

**CLEVERSON CARLOS MATIOLLI**

**“O FATOR DE TRANSCRIÇÃO ATBZIP63 COMO INTEGRADOR  
DE SINAIS ENERGÉTICOS E ESTRESSES BIÓTICO/ABIÓTICO”**

**CAMPINAS**

**2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**CLEVERSON CARLOS MATIOLLI**

**“O fator de transcrição AtbZIP63 como integrador de sinais energéticos e estresses biótico/abiótico”**

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

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Cleveson Carlos Matioli  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz .

CAMPINAS

2012

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

M427f      Matioli, Cleverson Carlos, 1980-  
              O fator de transcrição AtbZIP63 como integrador de  
              sinais energéticos e estresses biótico/abiótico /  
              Cleverson Carlos Matioli. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

              1. *Arabidopsis*. 2. Fatores de transcrição. 3.  
              Plantas – Tolerância à seca. 4. Fungos fitopatogênicos.  
              5. Plantas – Efeito do stress. I. Vincentz, Michel  
              Georges Albert, 1958-. II. Universidade Estadual de  
              Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** The transcription factor AtbZIP63 as a integrator of energetic signals and biotic/abiotic stresses

**Palavras-chave em Inglês:**

*Arabidopsis*

Transcription factors

Plants drought tolerance

Phytopathogenic fungi

Plants – Effect of stress on

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

**Títuloção:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Michel Georges Albert Vincentz [Orientador]

Ione Salgado

Katlin Brauer Massirer

Adriana Silva Hemerly

Daniel Scherer de Moura

**Data da defesa:** 03-08-2012

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

Campinas, 3 de agosto de 2012

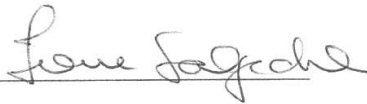
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz (Orientador)




---

Profa. Dra. Ione Salgado



---

Profa. Dra. Katlin Brauer Massirer



---

Profa. Dra. Adriana Silva Hemerly



---

Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura



---

Prof. Dr. José Andrés Yunes

---

Profa. Dra. Maria Helena Goldman

---

Prof. Dr. Jörg Kobarg

---

## A ilusão

Qual é o sentido de buscar o conhecimento de como outros lugares no Universo foram, são e serão? Qual é o sentido de buscar a compreensão de como a vida surgiu e o quão provável é que ela tenha surgido diversas vezes no Cosmos? Este sentido poderia superar a infindável busca humana pela própria aceitação incondicional de todas as diferenças culturais que permeiam a realidade de nossas relações sociais? O investimento de bilhões em tecnologia para alcançar distâncias cada vez maiores e entender processos que ocorrem longe de nossa experiência comum? Estes investimentos não seriam melhor empregados na solução de evidentes flagelos sociais e econômicos que assombram e inquietam aqueles que conseguem pensar um segundo neste assunto? Pergunto então o que a nossa experiência comum nos diz, senão deixar a simples sensação de que nossos horizontes não vão além do que nossos olhos desnudos conseguem fitar? Esta nossa ansiedade desamarrada por alcançar mais longe do que nossos braços conseguem alcançar foi da lança ao foguete e disparou contra as estrelas máquinas e seres humanos que buscavam revelar os segredos da existência. Escondido nas entranhas deste desejo de alcançar o infinito há um sentido que também encontra paralelo nas construções humanas ao redor da imortalidade, da continuidade absoluta da consciência e do incontrolável pavor do desaparecimento e das celas cerceando nossos limites.

A infinidade dos céus é alentadora e ao mesmo tempo inquietante. Por um lado nos esfria com a aspereza das condições dos lugares que distam da superfície da Terra, esta lâmina incrustada de vida que envolve rochas derretidas inabitáveis. Por outro lado, desperta nossos profundos desejos de experimentar o desconhecido, de tocar com a ponta dos dedos o que outrora eram apenas devaneios, equações e sonhos.

A questão fundamental é: qual é a finalidade de nossa existência? Excluindo quaisquer possibilidades que envolvam aspectos desconectados da realidade tangível, sobra-nos muito pouco para realmente acreditar que por sí algo tem uma finalidade, seja um átomo ou um ser humano que pensa sobre o átomo. O que nos resta na verdade é a escolha do que fazer uma vez que aqui estamos no momento e, dada esta propriedade emergente de nosso cérebro chamada consciência e sua voraz necessidade de nos convencer de que somos importantes, seguir um caminho julgado correto pelas próprias armadilhas do pensamento. A continuidade de nossa espécie, aparentemente, dependeu com uma

frequência elevada da nosso singular talento de ver mais longe do que os sentidos e os reflexos conseguem alcançar.

Buscamos sempre olhar o distante ponto entre as montanhas e acreditar que lá está a nossa possibilidade de continuar mais um pouco, e movemos nossos pés rumo a este lugar. Lá vemos que aquele velho ponto já não é mais distante e que do alto da montanha consegue-se vislumbrar um riacho cortando a vegetação e o brilho do Sol em suas espumas são tão hipnóticos que nossos destinos passam a ser traçados afim de buscar aquele novo alento.

Cada passo no futuro joga um pouco de pó sobre o passado, mas mostra que o futuro será passado no próximo instante. O que perdura é este movimento, este desenrolar, este fluxo contínuo das aspirações. Os olhos estão sempre à frente e enxergam longe para mostrar não só o próximo passo, mas sim os passos subsequêntes. Somos seres físicos e abstratos, conscientes de nossa matéria mas constantemente subtraídos da realidade por um pensamento.

Somos ambíguos, somos certos e errados. Pensamos, mas sentimos. Sonhamos, mas dormimos. Choramos, mas rimos. Esta nossa natureza nos acompanhará por muitos milênios ainda, e não acredito também que perder esta dúbia qualidade nos faria mais prósperos.

O que penso, enfim, é que o horizonte é maior do que podemos compreender e que buscar uma verdade é como bater em uma concha ôca e esperar um movimento dentro dela. Ter certezas é como ter bolhas de sabão dentro do bolso e viver delas é como jogar milho a leões.

A ilusão é simples, os olhos é que são complicados. O horizonte sempre estará lá, e nós sempre estaremos olhando aquele riacho e dando passos rumo a ele. Esta é a nossa natureza, é a centelha que o próprio Universo incutiu em nossas mentes para que pudesse perguntar sobre si mesmo: O que sou?

*Cleverson Carlos Matioli*

*Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution. It is, strictly speaking, a real factor in scientific research.*

(Albert Einstein)

**Para minha mãe querida, minha avó materna e minha maravilhosa esposa.**



## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Michel, por ter me ensinado os passos corretos na pesquisa científica e por todos os conselhos e broncas que tornaram-me um cientista melhor. Obrigado por ter apostado em mim.

Aos doutores Ione Salgado, Katlin Massirer, Adriana Hemerly, Daniel Scherer, membros da banca.

Aos membros da pré-banca Renato Vicentini e Fábio Tebaldi pelas críticas, revisões e sugestões.

Às meninas da secretaria, Tânia, Sandra e Gabriela, pelo desdobramento para resolver problemas que nós criamos.

Ao pessoal da limpeza, em especial Solange e Kátia, por terem cuidado tão bem do laboratório e pela grande amizade desenvolvida nestes anos e pelo sorriso inocente de todos os dias.

À todos os meus professores de graduação e pós por minha formação e espírito crítico.

À Sandra Martins por seu auxílio técnico.

Aos meus amigos Rafael Talaisys, Paulo Vinícius, Denner Peterlini, Valéria Martins, Amanda Silveira, Guilherme Sanvido e todos aqueles que fazem a vida valer realmente a pena.

Aos amigos de laboratório Juliana, Américo, Mariane, Raphael, Gustavo, Amanda, Dudu, Paula e David, por me aguentarem por tanto tempo.

Aos colaboradores Fernanda Prado e Maeli Melotto, por terem participado de forma tão construtiva para este trabalho.

Obrigado a toda a minha família, por terem me tornado o que sou hoje.

A Unicamp, por ter modificado a minha vida e fornecido novas e boas perspectivas. A CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Obrigado aos meus cães Pitoco e Carequinha, por me amarem incondicionalmente e por tornarem a minha vida mais afável com seus focinhos gelados.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	viii
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	19
CAPÍTULO 1 .....	20
CAPÍTULO 2 .....	44
APÊNDICE .....	64
CONCLUSÕES.....	68
PERSPECTIVAS.....	70
AUTORIZAÇÃO CIBIO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## Resumo

A manutenção do balanço energético em plantas é de crucial importância para a otimização de seu crescimento e desenvolvimento em resposta às condições sempre flutuantes do meio. A energia obtida através da fotossíntese deve ser utilizada parcimoniosamente e dividida entre crescimento, desenvolvimento, armazenamento e respostas a estresses bióticos e abióticos. Entender como a energia é canalizada para cada um destes processos e como os diversos sinais ambientais e metabólicos são integrados é de vital importância para a compreensão dos mecanismos que permitem o sucesso reprodutivo das plantas mesmo frente a condições ambientais adversas. Os fatores reguladores de transcrição desempenham um papel importante como pontos de convergência de vias de sinalização distintas e regulam a expressão dos conjuntos de genes mais adequados para cada combinação de sinais, permitindo uma resposta equilibrada diante de desafios muitas vezes concomitantes. Neste trabalho, mostramos que o fator de transcrição de *Arabidopsis thaliana* AtbZIP63, o qual pertence a família bZIP e é um mediador das respostas a carência energética induzidas pela quinase KIN10, é reprimido a curto prazo (2h e 4h) pela hexose glicose e o hormônio ácido abscísico (ABA). A repressão da expressão de *AtbZIP63* por 2% de glicose é independente da atividade sensora de glicose da enzima Hexokinase 1 (HXK1) e não envolve mudanças nos níveis endógenos de ABA, um mediador das respostas a glicose. No entanto, o ABA é capaz de modular a amplitude da resposta de *AtbZIP63* a glicose. ABA e glicose interagem de maneira sinérgica para repressão da expressão de *AtbZIP63* e esta interação envolve mecanismos de regulação pós-transcricionais. Análises em escala genômica de diferenças de perfis transcricionais entre mutantes para *AtbZIP63* e seus respectivos genótipos selvagens foram desenvolvidas para identificar os genes alvos de *AtbZIP63* e definir a rede de regulação da qual *AtbZIP63* participa. A classificação funcional dos 280 e 348 genes desregulados nos mutantes por inserção de T-DNA *atbzip63-1* e *atbzip63-2*, respectivamente, sugere que *AtbZIP63* está envolvido na regulação de genes relacionados as respostas à carência energética, síntese e resposta a hormônios, estresses abióticos e bióticos e ciclo circadiano, provavelmente modulando o uso equilibrado de energia em resposta aos desafios ambientais. Baseado na observação de que os mutantes para *AtbZIP63* apresentam diversos genes relacionados a respostas contra estresses bióticos, avaliamos a resposta dos mutantes *atbzip63-1* e

*atbzip63-2* a patógenos usando o patossistema *Arabidopsis-Pseudomonas*. O mutante *atbzip63-1* é mais resistente a infecção com o fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000, mostrando seu envolvimento nas respostas a estresse biótico. O mutante *atbzip63-2* apresenta atraso de crescimento quando cultivado em condições limitantes de energia, sugerindo sua participação também no crescimento/desenvolvimento de *Arabidopsis* nestas condições. A busca de proteínas interatoras de AtbZIP63 utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura (Y2H) revelou genes relacionados a degradação de proteínas sugerindo que controle da estabilidade da proteína de AtbZIP63. Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que AtbZIP63 é um nó de integração entre diferentes vias de sinalização para modular o crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis* de acordo com diversos sinais ambientais.

## Abstract

The maintenance of energy balance in plants is crucial to optimize their growth and development in response to ever changing environment. The energy obtained through photosynthesis must be used sparingly and divided between growth, development, storage, and responses to biotic and abiotic stresses. Understand how energy is channeled to each of these processes and how the environmental and metabolic signals are integrated have a vital importance to understanding the mechanisms by which plants reach the reproductive success even in adverse environmental conditions. Transcription factors play an important role as convergence points of several signaling pathways and regulate the expression of sets of genes most appropriate for each signal combination. We show that the transcription factor *AtbZIP63* from *Arabidopsis thaliana*, which belongs to the bZIP family and mediates partially the response to energy deprivation induced by kinase KIN10, is repressed in short-term treatments (2h and 4h) with glucose and hormone abscisic acid (ABA). The repression of *AtbZIP63* by 2% glucose is independent of the glucose sensing activity of the enzyme Hexokinase 1 (HXK1) and does not involve changes in endogenous ABA levels, a mediator of glucose responses. However, ABA modulates the amplitude of *AtbZIP63* responses to glucose. ABA and glucose interact synergistically to repress *AtbZIP63* mRNA accumulation and that this interaction involves post-transcriptional mechanisms. Genomic scale transcriptional profile comparison between *AtbZIP63* mutants and their respective wild-type genotypes have been developed to identify target genes and the regulatory context which *AtbZIP63* is involved. The functional classification of 280 and 348 misregulated genes in T-DNA insertion mutants *atbzip63-1* and *atbzip63-2*, respectively, suggests that *AtbZIP63* regulates genes involved in responses to energy starvation, synthesis and hormone response, biotic and abiotic stress, and circadian clock, probably by modulating the energy usage in response to environmental challenges. Based on the observation that the *AtbZIP63* mutants have several misregulated genes related to responses to biotic stress, we evaluated the response of *atbzip63-1* and *atbzip63-2* to pathogens using the Arabidopsis-Pseudomonas pathosystem. The *atbzip63-1* mutant is more resistant to infection with the pathogen *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000, showing their involvement in responses to biotic stress. The *atbzip63-2* mutant has arrested growth in energy-limiting conditions, also suggesting its participation in the growth / development of Arabidopsis under these

conditions. A searching for interacting proteins of AtbZIP63 using Yeast Two-Hybrid (Y2H) system revealed proteins related to protein degradation and suggests stability control of AtbZIP63 protein. Together, the results presented here suggest that AtbZIP63 is an integration node of different signaling pathways and modulates growth and development of Arabidopsis under different environmental conditions.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Controle da expressão gênica em eucariotos

O genoma de uma célula eucariótica contém, em sua seqüência de DNA, as unidades de informação que são necessárias para a síntese de milhares de proteínas e RNA's não-codificantes. O genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana* contém aproximadamente 28 mil genes codificantes de proteínas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), além de diversos genes representando RNA's não-codificantes que exercem funções importantes na regulação do crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses (Billoud *et al.*, 2005; Ben Amor *et al.*, 2008; Guttman & Rinn, 2012). Estas unidades de informação, ou genes, apesar de estarem presentes em praticamente todas as células de cada organismo, não são expressas todas ao mesmo tempo e em todos os órgãos e tecidos sendo, pelo contrário, precisamente regulados no tempo e no espaço. O conjunto de genes e a quantidade que cada um deles é expresso em cada estágio do ciclo de vida, órgão ou condição ambiental precisam ser propriamente regulados afim de garantir o adequado crescimento e desenvolvimento. Os mecanismos que definem o momento, o local e a quantidade que cada gene será expresso é denominado controle da expressão gênica.

O controle da expressão gênica pode ocorrer em diferentes níveis: transcrição (McKnight & Kingsbury, 1982; Singh, 2002; Kaufmann *et al.*, 2010), processamento e controle da estabilidade do RNAm, tradução do RNAm (Van der Kelen *et al.*, 2009), modificações pós-traducionais das proteínas, multimerização em complexos protéicos, controle da localização celular e regulação da estabilidade das proteínas. Estes diferentes níveis de regulação

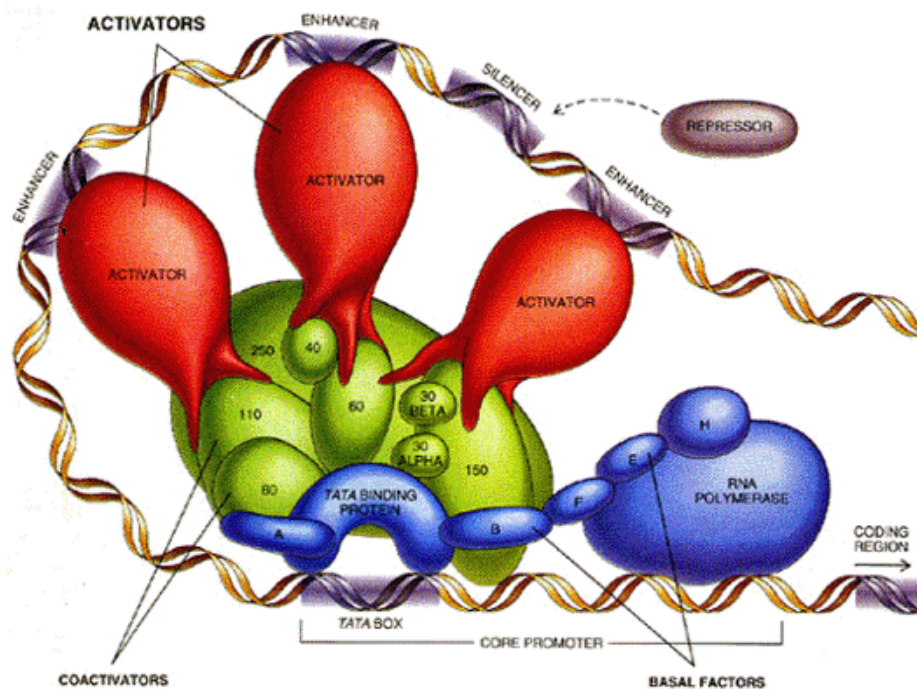
operam simultaneamente e de forma integrada afim de garantir o ajuste fino da expressão gênica.

O regulação da taxa de iniciação da transcrição é o primeiro passo do controle da expressão gênica. A regulação transcricional depende de uma complexa interação entre as RNA polimerases, DNA, fatores e cofatores de transcrição (Katagiri & Chua, 1992; Meshi & Iwabuchi, 1995; Singh *et al.*, 2002; Rushton *et al.*, 2010; Wehner *et al.*, 2011). Os fatores e cofatores de transcrição interagem e modulam a atividade do complexo basal de transcrição que inclui as RNA polimerases e fatores basais de transcrição. Por sua vez, o genoma dos organismos eucariotos apresenta-se compactado no núcleo de cada célula na forma de cromatina, uma combinação complexa do DNA genômico e proteínas com carga positiva denominadas histonas (Sanchez & Gutierrez, 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, fatores e cofatores de transcrição ao DNA é altamente regulada através do nível de metilação do DNA, acetilação (Waterborg, 2011) e metilação de histonas (Liu *et al.*, 2010) e localização dos nucleossomos (Conaway, 2012). A regulação da transcrição baseada na estrutura e propriedades físico-químicas da cromatina é denominada regulação epigenética.

Além do controle através de mecanismos epigenéticos, a taxa de iniciação da transcrição depende de fatores reguladores de transcrição (elementos *trans*), que são proteínas que ligam-se a pequenas seqüências de DNA (elementos *cis*) contidas na região promotora dos genes (Latchaman, 1990), aumentando ou reduzindo a taxa de iniciação de transcrição pela RNA polimerase (Lee & Young, 2000; Beckett, 2001; Juven-Gershon *et al.*, 2008) (Figura 1). Os fatores de transcrição correspondem a aproximadamente 10% (~2500) dos genes codificantes de proteínas em *Arabidopsis thaliana* (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009), os quais



são divididos em famílias de acordo com os domínios que apresentam e com quais elementos *cis* nos promotores dos genes estes fatores interagem (Riechmann *et al.*, 2000; Corrêa *et al.*, 2008). Os domínios conservados usados na classificação dos fatores de transcrição em famílias são responsáveis tanto pela interação com o DNA quanto com outras proteínas reguladoras. 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 (Singh, 1998; Riechmann *et al.*, 2000; Wingender *et al.*, 2000; Feller *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Representação esquemática do complexo de transcrição, contendo os fatores basais, co-ativadores, ativadores e repressores de transcrição. (Retirado de [http://berkeley.edu/news/features/1999/12/09\\_3dimage.html](http://berkeley.edu/news/features/1999/12/09_3dimage.html))

O controle da expressão gênica também pode ocorrer através de mecanismos pós-transcricionais envolvendo a modulação da estabilidade do RNA mensageiro e da taxa de tradução. Quanto a estabilidade do RNA mensageiro, estes podem ser classificados como estáveis (meia-vida de algumas horas), muito estáveis (meia-vida de dias) e instáveis (meia-vida de aproximadamente 1 hora) (Jonhson et al, 1998). Os componentes moleculares que controlam a estabilidade do RNAm podem ser alocados em três categorias: 1. Componentes do sistema basal de degradação de RNAm que fazem parte do controle de qualidade da produção dos transcritos de cada locus; 2. Fatores (elementos *trans*) que ligam-se a seqüências específicas (elementos *cis*) no RNA mensageiro e controlam sua estabilidade; e 3. Elementos transdutores de estímulos externos e/ou condições fisiológicas regulando a atividade dos fatores *trans* que modulam estabilidade de RNAm específicos através das seqüências *cis* nele contidas (Gutiérrez et al, 1999). A modulação da estabilidade do RNA mensageiro pode ser efetuado por diferentes vias como, por exemplo, por atividade de exonucleases, que degradam o RNAm no sentido 5`-3` após a remoção do *cap* 5'; atividade de exossomos, que degradam o RNAm no sentido 3'-5' após o processo de remoção da cauda poli-A; degradação sinalizada por miRNAs, nat-siRNAs (*natural anti-sense siRNAs*) e ta-siRNAs (*trans-acting siRNAs*) (Belostotsky & Sieburth, 2009; Houseley & Tollervey, 2009). Outro mecanismo importante de controle da estabilidade do RNA mensageiro é o processo de NMD (*Non-sense Mediated Decay*), mecanismo pelo qual o mecanismo de vigilância da célula degrada RNAm aberrantes contendo um códon de parada prematuro (*PTC – Premature Termination Codon*) (Kurihara et al., 2009). O controle da tradução efetuado por miRNAs foi recentemente descrito em plantas por Brodersen et al., 2008 e desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica.

A modulação da estabilidade de proteínas em *Arabidopsis* é crucial nas respostas aos hormônios etileno, jasmonato, giberelinas e auxinas. A regulação da estabilidade das proteínas é efetuada principalmente através da marcação 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. 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 (Gagne *et al.*, 2004; Binder *et al.*, 2007). Além disso, o monossacarídeo 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*) (Thines *et al.*, 2007; 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*) (Xie *et al.*, 1998; Melotto *et al.*, 2008) e induz a ubiquitinação das proteínas JAZ pelo complexo SCF<sup>COI1</sup>, destinando-as para degradação no proteassomo e liberando a transcrição promovida pelos fatores MYC2, MYC3 e MYC4 da repressão pelas proteínas JAZ. A molécula coronatina, análoga ao conjugado JA-Ile e produzida por diversas linhagens do

gênero *Pseudomonas*, também é capaz de destinar as proteínas JAZ para degradação, que é uma estratégia deste fitopatógeno para reduzir a resistência da planta (Uppalapati *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008). 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, liberando os fatores de transcrição que irão ativar a expressão dos genes responsivos a giberelina (revisão em 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<sup>TIR1</sup> e posterior degradação destes repressores via proteassomo (Dharmasiri *et al.*, 2005; Parry & Estelle, 2006). Estes dados sugerem que a regulação da estabilidade de proteínas é uma importante forma de controle das respostas a sinais de desenvolvimento e ambientais.

