41	1,0E-02	unknown protein
AT4G30270	-1,41	1,3E-02	MERI-5_MERI5B_SEN4_XTH24_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 24

AT1G13080	-1,41	8,9E-03	CYP71B2_cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 2
AT4G28030	-1,40	2,3E-02	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein
AT5G18630	-1,40	7,5E-03	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G28050	-1,39	2,3E-02	Cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein
AT1G60870	-1,39	9,3E-03	MEE9_maternal effect embryo arrest 9
AT1G18270	-1,38	1,1E-02	ketose-bisphosphate aldolase class-II family protein
AT1G66890	-1,38	1,0E-02	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown;
AT4G37330	-1,38	1,5E-02	CYP81D4_cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 4
AT1G72060	-1,37	3,3E-02	serine-type endopeptidase inhibitors
AT3G47430	-1,37	1,2E-02	PEX11B_peroxin 11B
AT5G24520	-1,36	3,9E-02	ATTTG1_TTG_TTG1_URM23_Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT3G47500	-1,36	1,7E-02	CDF3_cycling DOF factor 3
AT1G21400	-1,35	3,8E-02	Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein
AT4G19860	-1,35	1,4E-02	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT4G00355	-1,35	1,4E-02	unknown protein
AT3G16910	-1,34	2,1E-02	AAE7_ACN1_acyl-activating enzyme 7
AT2G35800	-1,34	2,2E-02	SAMTL_mitochondrial substrate carrier family protein
AT1G56220	-1,34	1,4E-02	Dormancy/auxin associated family protein
AT3G17470	-1,33	2,3E-02	ATCRSH_CRSH_Ca2+-activated RelA/spot homolog
AT3G57040	-1,33	3,4E-02	ARR9_ATRR4_response regulator 9
AT1G27100	-1,33	1,8E-02	Actin cross-linking protein
AT1G07110	-1,33	1,6E-02	ATF2KP_F2KP_FKFBP_fructose-2,6-bisphosphatase
AT4G08920	-1,32	2,9E-02	ATCRY1_BLU1_CRY1_HY4_OOP2_cryptochrome 1
AT5G47040	-1,32	1,5E-02	LON2_Ion protease 2
AT3G03150	-1,32	2,7E-02	unknown protein
AT5G49730	-1,31	2,1E-02	ATFRO6_FRO6_FRO6_ferric reduction oxidase 6
AT3G10740	-1,31	2,1E-02	ARAF_ARAF1_ASD1_ATASD1_alpha-L-arabinofuranosidase 1
AT1G80180	-1,31	4,1E-02	unknown protein
AT4G33666	-1,29	3,1E-02	unknown protein
AT1G01770	-1,29	2,2E-02	unknown protein
AT1G22985	-1,28	4,4E-02	CRF7_Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT5G02160	-1,28	3,0E-02	unknown protein
AT2G46220	-1,27	4,4E-02	Uncharacterized conserved protein (DUF2358)
AT3G15850	-1,23	4,6E-02	ADS3_FAD5_FADB_JB67_fatty acid desaturase 5
Genes que respondem á estresse energético via KIN10 (induzidos na linhagem RNAi L9)			
AT1G09200	1,36	1,2E-02	Histone superfamily protein
AT2G21970	1,30	3,9E-02	SEP2_stress enhanced protein 2

AT2G41540	1,42	3,9E-02	GPDHC1_6-phosphogluconate dehydrogenase family protein
AT3G16250	1,26	3,6E-02	NDF4_PnsB3_NDH-dependent cyclic electron flow 1
AT5G10390	1,38	2,6E-02	Histone superfamily protein
Genes relacionados ao metabolismo do amido			
At5g55700	-7,4	1,8E-06	BAM4_BMY6_beta-amylase 4
At5g18670	-2,3	1,2E-04	BAM9_BMY3_beta-amylase 3
At4g17090	-1,6	2,1E-03	BAM3_BMY8_CT-BMY_beta-amylase
At3g23920	-1,4	3,3E-02	BAM1_BMY7_TR-BAMY_beta-amylase 1
Extensão da parede celular			
At1g11545	1,7	6,9E-03	XTH8_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8
At2g36870	1,6	5,6E-03	XTH32_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32
At4g30290	1,5	8,0E-03	XTH19_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19
At1g65310	1,5	2,2E-02	XTH17_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 17
At2g28950	1,4	7,7E-03	AEXP6_ATEXPA6_ATHXP ALPHA 1.8_EXPA6_expansin A6
At2g39700	1,4	1,6E-02	AEXP4_ATEXPA4_ATHXP ALPHA 1.6_EXPA4_expansin A4
At5g57550	-4,3	1,3E-03	XTH25_XTR3_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 25
At1g02640	-2,7	9,2E-05	ATBXL2_BXL2_beta-xylosidase 2
At2g01850	-2,2	5,7E-05	XTH27_endoxyloglucan transferase A3
At5g57560	-2,0	3,9E-02	XTH22_Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family protein
At5g49360	-1,5	2,8E-03	ATBXL1_BXL1_beta-xylosidase 1
At1g32170	-1,4	1,7E-02	XTH30_XTR4_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 30
At4g30270	-1,4	1,3E-02	XTH24_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 24
Resposta a estímulo biótico e abiótico			
At5g10140	5,20	2,2E-03	AGL25_FLC_FLC_FLF_K-box region and MADS-box transcription factor family protein
At3g09440	2,75	4,9E-04	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
At5g61420	2,18	1,2E-04	AtMYB28_HAG1_MYB28_PMG1_myb domain protein 28
At1g55210	2,02	1,6E-03	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
At5g55920	2,00	5,5E-04	OLI2_S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
At1g71880	1,98	2,7E-03	ATSUC1_SUC1_sucrose-proton symporter 1
At1g01300	1,96	1,3E-03	Eukaryotic aspartyl protease family protein
At5g56030	1,94	2,4E-03	AtHsp90.2_ERD8_HSP81-2_HSP81.2_HSP90.2_heat shock protein 81-2
At5g56010	1,93	1,8E-04	AtHsp90-3_AtHsp90.3_HSP81-3_Hsp81.3_heat shock protein 81-3
At1g53230	1,90	1,4E-02	TCP3_TEOSINTE BRANCHED 1, cycloidea and PCF transcription factor 3
At3g17390	1,87	4,5E-04	MAT4_MTO3_SAMS3_S-adenosylmethionine synthetase family protein
At1g18590	1,83	2,3E-02	ATSOT17_ATST5C_SOT17_sulfotransferase 17
At3g03770	1,83	5,0E-03	Leucine-rich repeat protein kinase family protein