## **1.2 Fatores de transcrição do tipo bZIP (*basic leucine zipper*)**

Os fatores de regulação da transcrição do tipo bZIP foram descritos em todos os eucariotos (Wingender *et al.*, 2000) e são caracterizados por um domínio conservado de 40 a 80 aminoácidos, conhecido como domínio bZIP (*basic leucine zipper*). Este domínio é formado por dois motivos distintos, uma região básica e um zíper de leucinas. O zíper de leucinas, devido a sua característica hidrofóbica, é responsável por interações com outras moléculas de proteína, sendo que a dimerização pode ocorrer entre subunidades idênticas, formando homodímeros, ou entre subunidades diferentes, formando heterodímeros funcionais (Jakoby *et al.*, 2002; Figura 2). Os fatores bZIP atuam de 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 (Pontier *et al.*, 2001; Kaminaka *et al.*, 2006), sinalização de hormônios e sacarose (Finkelstein & Lynch, 2000; Uno *et al.*, 2000; Rolland & Sheen, 2005), resposta a estresse osmótico (Sato *et al.*, 2004, Weltmeier *et al.*, 2006) e controle da floração (Abe, *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006). Os fatores de transcrição do tipo bZIP de Arabidopsis foram classificados em 13 grupos (grupos A-L e S) de genes evolutivamente relacionados (Corrêa *et al.*, 2008).

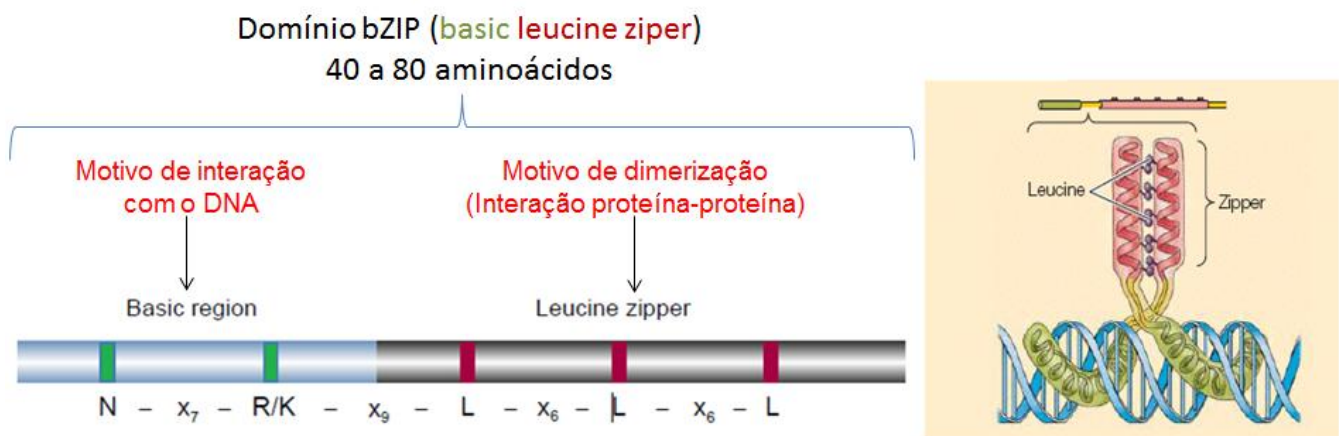


Figura 2. Representação esquemática da estrutura tridimensional do domínio conservado bZIP. O motivo básico é responsável pela especificidade de ligação ao DNA e endereçamento nuclear. O zíper de leucina é o motivo responsável pela dimerização (Adaptado de Jakoby *et al.*, 2002 – *Trends Plant Science*)

### 1.3 Sinalização por açúcares e sua interação com hormônios em plantas

Plantas são organismos fotoautotróficos capazes de converter a energia da luz em energia química que é utilizada para biossíntese de compostos ricos em energia como proteínas e carboidratos. Os açúcares produzidos nos tecidos fotossintetizantes (fonte) são transportados principalmente na forma de sacarose pelo floema, sendo distribuída entre os órgãos heterotróficos (drenos) como raízes, meristema apical vegetativo ou reprodutivo e

sementes (Roitsch, 1999). Para otimizar o seu crescimento e desenvolvimento tanto em condições favoráveis quanto adversas, é essencial que a planta possa ajustar a produção de açúcares (fotossíntese) em relação à demanda dos órgãos drenos. É também importante para as plantas ter a capacidade de integrar de maneira eficiente o metabolismo dos açúcares com a disponibilidade de outros macronutrientes essenciais (nitrogênio, fósforo e enxofre). Ao mesmo tempo, estresses bióticos (patógenos) e abióticos (hídrico e osmótico, entre outros) também afetam a expressão gênica e o metabolismo.

Para realizar estas complexas tarefas, as plantas desenvolveram redes de regulação intrincadas nas quais os açúcares desempenham papel chave de sinalização (Corruzi & Zhou, 2001; Forde, 2002; Rolland & Sheen, 2006; Rook *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2007). O dissacarídeo trealose aparentemente é um importante sinal que controla vários aspectos do desenvolvimento como crescimento de raízes, florescimento e embriogênese (Grennan *et al.*, 2007). Uma outra via de sinalização específica do dissacarídeo sacarose (a principal forma de transporte de carboidratos) envolvendo o fator de transcrição AtbZIP11, o qual controla a síntese de asparagina e a degradação de prolina foi recentemente identificada e define uma interação entre o metabolismo do nitrogênio e do carbono (Hanson *et al.*, 2007). A hexose glicose também é um importante sinal que promove mudanças importantes da expressão gênica (Koch, 1996; Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006), influenciando processos fundamentais como germinação, crescimento de raízes e caule, fotossíntese, metabolismo de carbono e nitrogênio, floração, resposta a estresses e senescência (Rolland *et al.*, 2002).

Estudos em *Saccharomyces* demonstraram que Hxk2 (*Hexokinase-2*) exerce papel fundamental na repressão de genes relacionados ao catabolismo de fontes de carbono não-fermentáveis em resposta a alta concentração de glicose (fonte fermentável) no meio (Carlson, 1999; Moreno *et al.*, 2005). Esta repressão ocorre pela interação de Hxk2 com a

proteína repressora Mig1 no núcleo (Ahuatzi *et al*, 2004), impedindo a fosforilação desta última pela proteína quinase Snf1 (*Sucrose non-fermenting 1*). A fosforilação de Mig1 é promovida por Snf1 em baixas concentrações de glicose e determina sua exportação do núcleo e a desrepressão de genes relacionados ao catabolismo de fontes alternativas de carbono como a sacarose (Santangelo, 2006) e ao metabolismo aeróbico (Polge & Thomas, 2006). A atividade sensora da hexoquinase é conservada em plantas. Foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* que a HXK1 (*Hexokinase 1*) atua como um sensor da glicose independentemente da sua atividade catalítica de fosforilação, induzindo a repressão de genes fotossintéticos (Moore *et al*, 2003). Dados recentes indicam que a HXK1 reprime a expressão do gene CAB2 (*Chlorophyll-a/b-binding 2*) interagindo com o promotor deste gene na forma de um complexo multiprotéico (Cho *et al.*, 2006). Outra forma de regulação é independente da atividade sensora de HXK1 e depende de sua atividade catalítica, sendo que os metabólitos produzidos após a fosforilação da glicose podem atuar regulando a expressão gênica (Revisão em Rolland *et al.*, 2006). Evidências genéticas também revelaram a existência de mecanismos de detecção e sinalização da glicose independente de HXK1, por exemplo aquela envolvendo um receptor acoplado a uma proteína G em *Arabidopsis* denominado RGS1 (*Regulator of G-protein signaling 1*) (Ullah *et al.*, 2002; Chen *et al.* 2003; Huang *et al.*, 2006).

A proteína Snf1 (*Sucrose non-fermenting 1*) de *Saccharomyces cerevisiae* possui grande similaridade com as famílias AMPk (*AMP-dependent protein kinase*) de mamíferos (Hong *et al*, 2003) e SnRKs (*Sucrose non-fermenting related kinases*) de plantas (Halford & Hardie, 1998). Estas proteínas quinases desempenham papéis fundamentais na manutenção da homeostasia energética, e as similaridades observadas entre estas proteínas sugerem mecanismos de monitoramento energético conservados em todos os eucariotos (Polge, &

Thomas, 2006). Recentemente, foram caracterizadas em *Arabidopsis* duas SnRK1s ativadas em condições de privação energética e reprimidas por glicose, KIN10 e KIN11. Estas duas quinases têm papel central na mudança do perfil de transcrição em respostas a condições que provocam deficiência energética (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Figura 3). Elas atuam ativando a expressão de genes relacionados a vias catabólicas (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) através de uma rede de sinalização que inclui fatores de transcrição tipo bZIP do grupo S e C (Baena-González *et al.*, 2007). Foi demonstrado neste mesmo trabalho que alguns fatores de transcrição dos grupos C e S de bZIPs (Jakoby *et al.*, 2003; Guedes Corrêa *et al.*, 2008) são importantes mediadores das respostas mediadas pelas SnRK1 KIN10 and KIN11 na adaptação a limitação energética (Baena-González *et al.*, 2007; Usadel *et al.*, 2008). Além disso, os fatores bZIP dos grupos C e S formam heterodímeros funcionais (Ehlert *et al.*, 2006), modificando o padrão de interação com o DNA e diversificando o conjunto de genes alvos diretos e indiretos que podem ser regulados por estes fatores.



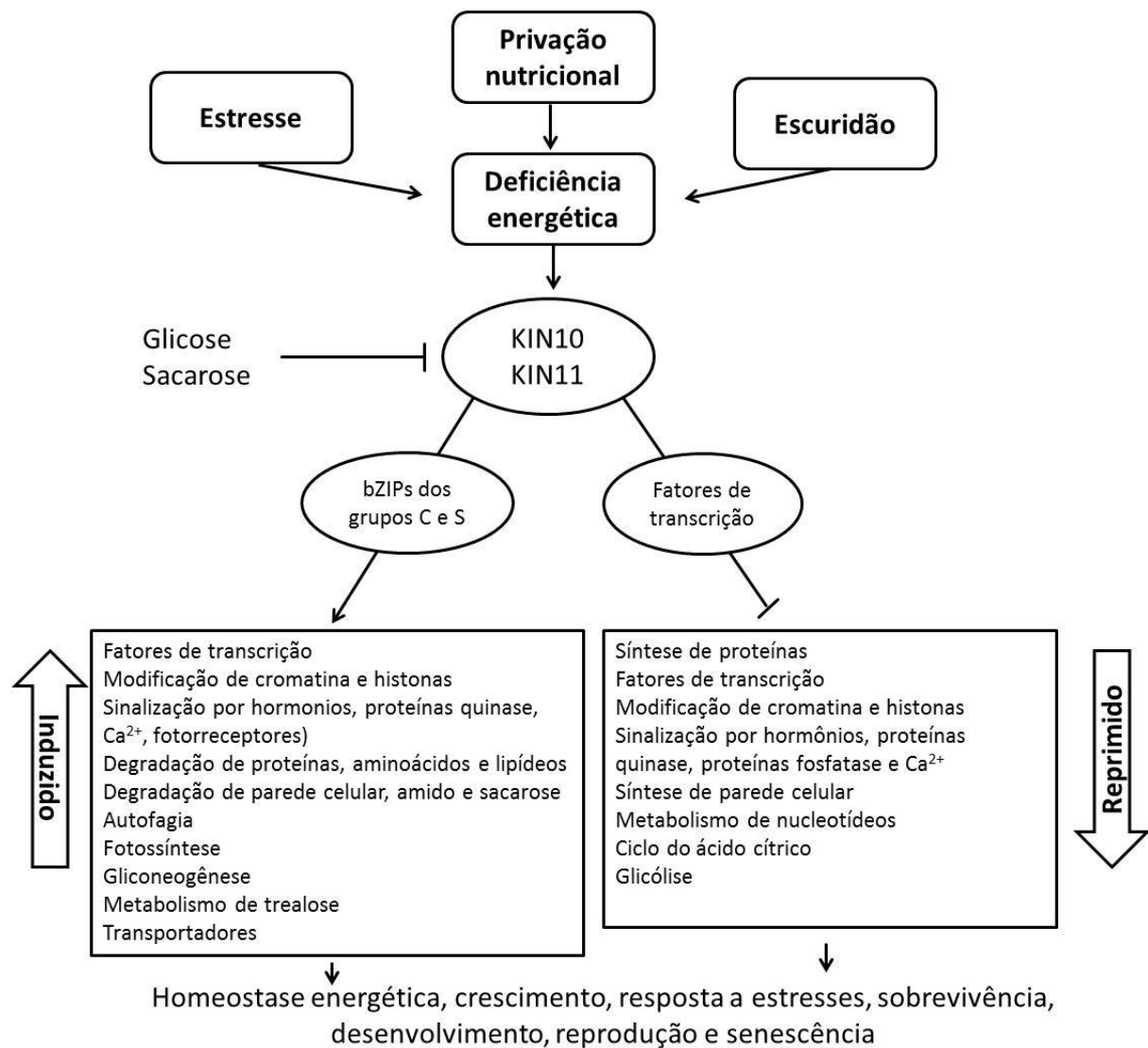


Figura 3. Regulação das respostas a privação energética mediada pelas quinases SnRK1 KIN10 e KIN11. Diversas condições de estresse, privação de nutrientes e escuridão provocam um deficit energético que ativa as quinases SnRK1 KIN10 e KIN11, as quais disparam uma cascata de sinalização que culminam na reprogramação transcricional que conduz a repressão de genes relacionados ao anabolismo e indução de genes relacionados ao catabolismo (Adaptado de Baena-González & Sheen, 2008 – *Trends in Plant Science*)

Outro ponto a ser ressaltado é que estudos com mutantes de *Arabidopsis* hipersensíveis (*glo* – glucose oversensitive) e insensíveis (*gin* - glucose insensitive) a glicose revelam íntima associação com sinalização por hormônios (revisão em Leon & Sheen, 2003). Esta associação parece ser essencial no ajuste fino do desenvolvimento e das respostas a

estresses ambientais, integrando informações do metabolismo energético e sinais transmitidos por hormônios. (Figura 4)

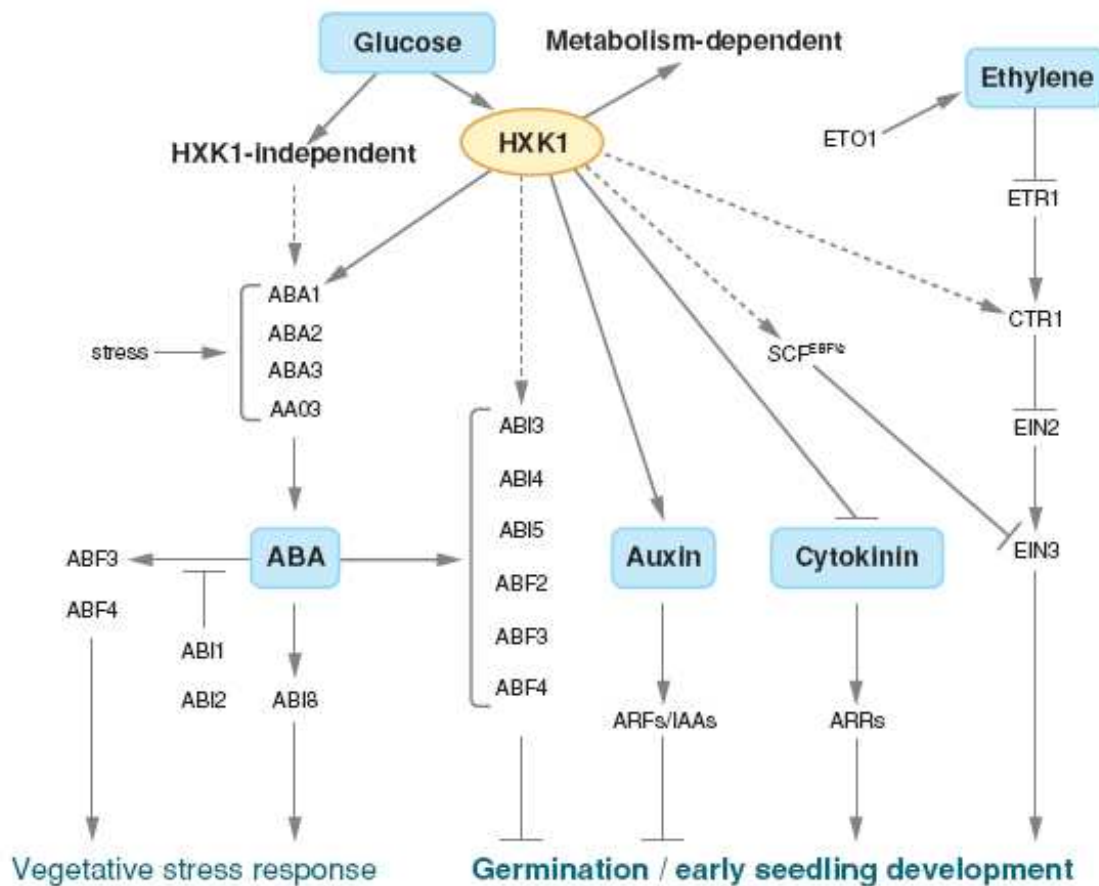


Figura 4. Interação entre a sinalização por glicose e hormônios em Arabidopsis. Parte das vias de sinalização induzidas por glicose dependem de genes relacionados a síntese e sinalização dos hormônios ABA, auxinas, citocininas e etileno. (Extraído de Rolland *et al.*, 2006 – *Annual Review of Plant Biology*).

A interação entre açúcares e ABA em Arabidopsis é evidenciada pela caracterização de diversos mutantes de síntese do ABA como *aba2* e *aba3* e de sensibilidade ao ABA como *abi4* e *abi5* como mutantes *gin* (Gibson, 2005). Uma possível interpretação destes resultados é que a glicose atua ativando a síntese da ABA (Cheng *et al.*, 2002). Alternativamente foi proposto que o ABA poderia modular as respostas a glicose (Rook *et al.*, 2006).

Outro hormônio que também demonstra interação com a sinalização por glicose é o etileno. Vários mutantes de componentes da via de sinalização do etileno como *ctr1*, *ein2* ou *etr1* apresentam respostas alteradas a glicose e foi deduzido que o etileno poderia ter uma atividade antagônica a glicose atenuando as respostas a esta hexose (Zhou *et al.*, 1998). A glicose por sua vez poderia também atuar como regulador negativo da sinalização pelo etileno promovendo a degradação de EIN3, regulador da transcrição envolvido nas respostas ao etileno (Yanagisawa *et al.*, 2003). Outras evidências genéticas apontam também para uma interação entre a glicose e os hormônios auxina e citocinina (Moore *et al.*, 2003). Porém, os mecanismos moleculares envolvidos nas comunicações cruzadas entre a glicose e os hormônios são pouco conhecidos. Além disto, o significado fisiológico destas conexões não é bem compreendido.

O ABA é considerado um hormônio de estresse e, portanto, é possível que as respostas coordenadas a ABA e glicose possam refletir a necessidade de adequar respostas a estresse de acordo com o nível energético (quantidade de açúcares) do organismo. Neste caso de interação entre ABA e glicose foi sugerido que o fator de regulação da transcrição ABI4 da família de reguladores do tipo AP2 (*Apetala 2*) e ABI5 da família do tipo bZIP poderiam atuar como elos de interação entre estes sinais para promover mudanças de expressão gênica e conseqüentemente respostas integradas da planta (Leon & Sheen, 2003). Outros fatores do tipo bZIP homólogos a ABI5 também foram identificados como mediadores da sinalização da glicose (Kim *et al.*, 2004). Análises das alterações dos perfis de expressão na escala genômica indicaram que a expressão de um conjunto de 39 fatores de transcrição é rapidamente alterada pela glicose (Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Estes fatores representam possíveis intermediários da cascata de regulação da transcrição ativada pela glicose. Deste conjunto de fatores de transcrição, 8 codificam para bZIPs, com 5 deles

sendo reprimidos (AtbZIP1, AtbZIP3, AtbZIP9, AtbZIP41 e AtbZIP63) e 3 induzidos (AtbZIP8, AtbZIP11 e AtbZIP39) (Li *et al.*, 2006).

#### **1.4 Ciclo circadiano**

O ciclo circadiano controla muitos processos metabólicos, desenvolvimentais e fisiológicos, como controle do florescimento, uso eficiente da água, controle do ritmo de crescimento/elongação e respostas á hormônios e luz (Barak *et al.*, 2000; Harmer, 2009; Montaigu *et al.*, 2010; Nakamichi, 2011) (Figura 5). O ritmo do relógio circadiano é sincronizado pelo ciclo dia/noite através da transdução de sinais luminosos e da acumulação de açúcares (Somers *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Farré & Weise, 2012), mas também pode ser alterado por outras condições ambientais como temperatura e estresse hídrico (Gould *et al.*, 2006; Legnaioli *et al.*, 2009). O relógio circadiano permite a antecipação de mudanças ambientais previsíveis (Mas & Yanovsky, 2009) como alterações de temperatura, estresse hídrico e infecção por patógenos (Nakamichi 2011; Shin *et al.*, 2012).

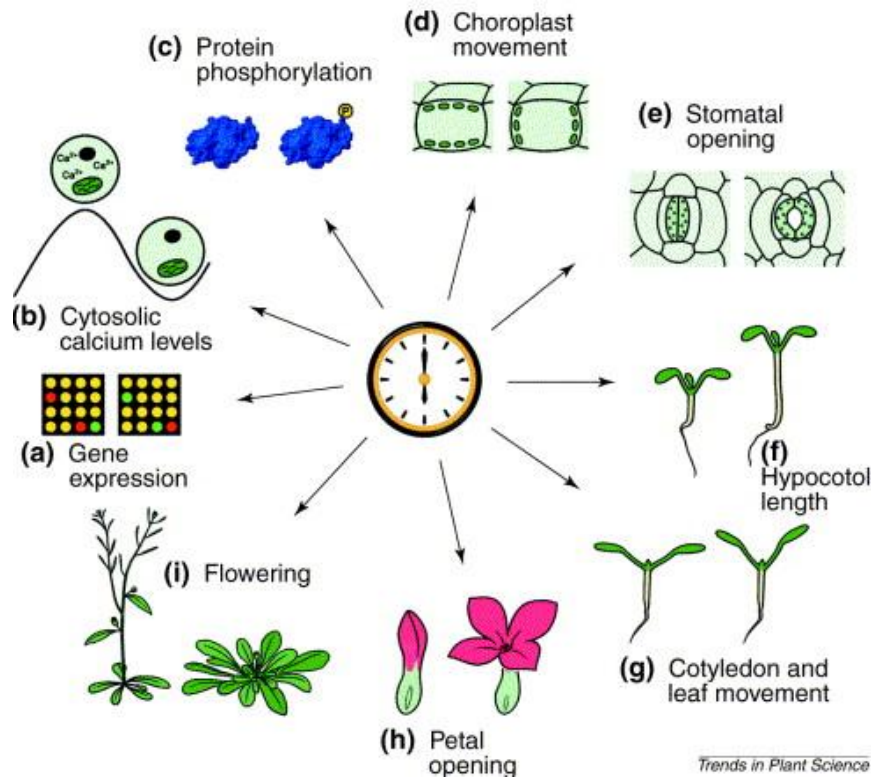


Figura 5. O relógio circadiano controla diversos processos importantes no crescimento e desenvolvimento e respostas a estresses (Extraído de Barak *et al.*, 2000).

## 1.5 Mecanismos de defesa contra patógenos

Quando um fitopatógeno atravessa os obstáculos que a planta possui para sua defesa, ele encontra um sistema de vigilância que detecta as tentativas de invasões, ativando uma ampla gama de defesas (Ingle *et al.*, 2006; Zipfel, 2008). A percepção inicial envolve a detecção de moléculas conservadas dos patógenos denominadas PAMP's (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) e MAMPs (*Microbe Associated Molecular Pattern*). A imunidade desencadeada por PAMP's (PTI ou *PAMP Triggered Immunity*) constitui a primeira linha da defesa que deve ser superada pelos patógenos para obterem sucesso na colonização dos tecidos das plantas (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2008). Isto é conseguido pelos patógenos através da secreção de efetores, que atuam no exterior ou interior da célula

hospedeira para suprimir ou manipular a imunidade inata da planta. Efeitos desencadeadores de suscetibilidade (ETS ou *Effector Triggered Susceptibility*) atuam na supressão da PTI. A PTI compreende uma gama de respostas universais, incluindo fluxos iônicos, cascatas de sinalização envolvendo diversas MAPK's (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS; *Reactive Oxygen Species*), reforço da parede celular e rápida indução de genes de resistência, amplamente regulados por fatores de transcrição WRKY (Ingle *et al.* , 2006). Para infectar uma planta hospedeira, patógenos bem sucedidos devem evitar o reconhecimento e/ou possuir efetores capazes de suprimir os moduladores chave de respostas da planta contra a infecção (Zipfel, 2008). As plantas possuem uma segunda linha de defesa, na forma de proteínas de resistência (R), os produtos que, direta ou indiretamente, detectam os efetores (chamadas proteínas de avirulência, AVR's), e conferem imunidade contra patógenos que foram bem sucedidos em suprimir a PTI. A imunidade desencadeada por efetores (ETI – *Effector triggered Immunity*) representa um segundo nível de resposta contra o organismo fitopatogênico. Na ETI, um produto dos genes R residente no interior da célula da planta, reconhece a(s) proteína(s) efetora(s) promotora de virulência correspondente entregue pelo patógeno. Muitos genes R codificam proteínas NB-LRR (*Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat*). Se um efector é reconhecido por uma proteína NB-LRR correspondente, ocorre ETI (Figura 6).

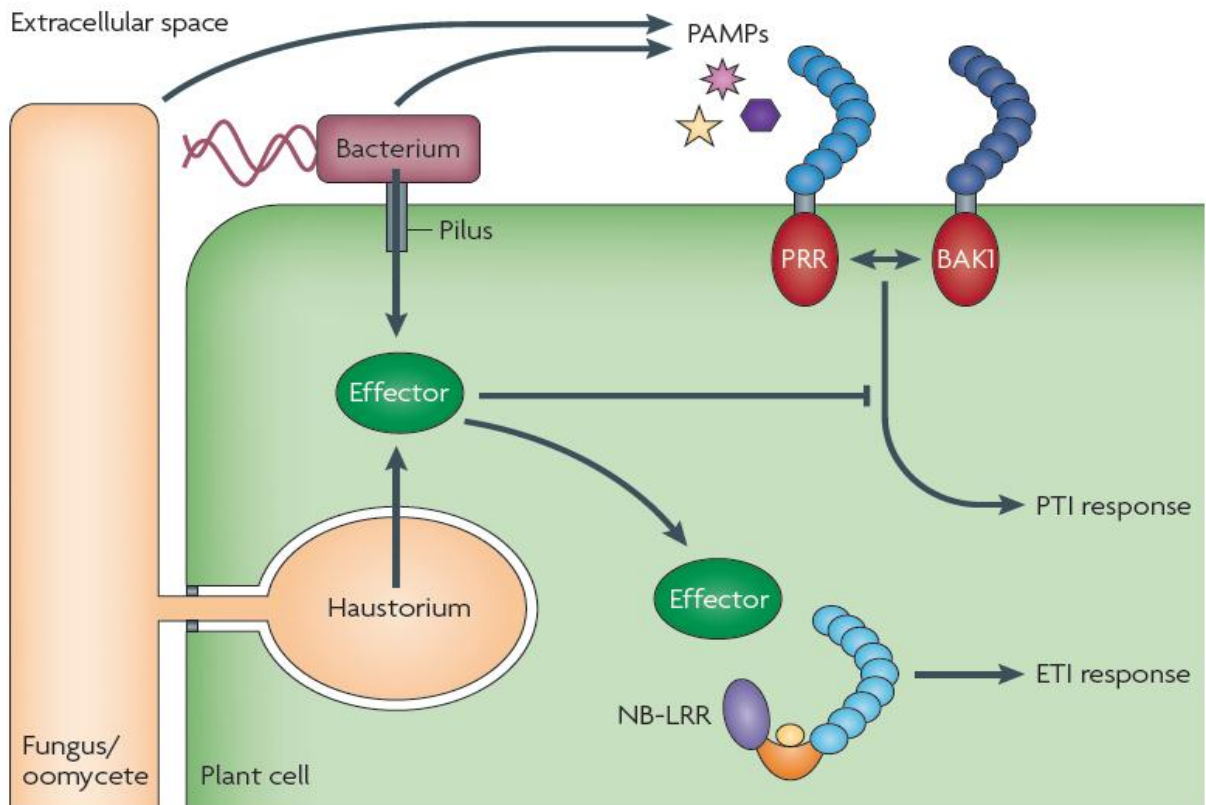


Figura 6. Representação esquemática do reconhecimento de elicitadores derivados de organismos fitopatogênicos pela planta e consequentes respostas PTI e ETI (Extraído de Dodds et al., 2011, Nature Genetics)

Análises de dados públicos de microarranjo mostraram, que o RNAm de *AtbZIP63* é fortemente induzido por diversas cepas da bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* e o PAMP flg22 (22 aminoácidos ativos da flagelo bacteriano) (www.genevestigator.com - Hruz et al., 2008). A observação de que a acumulação de RNAm de *AtbZIP63* pode ser regulado pela infecção com patógenos sugere que *AtbZIP63* participa também das respostas a estresses bióticos e revela mais um nível de complexidade da rede de regulação na qual este fator de transcrição está envolvido. Outro dado indicando que *AtbZIP63* poderia participar das respostas contra patógenos é a heterodimerização com o fator de transcrição *AtbZIP10* (Ehlert et al, 2006), um regulador positivo da resposta hipersensitiva (*HR – Hypersensitive*

*Response*) induzida por patógenos (Kaminaka *et al*, 2006). Neste trabalho foi demonstrado que na ausência de patógenos, AtbZIP10 associa-se a com a proteína citoplasmática LSD1 (*Lesions Simulating Disease resistance 1*), que o retém no citoplasma e impede seu transporte para o núcleo. Na presença de patógenos, AtbZIP10 dissocia-se da proteína LSD1 no citoplasma e é translocado até o núcleo, onde poderia interagir com AtbZIP63 e regular a expressão gênica. Reforçando a hipótese da participação de AtbZIP63 nas respostas a estresse biótico, dois de seus ortólogos, CPRF2 em salsa e G/HBF em soja (Lara *et al.*, 2003), estão envolvidos em respostas a patógenos e outros estresses ambientais (Weisshaar *et al*, 1991; Dröge-Laser *et al*, 1997).

O fator de transcrição AtbZIP63, além de ser regulado por glicose, também é regulado por ABA (Thomaz, 2008), apresenta um padrão de expressão variável ao longo do ciclo dia/noite (Usadel *et al.*, 2009) e media parcialmente as respostas a privação energética induzidas por KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007). Além disso, sua regulação por fitopatógenos sugere que este fator participa também das respostas a estresses bióticos. Em conjunto, estes dados o tornam um interessante objeto de estudo afim de contribuir para a compreensão de como são integrados o estado energético e as respostas a estresses abióticos (ABA) e bióticos (fitopatógenos).



## Objetivos

O presente estudo visou estabelecer os mecanismos envolvidos na regulação do fator de transcrição AtbZIP63 por glicose e ABA, bem como definir seu papel nas respostas a privação energética, sua importância na resposta contra fitopatógenos e na regulação do crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*.

1. Definir os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de AtbZIP63 por glicose e ABA e estabelecer como estes dois sinais interagem na regulação deste gene (Capítulo 1)
2. Avaliar o papel de AtbZIP63 no desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* e na resposta contra a bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 (Capítulo 2)
3. Determinar as proteínas que interagem com AtbZIP63 através do sistema de duplo híbrido em levedura (*Y2H – Yeast two-hybrid*) (Apêndice)

## **CAPÍTULO 1**

**Artigo publicado na revista *Plant Physiology***

# The Arabidopsis bZIP Gene *AtbZIP63* Is a Sensitive Integrator of Transient Abscisic Acid and Glucose Signals<sup>1[W][OA]</sup>

Cleverson Carlos Matioli<sup>2</sup>, Juarez Pires Tomaz<sup>2</sup>, Gustavo Turqueto Duarte, Fernanda Manso Prado, Luiz Eduardo Vieira Del Bem, Amanda Bortolini Silveira, Luciane Gauer, Luiz Gustavo Guedes Corrêa, Rodrigo Duarte Drumond, Américo José Carvalho Viana, Paolo Di Mascio, Christian Meyer, and Michel Vincentz\*

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

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

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

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

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

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

<sup>2</sup> These authors contributed equally to the article.

\* Corresponding author; e-mail mgavince@unicamp.br.

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

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

<sup>[OA]</sup> Open Access articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.181743](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.181743)

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESULTS

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

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

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

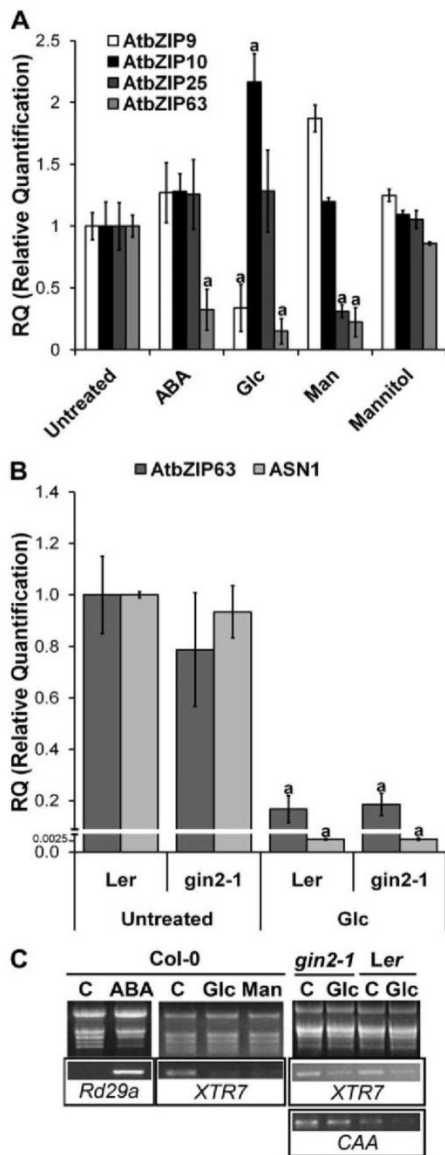
To evaluate more precisely the involvement of HXK1 sensing activity in the control of *AtbZIP63* expression by Glc, we analyzed the regulation of this gene in an HXK1 null mutant, *gin2-1* (ecotype Landsberg *erecta* [*Ler*] background), which is deficient in Glc-dependent photosynthetic gene repression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

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

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

The interaction between Glc and ABA to regulate gene expression may involve Glc-triggered modulation of ABA levels, as suggested previously (Arenas-Huertero et al., 2000). To assess the possibility that Glc-induced repression of *AtbZIP63* could be the result of an increase in ABA content, we monitored the changes in ABA levels in response to short-term Glc treatment. In addition, the changes in *ABI5* (At2g36270) mRNA levels were used as a positive control to verify the efficiency of the treatments (Fig. 2B), since this gene is induced by ABA (Lopez-Molina et al., 2003; Price et al., 2003).

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



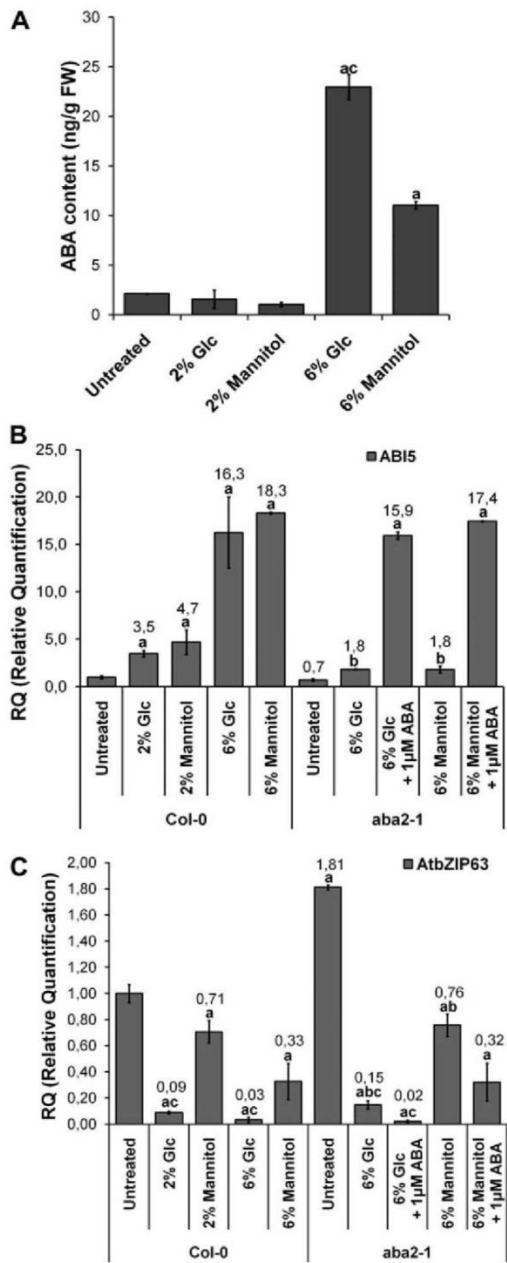
**Figure 1.** The expression of the Arabidopsis C-group bZIP genes *AtbZIP9*, *AtbZIP10*, *AtbZIP25*, and *AtbZIP63* is regulated by ABA, Glc, or Man, and Glc-mediated regulation of *AtbZIP63* is independent of *HXX1* sensing activity. Wild-type Col-0 and *Ler* or mutant *gin2-1* seedlings were grown for 6 d in MS/2 or MS/10 liquid medium for *Ler* and *gin2-1* and were subsequently treated with 100  $\mu$ M ABA, 2% Glc, 2% Man, or 2% mannitol for 4 h. Total RNA was analyzed by qRT-PCR assays. A, Relative transcript abundance of C-group bZIP genes. The data are means  $\pm$  SD (error bars) of at least three independent experiments. B, Expression of *AtbZIP63* and *AtASN1* in response to Glc treatment in *gin2-1*, a *HXX1* null mutant, and the corresponding *Ler* wild type. The data are means of at least three independent experiments. C, RNA integrity. C stands for the untreated control. The effectiveness of the treatments was verified by evaluating the induction of *Rd29a* by ABA and the repression of *XTR7* by Glc and Man by semiquantitative RT-PCR. *Carbonic anhydrase* (*CAA*; *At5g14740*) was used as a control for *HXX1*-mediated Glc-dependent gene repression. The differences from the untreated control were considered significant

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

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

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

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

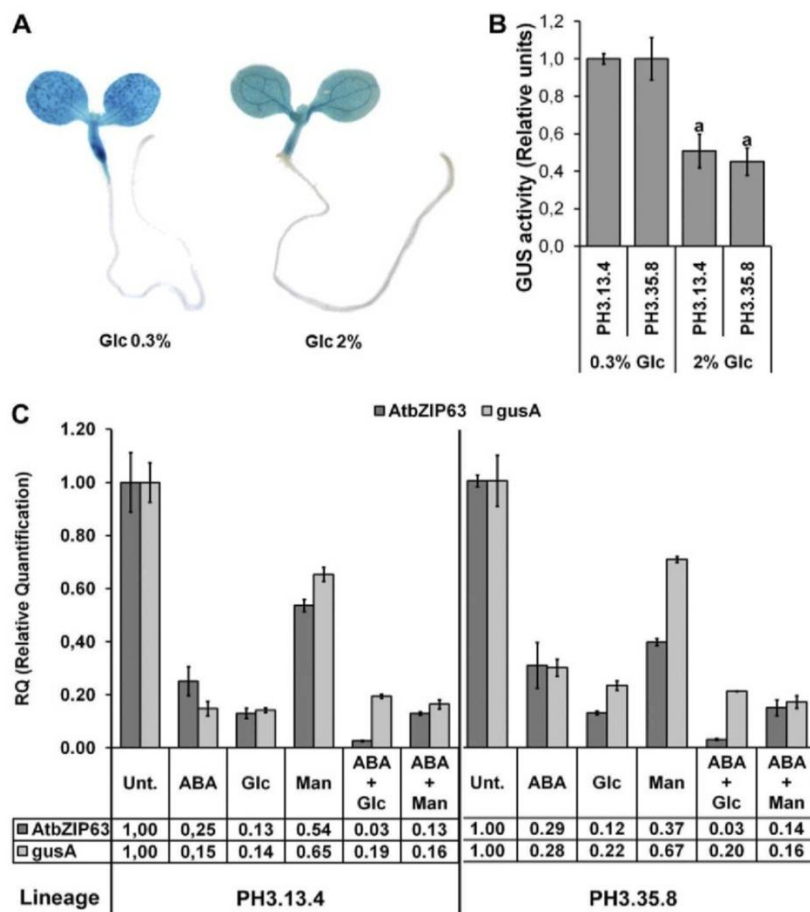


**Figure 2.** The repression of *AtbZIP63* by Glc is modulated by ABA. **A**, Quantification of ABA in untreated whole seedlings or seedlings treated with 2% or 6% Glc or 2% or 6% mannitol. Significant differences between treated and untreated seedlings and between Glc and mannitol treatments are indicated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

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

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

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



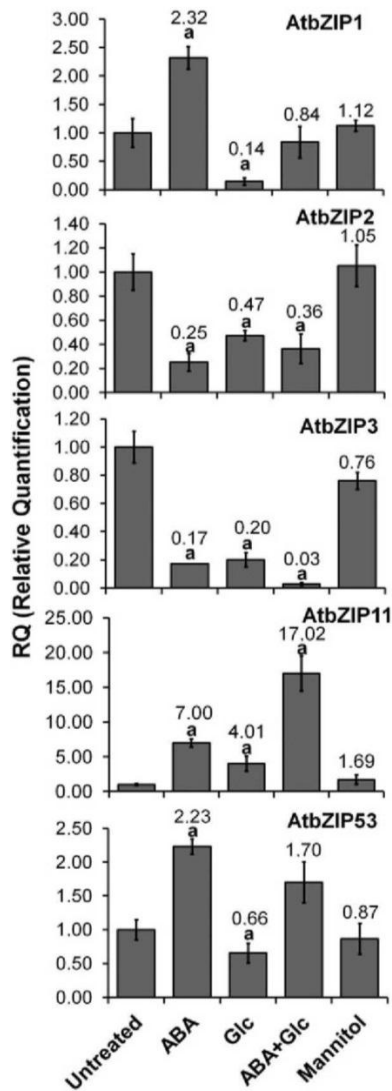
**Figure 3.** The synergistic repression of *AtbZIP63* by ABA+Glc cannot be reproduced by *AtbZIP63* promoter sequences. Transgenic seedlings of the PH3.13.4 and PH3.35.8 lineages (both homozygote for one transgenic locus) containing the reporter gene *GUS* under the control of the *AtbZIP63* promoter,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

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

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

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

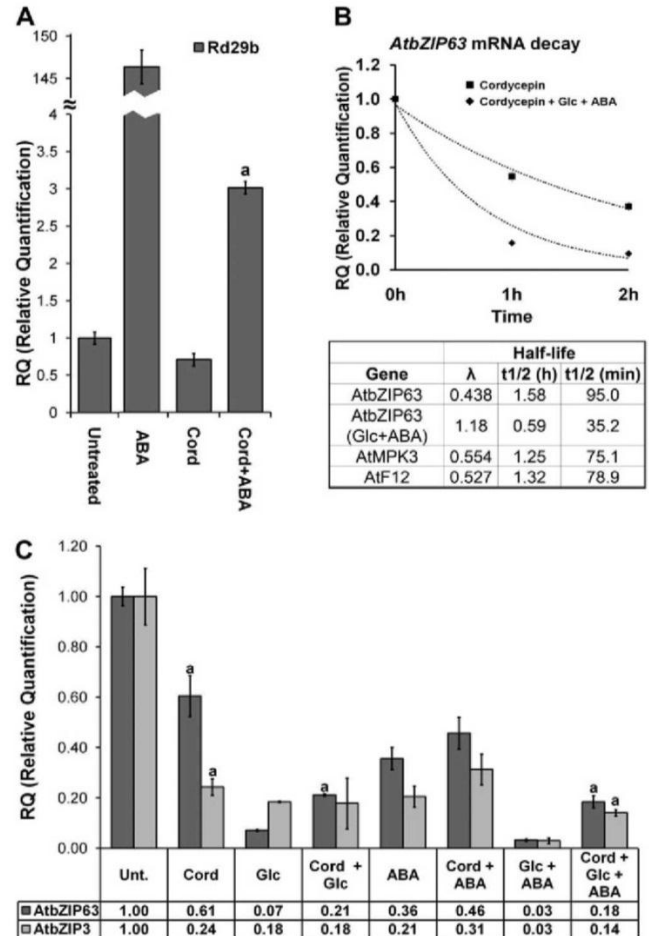




**Figure 4.** The expression of the Arabidopsis S-group bZIP genes *AtbZIP1*, *AtbZIP2*, *AtbZIP3*, *AtbZIP11*, and *AtbZIP53* is regulated by Glc and ABA. Wild-type Col-0 seedlings were grown for 6 d in MS/2 liquid medium under constant dim light and were subsequently treated with 2% mannitol (osmotic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

by almost 3-fold compared with the control treatment with cordycepin alone (Fig. 5C). These results indicate that Glc alone may also control the stability of *AtbZIP63* mRNA and that the expected Glc+ABA-mediated synergistic repression was hindered in the presence of cordycepin (Fig. 5C), raising the possibility that successful synergism requires transcription. This latter

conclusion also applies to Glc-induced down-regulation of *AtbZIP63*, since this regulation was significantly weaker in the presence of cordycepin compared with the samples treated only with Glc (Fig. 5C). In contrast, the ABA-mediated reduction of *AtbZIP63* mRNA in the presence of cordycepin was not significantly different from the control treatments with cordycepin or



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

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

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

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

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

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

*AtbZIP63* has been shown to interact with the SnRK1.1 KIN10 to promote the expression of Glc-dependent *ASN1* in a transient protoplast assay system (Baena-González et al., 2007). KIN10 is a key regulator of energetic stress adaptation, which involves a large extent of transcriptional changes (Baena-González et al., 2007). To further assess the involvement of *AtbZIP63* in KIN10-mediated responses, we analyzed the expression of selected genes that are known to be induced by KIN10 and highly coexpressed with *AtbZIP63* (<http://cressexpress.org>; Srinivasasainagendra et al., 2008) in two *AtbZIP63* mutants corresponding to T-DNA insertion lines (*atbzip63-1* in Col-0 and *atbzip63-2* in Ws; Fig. 6, A and B). We found that *ASN1* and *SEN1* (for senescence-associated protein 1; At4g35770) are misregulated in both *atbzip63-1* and *atbzip63-2* after 24 h of darkness when compared with their respective wild-type genotypes. Additionally, *DIN10* (for dark inducible 10; At5g20250) expression was found to present significant differences from the wild type only in

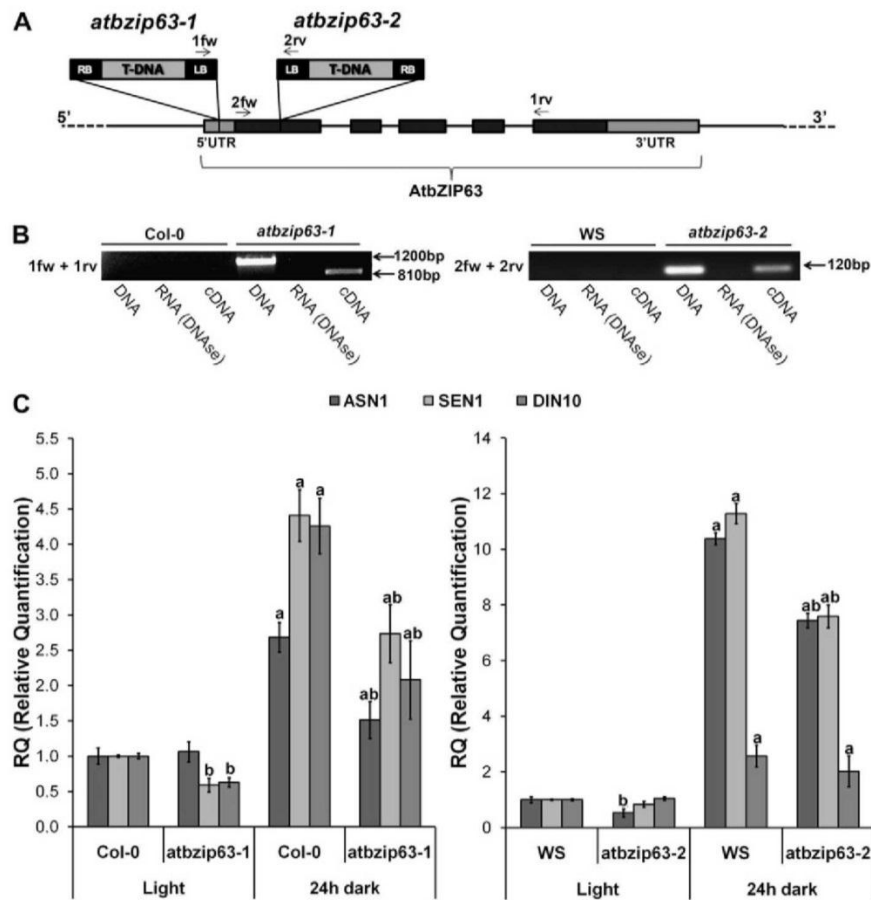
*atbzip63-1* (Fig. 6C). *DIN10* is a putative raffinose synthase (EC 2.4.1.82) from the GH36 family (<http://www.cazy.org/GH36.html>) that shares approximately 38% identity with a functionally characterized raffinose synthase from pea (*Pisum sativum*; European Bioinformatics Institute accession no. AJ426475; Peterbauer et al., 2002) that catalyzes the conversion of Suc and galactinol into myoinositol and raffinose. The differential expression profile between *atbzip63-1* and *atbzip63-2* could be due to the different genetic backgrounds, Col-0 and Ws, respectively. In conclusion, these results support the notion that *AtbZIP63* participates in the KIN10-mediated transcriptional changes.