At4g39260	1,80	1,1E-03	ATGRP8_CCR1_GR-RBP8_GRP8_cold, circadian rhythm, and RNA binding 1
At1g75780	1,78	1,9E-02	TUB1_tubulin beta-1 chain
At3g24440	1,77	1,9E-03	VIL1_VRN5_Fibronectin type III domain-containing protein
At5g20700	1,77	8,3E-04	Protein of unknown function (DUF581)
At4g20270	1,77	1,3E-03	BAM3_Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
At5g63770	1,76	2,3E-02	ATDGK2_DGK2_diacylglycerol kinase 2
At3g49670	1,75	8,6E-04	BAM2_Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
At4g16370	1,74	5,0E-04	ATOPT3_OPT3_OPT3_oligopeptide transporter
At4g19120	1,73	7,5E-04	ERD3_S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
At4g26780	1,72	2,9E-02	AR192_MGE2_Co-chaperone GrpE family protein
At1g15510	1,68	8,5E-04	ATECB2_ECB2_VAC1_Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
At5g18820	1,66	7,0E-03	Cpn60alpha2_EMB3007_TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
At1g65060	1,66	2,0E-02	4CL3_4-coumarate:CoA ligase 3
At1g31180	1,65	9,5E-03	ATIMD3_IMD3_IPMDH1_isopropylmalate dehydrogenase 3
At5g14200	1,65	9,5E-03	ATIMD1_IMD1_isopropylmalate dehydrogenase 1
At2g22360	1,65	2,0E-03	DNAJ heat shock family protein
At5g56040	1,63	7,7E-03	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
At5g61240	1,62	2,8E-03	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At2g20610	1,62	9,8E-03	ALF1_HLS3_RTY_RTY1_SUR1_Tyrosine transaminase family protein
At1g77690	1,62	1,3E-02	LAX3_like AUX1 3
At1g12110	1,61	1,3E-03	ATNRT1_B-1_CHL1_CHL1-1_NRT1_NRT1.1_nitrate transporter 1.1
At4g36180	1,60	1,1E-02	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
At5g54660	1,59	1,8E-02	HSP20-like chaperones superfamily protein
At1g28010	1,58	1,2E-02	ABCB14_ATABCB14_MDR12_PGP14_P-glycoprotein 14
At1g59740	1,58	1,6E-03	Major facilitator superfamily protein
At5g06460	1,57	9,2E-03	ATUBA2_UBA 2_ubiquitin activating enzyme 2
At3g14210	1,56	1,9E-03	ESM1_epithiospecifier modifier 1
At3g61670	1,55	4,6E-02	Protein of unknown function (DUF3133)
At2g36880	1,53	3,2E-03	MAT3_methionine adenosyltransferase 3
At1g78080	1,53	3,5E-03	RAP2.4_WIND1_related to AP2 4
At2g16660	1,53	2,4E-02	Major facilitator superfamily protein
At1g16970	1,52	2,6E-02	ATKU70_KU70 homolog
At1g14980	1,52	3,5E-03	CPN10_chaperonin 10
At3g44450	1,51	2,6E-02	unknown protein
At2g28790	1,51	8,2E-03	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
At4g37910	1,51	3,7E-03	mtHsc70-1_mitochondrial heat shock protein 70-1
At4g30400	1,51	7,4E-03	RING/U-box superfamily protein

At2g03070	1,51	3,5E-02	MED8_mediator subunit 8
At2g36830	1,51	6,9E-03	GAMMA-TIP_GAMMA-TIP1_TIP1;1_gamma tonoplast intrinsic protein
At3g22310	1,50	4,3E-03	ATRH9_PMH1_putative mitochondrial RNA helicase 1
At3g22330	1,50	4,3E-03	ATRH53_PMH2_putative mitochondrial RNA helicase 2
At5g62440	1,49	2,6E-02	Protein of unknown function (DUF3223)
At4g13770	1,48	6,5E-03	CYP83A1_REF2_cytochrome P450, family 83, subfamily A, polypeptide 1
At5g49480	1,48	4,0E-03	ATCP1_CP1_Ca2+-binding protein 1
At3g07590	1,48	1,5E-02	Small nuclear ribonucleoprotein family protein
At4g28200	1,48	4,8E-03	molecular_function unknown
At5g53460	1,48	7,0E-03	GLT1_NADH-dependent glutamate synthase 1
At1g55920	1,47	9,8E-03	ATSERAT2;1_SAT1_SAT5_SERAT2;1_serine acetyltransferase 2;1
At1g17840	1,47	5,9E-03	ABCG11_AtABCG11_ATWBC11_COF1_DSO_WBC11_white-brown complex homolog protein 11
At2g29120	1,47	4,7E-02	ATGLR2.7_GLR2.7_GLR2.7_glutamate receptor 2.7
At5g09590	1,46	8,0E-03	HSC70-5_MTHSC70-2_mitochondrial HSO70 2
At3g23000	1,46	1,2E-02	ATSR2_ATSRPK1_CIPK7_PKS7_SnRK3.10_CBL-interacting protein kinase 7
At1g10522	1,45	1,3E-02	unknown protein
At3g23810	1,45	5,9E-03	ATSAHH2_SAHH2_S-adenosyl-l-homocysteine (SAH) hydrolase 2
At3g51800	1,45	5,4E-03	ATEBP1_ATG2_EBP1_metallopeptidase M24 family protein
At2g30860	1,45	1,8E-02	ATGSTF7_ATGSTF9_GLUTTR_GSTF9_glutathione S-transferase PHI 9
At5g66920	1,45	4,0E-02	sks17_SKU5 similar 17
At1g55900	1,45	1,8E-02	EMB1860_TIM50_Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
At1g24020	1,45	1,2E-02	MLP423_MLP-like protein 423
At3g25230	1,44	3,4E-02	ATFKBP62_FKBP62_ROF1_rotamase FKBP 1
At4g18040	1,44	7,7E-03	AT.EIF4E1_CUM1_EIF4E_eIF4E1_eukaryotic translation initiation factor 4E
At3g15020	1,44	3,3E-02	mMDH2_Lactate/malate dehydrogenase family protein
At2g28950	1,44	7,7E-03	ATEXP6_ATEXPA6_ATHXP ALPHA 1.8_EXPA6_expansin A6
At3g02260	1,44	1,6E-02	ASA1_BIG_CRM1_DOC1_LPR1_TIR3_UMB1_auxin transport protein (BIG)
At1g78370	1,44	2,4E-02	ATGSTU20_GSTU20_glutathione S-transferase TAU 20
At4g36250	1,44	4,2E-03	ALDH3F1_aldehyde dehydrogenase 3F1
At5g23860	1,44	9,4E-03	TUB8_tubulin beta 8
At3g28910	1,43	7,1E-03	ATMYB30_MYB30_myb domain protein 30
At1g04120	1,43	6,5E-03	ABCC5_ATABCC5_ATMRP5_MRP5_MRP5_multidrug resistance-associated protein 5
At5g15950	1,43	9,2E-03	Adenosylmethionine decarboxylase family protein
At3g03780	1,43	8,1E-03	ATMS2_MS2_methionine synthase 2
At5g17920	1,43	8,1E-03	ATCIMS_ATMETS_ATMS1_Cobalamin-independent synthase family protein
At2g35040	1,43	2,0E-02	AICARFT/IMPCHase bienzyme family protein
At5g19320	1,43	5,0E-03	RANGAP2_RAN GTPase activating protein 2