## **DISCUSSION**

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material, Growth Conditions, and Treatments

*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) Col-0, Ws, and *Ler* wild-type ecotypes, as well as the mutants *aba2-1* (Léon-Kloosterziel et al., 1996; Cheng et al., 2002), *abi4-1* (Finkelstein, 1998), *gin2-1* (Jang et al., 1997), *atbzip63-1* (SALK\_006531), and *atbzip63-2* (FLAG\_610A08), were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center. Segregation analysis of kanamycin resistance was used to isolate genotypes homozygous for one T-DNA locus. Seeds (10 mg) were surfaced sterilized and incubated in MS/2 for 72 h at 4°C in the dark to break dormancy. Seedlings were subsequently grown for 5 d in 10 mL of liquid MS/2 or MS/10 salt medium (Sigma) adjusted to 0.3% Glc (w/v) at 22°C, constant light (20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), and constant agitation (70 rpm). The medium was then replaced by 10 mL of Glc-free medium, and seedlings were further grown for 24 h followed by 2- or 4-h treatments with 2% or 6% Glc or mannitol, 2% Man, or 100  $\mu\text{M}$   $\pm$ cis,trans-ABA (Sigma). Transcription inhibition assays consisted of challenging 6-d-old seedlings (MS/2) with 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (final concentration) cordycepin (3-deoxyadenosine; Sigma). Measurements of mRNA half-life were performed as described by Lam et al. (2001) and Gutiérrez et al. (2002), with samples treated with cordycepin for 1 and 2 h. Since the degradation of a mRNA obeys first-order kinetics, the difference in mRNA levels between 0 and 1 h was used to estimate the decay constant ( $\lambda$ ), which was used in the equation  $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda$  to estimate the transcript half-life. Glc- and ABA-mediated posttranscriptional responses were evaluated by incubating seedlings with 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  cordycepin for 1 h followed by 2-h treatments with 2% Glc and/or 100  $\mu\text{M}$  ABA.

### DNA Constructs, Plant Transformation, and GUS Detection

Transgenic lines expressing a translational fusion between the *AtbZIP63* promoter and the reporter gene *GUS* were obtained following the strategy described by Silveira et al. (2007). The *AtbZIP63* (At5g28770) promoter, 5' UTR sequence (75 bp), and 36 bp coding for the first 12 amino acids (approximately 2.8 kb) were amplified from genomic DNA with two specific primers, 5'-GGTGATTGCCCAATCTGCAGCTTTAATCG-3' and 5'-GTGATGGGATCCGGAGATTCTTCG-3', in which a *Pst*I and a *Bam*HI restriction site, respectively, was introduced to facilitate a translational fusion with *GUS* in pBI121 plant transformation binary vector (Chen et al., 2003b) from which the cauliflower mosaic virus 35S promoter was removed. Poly(A) signals are from the nopaline synthase gene present in pBI121. Two homozygous lines (PH3.13.4 and PH3.35.8) for a single transgenic locus were selected based on kanamycin resistance segregation, and the presence of the chimeric gene was verified by

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

### RNA Isolation, DNase Treatment, RT, and PCR

Total RNA was isolated with a buffer containing 8 M guanidine-HCl (Invitrogen), 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 (Invitrogen), 20 mM EDTA, pH 8.0 (Invitrogen), and 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Gibco) following the methodology described by Logemann et al. (1987). When necessary, RNA was treated with DNase (Turbo DNA Free; Ambion) following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis from 1.5  $\mu\text{g}$  of total RNA (final volume of 12.5  $\mu\text{L}$ ) was performed using ImProm II Reverse Transcriptase (Promega) and oligo(dT)<sub>18</sub> essentially according to the manufacturer's instructions. Semiquantitative PCR conditions were basically realized as described by Silveira et al. (2007). Control genes for ABA, Glc, and Man treatments were *Rd29a* for ABA (At5g52310; Arroyo et al., 2003) and *XTR7* for Glc and Man (At4g14130; Price et al., 2004), respectively. The carbonic anhydrase gene (At5g14740) was used as a Glc-repressible HXK1-dependent positive control (Moore et al., 2003). Primers and annealing temperatures are given in Supplemental Table S2.

### Real-Time PCR Analysis

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

### ABA Quantification by HPLC-Tandem Mass Spectrometry

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

### Statistical Analysis

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

## Supplemental Data

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

**Supplemental Figure S1.** The expression of *AtbZIP63* is repressed by 10  $\mu$ M ABA.

**Supplemental Figure S2.** ABI4 modulates ABA- and Glc-induced *AtbZIP63* repression.

**Supplemental Figure S3.** Regulation of the three C-group bZIP genes, *AtbZIP9*, *AtbZIP10*, and *AtbZIP25*, by different combinations of ABA, Glc, and Man.

**Supplemental Figure S4.** The synergistic repression of *AtbZIP63* by Glc+ABA does not rely directly on miRNA activity.

**Supplemental Figure S5.** Sequence analyses of *AtbZIP3* and *AtbZIP63* 3'UTRs.

**Supplemental Table S1.** Common promoter motifs between *AtbZIP63* and *AtbZIP3*.

**Supplemental Table S2.** Primers used in PCR, semiquantitative RT-PCR, and qRT-PCR assays.

**Supplemental Table S3.** *Actin2* and *PDF2* qRT-PCR cycle threshold (Ct) in different treatments and mutants.

## ACKNOWLEDGMENTS

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

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

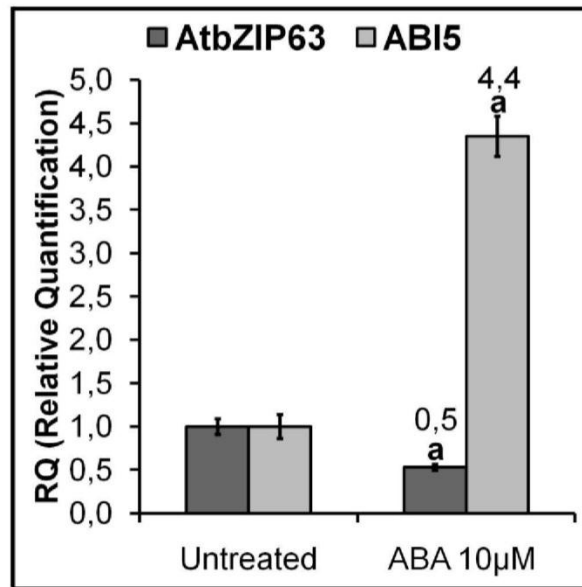
## LITERATURE CITED

- Acevedo-Hernández GJ, León P, Herrera-Estrella LR (2005) Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *Plant J* **43**: 506–519
- Alonso R, Oñate-Sanchez L, Weltmeier F, Ehlert A, Diaz I, Dietrich K, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W (2009) A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of *Arabidopsis* seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell* **21**: 1747–1761
- Arenas-Huerta E, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P (2000) Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* **14**: 2085–2096
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, León P (2003) Three genes that affect sugar sensing (Abscisic Acid Insensitive 4, Abscisic Acid Insensitive 5, and Constitutive Triple Response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**: 231–242
- Baena-González E (2010) Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Mol Plant* **3**: 300–313
- Baena-González E, Rolland F, Thevelin JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature* **448**: 938–943
- Baena-González E, Sheen J (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 474–482
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* **123**: 1279–1291
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2002) Regulation and role of the *Arabidopsis* *Abscisic Acid-Insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol* **129**: 1533–1543
- Brocard-Gifford I, Lynch TJ, García ME, Malhotra B, Finkelstein RR (2004) The *Arabidopsis thaliana* abscisic acid-insensitive8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* **6**: 406–421
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1499–1510
- Chen JG, Jones AM (2004) *AtRGS1* function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol* **389**: 338–350
- Chen JG, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP (2003a) A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* **301**: 1728–1731
- Chen P-Y, Wang C-K, Soong S-C, To K-Y (2003b) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol Breed* **11**: 287–293
- Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J, Zhang J (2006) The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* **140**: 302–310
- Cheng W-H, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, et al (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**: 2723–2743
- Cho J, Ryoo N, Eom J, Lee D, Kim H, Jeong S, Lee Y, Kwon Y, Cho M, Bho SH, et al (2009) Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiol* **149**: 745–759
- Cho Y, Sheen J, Yoo S (2010) Low glucose uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and C2H4 responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**: 1180–1182
- Cho Y-H, Yoo S-D, Sheen J (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* **127**: 579–589
- Correia LGG, Riaño-Pachón DM, Guerra Schrago C, Vicentini dos Santos R, Mueller-Roeber B, Vincenz M (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS ONE* **3**: e2944
- Corruzi GM, Zhou L (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging “matrix effect.” *Curr Opin Plant Biol* **4**: 247–253
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 5–17
- Dietrich K, Weltmeier F, Ehlert A, Weiste C, Stahl M, Harter K, Dröge-Laser W (2011) Heterodimers of the *Arabidopsis* transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell* **23**: 381–395
- Ehlert A, Weltmeier F, Wang X, Mayer CS, Smeekens S, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W (2006) Two-hybrid protein-protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J* **46**: 890–900
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* **10**: 1043–1054
- Forde BG (2002) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 203–224
- Gibson SI (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 93–102
- Gibson SI, Laby RJ, Kim D (2001) The sugar-insensitive1 (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 196–203
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res (Database Issue)* **36**: D154–D158
- Gutiérrez RA, Ewing RM, Cherry JM, Green PJ (2002) Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11513–11518
- Gutiérrez RA, Lejay LV, Dean D, Chiaromonte F, Shasha DE, Coruzzi GM (2007) Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **8**: R7
- Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J* **419**: 247–259
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MMWB, Smeekens S (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant J* **53**: 935–949
- Holtorf H, Schöb H, Kunz C, Waldvogel R, Meins F Jr (1999) Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and  $\beta$ -1,3-

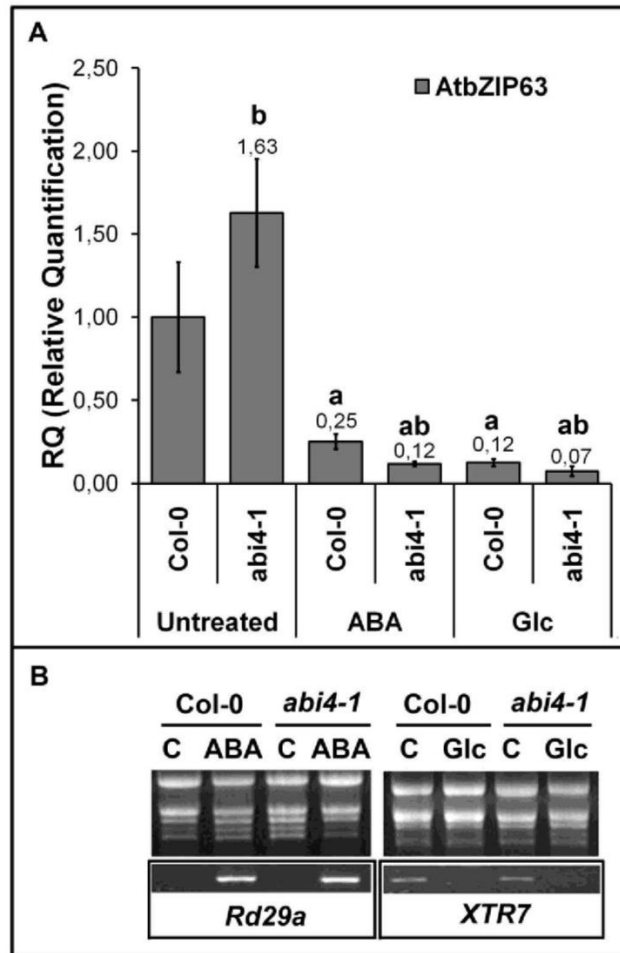
- glucanase genes involves increased RNA turnover: possible role for ribosome-independent RNA degradation. *Plant Cell* **11**: 471–483
- Houseley J, Tollervey D (2009) The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**: 763–776
- Huang J, Taylor JP, Chen JG, Uhrig JF, Schnell DJ, Nakagawa T, Korth L, Jones AM (2006) The plastid protein THYLAKOID FORMATION1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signal-ing mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1226–1238
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* **24**: 1695–1708
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S (2000) The *Arabidopsis* SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J* **23**: 577–585
- Jakoby M, Weisshaar B, Döge-Laser W, Vicent-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **7**: 106–111
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5–19
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–3907
- Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schütze K, Chaban C, Holt BF III, Merkle T, Schäfer E, Harter K, et al (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J* **25**: 4400–4411
- Kang SG, Price J, Lin P-C, Hong JC, Jang J-C (2010) The *Arabidopsis* bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. *Mol Plant* **3**: 361–373
- Kant P, Kant S, Gordon M, Shaked R, Barak S (2007) Stress response suppressor1 and stress response suppressor2, two dead-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiol* **145**: 814–830
- Kempa S, Krasensky J, Dal Santo S, Kopka J, Jonak C (2008) A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS ONE* **3**: e3935
- Koch KE (1996) Carbohydrates modulate gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 509–540
- Koussewitzky S, Not A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J (2007) Signal from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**: 715–719
- Laby RJ, Kincaid MS, Kim D, Gibson SI (2000) The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* **23**: 587–596
- Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltneane JM, Averett LM, Zhao H, Davis RE, Sathyamoorthy M, et al (2001) Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* **2**: 1–11
- León P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci* **8**: 110–116
- Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaert JA, Koornneef M (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* **10**: 655–661
- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW (2006) Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine. *Genome Res* **16**: 414–427
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods* **25**: 402–408
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16–20
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* **17**: 410–418
- Lu C, Fedoroff N (2000) A mutation in the *Arabidopsis* HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* **12**: 2351–2365
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. *Science* **300**: 332–336
- Narsai R, Howell KA, Millar AH, O'Toole N, Small I, Whelan J (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 3418–3436
- Nishimura N, Kitahata N, Seki M, Narusaka Y, Narusaka M, Kuromori T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2005) Analysis of ABA Hypersensitive Germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**: 972–984
- Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1999) Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol* **119**: 1017–1023
- Peterbauer T, Mach L, Mucha J, Richter A (2002) Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta* **215**: 839–846
- Polge C, Thomas M (2006) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci* **12**: 20–27
- Price J, Laxmi A, Saint Martin S, Jang J-C (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2128–2150
- Price J, Li T-C, Kang SG, Na JK, Jang J-C (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**: 1424–1438
- Ramon M, Rolland F, Sheen J (2008) Sugar sensing and signaling. The *Arabidopsis* Book **6**: e0117, doi/10.1199/tab.0117
- Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miRNA159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* **49**: 592–606
- Roitsch T (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 198–206
- Rolland F, Baena-González E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675–709
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell (Suppl)* **14**: S185–S205
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J* **26**: 421–433
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, Van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene. *Plant J* **15**: 253–263
- Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ* **29**: 426–434
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 296–302
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* **58**: 221–227
- Silveira AB, Gauer L, Tomaz JP, Cardoso PR, Carmello-Guerreiro S, Vincenz M (2007) The *Arabidopsis* AtbZIP9 protein fused to VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. *Plant Sci* **172**: 1148–1156
- Smeekens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 49–81
- Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**: 1126–1149
- Söderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2000) Regulation of the *Arabidopsis*-insensitive 4 gene in seed and abscisic acid response signaling network. *Plant Physiol* **124**: 1752–1765
- Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ (2004) AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* **15**: 173–183
- Srinivasanagendra V, Page GP, Mehta T, Coulibaly I, Loraine AE (2008) CressExpress: a tool for large-scale mining of expression data from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **147**: 1004–1016
- Ullah H, Chen JG, Wang S, Jones AM (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* **129**: 897–907
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* **51**: 1821–1839
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11632–11637

- Usadel B, Blasing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Hohne M, Gunther M, Stitt M** (2008) Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes. *Plant Physiol* **146**: 1834–1861
- Villadsen D, Smith S** (2004) Identification of more than 200 glucose-responsive *Arabidopsis* genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. *Plant Mol Biol* **55**: 467–477
- Vincentz MGA, Bandeira-Kobarg C, Gauer L, Schlögl P, Leite A** (2003) Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize *Opaque-2* regulatory protein. *J Mol Evol* **55**: 1–12
- Wang HX, Weerasinghe RR, Perdue TD, Cakmakci NG, Taylor JP, Marzluff WF, Jones AM** (2006) A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell* **17**: 4257–4269
- Weltmeier F, Ehlert A, Mayer CS, Dietrich K, Wang X, Schütze K, Alonso R, Harter K, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W** (2006) Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J* **25**: 3133–3143
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S** (2004) A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell* **16**: 1717–1729
- Xiao W, Sheen J, Jang JC** (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol* **44**: 451–461
- Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu W, Galbraith D, Zhu J-K** (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **1**: 771–781
- Zhou L, Jang J-C, Jones TL, Sheen J** (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10294–10299

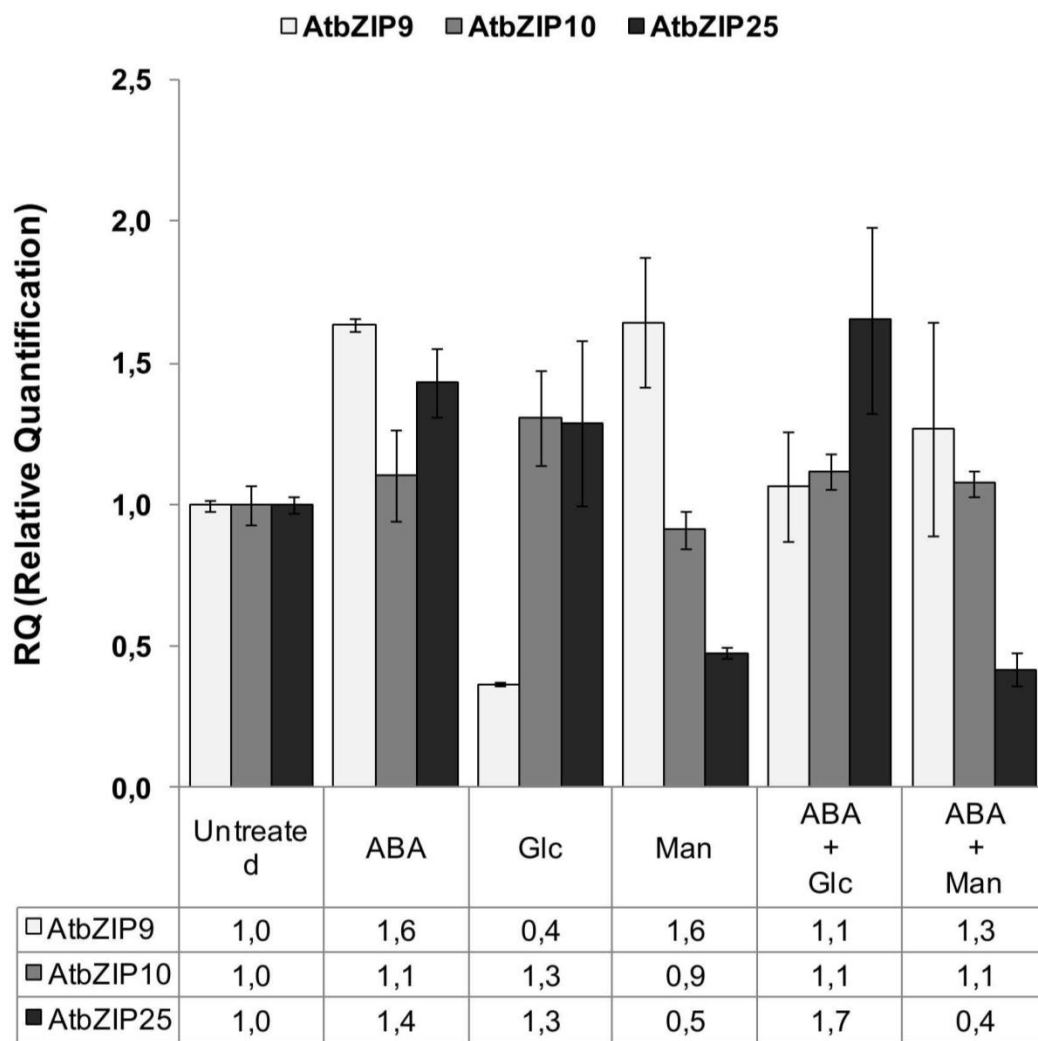




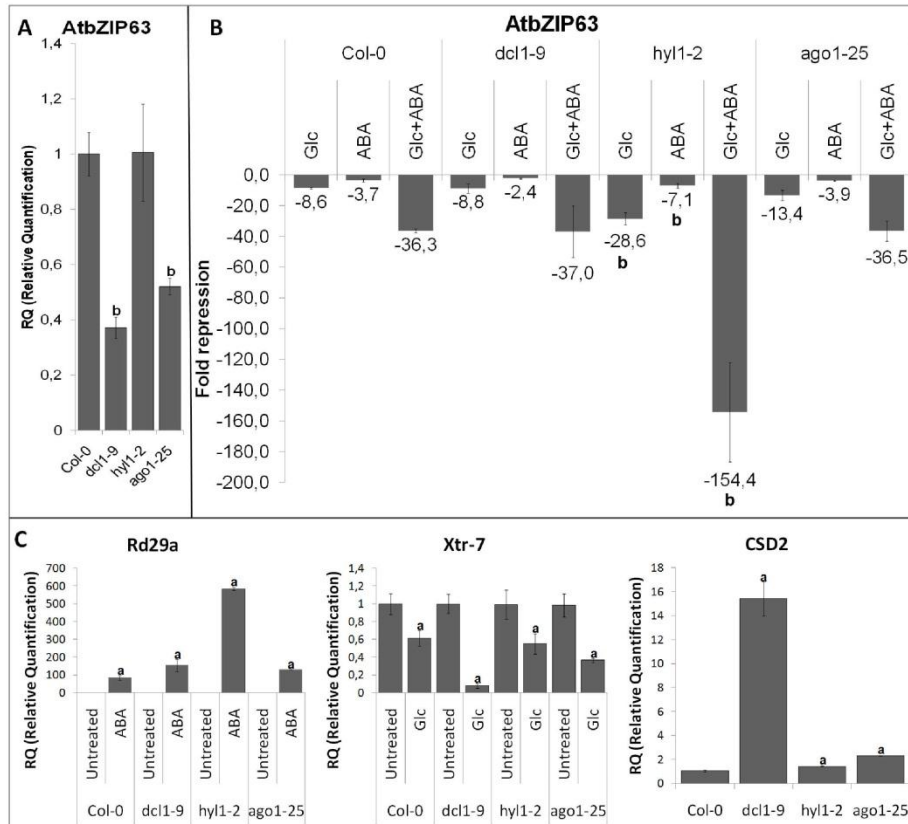
**Figure S1.** The expression of *AtbZIP63* is repressed by 10  $\mu$ M ABA. Wild-type Columbia-0 (Col-0) seedlings were grown for six days in MS/2 liquid medium and were subsequently treated with 10  $\mu$ M ABA. Total RNA was analyzed by qRT-PCR assays. The data are the mean  $\pm$  standard deviation (error bar) of four independent experiments. The numbers above the bars represent the mean values of the relative quantification. The effectiveness of the treatments was verified by evaluating the induction of *ABI5*. The differences to the untreated control were considered significant when  $P < 0.05$  (Student's *t* test) and are indicated by letter **a**. Expression data are normalized to the *PDF2* mRNA levels and the relative quantification is referring to the untreated Col-0.