At2g41540	1,42	3,9E-02	GPDHC1_6-phosphogluconate dehydrogenase family protein
At5g48500	1,42	1,8E-02	unknown protein
At1g09780	1,42	1,0E-02	iPGAM1_Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent
At4g12730	1,42	1,6E-02	FLA2_FASCICLIN-like arabinogalactan 2
At3g55605	1,42	3,3E-02	Mitochondrial glycoprotein family protein
At2g29550	1,42	2,4E-02	TUB7_tubulin beta-7 chain
At2g30080	1,42	4,5E-02	ATZIP6_ZIP6_ZIP metal ion transporter family
At2g38280	1,41	1,1E-02	ATAMPD_FAC1_AMP deaminase, putative / myoadenylate deaminase, putative
At2g43130	1,41	9,4E-03	ARA-4_ARA4_ATRAB11F_ATRABA5C_RABA5C_P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
At2g36530	1,41	7,0E-03	ENO2_LOS2_Enolase
At5g61780	1,41	2,8E-02	AtTudor2_TSN2_Tudor2_TUDOR-SN protein 2
At5g44650	1,40	7,8E-03	AtCEST_CEST_Y3IP1_Encodes a chloroplast protein that induces tolerance to multiple environmental stresses and reduces photo oxidative damage.
At5g12080	1,40	1,5E-02	ATMSL10_MSL10_mechanosensitive channel of small conductance-like 10
At1g77510	1,40	4,9E-02	ATPDI6_ATPDIL1-2_PDI6_PDIL1-2_PDI-like 1-2
At1g77760	1,40	7,9E-03	GNR1_NIA1_NR1_nitrate reductase 1
At2g35620	1,40	1,3E-02	FEI2_Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At3g28040	1,40	1,7E-02	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
At4g22010	1,40	7,3E-03	sks4_SKU5 similar 4
At4g00020	1,39	3,5E-02	BRCA2(IV)_BRCA2A_EDA20_MEE43_BREAST CANCER 2 like 2A
At4g13850	1,39	7,2E-03	ATGRP2_GR-RBP2_GRP2_glycine-rich RNA-binding protein 2
At2g45280	1,39	3,3E-02	ATRAD51C_RAD51C_RAS associated with diabetes protein 51C
At1g28440	1,39	1,7E-02	HSL1_HAESA-like 1
At2g27040	1,39	1,9E-02	AGO4_OCP11_Argonaute family protein
At1g20840	1,38	4,5E-02	AtTMT1_TMT1_tonoplast monosaccharide transporter1
At5g49910	1,38	1,0E-02	cpHsc70-2_HSC70-7_chloroplast heat shock protein 70-2
At3g13510	1,38	1,6E-02	Protein of Unknown Function (DUF239)
At3g51870	1,38	1,1E-02	Mitochondrial substrate carrier family protein
At1g30530	1,38	3,9E-02	UGT78D1_UDP-glucosyl transferase 78D1
At1g15100	1,38	1,7E-02	RHA2A_RING-H2 finger A2A
At3g47450	1,37	1,3E-02	ATNOA1_ATNOS1_NOA1_NOS1_RIF1_P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
At1g12460	1,37	4,6E-02	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At1g02205	1,37	1,5E-02	CER1_Fatty acid hydroxylase superfamily
At4g36020	1,37	1,0E-02	CSDP1_cold shock domain protein 1
At5g20630	1,37	1,8E-02	ATGER3_GER3_GLP3_GLP3A_GLP3B_germin 3
At1g13930	1,36	1,3E-02	Involved in response to salt stress. Knockout mutants are hypersensitive to salt stress.
At1g53240	1,36	1,1E-02	mMDH1_Lactate/malate dehydrogenase family protein

At5g15450	1,36	2,1E-02	APG6_AtCLPB3_CLPB-P_CLPB3_casein lytic proteinase B3
At4g39960	1,36	9,5E-03	Molecular chaperone Hsp40/DnaJ family protein
At2g30870	1,36	4,5E-02	ATGSTF10_ATGSTF4_ERD13_GSTF10_glutathione S-transferase PHI 10
At4g01560	1,36	3,2E-02	MEE49_Ribosomal RNA processing Brix domain protein
At3g12610	1,36	5,0E-02	DRT100_Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At2g21660	1,36	4,5E-02	ATGRP7_CCR2_GR-RBP7_GRP7_cold, circadian rhythm, and rna binding 2
At1g63940	1,36	8,6E-03	MDAR6_monodehydroascorbate reductase 6
At4g01070	1,36	3,9E-02	GT72B1_UGT72B1_UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
At5g61790	1,35	2,9E-02	ATCNX1_CNX1_calnexin 1
At3g52740	1,35	3,3E-02	unknown protein
At1g62740	1,35	1,9E-02	Hop2_stress-inducible protein, putative
At3g60240	1,35	3,5E-02	CUM2 EIF4G_eukaryotic translation initiation factor 4G
At3g02650	1,35	3,5E-02	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
At5g62680	1,35	4,5E-02	Major facilitator superfamily protein
At1g14920	1,35	3,9E-02	GAI_RGA2_GRAS family transcription factor family protein
At5g28540	1,3	1,1E-02	BIP1_heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
At5g42020	1,34	1,1E-02	BIP_BIP2_Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
At1g33440	1,34	2,4E-02	Major facilitator superfamily protein
At5g16000	1,34	2,7E-02	NIK1_NSP-interacting kinase 1
At1g07720	1,34	4,0E-02	KCS3_3-ketoacyl-CoA synthase 3
At2g25620	1,34	1,6E-02	AtDBP1_DBP1_DNA-binding protein phosphatase 1
At1g66070	1,34	2,4E-02	Translation initiation factor eIF3 subunit
At1g64790	1,34	2,7E-02	ILA_ILITYHIA
At5g37770	1,33	1,3E-02	CML24_TCH2_EF hand calcium-binding protein family
At3g01720	1,33	3,8E-02	unknown protein
At4g36220	1,33	3,2E-02	CYP84A1_FAH1_ferulic acid 5-hydroxylase 1
At1g74560	1,33	2,9E-02	NRP1_NAP1-related protein 1
At2g20000	1,32	2,2E-02	CDC27b_HBT_CDC27 family protein
At4g02680	1,32	3,3E-02	EOL1_ETO1-like 1
At1g22410	1,32	3,2E-02	Class-II DAHP synthetase family protein
At1g04190	1,32	4,4E-02	TPR3_Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
At3g47520	1,32	2,4E-02	MDH_pNAD-MDH_malate dehydrogenase
At5g63840	1,32	2,1E-02	PSL5_RSW3_Glycosyl hydrolases family 31 protein
At2g37630	1,32	4,6E-02	AS1_ATMYB91_ATPHAN_MYB91_myb-like HTH transcriptional regulator family protein
At4g12880	1,32	3,9E-02	AtENODL19_ENODL19_early nodulin-like protein 19
At3g24503	1,32	3,8E-02	ALDH1A_ALDH2C4_REF1_aldehyde dehydrogenase 2C4
At3g22780	1,32	1,5E-02	ATTSO1_TSO1_Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing protein

At2g02130	1,31	2,1E-02	LCR68_PDF2.3_low-molecular-weight cysteine-rich 68
At3g03250	1,31	1,5E-02	AtUGP1_UGP_UGP1_UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1
At3g17240	1,31	1,5E-02	mtLPD2_lipoamide dehydrogenase 2
At2g05710	1,31	1,7E-02	ACO3_aconitase 3
At1g49430	1,31	4,6E-02	LACS2_LRD2_long-chain acyl-CoA synthetase 2
At3g43800	1,31	4,6E-02	ATGSTU27_GSTU27_glutathione S-transferase tau 27
At2g16500	1,31	3,3E-02	ADC1_ARGDC_ARGDC1_SPE1_arginine decarboxylase 1
At3g54960	1,30	3,1E-02	ATPDI1_ATPDIL1-3_PDI1_PDIL1-3_PDI-like 1-3
At5g07690	1,30	4,9E-02	ATMYB29_MYB29_PMG2_myb domain protein 29
At5g45260	1,30	4,2E-02	ATWRKY52_RRS1_SLH1_Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
At1g53645	1,30	3,3E-02	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
At4g08685	1,30	3,9E-02	SAH7_Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
At1g68520	1,30	4,0E-02	B-box type zinc finger protein with CCT domain
At3g54280	1,30	3,1E-02	ATBTAF1_BTAF1_CHA16_CHR16_RGD3_DNA binding;ATP binding;nucleic acid binding;binding;helicases;ATP binding
At4g03550	1,29	3,2E-02	ATGSL05_ATGSL5_GSL05_GSL05_GSL5_PMR4_glucan synthase-like 5
At1g08250	1,29	4,2E-02	ADT6_AtADT6_arogenate dehydratase 6
At1g53310	1,29	3,9E-02	ATPEPC1_ATPPC1_PEP1_PPC1_phosphoenolpyruvate carboxylase 1
At3g55360	1,29	2,8E-02	ATTSC13_CER10_ECR_TSC13_3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein
At4g21150	1,29	2,1E-02	HAP6_ribosephorin II (RPN2) family protein
At1g54270	1,29	3,5E-02	EIF4A-2_eif4a-2
At3g21220	1,29	2,8E-02	ATMAP2K_ALPHA_ATMEK5_ATMKK5_MAP2K_A_MEK5_MKK5_MAP kinase kinase 5
At4g32720	1,29	2,9E-02	AtLa1_La1_La protein 1
At5g04530	1,28	4,2E-02	KCS19_3-ketoacyl-CoA synthase 19
At5g12250	1,28	3,1E-02	TUB6_beta-6 tubulin
At5g05470	1,28	3,5E-02	ATEIF2-A2_EIF2_ALPHA_EIF2-A2_eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit
At1g12200	1,28	4,1E-02	FMO_Flavin-binding monooxygenase family protein
At1g62020	1,28	3,0E-02	Coatomer, alpha subunit
At2g18790	1,28	4,8E-02	HY3_OOP1_PHYB_phytochrome B
At3g03050	1,28	3,9E-02	ATCSLD3_CSLD3_KJK_RHD7_cellulose synthase-like D3
At5g12860	1,28	2,8E-02	DiT1_dicarboxylate transporter 1
At3g57300	1,28	3,0E-02	ATINO80_INO80 ortholog
At4g35260	1,27	2,8E-02	IDH-I_IDH1_isocitrate dehydrogenase 1
At4g09320	1,27	2,5E-02	NDPK1_Nucleoside diphosphate kinase family protein
At2g23390	1,27	3,1E-02	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF482 (InterPro:IPR007434)
At4g13940	1,27	3,2E-02	ATSAHH1_EMB1395_HOG1_MEE58_SAHH1_S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
At1g03630	1,26	3,1E-02	POR C_PORC_protochlorophyllide oxidoreductase C
At5g39740	1,26	3,9E-02	OLI7_RPL5B_ribosomal protein L5 B