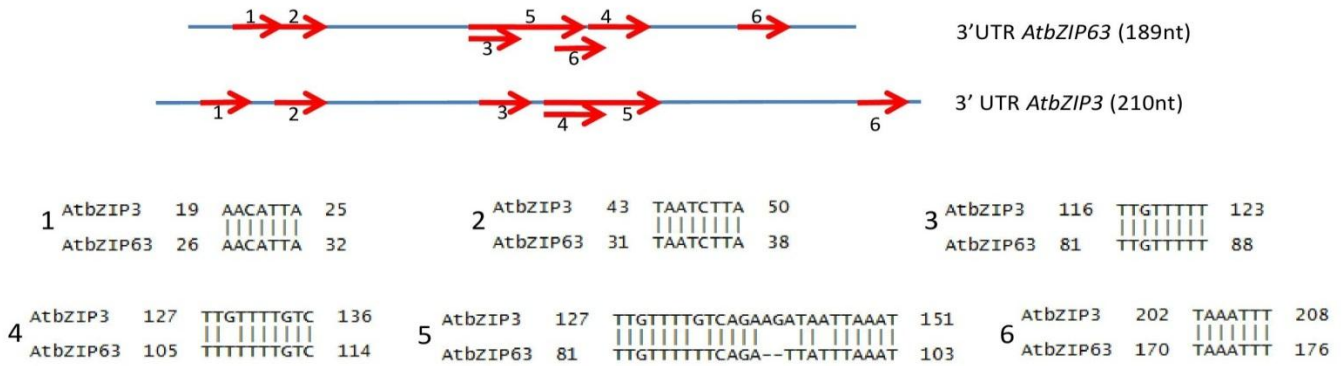
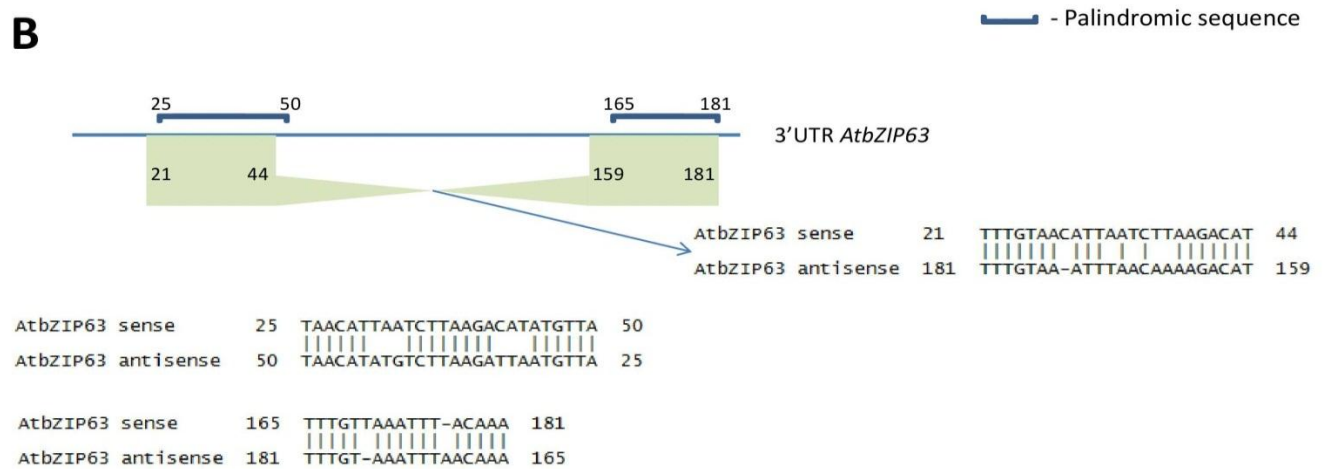
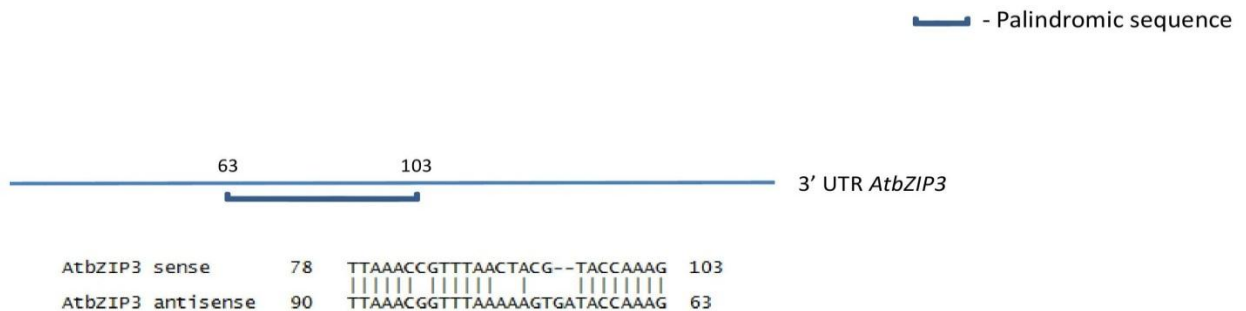
**Figure S2.** ABI4 modulates ABA- and Glc-induced *AtbZIP63* repression. Regulation of *AtbZIP63* expression by ABA and Glc was compared between *abi4-1* and wild-type Col-0. **A.** Relative transcript abundance of *AtbZIP63* in untreated and treated *abi4-1* and Col-0 wild-type 6-day-old seedlings.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



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



**Figure S4.** The synergistic repression of *AthZIP63* by Glc+ABA does not rely directly on miRNA activity. The regulation of *AthZIP63* expression by ABA, Glc and Glc+ABA was compared between homozygous mutants that lack an intact miRNA pathway and wild-type Col-0. *dcl1-9* (Jacobsen et al, 1999) is a nonlethal allele that is deficient in miRNA biogenesis. Originally isolated in WS (Wassilewskija) background, the *dcl1-9* was back crossed six times into Col-0 (Hervé Vaucheret, personal communication). *hyl1-2* (Lu & Fedoroff, 2000; Vazquez et al., 2004; Han et al., 2004) shows reduced accumulation of miRNA. *ago1-25* (Morel et al, 2002) is impaired in miRNA-directed cleavage of target mRNA. Seedlings of Col-0, *hyl1-2* and *ago1-25* were grown in MS/2 liquid medium as described in Material and Methods, and were subsequently treated with 100µM ABA and/or 2% Glc for 4 h. *dcl1-9* homozygous seedlings were identified in the progeny resulting from selfing of (DCL1 / *dcl1-9*) heterozygous plants and which was grown for 8 days in solid MS/2 supplemented with 0.3% Glc. *dcl1-9* seedlings and their corresponding wild-type Col-0 (grown under the same conditions as *dcl1-9*) were then transferred to Glc-free MS/2 liquid medium for 24 h and subsequently treated as described above. *PDF2* was used as reference control gene. The data on the graphic are the mean +/- standard deviation (error bar) from three independent experiments for each treatment. **A.** Relative *AthZIP63* transcript abundance in untreated genotypes, quantification is referring to the untreated wild type Col-0. Letter **b** represents a significant difference of expression between equally treated mutants and Col-0. *dcl1-9* and *ago1-25* show reduced accumulation of *AthZIP63* mRNA compared to Col-0, indicating that the regulation by miRNA may have an indirect effect on *AthZIP63* expression. **B.** Fold repression of *AthZIP63* in treated Col-0, *dcl1-9*, *hyl1-2* and *ago1-25*, relative quantification is referring to the respective untreated genotype. Letter **a** represents a significant difference of expression between treated mutant and the same treatment in Col-0. **C.** Treatments effectiveness was verified by evaluating the induction of *Rd29a* by ABA and repression of *Xtr-7* by glucose. *CSD2* (*At2g28190*; Cu/Zn Superoxide Dismutase 2), whose post-transcriptional induction results from the down-regulation of miR398 (Sunkar et al., 2006), was used as a control of miRNA pathway mutants. Letter **a** represents a significant difference of expression between treated and untreated plants (for *Rd29a* and *Xtr-7*) and letter **b** between equally treated mutants and Col-0 (for *CSD2*). Differences were considered significant when  $P < 0.05$  ( $n = 3$ ).

**A****B****C**

**Figure S5.** Sequence analysis of *AtbZIP3* and *AtbZIP63* 3' UTRs. Sequence motifs shared by *Arabidopsis thaliana* and *A. lyrata* *AtbZIP63* or *AtbZIP3* orthologs were in a first step identified. *AtbZIP3* and its *A. lyrata* ortholog (488428 – JGI accession number) 3'UTRs are 94.2% identical while *AtbZIP63* and its ortholog (489663) 3'UTRs are 87% identical. Subsequently, the presence of shared motives in both *A. thaliana* *AtbZIP63* and *AtbZIP3* was evaluated. **A** – Schematic representation and alignment of the six common motifs between *AtbZIP3* and *AtbZIP63* 3' UTRs. **B** – Palindromic sequences present in *AtbZIP63* 3' UTR along with inverted repeats that may potentially form a secondary structure. **C** – Palindromic sequence present in *AtbZIP3* 3' UTR. The alignments were produced by Blast2Seq ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi); optimized for Blastn, word size=7 and low complexity filter off).

**Table S1.** Common promoter motifs between *AtbZIP63* and *AtbZIP3*.

Motif name	Motif sequence	Responsiveness	Transcription factor	Reference
CANBNNAPA	CNAACAC	Embryo and endosperm-specificity	Unknown	Ellerstrom <i>et al.</i> (1996)
MYCCONSENSUSAT	CANN TG	ABA, stress, cold, leaf, seed	AIMYC2 ( <i>Arabidopsis</i> - bHLH)	Abe <i>et al.</i> (2003); Lee <i>et al.</i> (2005)
WBOXHVISO1	TGACT	Sugar (SURE)	SUSIBA2 (barley - WRKY)	Sun <i>et al.</i> (2003)
IBOX	GATAAG	Light	LeMYB1 (tomato - MYB-like)	Giuliano <i>et al.</i> (1988); Rose <i>et al.</i> (1999)
ABRELATERD1	ACGTG	ABA, dehydration, etiolation	bZIP-type ABRE-binding proteins (AREBs; <i>Arabidopsis</i> )	Simpson <i>et al.</i> (2003); Nakashima <i>et al.</i> (2006)
RBGSCONSENSUS	AATCAA	Light, leaf, shoot	Unknown	Manzara & Gruissem (1988); Donald & Cashmore (1990)
TBOXATGAPB	ACTTTG	Light	Unknown	Chan <i>et al.</i> (2001)
TGACGTVMAMY	TGACGT	Cotyledon, seed germination	Unknown	Yamauchi (2001)
HDMOTIFPCPR2	CTAATTGTTTA	Pathogen defense	HD (parsley)	Korfhage <i>et al.</i> (1994)
UPRMOTIFFIAT	CCNNNNNNNNNNCCACG	UPR	Unknown	Martinez & Chrispeels (2003); Oh <i>et al.</i> (2003)
SREATMSD	TTATCC	Sugar repression	Unknown	Tatamitsu <i>et al.</i> (2005)
GTIGMSCAM4	GAAAAA	Pathogen- and salt-induction	GT-1-like (soybean)	Park <i>et al.</i> (2004)
DPBFORCEDC3	ACACNNG	ABA	bZIP (carrot, <i>Arabidopsis</i> )	Kim <i>et al.</i> (1997)
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTTC	GA, ABA	Unknown	Ceros <i>et al.</i> (1999)

Only promoter blocks conserved between *Arabidopsis thaliana AtbZIP3* and *AtbZIP63* and their corresponding *Arabidopsis lyrata* (>90% of identity) orthologs were analyzed. We used the complete upstream intergenic space of *A. thaliana* genes in the alignments. Orthologs promoters were aligned using BLATn (Kent, 2002 - Genome Research) and motifs present within the conserved blocks were predicted using PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>). All presented motifs are identical between *A. thaliana* and *A. lyrata* orthologs. ABH4 binding motif (CCAC; Koussevitzky *et al.*, 2007) was only present in *AtbZIP63* promoter and its *A. lyrata* corresponding ortholog.

## References Table S1

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

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki RAK. (2003) *Arabidopsis* AIMYC2 (bHLH) and AIMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signalling. *Plant Cell* 15: 63-78.

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

Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C. (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* 15: 2076-2092

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

Rose A, Meier I, Wienand U. (1999) The tomato I-box binding factor LeMYB1 is a member of a novel class of Myb-like proteins. *Plant J* 20: 641-652

Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a c1pA homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J*. 33: 259-270

- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 60:51-68
- Manzara T, Gruissem W. (1988) Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. *Photosynth Res* 16:117-139
- Donald RGK, Cashmore AR. (1990) Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the Arabidopsis rbcS-1A promoter. *EMBO J* 9:1717-1726
- Chan CS, Guo L, Shih MC. (2001) Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 46: 131-141
- Yamauchi D. (2001) A TGACGT Motif in the 5'-Upstream Region of alpha-Amylase Gene from *Vigna mungo* is a cis-Element for Expression in Cotyledons of Germinated Seeds. *Plant Cell Physiol* 42: 635-641
- Korfhage U, Trezzini GF, Meier I, Hahlbrock K, Somssich IE. (1994) Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* 6:695-708
- Martinez JM, Chrispeels MJ. (2003) Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell.* 15:561-576
- Oh DH, Kwon CS, Sano H, Chung WI, Koizumi N. (2003) Conservation between animals and plants of the cis-acting element involved in the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:225-230
- Tatematsu K, Ward S, Leyser O, Kamiya Y, Nambara E. (2005) Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in Arabidopsis. *Plant Physiology* 138: 757-766
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol.* 135: 2150-2161
- Kim SY, Chung HJ, Thomas TL. (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J* 11: 1237-1251
- Cercos M, Gomez-Cadenas A, Ho THD. (1999) Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *Plant J* 19: 107-118

**Table SII. Primers used in PCR assays**

AGI	Gene	Primers (5' - 3')			Exon-exon junction
		forward	reverse		
At4g14130	<i>Xlr-7#</i>	cgtcactgtctactactgtctctcac	ccataagcattgagctcggttgcc	Yes	
At4g14130	<i>Xlr-7*</i>	ctgcttactactgtctctcac	cccttgagcaaaagacatgg	Yes	
At5g52310	<i>Rd29A#</i>	ccaaagaagaacgtggaggag	cacatcatcactctcgcg	Yes	
At5g52310	<i>Rd29A*</i>	ccaccacaagaagaactgg	ttgtcctggctctctgatcag	Yes	
At5g14740	<i>CAA#</i>	gctctcattgagaagatga	gaatgaacgggggaaltcc	Yes	
At2g36270	<i>ABI5*</i>	gcaagaaacaagcatalatacag	ttcctctctctccaactc	Yes	
At5g52310	<i>Rd29B*</i>	aaggagcgtcactctctg	ccatagtcccaacgggtgt	Yes	
At2g28190	<i>CSD2*</i>	gtggacaatcagattctctctg	ttccagtggtcagactaagc	Yes	
At5g49450	<i>AtbZIP1*</i>	caggttccgacatagatgag	cggtcttccattaaactctg	No	
At2g18160	<i>AtbZIP2*</i>	cggtgcaggattgggtgtg	actcatcattctatacatcg	No	
At5g15830	<i>AtbZIP3*</i>	cgagaaccaccagcttttag	ggatgataaacctgacgaag	No	
At4g34590	<i>AtbZIP11*</i>	gcaaggagatcaagaatgaag	ggtagtgttcggtgtgtag	No	
At3g62420	<i>AtbZIP53*</i>	gcttcggagtgcacggatag	aagggttctgcatagattcag	No	
At5g24800	<i>AtbZIP9*</i>	gagagcaagggaactag	cgaggatttcccgtgtagt	Yes	
At4g02640	<i>AtbZIP10*</i>	cctcgaacacacaggtaatg	gccatttcaaccttagctct	Yes	
At3g54620	<i>AtbZIP25*</i>	gctcaaggctccattgtgg	ccatcaagatcctgctc	Yes	
At5g28770	<i>AtbZIP63*</i>	cgcgtaataggatgctctc	gtttgagttacatcagtgaga	Yes	
At3g18780	<i>Actin2*</i>	cgtacaaccggtattgtgctgg	ctctctgtaaggatctcatg	Yes	
At3g45640	<i>AtMPK3*</i>	gtctgttggttatctttatg	aagcaactctgcaataagcg	Yes	
At5g03430	<i>AtF12*</i>	cttaacgggaaaggataatgc	actgatttctacgaacacatc	Yes	
At1g13320	<i>Pdf2*</i>	catgtccaacictaccctg	gttccacaaccgcttgg	Yes	
At3g47340	<i>ASN*</i>	aggtgcggacgagatctttg	gtgaagagccttgatctgc	Yes	
At4g35770	<i>SEN1*</i>	cagagtcggatcaggaatgg	attatgatttcatcgtgtttcc	Yes	
At5g20250	<i>DIN10*</i>	tgtcagtgattctcctggaa	caccatcacgggcaggatc	Yes	
T-DNA left border <i>atbzip63-1</i>	<i>1fw</i>	attttgccgatttcggaac		No	
T-DNA left border <i>atbzip63-2</i>	<i>2rv</i>		gggttgggtttctacaggac	No	
At5g28770 specific primer 1	<i>1rv</i>		ctgtgaaactgtgtctctag	No	
At5g28770 specific primer 2	<i>2fw</i>	atggaaaaatggttctccga		No	
	<i>GUS*</i>	gcaattgtgtgccaggca	gcatcgaaacgcgacacgat	No	



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

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

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

**Table SIII B.** *PDF2* qRT-PCR cycles at threshold R= 0.2 from Col-0 ecotype and mutant lines.

<b>a</b>	<b>Col</b>	<b><i>ago1-25</i></b>	<b><i>hyl1-2</i></b>	<b><i>dcl1-9</i></b>	<b><i>aba2-1</i></b>
<b>Untreated</b>	19.25±0.24 (15)	18.84±0.44 (19)	19.28±0.22 (9)	19.15±0.39 (6)	19.15±0.32 (14)
<b>ABA</b>	19.01±0.38 (17)	19.04±0.18 (22)	19.34±0.54 (7)	18.91±0.32 (9)	19.14±0.43 (11)
<b>Glc</b>	18.95±0.55 (19)	19.06±0.36 (24)	18.86±0.28 (15)	19.06±0.47 (7)	18.96±0.09 (12)
<b>b</b>					
<b>ABA</b>	0.16		0.92	0.56	0.88
<b>Glc</b>	0.23	0.85	0.18	0.13	0.36

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

## CAPÍTULO 2

**Avaliação do papel de AtbZIP63 no desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* e na resposta contra a bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000**

## Materiais e métodos

### Material vegetal e condições de crescimento

Plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana* dos ecótipos Col-0 e WS (Wassilewskija) e as linhagens mutantes por inserção de T-DNA homozigotas *atbzip63-1* (SALK\_006531, derivada do ecótipo Col-0) e *atbzip63-2* (FLAG\_610A08, derivada do ecótipo WS), foram cultivadas em câmaras climatizadas com temperatura de 22°C, fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro durante 4 semanas para os experimentos de infecção com *Pst* DC3000 e 10h luz/ 14h escuro durante 20 dias para os experimentos de análise de expressão gênica, sob intensidade de luz de 100µE/m<sup>2</sup>/s.

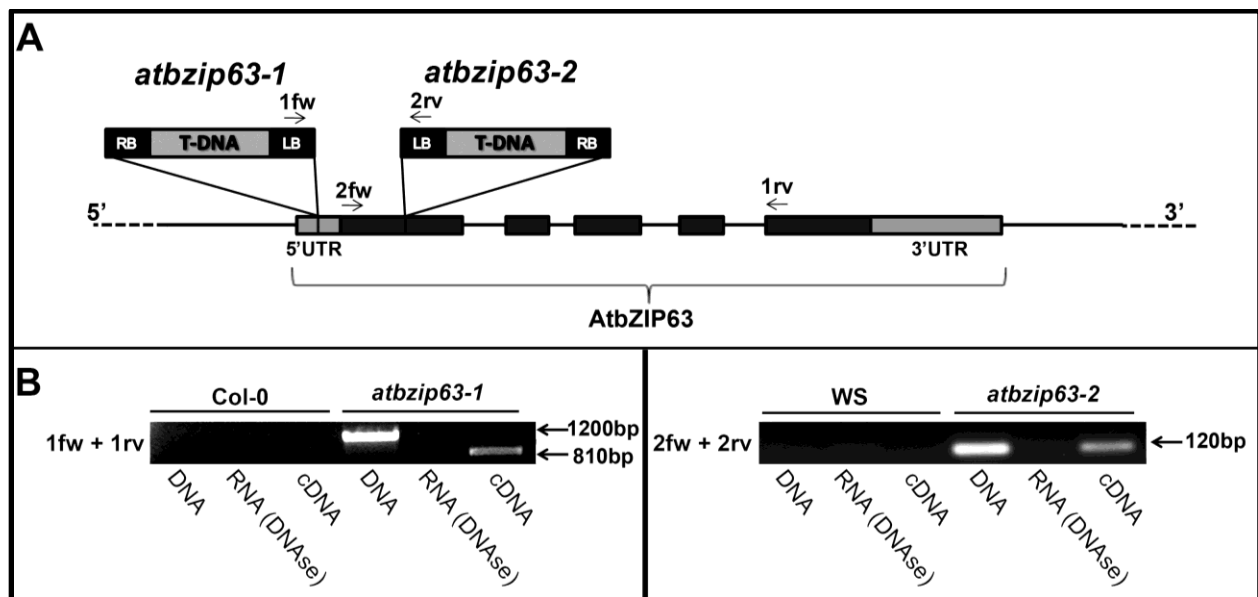


Figura 1: Validação dos mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2*. **A**. Posições das inserções dentro do gene que codifica para o fator de transcrição AtbZIP63. **B**. RT-PCR semiquantitativo mostrando a redução da acumulação do mRNA de AtbZIP63 em ambos os mutantes.

## Identificação dos genes alvos do AtbZIP63 por microarranjo de DNA e RNA-seq

O RNA total foi extraído das quatro folhas mais jovens de plantas com 20 dias de cultivo em terra, com fotoperíodo 10h luz/14h escuridão usando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) segundo o protocolo indicado do fabricante. Cada amostra foi obtida a partir de cinco plantas e foram utilizados 4 chips de DNA para cada genótipo (mutante *atbzip63-2* e ecótipo Ws). Para o procedimento de RNA-seq o procedimento de obtenção das amostras foi semelhante (cinco plantas por amostra), com exceção de que uma amostra de cada genótipo (*atbzip63-1* e seu respectivo genótipo selvagem Col-0) foram sequenciados utilizando a plataforma Genome Analyzer (GA) Illumina. A marcação e hibridização do RNA foram realizadas conforme os protocolos da Affymetrix®, utilizando as instalações 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 corados com estreptavidina, em seguida foram escaneados com scanner GeneArray. As amostras de RNA total de *atbzip63-1* e Col-0 foram processadas e sequenciadas pela empresa Ambrygen ([www.ambrygen.com](http://www.ambrygen.com)).