At5g10030	1,26	4,9E-02	OBF4_TGA4_TGACG motif-binding factor 4
At1g56070	1,26	3,3E-02	LOS1_Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V family protein
At3g60320	1,26	4,8E-02	Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)
At3g11710	1,26	3,4E-02	ATKRS-1_lysyl-tRNA synthetase 1
At4g38200	1,26	4,6E-02	SEC7-like guanine nucleotide exchange family protein
At1g13440	1,25	4,1E-02	GAPC-2_GAPC2_glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
At2g37990	1,25	4,5E-02	ribosome biogenesis regulatory protein (RRS1) family protein
At1g80070	1,24	4,0E-02	EMB14_EMB177_EMB33_SUS2_Pre-mRNA-processing-splicing factor
At3g04790	1,24	4,7E-02	EMB3119_Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein
At3g60750	1,23	4,7E-02	Transketolase
At4g35770	-15,29	7,4E-07	ATSEN1_DIN1_SEN1_SEN1_Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
At3g47340	-14,52	3,1E-07	ASN1_AT-ASN1_DIN6_glutamine-dependent asparagine synthase 1
At4g37610	-11,07	1,8E-06	BT5_BTBT and TAZ domain protein 5
At3g57520	-9,20	2,0E-06	AtSIP2_RS2_SIP2_seed imbibition 2
At3g22060	-4,21	2,5E-05	Receptor-like protein kinase-related family protein
At3g53260	-3,96	5,2E-06	ATPAL2_PAL2_phenylalanine ammonia-lyase 2
At2g38230	-3,60	7,6E-06	ATPDX1.1_PDX1.1_pyridoxine biosynthesis 1.1
At1g18330	-3,58	2,1E-04	EPR1_RVE7_Homeodomain-like superfamily protein
At5g20250	-3,47	8,4E-06	DIN10_RS6_Raffinose synthase family protein
At3g48360	-3,44	1,1E-04	ATBT2_BT2_BTBT and TAZ domain protein 2
At5g05140	-3,38	8,4E-06	Transcription elongation factor (TFIIS) family protein
At3g30775	-3,23	9,7E-04	AT-POX_ATPDH_ATPOX_ERD5_PDH1_PRO1_PROD_H_Methylenetetrahydrofolate reductase family protein
At2g15890	-3,22	1,4E-04	MEE14_maternal effect embryo arrest 14
At2g40000	-3,15	8,4E-06	ATHSPRO2_HSPRO2_ortholog of sugar beet HS1 PRO-1 2
At3g61890	-3,11	2,3E-05	ATHB-12_ATHB12_HB-12_homeobox 12
At5g07440	-2,96	8,8E-03	GDH2_glutamate dehydrogenase 2
At1g80920	-2,89	1,9E-05	AtJ8_AtToc12_J8_Toc12_Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
At3g62550	-2,63	1,2E-04	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
At5g59820	-2,61	2,4E-03	RHL41_ZAT12_C2H2-type zinc finger family protein
At1g25400	-2,54	3,3E-02	unknown protein
At4g27450	-2,52	4,9E-05	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs
At1g66760	-2,51	2,8E-03	MATE efflux family protein
At2g42540	-2,42	3,3E-02	COR15_COR15A_cold-regulated 15a
At1g11260	-2,41	4,6E-05	ATSTP1_STP1_sugar transporter 1
At1g70700	-2,41	3,2E-02	JAZ9_TIFY7_TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
At5g67480	-2,39	4,6E-02	ATBT4_BT4_BTBT and TAZ domain protein 4
At1g17860	-2,38	2,5E-04	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein

At5g51550	-2,23	1,1E-04	EXL3_EXORDIUM like 3
At2g42620	-2,18	1,2E-04	MAX2_ORE9_PPS_RNI-like superfamily protein
At5g37260	-2,17	3,1E-03	CIR1_RVE2_Homeodomain-like superfamily protein
At3g15500	-2,15	2,1E-02	ANAC055_ATNAC3_NAC055_NAC3_NAC domain containing protein 3
At5g61590	-2,11	2,2E-04	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
At2g25735	-2,11	1,3E-03	unknown protein
At2g41100	-2,05	2,7E-03	ATCAL4_TCH3_Calcium-binding EF hand family protein
At4g27410	-2,02	2,3E-02	ANAC072_RD26_NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
At3g13450	-2,02	1,9E-03	DIN4_Transketolase family protein
At1g53580	-2,01	1,9E-03	ETHE1_GLY2-3_GLY3_glyoxalase II 3
At2g02930	-2,00	9,1E-04	ATGSTF3_GST16_GSTF3_glutathione S-transferase F3
At4g02520	-2,00	9,1E-04	ATGSTF2_ATPM24_ATPM24.1_GST2_GSTF2_glutathione S-transferase PHI 2
At5g49450	-1,98	7,5E-04	AtbZIP1_bZIP1_basic leucine-zipper 1
At3g57020	-1,97	8,8E-04	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
At5g57560	-1,96	3,9E-02	TCH4_XTH22_Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family protein
At5g24850	-1,92	7,4E-04	CRY3_cryptochrome 3
At5g13200	-1,90	2,4E-02	GRAM domain family protein
At5g24210	-1,90	9,1E-04	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
At5g18130	-1,90	1,5E-02	unknown protein
At4g19530	-1,87	1,7E-03	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
At5g17300	-1,87	3,1E-04	RVE1_Homeodomain-like superfamily protein
At2g39980	-1,83	1,6E-02	HXXXD-type acyl-transferase family protein
At5g06980	-1,81	6,9E-04	unknown protein
At1g03850	-1,81	8,7E-03	ATGRXS13_GRXS13_Glutaredoxin family protein
At3g02140	-1,77	5,1E-04	AFP4_TMAC2_AFP2 (ABI five-binding protein 2) family protein
At4g39090	-1,77	6,8E-04	RD19_RD19A_Papain family cysteine protease
At1g74840	-1,75	1,1E-03	Homeodomain-like superfamily protein
At4g12470	-1,75	1,5E-02	AZI1_azelaic acid induced 1
At1g71030	-1,73	7,0E-04	ATMYBL2_MYBL2_MYB-like 2
At3g06210	-1,71	2,5E-03	ARM repeat superfamily protein
At5g47370	-1,70	2,8E-03	HAT2_Homeobox-leucine zipper protein 4 (HB-4) / HD-ZIP protein
At1g72360	-1,66	1,2E-02	AtERF73_ERF73_HRE1_Integrase-type DNA-binding superfamily protein
At5g52250	-1,66	6,6E-03	EFO1_RUP1_Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
At1g75380	-1,65	8,0E-03	ATBBD1_BBD1_bifunctional nuclease in basal defense response 1
At3g61430	-1,65	1,0E-03	ATPIP1_PIP1_PIP1;1_PIP1A_plasma membrane intrinsic protein 1A
At3g06850	-1,65	2,2E-03	BCE2_DIN3_LTA1_2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein
At1g70530	-1,64	2,0E-02	CRK3_cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 3

At2g45660	-1,64	1,0E-02	AGL20_ATSOC1_SOC1_AGAMOUS-like 20
At4g17090	-1,64	2,1E-03	BAM3_BMY8_CT-BMY_chloroplast beta-amylase
At4g26150	-1,63	3,3E-03	CGA1_GATA22_GNL_cytokinin-responsive gata factor 1
At3g05200	-1,63	8,4E-03	ATL6_RING/U-box superfamily protein
At5g58350	-1,63	4,5E-02	WNK4_ZIK2_with no lysine (K) kinase 4
At5g54470	-1,62	1,9E-03	B-box type zinc finger family protein
At1g09570	-1,61	1,3E-03	FHY2_FRE1_HY8_PHYA_phytochrome A
At2g28200	-1,60	6,3E-03	C2H2-type zinc finger family protein
At3g10985	-1,60	1,1E-02	ATWI-12_SAG20_WI12_senescence associated gene 20
At1g12910	-1,59	3,2E-03	ATAN11_LWD1_Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
At5g04770	-1,58	6,5E-03	ATCAT6_CAT6_cationic amino acid transporter 6
At5g18170	-1,58	2,3E-03	GDH1_glutamate dehydrogenase 1
At5g67300	-1,56	2,1E-02	ATMYB44_ATMYBR1_MYB44_MYBR1_myb domain protein r1
At4g37560	-1,55	8,6E-03	Acetamidase/Formamidase family protein
At3g51910	-1,55	3,2E-02	AT-HSFA7A_HSFA7A_heat shock transcription factor A7A
At3g19580	-1,55	9,3E-03	AZF2_ZF2_zinc-finger protein 2
At4g02380	-1,54	5,4E-03	AtLEA5_SAG21_senescence-associated gene 21
At2g13360	-1,54	3,5E-03	AGT_AGT1_SGAT_alanine:glyoxylate aminotransferase
At5g54770	-1,54	6,3E-03	THI1_THI4_TZ_thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (ARA6) (THI1) (THI4)
At1g69490	-1,52	2,8E-03	ANAC029_ATNAP_NAP_NAC-like, activated by AP3/PI
At1g42540	-1,52	3,3E-02	ATGLR3.3_GLR3.3_glutamate receptor 3.3
At4g39140	-1,52	1,2E-02	RING/U-box superfamily protein
At1g45976	-1,51	6,8E-03	SBP1_S-ribonuclease binding protein 1
At5g14620	-1,51	3,9E-02	DMT7_DRM2_domains rearranged methyltransferase 2
At1g22190	-1,51	1,6E-02	RAP2.4_Integrase-type DNA-binding superfamily protein
At3g52400	-1,50	4,5E-02	ATSYP122_SYP122_syntaxin of plants 122
At1g02340	-1,50	4,0E-02	FBI1_HFR1_REP1_RSF1_basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
At5g39610	-1,50	1,5E-02	ANAC092_ATNAC2_ATNAC6_NAC2_NAC6_ORE1_NAC domain containing protein 6
At4g04330	-1,50	1,3E-02	AtRbcX1_RbcX1_Chaperonin-like RbcX protein
At1g54850	-1,49	7,4E-03	HSP20-like chaperones superfamily protein
At5g25440	-1,48	3,3E-02	Protein kinase superfamily protein
At1g67865	-1,47	1,4E-02	unknown protein
At1g12240	-1,47	2,5E-02	ATBETAFRUCT4_VAC-INV_Glycosyl hydrolases family 32 protein
At1g69270	-1,47	3,2E-02	RPK1_receptor-like protein kinase 1
At3g51730	-1,46	6,5E-03	saposin B domain-containing protein
At4g02440	-1,46	1,6E-02	EID1_F-box family protein
At4g10925	-1,46	4,0E-03	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein

At5g15960	-1,5	1,2E-02	KIN1_stress-responsive protein (KIN1) / stress-induced protein (KIN1)
At5g15970	-1,46	1,2E-02	AtCor6.6_COR6.6_KIN2_stress-responsive protein (KIN2) / stress-induced protein (KIN2) / cold-responsive protein
At4g31820	-1,46	1,1E-02	ENP_MAB4_NPY1_Phototropic-responsive NPH3 family protein
At4g21980	-1,45	6,1E-03	APG8A_ATG8A_Ubiquitin-like superfamily protein
At5g02020	-1,45	7,6E-03	SIS_Encodes a protein involved in salt tolerance, names SIS (Salt Induced Serine rich).
At3g11600	-1,45	1,1E-02	unknown protein
At1g20693	-1,45	1,1E-02	HMG BETA 1_HMGB2_NFD02_NFD2_high mobility group B2
At1g73500	-1,45	3,5E-02	ATMCK9_MKK9_MAP kinase kinase 9
At1g11360	-1,44	1,4E-02	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
At2g41430	-1,44	9,4E-03	CID1_ERD15_LSR1_dehydration-induced protein (ERD15)
At1g76560	-1,44	9,2E-03	CP12-3_CP12 domain-containing protein 3
At1g07440	-1,44	3,7E-02	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
At5g51170	-1,44	1,8E-02	unknown protein
At5g57660	-1,43	1,4E-02	ATCOL5_COL5_CONSTANS-like 5
At4g34030	-1,43	7,8E-03	MCCB_3-methylcrotonyl-CoA carboxylase
At3g17740	-1,43	8,0E-03	unknown protein
At4g15430	-1,43	4,3E-03	ERD (early-responsive to dehydration stress) family protein
At1g22640	-1,43	1,5E-02	ATMYB3_MYB3_myb domain protein 3
At3g04210	-1,43	2,3E-02	Disease resistance protein (TIR-NBS class)
At2g39800	-1,42	7,4E-03	ATP5CS_P5CS1_delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase 1
At3g55610	-1,42	7,4E-03	P5CS2_delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthase 2
At1g14290	-1,42	3,0E-02	SBH2_sphingoid base hydroxylase 2
At1g02750	-1,42	1,7E-02	Drought-responsive family protein
At3g13550	-1,42	1,1E-02	CIN4_COP10_EMB144_FUS9_Ubiquitin-conjugating enzyme family protein
At1g06400	-1,42	6,9E-03	ARA-2_ARA2_ATRAB11E_ATRABA1A_Ras-related small GTP-binding family protein
At5g47390	-1,42	8,4E-03	myb-like transcription factor family protein
At4g18210	-1,4	8,2E-03	ATPUP10_PUP10_purine permease 10
At5g46410	-1,41	1,2E-02	SSP4_SCP1-like small phosphatase 4
At4g26400	-1,41	1,7E-02	RING/U-box superfamily protein
At4g39070	-1,41	4,5E-02	B-box zinc finger family protein
At1g25560	-1,41	1,4E-02	EDF1_TEM1_AP2/B3 transcription factor family protein
At5g02810	-1,41	2,6E-02	APRR7_PRR7_pseudo-response regulator 7
At1g13080	-1,41	8,9E-03	CYP71B2_cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 2
At4g28030	-1,40	2,3E-02	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein
At5g17290	-1,40	1,4E-02	APG5_ATATG5_ATG5_autophagy protein Apg5 family
At3g24120	-1,40	1,4E-02	Homeodomain-like superfamily protein
At5g15020	-1,40	3,0E-02	SNL2_SIN3-like 2

At2g18250	-1,40	7,7E-03	ATCOAD_COAD_4-phosphopantetheine adenylyltransferase
At2g30360	-1,40	3,8E-02	CIPK11_PKS5_SIP4_SNRK3.22_SOS3-interacting protein 4
At2g23150	-1,40	2,4E-02	ATNRAMP3_NRAMP3_natural resistance-associated macrophage protein 3
At3g59060	-1,39	9,2E-03	PIF5_PIL6_phytochrome interacting factor 3-like 6
At5g19430	-1,39	2,5E-02	RING/U-box superfamily protein
At5g15850	-1,38	1,2E-02	ATCOL1_COL1_CONSTANS-like 1
At3g23920	-1,38	3,3E-02	BAM1_BMY7_TR-BAMY_beta-amylase 1
At4g13510	-1,38	4,2E-02	AMT1;1_ATAMT1_ATAMT1;1_ammonium transporter 1;1
At5g61600	-1,37	4,7E-02	ERF104_ethylene response factor 104
At3g57530	-1,37	2,6E-02	ATCPK32_CDPK32_CPK32_calcium-dependent protein kinase 32
At5g11260	-1,36	4,3E-02	HY5_TED 5_Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
At3g06190	-1,36	2,6E-02	ATBPM2_BPM2_BTB-POZ and MATH domain 2
At3g20550	-1,36	1,3E-02	DDL_SMAD/FHA domain-containing protein
At1g80840	-1,36	4,4E-02	ATWRKY40_WRKY40_WRKY DNA-binding protein 40
At1g14200	-1,36	8,8E-03	RING/U-box superfamily protein
At5g10250	-1,35	4,6E-02	DOT3_Phototropic-responsive NPH3 family protein
At2g42870	-1,35	1,2E-02	HLH1_PAR1_phy rapidly regulated 1
At5g66880	-1,35	3,1E-02	SNRK2-3_SNRK2.3_SRK2I_sucrose nonfermenting 1(SNF1)-related protein kinase 2.3
At4g20380	-1,35	2,3E-02	LSD1 zinc finger family protein
At3g08730	-1,35	2,9E-02	ATPK1_ATPK6_ATS6K1_PK1_PK6_S6K1_protein-serine kinase 1
At3g06760	-1,35	1,9E-02	Drought-responsive family protein
At2g37970	-1,35	3,4E-02	SOUL-1_SOUL heme-binding family protein
At5g19280	-1,34	3,0E-02	KAPP_RAG1_kinase associated protein phosphatase
At3g12360	-1,34	2,8E-02	ITN1_Ankyrin repeat family protein
At5g38895	-1,34	3,6E-02	RING/U-box superfamily protein
At3g17510	-1,34	1,4E-02	CIPK1_SnRK3.16_CBL-interacting protein kinase 1
At3g12630	-1,34	2,4E-02	SAP5_A20/AN1-like zinc finger family protein
At3g60290	-1,34	3,2E-02	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
At1g76110	-1,33	2,4E-02	HMG (high mobility group) box protein with ARID/BRIGHT DNA-binding domain
At5g17310	-1,33	1,5E-02	AtUGP2_UGP2_UDP-glucose pyrophosphorylase 2
At5g45110	-1,33	2,7E-02	ATNPR3_NPR3_NPR1-like protein 3
At4g24990	-1,33	1,7E-02	ATGP4_Ubiquitin family protein
At5g14420	-1,33	3,6E-02	RGLG2_RING domain ligase2
At2g03760	-1,32	3,3E-02	AtSOT1_AtSOT12_ATST1_RAR047_SOT12_ST_ST1_sulphotransferase 12
At4g08920	-1,32	2,9E-02	ATCRY1_BLU1_CRY1_HY4_OOP2_cryptochrome 1
At1g21910	-1,32	4,2E-02	DREB26_Integrase-type DNA-binding superfamily protein
At5g04760	-1,32	3,6E-02	Duplicated homeodomain-like superfamily protein