## Análise dos dados de transcriptoma

Para o tratamento estatístico dos dados brutos de microarranjo dos genótipos *atbzip63-2* e WS foi utilizado o software R 2.12.1 (R Development Core Team, 2008) com a interface gráfica de análise de microarrays *affyLmGUI* (<http://www.bioconductor.org/packages/2.0/bioc/html/affyLmGUI.html>). Para a normalização entre as lâminas utilizamos o método RMA (“Robust Multichip Average”) no software

Expression Console™ (Affymetrix®). Os *reads* obtidos a partir do RNA-seq de *atbzip63-1* e Col-0 foram mapeados contra o banco de transcritos de *Arabidopsis thaliana* (TAIR9, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) utilizando o software CLC Genomics WorkBench (<http://www.clcbio.com>) e a significância estatística dos genes diferencialmente expressos foi avaliada através do teste de Baggerley ( $P$ -valor < 0.05). Os genes diferencialmente expressos foram sobrepostos com outros experimentos de microarranjo utilizando o software VennMaster 0.37.4 (<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/vennm/doc.html>). O agrupamento destes genes diferencialmente expressos foi realizado no Genevestigator ([www.genevestigator.ethz.ch/](http://www.genevestigator.ethz.ch/)).

### **Desafio com fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000**

*Pseudomonas syringae* pv. tomato estirpe DC3000 (*Pst* DC3000) foram cultivadas a 30°C em meio Luria-Bertani modificado (LB; Katagiri *et al.*, 2002) suplementado com os antibióticos apropriados até alcançar a OD600 de 0.8. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em água até a concentração final de  $10^8$  cfu/mL contendo o surfactante Silwet L-77 a 0.05% para posterior uso nos experimentos de infecção. *Arabidopsis* dos genótipos *atbzip63-1*, *atbzip63-2*, Col-0 e WS com cinco semanas de idade foram mergulhados na suspensão bacteriana obtida e colocadas em condições de alta umidade até o desenvolvimento de sintomas. Plantas foram infiltradas com suspensão de *Pst* DC3000 a  $10^6$  CFU/mL contendo Silwet L-77 a 0.004% por meio de vácuo. As plantas infiltradas foram deixadas secar e cobertas até que o experimento seja completado. A população bacteriana no mesófilo foliar foi determinada como descrito em Katagiri *et al.*, 2002 e os sintomas clorose e necrose foram avaliados 1 e 3 dias após a infecção.

## Resultados e discussão

### O fator de transcrição AtbZIP63 participa da modulação das respostas a estresse energético

Considerando que AtbZIP63 media parcialmente as respostas ao estresse energético moduladas pela quinase KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007; Mantioli *et al.*, 2011), procuramos avaliar a sobreposição entre o transcriptoma do mutante *atbzip63-2*, os genes regulados por KIN10 (Baena-González *et al.*, 2007) e mudanças de perfis de expressão decorrentes do estresse energético promovidos por extensão do período da noite (Usadel *et al.*, 2008). A comparação entre os 119 genes induzidos por AtbZIP63 e os 8900 genes induzidos em 6 *time-points* de extensão após o período de uma noite de 12h (2, 4, 6, 8, 24 e 48h após o fim da noite) (Usadel *et al.*, 2008), resultou numa sobreposição de 59 genes sem redundância entre os *time-points*, ou seja, os genes que tinha sobreposição em 2h foram removidos das análises subsequentes com 4h e assim sucessivamente (Figura 2A). Estes 59 genes foram então comparados com os 504 genes induzidos por KIN10 (Baena-Gonzales *et al.*, 2007) levando a identificação de um conjunto comum de 22 genes entre estes três conjuntos (Figura 2B). Destes 22 genes, 20 estão também presentes no conjunto de genes induzidos já nas primeiras 2h e os outros dois em 4h de extensão do período da noite (Figura 2C). Esta observação sugere que AtbZIP63 regula a atividade dos genes que respondem rapidamente á pequenas mudanças no status de carbono. Propomos que AtbZIP63 promove a aclimação da planta para uma condição de déficit energético, reprimindo a atividade dos genes relacionados com a biossíntese e crescimento celular e induzindo os genes que promovem o catabolismo de proteínas, lipídios e outras fontes de carbono (Usadel *et al.*,

2008). Comparando os genes induzidos por AtbZIP63 com os genes induzidos por KIN10 (Baena-Gonzales *et al*, 2007), identificamos 28 genes sobrepostos incluindo os 22 genes comuns a AtbZIP63/KIN10/extensão da noite.

A comparação entre os genes reprimidos por AtbZIP63 e KIN10 resultou na sobreposição de apenas três genes, este valor não é estatisticamente relevante, pois está bem abaixo das sobreposições esperadas de forma aleatória (*P*-valor <0,005).

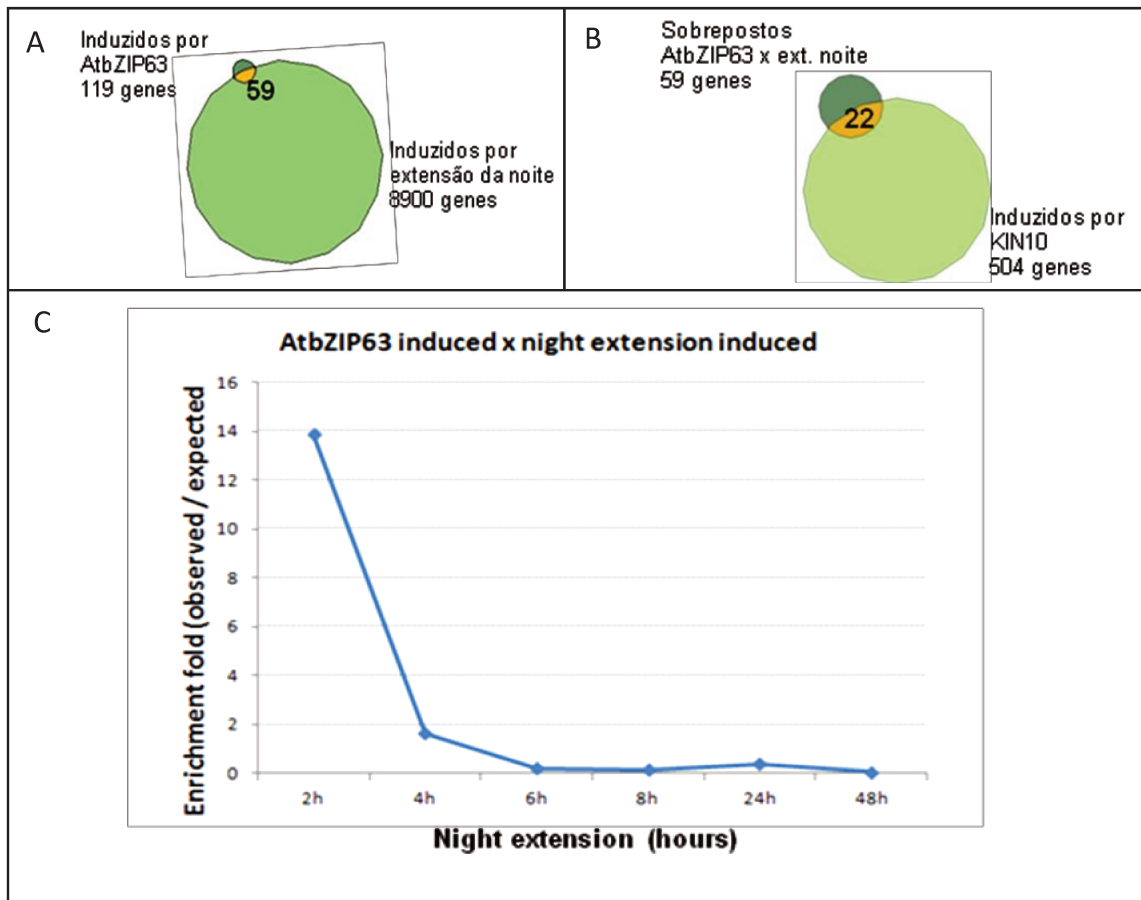


Figura 2. Sobreposição dos genes desregulados no mutante *atbzip63-2* com os perfis de expressão associados a mutante Kin10 e extensão do período da noite. **A.** Sobreposição entre os 119 genes induzidos por AtbZIP63 e os 8900 genes induzidos em 6 time-points de extensão após o período de uma noite de 12h. **B.** Os 59 genes resultantes da sobreposição entre induzidos por AtbZIP63 x induzidos por extensão da noite, foram então comparados com os 504 genes induzidos por KIN10. **C.** Dos 22 genes sobrepostos com os induzidos por KIN10, 20 estão nas primeiras 2h e os outros dois em 4h de extensão do período da noite.

### AtbZIP63 modula o metabolismo de amido e da parede celular

O controle do metabolismo de amido durante o ciclo dia/noite é de crucial importância para a manutenção da homeostasia energética de forma a otimizar o crescimento e evitar a carência energética (Revisão em Stitt & Zeeman, 2012). A análise dos genes diferencialmente expressos entre o mutante *atbzip63-2* e o correspondente ecótipo selvagem WS sugere a participação do gene AtbZIP63 no controle do metabolismo de amido durante o ciclo dia/noite, pois vários genes envolvidos tanto na acumulação de amido durante o dia



quanto na sua degradação durante a noite apresentam-se desregulados no mutante *atbzip63-2*. Ainda dentro do contexto de particionamento de carbono fixado pela fotossíntese, vários genes que controlam o direcionamento do fluxo de carbono para produção de dissacarídeos (e.g. sacarose e maltose) e síntese / expansão da parede celular primária colocam AtbZIP63 em uma posição importante dentro do controle do uso do carbono durante o desenvolvimento e crescimento de *Arabidopsis*.

O gene PGM (*Phosphoglucomutase*), induzido 1,6x no mutante *atbzip63-2*, codifica uma isomerase que converte glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato, substrato essencial para a síntese de amido (Caspar *et al.*, 1985). O mutante *pgm-1* apresenta significativo atraso de crescimento quando comparado ao genótipo selvagem em fotoperíodos com noites longas e crescimento similar ao selvagem quando em condição de luz contínua (Bläsing *et al.*, 2005; Stitt *et al.*, 2007). O gene BAM9 (*Beta-amylase 9*), reprimido 2x no mutante *atbzip63-2*, codifica uma enzima que cliva as ligações glicosídicas  $\alpha$ 1-4 das cadeias lineares de amido gerando maltose (Kaplan *et al.*, 2006), que é exportada para o citosol onde pode ser convertida em sacarose ou utilizada no metabolismo celular (Weise *et al.*, 2004). A expressão do gene BAM9, assim como AtbZIP63, é induzida por KIN10/11 e pode ser um dos responsáveis pelo excesso de amido observado em plantas knockdown KIN10/11 (Baena-González, E. *et al.*, 2008). Além disso, o gene BAM9 é regulado de acordo com o ciclo circadiano (Chandler *et al.*, 2001) assim como AtbZIP63 (Bläsing *et al.*, 2005), sugerindo que AtbZIP63 participa da regulação circadiana de BAM9. Também relacionado ao metabolismo de maltose, o gene que codifica a enzima amilomaltase DPE2 (*Disproportionating Enzyme 2*) encontra-se induzido 1,5x no mutante *atbzip63-2*. Esta enzima é essencial no metabolismo da maltose exportada pelo cloroplasto, participando do controle da produção de sacarose a ser transportada para outros tecidos e do metabolismo energético nas folhas de *Arabidopsis*

durante a noite (Chia *et al.*, 2004; Weise *et al.*, 2004). O mutante *knockout dpe2-3* possui elevadas quantidades de amido, maltose, glicose, frutose e outros malto-oligossacarídeos. Entretanto a quantidade do dissacarídeo sacarose é reduzida neste mutante quando comparado com o genótipo selvagem (Chia *et al.*, 2004). Portanto, DPE2 tem um papel importante no direcionamento dos produtos de degradação do amido do cloroplasto para o citosol. Considerando que o gene *DPE2* está induzido no mutante *atbzip63-2* (i.e., reprimido por AtbZIP63), levantamos a hipótese de que AtbZIP63 está envolvido no direcionamento do fluxo de carbono derivado da degradação do amido para a utilização na própria célula em detrimento de sua exportação na forma de sacarose. Esta proposta também é reforçada pelo fato de que a expressão de dois genes que codificam enzimas que participam diretamente da síntese de sacarose, referidas SPS1F (*Sucrose Phosphate Synthase 1F*) e SPS4F (*Sucrose Phosphate Synthase 4F*) estão induzidas no mutante *atbzip63-2*.

A análise dos genes desregulados no mutante *atbzip63-2* também revelou a participação de AtbZIP63 na organização estrutural da parede celular (Figura 2) regulando a expressão de cinco XTH's (*Xyloglucan Endotransglycosylase/hydrolases*) e três expansinas. Estes genes atuam no processo de modificação da parede celular tornando-a mais extensível e facilitando assim a expansão do volume celular (Cosgrove, 2000; Rose *et al.*, 2002; Sasidharan & Pierik, 2010). As XTH's atuam na reorganização da rede de xiloglucanos que compõem a parede celular e as expansinas promovem o rompimento das pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e os xiloglucanos induzindo o afrouxamento na parede celular (Cosgrove, 2000). Todas as cinco XTH's diferencialmente expressas na comparação entre o mutante *atbzip63-2* e o selvagem WS estão reprimidas no mutante (Tabela 1) e quatro delas são induzidas por escuridão.

Locus	Repressão (fold)	Nome	Induzido por escuridão
AT4G14130	-8.0	XTH15 ( <i>Xyloglucan Endotransglucosylase/hydrolase 15</i> )	Sim
AT3G23730	-2.1	XTH16 ( <i>Xyloglucan Endotransglucosylase/hydrolase 16</i> )	Sim
AT1G10550	-1.7	XTH33 ( <i>Xyloglucan Endotransglucosylase/hydrolase 33</i> )	Sim
AT2G01850	-1.6	XTH27 ( <i>Xyloglucan Endotransglucosylase/hydrolase 27</i> )	Sim
AT5G65730	-1.5	XTH6 ( <i>Xyloglucan Endotransglucosylase/hydrolase 6</i> )	Não

Tabela 1. XTH's (*Xyloglucan Endotransglycosylase/hydrolases*) reprimidas no mutante *atbzip63-2*. A repressão mostrada é relativa ao respetivo genótipo selvagem *Wassileskija* (WS).

O aumento do nível de mRNA de *AtbZIP63* durante a noite (Usadel *et al.* 2008), sugere que *AtbZIP63* poderia induzir a expressão dos genes XTH neste período do dia, favorecendo assim a expansão da parede celular. Esta hipótese está de acordo com dados que indicam que genes relacionados a expansão da parede normalmente apresentam um pico na sua expressão durante o período noturno enquanto genes relacionados a síntese de nova parede celular (Ex.: *Cellulose Synthase*, *Glycosyl Hydrolase* e *Fucosyltransferase*), normalmente apresentam uma atividade maior durante o período diurno (Bläsing *et al.*, 2005; Gibon *et al.*, 2005). O conjunto destas observações sugere que *AtbZIP63* modula, ao menos parcialmente, a expansão da parede celular durante o período noturno através da regulação da expressão das XTH's citadas. Esta hipótese é reforçada pela observação de que o mutante *atbzip63-2* apresenta um fenótipo de atraso de desenvolvimento em condições de noites longas quando comparado ao seu respectivo ecótipo selvagem WS (Figura 3). Este fenótipo poderia ser atribuído a uma deficiência da expansão da parede celular, contudo, outras hipóteses relacionadas a diferenças na regulação hormonal e metabolismo de amido indicadas pelo transcriptoma do mutante *atbzip63-2* também serão investigadas.

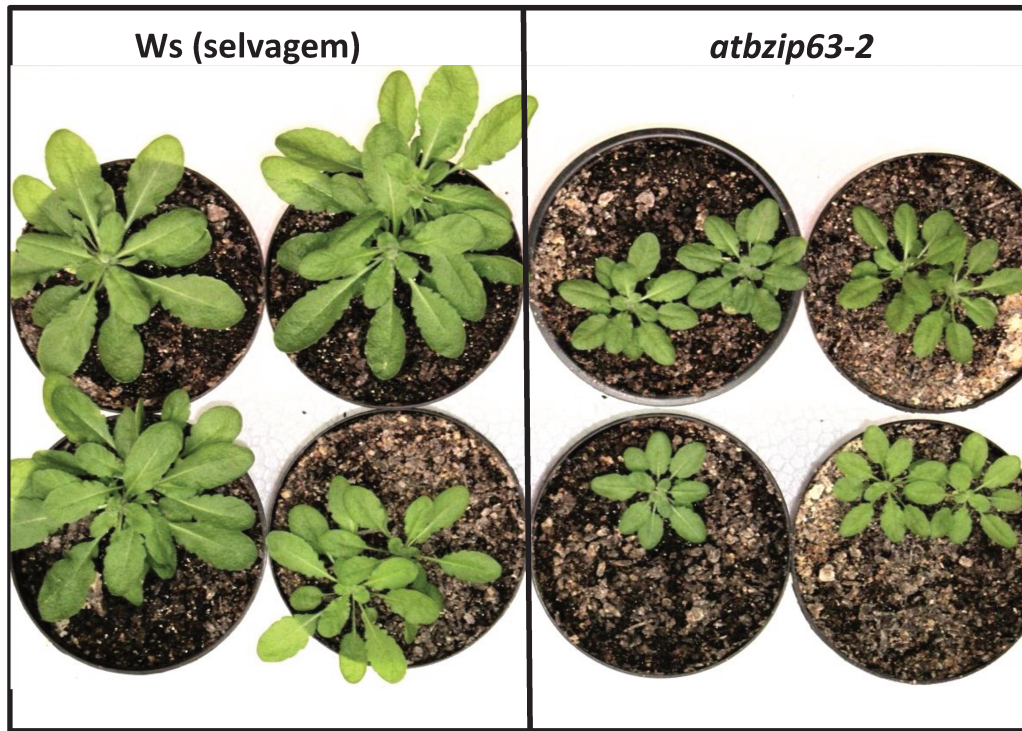


Figura 3. Análise comparativa do desenvolvimento vegetativo do mutante *atbzip63-2* e o ecótipo selvagem Ws. O mutante apresentou atraso de crescimento e desenvolvimento. Foto dos genótipos analisados após 30 dias de cultivo em substrato sob fotoperíodo de 10h luz/14h escuridão à 22<sup>o</sup> C.

### **AtbZIP63 participa da regulação do *core* do relógio circadiano**

A expressão do AtbZIP63 apresenta uma oscilação diária, condizente com o padrão dos genes regulados pelo ciclo circadiano (Blasing *et al.*, 2005). Além de responder as oscilações do ritmo circadiano, AtbZIP63 também possui um *input* neste sistema, uma vez que um dos reguladores do *core* do relógio circadiano, o gene PRR7 (*Pseudo-Response Regulator 7*), encontra-se reprimido (-1,5x) no mutante *atbzip63-2*. PRR7 é um dos principais genes do *core* central do relógio circadiano de *Arabidopsis*, tendo envolvimento no ajuste do relógio pela transdução de estímulos luminosos e no controle dos osciladores centrais do relógio (Farré *et al.*, 2005). A proteína codificada pelo PRR7 reprime a transcrição dos genes CCA1 (*Circadian Clock-Associated 1*) e LHY (*Late Elongated Hypocotyl*), ligando-se diretamente em suas seqüências promotoras. CCA1 e LHY são dois reguladores centrais do

mecanismo oscilatório do ciclo circadiano, sendo que estes genes compõem os múltiplos fatores que interagem ao nível transcricional e pós-transcricional por meio de loops de auto-regulação (Harmer, 2009). CCA1 e LHY são elementos do período diurno, pois o pico de expressão de suas proteínas ocorre no começo do dia. As proteínas dos genes CCA1 e LHY reprimem a transcrição do gene TOC1 (*Timing of Cab Expression 1*) ligando-se diretamente ao motivo EE (*Evening Element*) presente no promotor de TOC1 (Alabadi et al., 2001). TOC1 por sua vez, interage com CHE (*CCA1 hiking expedition*) no promotor de CCA1 induzindo sua expressão, formando o *feedback* de controle transcricional central do relógio circadiano.

Outro indício que liga AtbZIP63 com o ciclo circadiano, é o fato de que 37 dos 119 genes induzidos pelo AtbZIP63 apresentam oscilação diária de expressão acompanhando o período diurno/noturno. Destes 37 genes, 23 possuem alta amplitude de oscilação de expressão e 14 possuem moderada amplitude de oscilação. A amplitude de oscilação é classificada como alta, se a razão entre a expressão máxima e mínima de gene for maior que 6, se esta razão ficar entre 4 a 6 sua amplitude de oscilação é classificada como moderada (Mizuno & Yamashino, 2008). Detectamos ainda que 20 destes 23 genes com alta amplitude de oscilação e todos os 14 com moderada amplitude de oscilação acompanham o ritmo de oscilação do AtbZIP63. Estes dados sugerem que AtbZIP63 participa do controle circadiano da expressão destes genes. Apesar de AtbZIP63 provavelmente estar sobre controle do relógio circadiano (Espinoza *et al.*, 2010) a amplitude da variação de expressão de AtbZIP63 entre o final do dia e o final da noite é essencialmente definida pelas flutuações de carboidratos resultante da atividade fotossintética durante o dia e uso do amido durante a noite (Bläsing *et al.*, 2005; Smith & Stitt, 2007; Usadel *et al.*, 2008; Matioli *et al.*, 2011). Em suma, a variação na disponibilidade de carboidratos na planta ao longo do dia é um dos principais *inputs* que geram a oscilação na expressão do AtbZIP63. Os resultados indicam

que o regulador AtbZIP63 age como um intermediador dos sinais de carboidratos, que é um dos *inputs* que mantém o ritmo de oscilação do relógio circadiano, ou seja, AtbZIP63 está modulando diversas vias de sinalização em sincronia com o ciclo circadiano, tendo sua expressão regulada pelas flutuações circadianas dos níveis dos carboidratos. Desta forma o AtbZIP63 poderia estar participando da coordenação do crescimento da planta ao longo do ciclo circadiano.

### **AtbZIP63 modula síntese e sinalização de hormônios**

A análise dos transcriptomas dos mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2* revelou diversos genes relacionados a síntese e sinalização de hormônios. O mutante *atbzip63-1* apresenta dois genes desregulados que estão relacionados a degradação (CYP707A03; *Cytochrome P450, Family 707, Sub-family A, Polypeptide 3*) e síntese (ABA1; *ABA deficient 1*) do hormônio ABA. O gene CYP707A03, reprimido 5,8x no mutante, participa da principal via de degradação de ABA em plantas, que se inicia a partir da hidroxilação do carbono 8' da molécula de ABA, e o mutante para este gene acumula mais ABA e apresenta maior tolerância a seca (Umezawa *et al.*, 2006). O gene ABA1, reprimido 1,6x no mutante, catalisa a primeira etapa da síntese de ABA a partir da conversão de zeaxantina em violaxantina. Este dado sugere que AtbZIP63, além de ser regulado por ABA, também pode regular a acumulação deste hormônio. O mutante *atbzip63-1* também apresenta genes desregulados relacionados a síntese de etileno e jasmonato, os quais serão discutidos no próximo tópico relativo a genes de defesa contra patógenos desregulados nos mutantes para AtbZIP63. O mutante *atbzip63-2* também apresentou genes relacionados a síntese e sinalização de ABA desregulados. Um dos genes induzidos (1,8x) no mutante *atbzip63-2* é NCED4 (*Nine-Cis-*

*Epoxycarotenoid Dioxygenase 4*), que pode clivar os precursores 9-cis-violaxanthin ou 9'-cis-neoxanthin, formando o primeiro precursor de ABA C15 (15 carbonos) xanthoxin (Bray, 2002). NCED4 é parte de uma família multigênica com 6 membros em *Arabidopsis thaliana* (Bray, 2002) e o papel de NCED4 ainda é pouco definido. Seu papel na síntese de ABA ainda é incerto, mas a similaridade com as demais NCEDs sugere esta função e doravante pode ser confirmada em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*. No contexto da sinalização de ABA em *Arabidopsis*, dois importantes reguladores positivos da transdução do sinal ABA recentemente identificados PYL5 e PYL8 (*Pyrabactin resistance1-Like 5* e *8*, respectivamente) (Ma *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009) estão desregulados no mutante *atbzip63-2*. PYL5 (reprimido 2x) e PYL8 (induzido 2x) funcionam como receptores solúveis da molécula de ABA (Yin *et al.*, 2009) e que ao se ligarem alostericamente à molécula de ABA, mudam para uma conformação estrutural (Shibata *et al.*, 2010) que favorece sua interação com as proteínas fosfatase tipo 2C (*PP2C - Protein phosphatase 2C*), reguladoras negativas das resposta a ABA, inibindo-as e permitindo as respostas a este hormônio (Ma *et al.*, 2009).

O gene CYP85A2/BR6OX2 (*Cytochrome P-450 monooxygenase A2 / Brassinosteroid-6-oxidase 2*), o qual codifica uma enzima crucial da etapa limitante de síntese do hormônio esteróide brassinolídeo, está reprimido 2x no mutante *atbzip63-2*. Brassinosteróides são hormônios esteróides que participam do controle do crescimento, desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, germinação, senescência e respostas a estresses bióticos e abióticos (Revisão em Witthöft & Harter, 2011). Os hormônios brassinolídeo (BL) e castasterona (CS) fazem parte do grande grupo dos brassinosteróides que tem atividade biológica, sendo o brassinolídeo o mais biologicamente ativo dentre os demais (Grove *et al.*, 1979; Shimada *et al.*, 2003). O hormônio castasterona pode ser convertido em brassinolídeo

através da ação da enzima CYP85A2/BR6OX2 (Montoya *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). O duplo mutante *cyp86a1-1/cyp85a2-2* possui severo fenótipo anão (*dwarf*) característicos dos mutantes deficientes na produção de brassinosteróides. Sendo CYP85A2/BR6OX2 crucial para a produção do hormônio brassinolídeo e reprimido no mutante *atbzip63-2*, sugerimos que AtbZIP63 pode ter um papel importante na modulação da acumulação de brassinosteróides. O fenótipo de atraso de crescimento observado no mutante *atbzip63-2* (Figura 3) poderia estar relacionado parcialmente a acumulação diferencial de brassinosteróides, apresentando-se como mais uma possibilidade de explicação do fenótipo observado junto ao metabolismo alterado de amido e parede celular. Investigações mais refinadas como a quantificação deste hormônio no mutante *atbzip63-2* e no super-expressor de AtbZIP63, além de análises de co-expressão espacial e temporal entre AtbZIP63 e CYP85A2/BR6OX2, serão necessárias para confirmar a possível interação entre estes dois genes e como isto poderia afetar o crescimento de *Arabidopsis*.

### **Diversos genes de resposta a patógenos estão desregulados nos mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2***

A análise dos transcriptomas dos mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2* mostrou que diversos genes relacionados a resposta contra fitopatógenos estão desregulados. Este dado, junto as dados prévios de que AtbZIP63 é induzido pelo PAMP *flg22* (flagelina 22) ([www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com) - Hruz *et al.*, 2008) e de que um de seus parceiros de heterodimerização AtbZIP10 está envolvido na modulação da resposta hipersensível (HR – *Hypersensitive Response*) (Ehlert *et al.*, 2006; Kaminaka *et al.*, 2006), sugerem que AtbZIP63 estaria envolvido nas respostas contra organismos patogênicos.



Dentre os genes reprimidos no mutante *atbzip63-1*, encontramos ACS6 (*Aminocyclopropane-1 Carboxylic Acid (ACC) synthase 6*); reprimido 5,8x) e ERF104 (*Ethylene Response Factor 104*; reprimido 7,0x), envolvidos na síntese e sinalização de etileno, respectivamente. A enzima ACS6, que pertence a uma família com 12 membros em *Arabidopsis thaliana* (Peng *et al.*, 2005), é fundamental na síntese de etileno induzida pela infecção com patógenos e é diretamente ativada pela MAP quinase MPK6 após a infecção com *Pseudomonas syringae* e tratamento com *flg22*, levando ao aumento da produção de etileno (Zhang & Liu, 2004). O fator de transcrição ERF104, importante regulador das respostas transcricionais em resposta a patógenos via etileno, permanece inativo em complexo com MPK6 e é liberado e ativado após tratamento com *flg22* (Bethke *et al.*, 2009). Outro fator de transcrição envolvido nas respostas a etileno e fortemente reprimido no mutante *atbzip63-1* (-6,1x) é ERF003 (*Ethylene Response Factor 003*), o qual é induzido tanto por etileno quanto por jasmonato (Nakano *et al.*, 2006; Leon-Reyes *et al.*, 2010). No modelo atual que relaciona hormônios e defesa contra estresses bióticos, etileno e jasmonato atuam de forma agonista na ativação das respostas contra patógenos necrotróficos (e.g. *Alternaria brassicicola*), enquanto ácido salicílico (AS) media as respostas contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos (e.g. *Peronospora parasitica* e *Pseudomonas syringae*, respectivamente), sendo que as vias jasmonato/etileno e AS são de modo geral antagonistas (Glazebrook 2005, Leon-Reyes *et al.*, 2010). O gene LOX2 (*Lipoxygenase 2*), que catalisa a primeira reação na via de síntese de ácido jasmônico em resposta a ferimentos (Mullet *et al.*, 1995), está induzido no mutante *atbzip63-1* (1,6x) e sugere uma maior acumulação deste hormônio neste genótipo. De acordo com isso, o gene JR1 (*Jasmonate Responsive 1*), cuja acumulação de RNA mensageiro aumenta em resposta a ácido jasmônico e ferimentos (León *et al.*, 1998), encontra-se induzido (1,5x) no mutante

*atbzip63-1*. O fator de transcrição WRKY70, reprimido no mutante *atbzip63-1* (3,8x), é um importante ponto de convergência e controle no balanço entre as respostas de defesa das vias antagonistas jasmonato/etileno e ácido salicílico (Li *et al.*, 2004), sendo um regulador positivo das respostas induzidas por ácido salicílico e reprimindo as respostas mediadas por ácido jasmônico. O gene PDF2.2 (*Plant defensin 2.2*), induzido 1,6x no mutante *atbzip63-1*, codifica um pequeno peptídeo com atividade anti-microbiana (Thomma & Broakert, 1998) em resposta ao *burst* oxidativo provocado pela infecção por patógenos (O'Brien *et al.*, 2012). De particular interesse entre os genes desregulados no mutante *atbzip63-1* está PCC1 (*Pathogen and Circadian Controlled 1*), que é induzido por patógenos e regulado pelo relógio circadiano central de *Arabidopsis* (Sauerbrunn & Schlaich, 2003). PCC1 está fortemente reprimido no mutante *atbzip63-1* (-14,6x). A superexpressão de PCC1 em *Arabidopsis* aumenta a resistência contro o oomiceto *Hyaloperonospora parasitica*, e sugere que este gene poderia ser um ponto de convergência entre o ciclo circadiano e respostas contra patógenos (Sauerbrunn & Schlaich, 2003). Os mecanismos de interação entre o ciclo circadiano e as respostas contra patógenos ainda são pouco conhecidos. Um recente trabalho mostra que plantas de *Arabidopsis* inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 no início da manhã são mais resistentes a infecção do que plantas inoculadas ao final do dia e que diversos genes envolvidos nas respostas a patógenos tem a expressão regulada pelo relógio circadiano (Bhardwaj *et al.*, 2011).

Também foram encontrados genes que regulam as respostas contra patógenos no transcriptoma do mutante *atbzip63-2*. O fator de transcrição MYB96, induzido 1,5x no mutante *atbzip63-2*, faz parte da extensa família de fatores reguladores de transcrição do tipo MYB em *Arabidopsis*, a qual está envolvida em vários aspectos do desenvolvimento e defesa contra patógenos. MYB96 é um mediador da sinalização de ABA durante a resposta ao

estresse hídrico e crescimento de raízes laterais, sendo esta via integrada à sinalização de auxina (Seo *et al.*, 2009). MYB96 também tem um papel importante na resposta a patógenos, uma vez que a indução ou a repressão deste gene aumenta ou diminui, respectivamente, a resistência de *Arabidopsis* à linhagem virulenta de *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000, possivelmente modulando a produção de ácido salicílico em uma via dependente de ABA (Seo & Park, 2010). A possibilidade de que AtbZIP63 participa das respostas a estresse biótico é reforçada pelo fato de que nossos resultados mostram que o fator regulador de transcrição WRKY33 é fortemente induzido no mutante *atbzip63-2* (4,0x). Uma parcela substancial da grande família de fatores de transcrição do tipo WRKY em *Arabidopsis* participa de respostas a estresses bióticos, sendo que sua diversificação durante a evolução das plantas é estreitamente relacionada com a elevada sofisticação dos mecanismos de interação planta-patógeno (Rushton *et al.*, 2010). O gene WRKY33 está associado tanto a respostas a fungos necrotróficos (Zheng *et al.*, 2006), nas quais participa da cascata de sinalização via MAPK (MPK3 e MPK6) para a síntese de fitoalexinas (Eckardt, 2011), quanto nas respostas a bactérias biotróficas como *Pseudomonas* (Qiu, 2008). No entanto, WRKY33 aparentemente possui uma função antagonista entre as respostas a fungos necrotróficos e a bactérias biotróficas. A superexpressão de WRKY33 em *Arabidopsis* aumenta a sua resistência ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, mas em contrapartida reduz sua resistência contra *Pseudomonas syringae* pv tomato, provavelmente pela redução da expressão de PR1 (*Pathogenesis Related gene 1*) (Zheng *et al.*, 2006). Curiosamente, a expressão basal de PR1 é elevada em mutantes *wrky33* submetidos a fotoperíodos com dias curtos (Andreasson *et al.*, 2005), sugerindo uma interação fotoperíodo e/ou ciclo circadiano na modulação das respostas a estresses bióticos.

Com base nestes dados, realizamos experimentos de infecção dos mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2* com o fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 para avaliar se estes mutantes seriam mais resistentes ou mais suscetíveis a este patógeno.

### **O mutante *atbzip63-1* apresenta resistência ao fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000**

A partir da hipótese de que AtbZIP63 poderia estar envolvido nas respostas a estresse biótico e diante da possibilidade de conectar estas respostas ao estado energético e ciclo circadiano, os mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2* foram avaliados quanto a sua susceptibilidade a infecção com *Pst* DC3000. Os parâmetros considerados foram: 1- suporte a multiplicação bacteriana no mesófilo foliar e 2- desenvolvimento dos sintomas clorose e necrose nas folhas infectadas, ambos 1 e 3 dias após a infecção. O mutante e seu respectivo ecótipo selvagem foram mergulhados em uma suspensão com *Pst* DC3000, cujo objetivo é avaliar a penetração bacteriana no mesófilo foliar através dos estômatos e posterior multiplicação. Além disso, *Pst* DC3000 em suspensão foram infiltradas diretamente no mesófilo foliar utilizando uma bomba de vácuo, sendo este segundo método usado para quantificar a multiplicação bacteriana no mesófilo foliar ignorando a resistência baseada no fechamento estomático (Melotto *et al.*, 2006, Underwood *et al.*, 2007). O mutante *atbzip63-1* mostrou-se mais resistente a *Pst* DC3000, suportando uma menor proliferação bacteriana no mesófilo foliar (aproximadamente 10 vezes menos que o ecótipo selvagem Col-0, Figura 2) e também apresentando reduzida clorose e necrose dos tecidos infectados em comparação com o respectivo genótipo selvagem Col-0 (Figura 4). Curiosamente, o mutante *atbzip63-2* mostrou menor resistência a proliferação bacteriana no mesófilo foliar e sintomas

semelhantes ao seu respectivo genótipo selvagem (Dados não mostrados). Isto pode ser explicado em parte pelas diferenças entre os genótipos WS e Col-0 em relação a infecção com *Pst* DC3000. Além disso, os mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2* apresentam baixa sobreposição de genes desregulados, o que poderiam representar diferenças das redes de regulação nas quais AtbZIP63 estaria envolvido nos ecótipos Col-0 e WS.

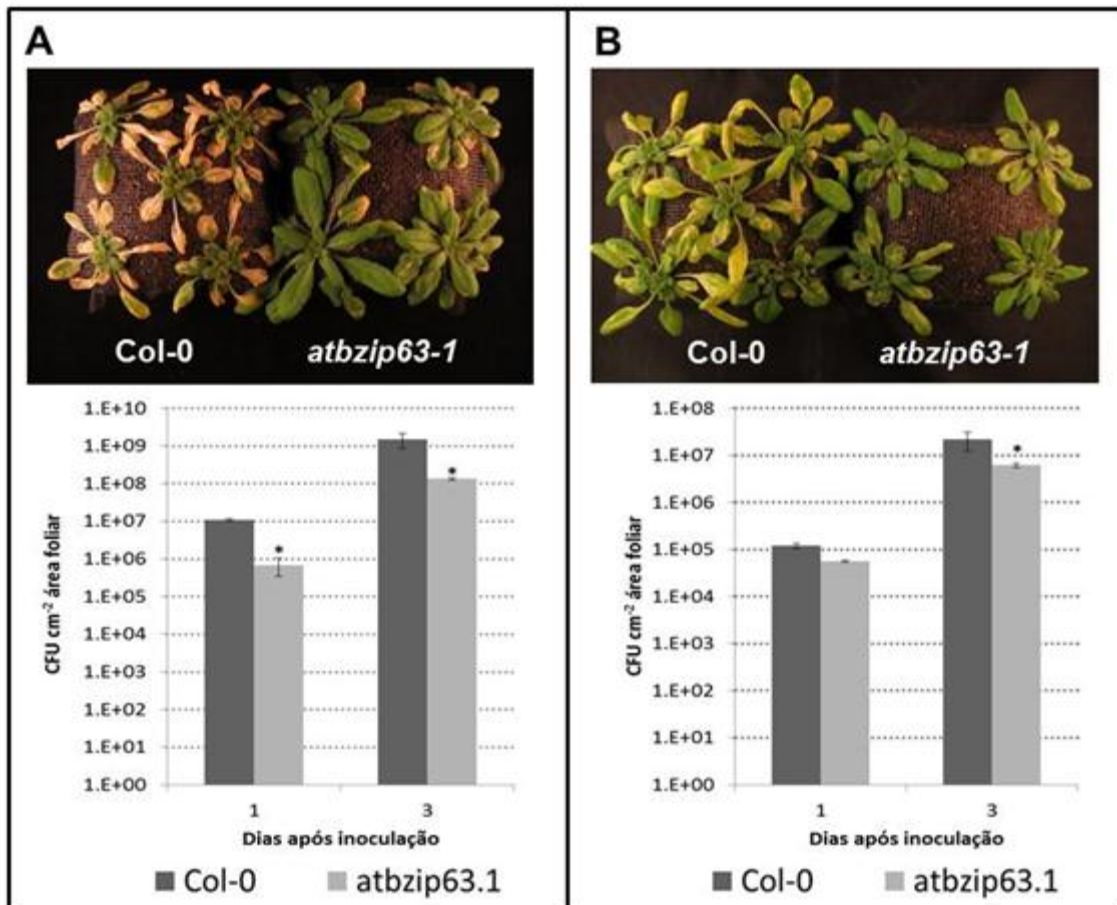


Figura 4. O mutante *atbzip63-1* é mais resistente a *Pst* DC3000. Sintomas e quantificação da população bacteriana no mesófilo foliar após 1 e 3 dias de infecção. **A.** Mergulho em suspensão bacteriana contendo 107 CFU/mL. **B.** Infiltração a vácuolo de suspensão com 105 CFU/mL. (CFU = *Colony-forming Unit*). O asterisco sobre as barras indica a significância estatística calculada com o teste T de Student e P-valor < 0,05.

## **Apêndice**

**Busca de proteínas interatoras de AtbZIP63 (Interatoma) através do sistema de duplo híbrido em levedura (*Y2H – Yeast two-hybrid*)**

## Busca de proteínas interatoras de AtbZIP63 através de Y2H (*Yeast-two Hybrid*)

Buscando obter novos indícios do papel de AtbZIP63, efetuamos uma busca de suas proteínas interatoras. O conhecimento de quais proteínas interagem com uma determinada proteína pode fornecer indícios do papel desempenhado por este gene, bem como auxiliar a estabelecer quais são as vias de sinalização envolvidas na sua regulação (Braun *et al.*, 2011; Braun, 2012). Para isso, utilizamos o sistema de expressão heterólogo de duplo-híbrido em levedura (*Y2H - yeast-two-hybrid*) e efetuamos um *screening* contra um banco de cDNAs produzido a partir de RNA mensageiro extraído de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Col-0. A região codificante completa de AtbZIP63 foi clonada usando cDNA obtido a partir do RNA mensageiro de plantas de *A. thaliana* ecótipo Col-0. A proteína AtbZIP63 apresenta três isoformas distintas correspondentes a diferentes *splincing* alternativos (<http://www.arabidopsis.org>), sendo que a isoforma selecionada foi AtbZIP63.2. Esta isoforma foi selecionada por ser a mais representada nos bancos de dados de sequenciamento de cDNA e aquela codificante para maior número de aminoácidos (314 a.a.). Este último critério deveria maximizar o número de domínios da proteína disponíveis para interações com outras proteínas. A região codificante de AtbZIP63 representando a isca ou “*bait*” foi clonada em fase de leitura com o domínio de interação com o DNA (*BD: Binding Domain*) LexA do vetor pGILDA (Clontech®). A biblioteca de cDNA utilizada no *screening* foi clonada no vetor pB42AD (Clontech®) que contém o domínio de ativação de transcrição (*AD: Activation Domain*) fusionado à proteína desconhecida da biblioteca de cDNA (presa ou “*prey*”) (Thines *et al.*, 2007). Os marcadores para seleção das proteínas interatoras após a co-transformação foram a complementação de auxotrofia para leucina da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 e ativação do gene repórter lacZ do vetor p8op-lacZ (Thines *et al.*, 2007). As colônias de leveduras que cresceram no meio de cultura seletivo (sem adição de leucina)

e que apresentaram coloração azul foram selecionadas para extração do DNA plasmidial e posterior sequenciamento usando primers específicos para o vetor pB42AD contendo a proteína interatora de AtbZIP63 desconhecida da biblioteca de cDNA.

Um total de 20 proteínas que interagem com AtbZIP63 foram selecionadas para posterior validação *in planta*. Dentro deste grupo observamos um enriquecimento de genes (20% dos genes) relacionados a regulação da estabilidade de proteínas (Tabela 1). Dentre eles, o gene APC10 (*Anaphase Promoting Complex 10*) codifica uma sub-unidade do complexo APC/C, o qual promove a ubiquitinação de proteínas no núcleo (Capron *et al.*, 2003) e participa do controle do desenvolvimento do sistema vascular das folhas (Marroco *et al.*, 2009, Eloy *et al.*, 2011). Identificamos também a proteína SKIP34 (*SKP1-Interacting protein 34*), a qual interage com a proteína ASK2 (*Arabidopsis SKP-like 2*) que faz parte de diferentes complexos SCF (*SKP, Cullin, F-Box containing complex*) que mediam a degradação de proteínas via ubiquitinação-proteassomo (Risseeuw *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 2011). At1g73760 codifica uma RING/U-Box E3 ligase que confere especificidade ao complexo E3 ligase (Vierstra 2003; Trujillo & Shirasu 2010). Uma interessante proteína interatora de AtbZIP63 é SCE1 (*Sumo Conjugation Enzyme 1*), a qual promove a sumoilação de proteínas (Saracco *et al.*, 2007; Miller & Vierstra, 2011). A sumoilação consiste na ligação covalente da proteína SUMO (*Small Ubiquitin-Like Modifier*) às proteínas alvo de forma a modificar sua estabilidade, localização celular ou atividade, sendo que esta modificação pós-traducional afeta diversos processos biológicos e desempenha um papel importante nas respostas a estresses (Saracco *et al.*, 2007). O gene DI19 (*Drought-induced 19*) contém um domínio RING/U-Box, o que sugere sua atividade como E3-ligase, sendo que seu transcrito acumula em resposta a estresse hídrico de forma independente de ABA (Gosti *et al.*, 1995;



Milla *et al.*, 2006). Contudo, seu papel na regulação da estabilidade de proteínas ainda não foi investigado.

	Nome	AGI	Descrição
Protein degradation / stability	APC10	AT2G18290	ANAPHASE PROMOTING COMPLEX sub-unit 10
	SKIP34	AT5G65495	SKIP34 protein (SKP1-interacting partner 34).
	RING/U-box protein	AT1G73760	RING/U-box containing protein (E3 ligase complex)
	SCE1	AT3G57870	Sumoylation enzyme
	DI19	AT1G56280	Drought-induced 19
Transcription factors	COL10	AT5G48250	CONSTANS-like 10
	bHLH162	AT4G20970	basic Helix-loop-helix 162
	AtbZIP10	AT4G02640	bZIP transcription factor
	AtbZIP11	AT4G34590	bZIP transcription factor
Redox state	AtGST1; ERD11	AT1G02930	Glutathione S-Transferase 1.
	TRX3; ATH3	AT5G42980	Thioredoxin 3
	ATGSTF10; ERD13	AT2G30870	Glutathione S-Transferase phi 10
Ca <sup>2+</sup> signaling	ATCP1	AT5G49480	Ca <sup>2+</sup> binding protein calmodulin
	TCH3; ATCAL4	AT2G41100	Touch Induced 3 calmodulin-like protein
Unknown	Unknown protein 1	AT3G57450	
	Unknown protein 2	AT5G13340	
	Unknown protein 3	AT1G76070	
	Unknown protein 4	AT5G05360	
Other	dynein / LRR	AT4G03260	Outer arm dynein light chain / LRR (Leucine-rich repeat).
	POM1, CTL1	AT1G05850	Chitinase-like protein 1)

**Tabela 1.** Proteínas interatoras de AtbZIP63 encontradas no *screening* usando duplo híbrido em levedura (Y2H).

## Conclusões

A produtividade das espécies de plantas de interesse agrônomico depende em grande parte de como os recursos energéticos obtidos através da fotossíntese são divididos entre armazenamento, crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses bióticos e abióticos. Entender como a energia é canalizada para cada uma destas vias e como os diversos sinais ambientais e metabólicos são integrados é de vital importância para o melhoramento genético destas espécies.

A análise funcional dos transcriptomas dos mutantes de *AtbZIP63* sugere que este gene está envolvido em uma ampla gama de processos que incluem modulação do metabolismo de amido, resposta à carência energética, controle da expansão da parede celular durante a noite, ajuste do relógio circadiano, síntese e sinalização de diversos hormônios e respostas a patógenos. Desta forma, o gene *AtbZIP63*, cuja expressão é regulada por glicose e ABA de forma sinérgica, pode ter uma participação importante no “*cross-talk*” entre o metabolismo energético, ciclo circadiano e respostas a estresses no controle do crescimento e desenvolvimento. Esta hipótese é reforçada pela observação de que o mutante *atbzip63-2* apresenta um significativo atraso de desenvolvimento, sendo que este fenótipo pode ser resultado de alterações no metabolismo de amido e/ou de parede celular, uma vez que temos vários genes relacionados a ambos os processos desregulados neste mutante. *AtbZIP63* também pode ter um papel importante nas respostas a carência energética, mediando as respostas induzidas por KIN10/11 em condições de privação energética. Além disso, as diferenças de susceptibilidade a patógenos de *atbzip63-1* e *atbzip63-2* em relação aos seus respectivos genótipos selvagens Col-0 e WS sugere que *AtbZIP63* poderia ter um papel amplo nas respostas a estresses tanto biótico quanto abiótico

de acordo com a variável disponibilidade energética ao longo do dia (ciclo circadiano) e condições que levam ao estresse energético cujas respostas são mediadas por KIN10.

Os dados obtidos a partir do interatoma de AtbZIP63 abre novas perspectivas no estudo deste fator de transcrição no que tange a estabilidade de sua proteína, associação com outros fatores de transcrição, regulação pelo estado *redox* celular, regulação por  $\text{Ca}^{2+}$ , entre outros. A elucidação do contexto molecular no qual AtbZIP63 atua ajudará a explicar os fenótipos observados nos mutantes *atbzip63-1* e *atbzip63-2*, bem como acrescentará informações de como ciclo circadiano, estado energético e respostas a estresses são integrados e convertidos em mudanças dos perfis transcricionais para aqueles mais adequados a cada combinação de sinais.

## Perspectivas

- Elucidar os mecanismos envolvidos na regulação pós-transcricional de AtbZIP63 induzidos por glicose e ABA (elementos reguladores, elementos *cis* no RNAm de *AtbZIP63*)
- Determinar as vias de regulação envolvidas no fenótipo de atraso de desenvolvimento observado no mutante *atbzip63-2*
- Descobrir os genes alvos regulados diretamente por AtbZIP63 através da verificação de sua interação com os promotores dos genes desregulados nos mutantes para AtbZIP63
- Verificar a suscetibilidade ao fitopatógeno *Pst* DC3000 de linhagens transgênicas super-expressando e silenciando AtbZIP63
- Determinar os genes diferencialmente expressos entre o mutante *atbzip63-1* e seu respectivo ecótipo selvagem Col-0 em resposta a *Pst* DC3000
- Determinar a estabilidade da proteína AtbZIP63 durante o ciclo circadiano e em resposta a privação energética, glicose, ABA e *Pst* DC3000 em plantas selvagens e mutantes afetados nas respectivas vias de sinalização.
- Verificar in planta a interação proteína-proteína entre AtbZIP63 e seus possíveis interatores relacionados ao controle de estabilidade de proteínas.
- Determinar a via de degradação da proteína AtbZIP63 utilizando mutantes e inibidores de protease sintéticos.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "O fator de transcrição AtbZIP63 como integrador de sinais energéticos e estresses biótico/abiótico"

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

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

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. 2003/01, Instituição:  
ANÁLISE FUNCIONAL DE FATORES DE REGULAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO bZIP.

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

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

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

  
Aluno: Cleverson Carlos Matioli

  
Orientador: Michel Georges Albert Vincentz

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

## Referências

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., and Araki, T. (2005). FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. *Science* *309*, 1052–1056.
- Achard, P., and Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* *60*, 1085–1092.
- Ahuatzi, D., Herrero, P., Cera, T. de la, and Moreno, F. (2004). The Glucose-regulated Nuclear Localization of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* *279*, 14440–14446.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., and Kay, S.A. (2001). Reciprocal Regulation Between TOC1 and LHY/CCA1 Within the Arabidopsis Circadian Clock. *Science* *293*, 880–883.
- Amor, B.B., Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., d' Aubenton-Carafa, Y., Hirsch, J., Maizel, A., Mallory, A., Lucas, A., Deragon, J.M., et al. (2009). Novel long non-protein coding RNAs involved in Arabidopsis differentiation and stress responses. *Genome Res.* *19*, 57–69.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.-L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., et al. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal* *24*, 2579–2589.
- Barak, S., Tobin, E.M., Green, R.M., Andronis, C., and Sugano, S. (2000). All in good time: the Arabidopsis circadian clock. *Trends in Plant Science* *5*, 517–522.
- Beckett, D. (2001). Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *Journal of Molecular Biology* *314*, 335–352.
- Belostotsky, D.A., and Sieburth, L.E. (2009). Kill the messenger: mRNA decay and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* *12*, 96–102.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Pöschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Pnas* *106*, 8067–8072.
- Bhardwaj, V., Meier, S., Petersen, L.N., Ingle, R.A., and Roden, L.C. (2011). Defence Responses of *Arabidopsis thaliana* to Infection by *Pseudomonas syringae* Are Regulated by the Circadian Clock. *PLoS ONE* *6*, e26968.
- Billoud, B., De Paepe, R., Baulcombe, D., and Boccardo, M. (2005). Identification of new small non-coding RNAs from tobacco and Arabidopsis. *Biochimie* *87*, 905–910.
- Bläsing, O.E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W.-R., and Stitt, M. (2005). Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell* *17*, 3257–3281.

- Braun, P. (2012). Interactome mapping for analysis of complex phenotypes: Insights from benchmarking binary interaction assays. *Proteomics* 12, 1499–1518.
- Bray, E.A. (2002). Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant, Cell & Environment* 25, 153–161.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. (2008). Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185–1190.
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology* 2, 202–207.
- Caspar, T., Huber, S.C., and Somerville, C. (1985). Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of Arabidopsis thaliana (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity 1. *Plant Physiol* 79, 11–17.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M., and Smith, A.M. (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *The Plant Journal* 37, 853–863.
- 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. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671.
- Cho, Y.-H., Yoo, S.-D., and Sheen, J. (2006). Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell* 127, 579–589.
- Chuang, C.-F., Running, M.P., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M. (1999). The PERANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* 13, 334–344.
- Ciceri, P., Locatelli, F., Genga, A., Viotti, A., and Schmidt, R.J. (1999). The Activity of the Maize Opaque2 Transcriptional Activator Is Regulated Diurnally. *Plant Physiol.* 121, 1321–1327.
- Corrêa, L.G.G., Riaño-Pachón, D.M., Schrago, C.G., Vicentini dos Santos, R., Mueller-Roeber, B., and Vincenz, M. (2008). The Role of bZIP Transcription Factors in Green Plant Evolution: Adaptive Features Emerging from Four Founder Genes. *PLoS ONE* 3, e2944.
- Cosgrove, D.J. (2000a). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 109–124.
- Cosgrove, D.J. (2000b). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407, 321–326.
- Van Der Kelen, K., Beyaert, R., Inzé, D., and De Veylder, L. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 143–168.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441–445.

- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11, 539–548.
- 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. (2007). MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2225–2245.
- Downes, B.P., Stupar, R.M., Gingerich, D.J., and Vierstra, R.D. (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *The Plant Journal* 35, 729–742.
- Dreze, M., Carvunis, A.-R., Charlotiaux, B., Galli, M., Pevzner, S.J., Tasan, M., Ahn, Y.-Y., Balumuri, P., Barabási, A.-L., Bautista, V., et al. (2011). Evidence for Network Evolution in an Arabidopsis Interactome Map. *Science* 333, 601–607.
- Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B.A., Loake, G.J., Doerner, P., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1997). Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *The EMBO Journal* 16, 726–738.
- Eckardt, N.A. (2009). Negative Regulation of Stress-Activated MAPK Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 2545–2545.
- Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C.S., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. (2006). 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.
- Eloy, N.B., de Freitas Lima, M., Van Damme, D., Vanhaeren, H., Gonzalez, N., De Milde, L., Hemerly, A.S., Beemster, G.T.S., Inzé, D., and Ferreira, P.C.G. (2011). The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *The Plant Journal* 68, 351–363.
- Espinoza, C., Degenkolbe, T., Caldana, C., Zuther, E., Leisse, A., Willmitzer, L., Hinch, D.K., and Hannah, M.A. (2010). Interaction with Diurnal and Circadian Regulation Results in Dynamic Metabolic and Transcriptional Changes during Cold Acclimation in Arabidopsis. *PLoS ONE* 5, e14101.
- Farré, E.M., and Weise, S.E. (2012). The interactions between the circadian clock and primary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 293–300.
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E.L., and Grotewold, E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* 66, 94–116.
- 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. (2011). 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.



- Forde, B.G. (2002). The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *J. Exp. Bot.* *53*, 39–43.
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y., and Takahashi, Y. (2000). REPRESSION OF SHOOT GROWTH, a bZIP Transcriptional Activator, Regulates Cell Elongation by Controlling the Level of Gibberellins. *Plant Cell* *12*, 901–915.
- Gagne, J.M., Smalle, J., Gingerich, D.J., Walker, J.M., Yoo, S.-D., Yanagisawa, S., and Vierstra, R.D. (2004). Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Pnas* *101*, 6803–6808.
- Gibon, Y., Bläsing, O.E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J.H.M., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. (2004). Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant Journal* *39*, 847–862.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* *43*, 205–227.
- Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N., and Giraudat, J. (1995). Abscisic acid-dependent and -independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*; Molecular and General Genetics *MGG* *246*, 10–18.
- Gould, P.D., Locke, J.C.W., Larue, C., Southern, M.M., Davis, S.J., Hanano, S., Moyle, R., Milich, R., Putterill, J., Millar, A.J., et al. (2006). The Molecular Basis of Temperature Compensation in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell* *18*, 1177–1187.
- Grennan, A.K. (2007). The Role of Trehalose Biosynthesis in Plants. *Plant Physiol.* *144*, 3–5.
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., and Cook, J.C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. , Published Online: 20 September 1979; | Doi:10.1038/281216a0 *281*, 216–217.
- Gutiérrez, R.A., MacIntosh, G.C., and Green, P.J. (1999). Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends in Plant Science* *4*, 429–438.
- Guttman, M., and Rinn, J.L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* *482*, 339–346.
- Halford, N.G., and Grahame Hardie, D. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology* *37*, 735–748.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M.M.W.B., and Smeekens, S. (2008). The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *The Plant Journal* *53*, 935–949.

- Harmer, S.L. (2009). The Circadian System in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* 60, 357–377.
- Hong, S.-P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Pnas* 100, 8839–8843.
- Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell* 136, 763–776.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P. (2008). Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008, 1–5.
- Huang, E., Blagg, S.L., Keller, T., Katoh, M., Shaulsky, G., and Thompson, C.R.L. (2006a). bZIP transcription factor interactions regulate DIF responses in *Dictyostelium*. *Development* 133, 449–458.
- Huang, J., Taylor, J.P., Chen, J.-G., Uhrig, J.F., Schnell, D.J., Nakagawa, T., Korth, K.L., and Jones, A.M. (2006b). The Plastid Protein THYLAKOID FORMATION1 and the Plasma Membrane G-Protein GPA1 Interact in a Novel Sugar-Signaling Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1226–1238.
- Ingle, R.A., Carstens, M., and Denby, K.J. (2006). PAMP recognition and the plant–pathogen arms race. *BioEssays* 28, 880–889.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 7, 106–111.
- Jones, A.M., Ecker, J.R., and Chen, J.-G. (2003). A Reevaluation of the Role of the Heterotrimeric G Protein in Coupling Light Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 1623–1627.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Johnson MA et al (1998) Determinants of mRNA stability in plants. In: J. Bailey-Serres and D.R. Gallie Editors, *A Look Beyond Transcription: Mechanisms Determining mRNA Stability and Translation in Plants* American Society of Plant Physiologists pag. 40–53.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J.-Y., Theisen, J.W., and Kadonaga, J.T. (2008). The RNA polymerase II core promoter — the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 253–259.
- Kaminaka, H., Näke, C., Epple, P., Dittgen, J., Schütze, K., Chaban, C., Holt, B.F., Merkle, T., Schäfer, E., Harter, K., et al. (2006). bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *The EMBO Journal* 25, 4400–4411.
- Kaplan, F., Sung, D.Y., and Guy, C.L. (2006). Roles of  $\beta$ -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126, 120–128.

Katagiri, F., and Chua, N.-H. (1992). Plant transcription factors: present knowledge and future challenges. *Trends in Genetics* 8, 22–27.

Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y. (2002). The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction. *Arabidopsis Book* 1,.

Kaufmann, K., Wellmer, F., Muino, J.M., Ferrier, T., Wuest, S.E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E.M., et al. (2010). Orchestration of Floral Initiation by APETALA1. *Science* 328, 85–89.

Keuskamp, D.H., Sasidharan, R., and Pierik, R. (2010). Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant Signal Behav* 5, 655–662.

Kim, J.-Y., Song, H.-R., Taylor, B.L., and Carré, I.A. (2003). Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY. *The EMBO Journal* 22, 935–944.

Kim, S., Kang, J., Cho, D.-I., Park, J.H., and Kim, S.Y. (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal* 40, 75–87.

Koch, K.E. (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 509–540.

Kurihara, Y., Matsui, A., Hanada, K., Kawashima, M., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Kaminuma, E., Mochizuki, Y., Matsushima, A., et al. (2009). Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in *Arabidopsis*. *Pnas* 106, 2453–2458.

Lara, P., Oñate-Sánchez, L., Abraham, Z., Ferrándiz, C., Díaz, I., Carbonero, P., and Vicente-Carbajosa, J. (2003). Synergistic Activation of Seed Storage Protein Gene Expression in *Arabidopsis* by ABI3 and Two bZIPs Related to OPAQUE2. *J. Biol. Chem.* 278, 21003–21011.

Latchman, D.S. (1990). Eukaryotic transcription factors. *Biochem J* 270, 281–289.

Lee, T.I., and Young, R.A. (2000). Transcription of Eukaryotic Protein-Coding Genes. *Annual Review of Genetics* 34, 77–137.

Legnaioli, T., Cuevas, J., and Mas, P. (2009). TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *The EMBO Journal* 28, 3745–3757.

León, P., and Sheen, J. (2003). Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science* 8, 110–116.

Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S., Ritsema, T., and Pieterse, C. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232, 1423–1432.

- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T. (2004). The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *Plant Cell* *16*, 319–331.
- Li, Y., Lee, K.K., Walsh, S., Smith, C., Hadingham, S., Sorefan, K., Cawley, G., and Bevan, M.W. (2006a). Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.* *16*, 414–427.
- Li, Y., Lee, K.K., Walsh, S., Smith, C., Hadingham, S., Sorefan, K., Cawley, G., and Bevan, M.W. (2006b). Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.* *16*, 414–427.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., and Cao, X. (2010). Histone Methylation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* *61*, 395–420.
- Liu, Y., and Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6, a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase, Induces Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* *16*, 3386–3399.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* *324*, 1064–1068.
- Marrocco, K., Thomann, A., Parmentier, Y., Genschik, P., and Criqui, M.C. (2009). The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development* *136*, 1475–1485.
- Más, P., and Yanovsky, M.J. (2009). Time for circadian rhythms: plants get synchronized. *Current Opinion in Plant Biology* *12*, 574–579.
- Matiolli, C.C., Tomaz, J.P., Duarte, G.T., Prado, F.M., Bem, L.E.V.D., Silveira, A.B., Gauer, L., Corrêa, L.G.G., Drumond, R.D., Viana, A.J.C., et al. (2011). The Arabidopsis bZIP Gene *AtbZIP63* Is a Sensitive Integrator of Transient Abscisic Acid and Glucose Signals. *Plant Physiol.* *157*, 692–705.
- McKnight, S.L., and Kingsbury, R. (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* *217*, 316–324.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., et al. (2008). 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 CO11 F-box protein. *The Plant Journal* *55*, 979–988.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* *126*, 969–980.
- Meshi, T., and Iwabuchi, M. (1995). Plant Transcription Factors. *Plant Cell Physiol* *36*, 1405–1420.

- Milla, M., Townsend, J., Chang, I.-F., and Cushman, J. (2006). The Arabidopsis Gene Family Encodes a Novel Type of Cys2/His2 Zinc-finger Protein Implicated in ABA-independent Dehydration, High-salinity Stress and Light Signaling Pathways. *Plant Molecular Biology* *61*, 13–30.
- Miller, M.J., and Vierstra, R.D. (2011). Mass spectrometric identification of SUMO substrates provides insights into heat stress-induced SUMOylation in plants. *Plant Signal Behav* *6*, 130–133.
- Mitsuda, N., and Ohme-Takagi, M. (2009). Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* *50*, 1232–1248.
- Mizuno, T., and Yamashino, T. (2008). Comparative Transcriptome of Diurnally Oscillating Genes and Hormone-Responsive Genes in Arabidopsis thaliana: Insight into Circadian Clock-Controlled Daily Responses to Common Ambient Stresses in Plants. *Plant Cell Physiol* *49*, 481–487.
- de Montaigu, A., Tóth, R., and Coupland, G. (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends in Genetics* *26*, 296–306.
- Montoya, T., Nomura, T., Yokota, T., Farrar, K., Harrison, K., Jones, J.G.D., Kaneta, T., Kamiya, Y., Szekeres, M., and Bishop, G.J. (2005). Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *The Plant Journal* *42*, 262–269.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Hwang, I., Jones, T., and Sheen, J. (2003). Role of the Arabidopsis Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science* *300*, 332–336.
- Moreno, F., Ahuatzli, D., Riera, A., Palomino, C.A., and Herrero, P. (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 265–268.
- Nakamichi, N. (2011). Molecular Mechanisms Underlying the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell Physiol* *52*, 1709–1718.
- Nakamura, S., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *The Plant Journal* *26*, 627–635.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H. (2006). Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiol.* *140*, 411–432.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.-Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., et al. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* *61*, 290–299.
- O'Brien, J., Daudi, A., Butt, V., and Paul Bolwell, G. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 1–15.
- Osterluund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W. Targeted destabilization of HY5

during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 405, 462–466.

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

Peng, H.-P., Lin, T.-Y., Wang, N.-N., and Shih, M.-C. (2005). Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in Arabidopsis during hypoxia. *Plant Molecular Biology* 58, 15–25.

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

Pontier, D., Miao, Z.-H., and Lam, E. (2001). Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *The Plant Journal* 27, 529–538.

Price, J., Laxmi, A., St. Martin, S.K., and Jang, J.-C. (2004). Global Transcription Profiling Reveals Multiple Sugar Signal Transduction Mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2128–2150.

Qiu, J.-L., Zhou, L., Yun, B.-W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., MacKinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J., and Morris, P.C. (2008). Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases MKK1 and MKK2 Have Overlapping Functions in Defense Signaling Mediated by MEK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol.* 148, 212–222.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., -Z, C., Jiang, Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., et al. (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 290, 2105–2110.

Risseuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., and Crosby, W.L. (2003). Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *The Plant Journal* 34, 753–767.

Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 198–206.

Rojo, E., León, J., and Sánchez-Serrano, J.J. (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 20, 135–142.

Rolland, F., and Sheen, J. (2005). Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 269–271.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006). SUGAR SENSING AND SIGNALING IN PLANTS: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 675–709.

Rook, F., Hadingham, S.A., Li, Y., and Bevan, M.W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell & Environment* 29, 426–434.

- Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K. (2002). The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature. *Plant Cell Physiol* *43*, 1421–1435.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., and Shen, Q.J. (2010a). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* *15*, 247–258.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., and Shen, Q.J. (2010b). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* *15*, 247–258.
- Santangelo, G.M. (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 253–282.
- Saracco, S.A., Miller, M.J., Kurepa, J., and Vierstra, R.D. (2007). Genetic Analysis of SUMOylation in Arabidopsis: Conjugation of SUMO1 and SUMO2 to Nuclear Proteins Is Essential. *Plant Physiol.* *145*, 119–134.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). A Novel Subgroup of bZIP Proteins Functions as Transcriptional Activators in Hypoosmolarity-Responsive Expression of the ProDH Gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* *45*, 309–317.
- Sauerbrunn, N., and Schlaich, N. (2004). PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis; *Planta* *218*, 552–561.
- Seo, P.J., and Park, C.-M. (2010). MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in Arabidopsis. *New Phytologist* *186*, 471–483.
- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.-Y., Lee, Y.N., Kim, S.-G., Lee, Y.-H., Park, W.J., and Park, C.-M. (2009). The MYB96 Transcription Factor Mediates Abscisic Acid Signaling during Drought Stress Response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *151*, 275–289.
- Shibata, N., Kagiya, M., Nakagawa, M., Hirano, Y., and Hakoshima, T. (2010). Crystallization of the plant hormone receptors PYL9/RCAR1, PYL5/RCAR8 and PYR1/RCAR11 in the presence of (+)-abscisic acid. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* *66*, 456–459.
- Shimada, Y., Goda, H., Nakamura, A., Takatsuto, S., Fujioka, S., and Yoshida, S. (2003). Organ-Specific Expression of Brassinosteroid-Biosynthetic Genes and Distribution of Endogenous Brassinosteroids in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *131*, 287–297.
- Shin, J., Heidrich, K., Sanchez-Villarreal, A., Parker, J.E., and Davis, S.J. (2012). TIME FOR COFFEE Represses Accumulation of the MYC2 Transcription Factor to Provide Time-of-Day Regulation of Jasmonate Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*.
- Singh, K.B., Foley, R.C., and Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* *5*, 430–436.
- Smith, A.M., and Stitt, M. (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* *30*, 1126–1149.

- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., and Kay, S.A. (2000). ZEITLUPE Encodes a Novel Clock-Associated PAS Protein from Arabidopsis. *Cell* *101*, 319–329.
- Stitt, M., and Zeeman, S.C. (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology* *15*, 282–292.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* *448*, 661–665.
- Thomma, B.P.H.J., and Broekaert, W.F. (1998). Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry* *36*, 533–537.
- Tomaz, J.P., and Vincentz, M.G.A. (2008). Envolvimento dos quatro genes bZIPs do Grupo C de Arabidopsis thaliana na sinalização por glicose, manose e ABA.
- Trujillo, M., and Shirasu, K. (2010). Ubiquitination in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* *13*, 402–408.
- Ullah, H., Chen, J.-G., Wang, S., and Jones, A.M. (2002). Role of a Heterotrimeric G Protein in Regulation of Arabidopsis Seed Germination. *Plant Physiol.* *129*, 897–907.
- Ulm, R., and Nagy, F. (2005). Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology* *8*, 477–482.
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Shinozaki, K. (2006). CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* *46*, 171–182.
- Underwood, W., Zhang, S., and He, S.Y. (2007). The Pseudomonas syringae type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* *52*, 658–672.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Pnas* *97*, 11632–11637.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B.N., Anand, A., Mysore, K.S., and Bender, C.L. (2007). The Phytotoxin Coronatine Contributes to Pathogen Fitness and Is Required for Suppression of Salicylic Acid Accumulation in Tomato Inoculated with Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions* *20*, 955–965.
- Usadel, B., Bläsing, O.E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. (2008). Global Transcript Levels Respond to Small Changes of the Carbon Status during Progressive Exhaustion of Carbohydrates in Arabidopsis Rosettes. *Plant Physiol.* *146*, 1834–1861.



- Vierstra, R.D. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* 8, 135–142.
- Vierstra, R.D. (2009). The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 385–397.
- Wager, A., and Browse, J. (2012). Social Network: JAZ Protein Interactions Expand Our Knowledge of Jasmonate Signaling. *Front Plant Sci* 3.
- Waterborg, J.H. (2011). Plant histone acetylation: In the beginning.... *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809, 353–359.
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., and Hahlbrock, K. (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *Embo J* 10, 1777–1786.
- Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C.S., Dietrich, K., Wang, X., Schütze, K., Alonso, R., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. (2006). Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *The EMBO Journal* 25, 3133–3143.
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B., and Smeekens, S. (2004). A Conserved Upstream Open Reading Frame Mediates Sucrose-Induced Repression of Translation. *Plant Cell* 16, 1717–1729.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüß, M., Reuter, I., and Schacherer, F. (2000a). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucl. Acids Res.* 28, 316–319.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüß, M., Reuter, I., and Schacherer, F. (2000b). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucl. Acids Res.* 28, 316–319.
- Xie, D.-X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998a). COI1: An Arabidopsis Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science* 280, 1091–1094.
- Xie, D.-X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998b). COI1: An Arabidopsis Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science* 280, 1091–1094.
- Yin, Y., Zhu, Q., Dai, S., Lamb, C., and Beachy, R.N. (1997). RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *The EMBO Journal* 16, 5247–5259.
- Zheng, Z., Qamar, S.A., Chen, Z., and Mengiste, T. (2006a). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* 48, 592–605.
- Zheng, Z., Qamar, S.A., Chen, Z., and Mengiste, T. (2006b). Arabidopsis WRKY33

transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* *48*, 592–605.

Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* *20*, 10–16.