At3g01290	-1,32	3,8E-02	AtHIR2_HIR2_SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family
At5g61510	-1,31	4,2E-02	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
At4g23570	-1,31	1,6E-02	SGT1A_phosphatase-related
At5g49730	-1,31	2,1E-02	ATFRO6_FRO6_FRO6_ferric reduction oxidase 6
At5g04190	-1,31	2,5E-02	PKS4_phytochrome kinase substrate 4
At1g15430	-1,31	3,0E-02	Protein of unknown function (DUF1644)
At4g16780	-1,30	2,8E-02	ATHB-2_ATHB2_HAT4_HB-2_homeobox protein 2
At1g21760	-1,30	4,3E-02	ATFBP7_FBP7_F-box protein 7
At1g33240	-1,29	4,9E-02	AT-GTL1_GTL1_GT-2-like 1
At2g16390	-1,29	2,9E-02	CHR35_DMS1_DRD1_SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein
At5g13190	-1,29	4,4E-02	AtGILP_GILP_CONTAINS InterPro DOMAIN/s: LPS-induced tumor necrosis factor alpha factor (InterPro:IPR006629)
At4g35110	-1,29	3,3E-02	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1 4) family
At1g04300	-1,29	3,8E-02	TRAF-like superfamily protein
At5g10860	-1,29	3,3E-02	CBSX3_Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein
At1g69850	-1,29	2,6E-02	ATNRT1:2_NRT1:2_NTL1_nitrate transporter 1:2
At5g64930	-1,28	3,0E-02	HYS1_CPR5 protein, putative
At5g10450	-1,28	3,1E-02	14-3-3lambda_AFT1_GRF6_G-box regulating factor 6
At4g30200	-1,28	3,5E-02	VEL1_VIL2_vernalization5/VIN3-like
At1g48960	-1,27	4,5E-02	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
At2g46220	-1,27	4,4E-02	Uncharacterized conserved protein (DUF2358)
At1g72770	-1,27	3,5E-02	HAB1_homology to ABI1
At1g65420	-1,27	2,9E-02	NPQ7_Protein of unknown function (DUF565)
At3g12320	-1,26	3,6E-02	unknown protein
At1g70660	-1,26	3,6E-02	MMZ2_UEV1B_MMS ZWEI homologue 2
At4g18710	-1,26	4,6E-02	ATSK21_BIN2_DWF12_SK21_UCU1_Protein kinase superfamily protein
At5g19530	-1,26	4,8E-02	ACL5_S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
At1g18260	-1,25	4,8E-02	EBS5_HRD3A_HCP-like superfamily protein
At1g08550	-1,25	4,4E-02	AVDE1_NPQ1_non-photochemical quenching 1
At5g24270	-1,25	4,2E-02	ATSOS3_CBL4_SOS3_Calcium-binding EF-hand family protein
At4g14110	-1,24	3,7E-02	CSN8_EMB143_FUS7_COP9 signalosome, subunit CSN8
At3g15850	-1,23	4,6E-02	ADS3_FAD5_FADB_JB67_fatty acid desaturase 5
At1g08930	-1,23	4,7E-02	ERD6_Major facilitator superfamily protein
Gene de resposta a patógenos			
At3g22060	-4,21	2,5E-05	Receptor-like protein kinase-related family protein
At5g05140	-3,38	8,4E-06	Transcription elongation factor (TFIIS) family protein
At2g15890	-3,22	1,4E-04	MEE14_maternal effect embryo arrest 14
At3g61890	-3,11	2,3E-05	ATHB-12_ATHB12_HB-12_homeobox 12

Tabela suplementar 3. Continuação.

At1g66760	-2,51	2,8E-03	MATE efflux family protein
At1g70700	-2,41	3,2E-02	JAZ9_TIFY7_TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
At2g25735	-2,11	1,3E-03	unknown protein
At2g02930	-2,00	9,1E-04	ATGSTF3_GST16_GSTF3_glutathione S-transferase F3
At5g24210	-1,90	9,1E-04	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
At1g03850	-1,81	8,7E-03	ATGRXS13_GRXS13_Glutaredoxin family protein
At1g75380	-1,65	8,0E-03	ATBBD1_BBD1_bifunctional nuclease in basal defense response 1
At3g10985	-1,60	1,1E-02	ATWI-12_SAG20_WI12_senescence associated gene 20
At1g69490	-1,52	2,8E-03	ANAC029_ATNAP_NAP_NAC-like, activated by AP3/PI
At5g14620	-1,51	3,9E-02	DMT7_DRM2_domains rearranged methyltransferase 2
At1g67865	-1,47	1,4E-02	unknown protein
At1g12240	-1,47	2,5E-02	ATBETAFRUCT4_VAC-INV_Glycosyl hydrolases family 32 protein
At4g21980	-1,45	6,1E-03	APG8A_ATG8A_Ubiquitin-like superfamily protein
At3g04210	-1,43	2,3E-02	Disease resistance protein (TIR-NBS class)
At5g17290	-1,40	1,4E-02	APG5_ATATG5_ATG5_autophagy protein Apg5 family
At2g30360	-1,40	3,8E-02	CIPK11_PKS5_SIP4_SNRK3.22_SOS3-interacting protein 4
At2g23150	-1,40	2,4E-02	ATNRAMP3_NRAMP3_natural resistance-associated macrophage protein 3
At5g61600	-1,37	4,7E-02	ERF104_ethylene response factor 104
At1g80840	-1,36	4,4E-02	ATWRKY40_WRKY40_WRKY DNA-binding protein 40
At1g80840	-1,36	4,4E-02	ATWRKY40_WRKY40_WRKY DNA-binding protein 40
At3g01290	-1,32	3,8E-02	AtHIR2_HIR2_SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada: **O fator de transcrição bZIP AtbZIP63 interage com o relógio circadiano e afeta a degradação do amido impactando o crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana***

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

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

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 02/2003 , Instituição: IB-UNICAMP

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

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

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

Américo José Barbalho Viana
Aluno (nome completo)

[Assinatura]
Orientador (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

[Assinatura]
Prof. Dra. EDI LÚCIA SAMONHILLO
Lab. Genética Humana
CBMEG - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura