



KAROLINE ESTEFANI DUARTE

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES E FISIOLÓGICAS PARA
MITIGAÇÃO DE ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Setaria viridis***

LAVRAS - MG

2018

KAROLINE ESTEFANI DUARTE

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES E FISIOLÓGICAS PARA MITIGAÇÃO DE
ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Setaria viridis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Pierre Roger René Marraccini

Orientador

Dr. Adilson Kenji Kobayashi

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari

Dr. Wagner Rodrigo de Souza

Coorientadores

LAVRAS - MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Duarte, Karoline Estefani.

Estratégias moleculares e fisiológicas para mitigação de estresses
abióticos em *Setaria viridis* / Karoline Estefani Duarte. - 2018.
105 p. : il.

Orientador: Pierre Roger René Marraccini.

Coorientadores: Adilson Kenji Kobayashi, Hugo Bruno Correa
Molinari, Wagner Rodrigo de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Estresse abiótico. 2. Ácido abscísico. 3. *Setaria viridis*. 4.
Transformação genética. I. Marraccini, Pierre Roger René. II.
Kobayashi, Adilson Kenji. III. Molinari, Hugo Bruno Correa. IV.
Souza, Wagner Rodrigo de. V. Título.

KAROLINE ESTEFANI DUARTE

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES E FISIOLÓGICAS PARA MITIGAÇÃO DE
ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Setaria viridis***

**MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL STRATEGIES FOR MITIGATION OF
ABIOTIC STRESSES IN *Setaria viridis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de janeiro de 2018.

Dr. Adilson Kenji Kobayashi EMBRAPA

Dr. Francisco José Lima Aragão EMBRAPA

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari EMBRAPA

Dr. Thomas Christopher Rhys Williams UnB

Prof. Dr. Pierre Roger René Marraccini
Orientador

Dr. Adilson Kenji Kobayashi
Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
Dr. Wagner Rodrigo de Souza
Coorientadores

LAVRAS – MG

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por estarem comigo durante toda essa jornada, me incentivarem e principalmente por nunca desistirem do meu sonho. Vocês foram a base sólida que fizeram com que eu me mantivesse de pé durante os piores dias. A todos das famílias Duarte e Silva que me acolheram nas voltas para casa e sempre fizeram de tudo para que a saudade não me abalasse, foram sempre presentes e compreensivos.

Aos meus amigos Aline, Amanda, Andressa, Gabriela, Pâmella, Nathália, Gustavo, Nikollas que amenizaram todo o processo estiveram sempre ao meu lado seja por telefone ou presencialmente. Aos amigos que Brasília me deu Edriana, Lucas, Michelle, Gabriel, Érica que estiveram sempre ao meu lado e cuidaram de mim quando a família estava distante, fazendo-me sorrir sempre e levar a vida de maneira mais suave.

A todos do grupo Cana-di-setaria, que me receberam na Embrapa Agroenergia e me inseriram em um grupo no qual encontrei suporte para executar todas as ideias que surgiam. Especialmente à Ana Paula e à Thaís que me deram não somente o auxílio de pesquisa, mas também uma amizade que sempre fez com que essa jornada fosse mais suave.

Durante toda a jornada da pós-graduação, eu tive o prazer de compartilhar dos ensinamentos do prof. Pierre e agradeço imensamente por sempre estar aberto para contribuir para a minha formação profissional, me fazer crescer como pessoa e me oferecer todas as oportunidades para uma formação de qualidade.

Serei eternamente grata ao Hugo Molinari e Adilson Kobayashi por me receberem diante de todas as adversidades e me acolherem com muito carinho. Com vocês, eu tive todas as condições necessárias para desenvolver um bom trabalho e acima de tudo me desenvolver como pesquisadora e pessoa. Obrigada por acreditarem em mim durante todo esse tempo.

Da metade do doutorado em diante, eu recebi um presente especial que foi poder compartilhar a minha vida com você, Wagner, me fez ter outra visão da vida. Quando você entrou na minha vida, eu estava totalmente desacreditada do meu trabalho e em mim como profissional. Com você, eu aprendi a acreditar em mim mesma e no meu potencial, você batalhou comigo durante os momentos mais difíceis começando um trabalho do zero com pouco tempo para defender e me fez ver como é ser apaixonado pelo que faz. Muito obrigada por ser meu companheiro em todos os momentos e fazer a vida ter outro sentido, com muito amor e parceria.

RESUMO GERAL

As técnicas de melhoramento genético de plantas se tornaram promissoras e têm contribuído para que países superem o desafio de atender à crescente demanda por alimentos, em especial em um cenário de escassez de recursos como a água. Um dos gargalos está nas informações quantitativas sobre as complexas características necessárias às plantas para enfrentar, entre outras situações, secas, alagamentos, altas temperaturas. Os métodos de transformação e regeneração para a maioria das culturas são de baixa eficiência, tempo demorado e trabalho intensivo, ou simplesmente não estão disponíveis. Com essas deficiências têm-se a necessidade da utilização de plantas modelo para análise rápida de potenciais genes alvos envolvidos na resposta de estresses abióticos e bióticos. Nesse cenário, *Setaria viridis* tem se demonstrado como um excelente modelo para plantas que realizam fotossíntese C4. Essa espécie pertence ainda ao mesmo grupo de culturas de importância econômica como o milho, sorgo e a cana-de-açúcar. Por duas abordagens diferentes, este estudo se propõe a entender melhor como esta planta responde ao estresse hídrico. Na primeira abordagem os efeitos do gene órfão *CcUNK8* de *Coffea canephora*, previamente identificado como um gene candidato que estava potencialmente relacionado em processos de tolerância à seca no cafeeiro, foi caracterizado por meio da transformação genética de *S. viridis*. A segunda abordagem teve como objetivo identificar e caracterizar os genes de *S. viridis* que codificam as proteínas PYL-PYR-RCAR/SnRK2/PP2C do sistema tripartite envolvidas nos primeiros passos da percepção do ácido abscísico (ABA) em resposta ao estresse abiótico. Além do potencial uso destes genes em biotecnologia, a identificação dos genes que controlam essa importante via de sinalização, bem como o estudo de sua regulação, são essenciais para melhor compreender os mecanismos envolvidos nas respostas das plantas a estresses abióticos.

Palavras-chave: Estresse abiótico. Ácido abscísico. *Setaria viridis*. Transformação genética.

GENERAL ABSTRACT

Genetic breeding techniques became promising in helping countries to overcome the challenge of growing demand for food, especially in a scenario of scarce resources, such as water. There is a gap regarding the quantitative information on the complex conditions faced by plants, such as drought and high temperature conditions, for example. For most of crops, the transformation and regeneration times used in transgenic methods have low efficiency, and are also time consuming or simply not available. Due to these drawbacks, there is a need to use model plants to perform rapid analysis of potential target genes involved in the responses to abiotic and biotic stresses. In this scenario, *Setaria viridis* has been demonstrated to be an excellent model for plants performing *C4 photosynthesis*. This species belongs to the same plant group of crops of high economic importance, such as corn, sorghum and sugarcane. By two different approaches, the study presented here aimed to better understand how this plant responds to drought stress. The first approach was to study the effects of the orphan gene *CcUNK8* from *Coffea canephora*, previously reported as a candidate gene involved in drought tolerance processes in this plant species, through genetic transformation of *S. viridis*. The second approach was to identify and characterize the *S. viridis* genes coding the PYL-PYR-RCAR/SnRK2/PP2C proteins of tripartite system involved in the first steps of abscisic acid (ABA) perception in response to abiotic stress. In addition to their potential use biotechnology, the identification of the genes controlling this important signalling pathway as well as the study of their regulation, are essential to better understand the mechanisms involved in plant responses to abiotic stresses.

Keywords: Abiotic stress. Abscisic acid. *Setaria viridis*. Genetic transformation.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Mecanismos de formação de novos genes, que podem ocorrer por quatro processos distintos, duplicação do DNA, retro transposição do RNA, fusão gênica e formação de novos genes em regiões não codantes. 18
- Figura 2 - Modelo geral de resposta ao estresse abiótico.....20
- Figura 3 - Esquema das vias reguladoras envolvidas nas respostas à seca, salinidade e estresse frio.....24
- Figura 4 - Estrutura química do ácido abscísico (\pm) ABA.25
- Figura 5 - Via de biossíntese de ABA.....26
- Figura 6 - Componentes principais da via de transdução de sinal do ABA.....28

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 - Representação esquemática do T-DNA clonado no vetor binário *p6i* (DNA Cloning Service, Alemanha).....44
- Figura 2 - Análise do produto de PCR de plantas *ZmUbi:CcUNK8*. **M**: Marcador 100 pb (InvitrogenTM); **B**:Branco; **C-**: planta não transgênica; **C+**: controle positivo (DNA plasmidial contendo a construção gênica *ZmUbi:CcUNK8*); em sequência os 27 eventos positivos.47
- Figura 3 - Análise da expressão gênica relativa de folhas das plantas T₀ de *S. viridis* transformados com o vetor *ZmUbi:CcUNK8* comparados com plantas da linhagem não-transgênica (NT).48
- Figura 4 - (A) Imagem térmica representativa de plantas *S. viridis* nos diferentes regimes hídricos com respectivas temperaturas médias. (B) Gráfico do conteúdo médio de água no solo das plantas de *S. viridis* em cada regime hídrico.....49
- Figura 5 - Gráficos com valores de eficiência fotossintética apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT).50
- Figura 6 - Gráficos com valores de biomassa da parte aérea apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT).52
- Figura 7 - Gráficos com valores de biomassa de raiz apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT).53

Figura 8 - Gráficos com número de perfilhos apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT). 53

ARTIGO 2

- Fig 1** Sequence alignment of *S. viridis* SvPYL, SvPP2C and SvSnRK2 proteins and SbPYL, SbPP2C and SbSnRK2 from *Sorghum bicolor*. For each protein, total length is indicated in amino acids (aa). Conserved residues are shaded with black or grey shading. (A) Sequence alignment of the eight characterized SvPYL and SbPYL receptors. Conserved residues and residues involved in ligand binding in ABA receptors are marked by black arrows, and the Gate and Latch domains are indicated. (B) Sequence alignment of the 12 SvPP2Cs and the nine characterized SbPP2Cs. Residues involved in interaction of ABA, PYLs and Mg⁺²/Mg⁺² ions are marked by black arrows, asterisks and triangles, respectively. Phosphatase sites are marked with black points. (C) The subclass III SvSnRK2 amino acid sequences are compared with the predicted amino acid sequences of SbSnRK2s. The functional domains ATP binding site, activation loop and motif I are indicated. The phosphatase sites are marked with black points. 86
- Fig 2** Phylogenetic analysis of ABA core signalling protein components from *Setaria viridis*. Maximum likelihood phylogeny of functionally characterised (A) SvPYL (B) SvPP2C (C) SvSnRK2 proteins and their close homologs from *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Sorghum bicolor* (*Sb*) and *Oryza sativa* (*Os*). The phylogenetic tree was constructed using FastTree 2.1.5 program. Branch colour scale represents SH-like local support (red to lower values and green to higher values). 87
- Fig 3** (A) MEME analysis of 10 conserved motifs of SvPYL, SvPP2C and SvSnRK2 proteins. Different colour boxes correspond to different motifs. (B) Gene structure of ABA core signalling components. Filled boxes and single lines show exons and introns, respectively. 88
- Fig 4** *Cis*-elements in the putative promoter regions of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes related with ABA-responsive element (ABRE), low temperature-responsive element (LTRE) and MYB binding site (MBS). 89
- Fig 5** *Setaria viridis* accession A10.1 (left) and Ast-1 (right) in the reproductive stage (RP), 32 days post-germination (DPG). 89
- Fig 6** Physiological responses of *S. viridis* accessions submitted to abiotic stresses and exogenous ABA treatment. Photosynthesis (A), stomatal conductance (g_s) and

transpiration rate (*E*) are shown for drought (A), exogenous ABA application (B), salt stress (C) and cold stress (D). 90

Fig 7 Expression profile of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes in different abiotic stresses in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis*. The heat map shows the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (control; 0 h). (A): drought stress, (B): exogenous ABA treatment, (C): salt stress, (D): Cold stress. CTL represent the control of the experiment (untreated samples). 91

Fig 8 LC-MS analysis of ABA leaf accumulation in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis* submitted to (A) drought, (B) exogenous ABA, (C) salt and (D) cold. The results are shown as the peak areas ratio obtained from samples and peak areas obtained from the internal standard (A_{ABA}/A_{IS}). 91

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Pares de primers utilizados para RT-qPCR.45

Tabela 2 - Eventos de *S. viridis* transformados com o gene *CcUNK8* utilizados no experimento de déficit hídrico e suas respectivas gerações. A análise de geração foi realizada por meio de teste de X^2 46

ARTIGO 2

Table 1 List of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes and their features.85

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Setaria viridis</i> como planta modelo	16
2.2 Genes órfãos	17
2.3 Estresse abiótico em plantas	19
2.4 Déficit hídrico	21
2.5 Estresse salino	21
2.6 Estresse de frio	22
2.7 Estrutura, biossíntese e transporte do ácido abscísico (ABA)	24
2.7.1 Sistema tripartiteo: PYL-PP2C/SnRK	27
2.7.2 PYR/PYL/RCARs: Receptores de ABA	28
2.7.3 Fosfatases: PP2Cs	29
2.7.4 Quinases: SnRK2	30
REFERÊNCIAS	31
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	40
ARTIGO 1 - ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE ÓRFÃO <i>CcUNK8</i> DE <i>Coffea canephora</i> VIA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Setaria viridis</i>	40
ARTIGO 2 - IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CORE ABSCISIC ACID (ABA) SIGNALLING COMPONENTS AND THEIR GENE EXPRESSION PROFILE IN RESPONSE TO ABIOTIC STRESSES In <i>Setaria viridis</i>	58

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Na última década, observou-se um aumento na população mundial, estima-se que a esta deve aumentar para 9,8 bilhões de pessoas até 2050 (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU, 2017). Consequentemente, para alimentar a população em crescimento, a produtividade do setor agropecuário precisa ser aumentada consideravelmente (ZHOU; ELSHKAKI; GRAEDEL, 2018). Um dos principais obstáculos para o aumento da sua produtividade nos próximos anos será o desenvolvimento de genótipos melhor adaptados a estresses bióticos ou abióticos (BEVAN et al., 2017).

As plantas estão sujeitas a vários tipos de pressões ambientais, tais como seca, congelamento, salinidade, radiação dentre outros. Essas pressões ambientais consequentemente levam à limitação da produtividade no campo (SAVVIDES et al., 2016; XIONG; ZHU, 2001).

Fatores como maior urbanização, industrialização e mudanças climáticas continuam a intensificar os efeitos prejudiciais desses estresses quanto à produtividade das culturas. Como consequência do declínio de alimentos disponíveis, gera-se uma ameaça à segurança alimentar global (LOBELL; FIELD, 2007; NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010; REDDY, 2015; SAVVIDES et al., 2016). Em média, mais de 50% das principais das grandes culturas foram danificadas por efeitos adversos do estresse abiótico (POLTRONIERI et al., 2014).

O estresse abiótico em plantas pode resultar no desbalanço nutricional (influenciando negativamente na absorção de nutrientes), redução do potencial hídrico, redução na absorção de água do solo, fechamento estomático, redução na fotossíntese, consequentemente, interferindo drasticamente nos processos de crescimento e desenvolvimento da planta, bem como na sua produtividade (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014).

A engenharia genética de plantas tem sido utilizada para estudos visando à produção de cultivares tolerantes a estresse abiótico. Algumas estratégias utilizadas consistem no fortalecimento dos sistemas de resposta da planta, intervindo, principalmente, em diferentes etapas da resposta: de sensores, componentes de sinalização / regulação (por exemplo, receptores, quinases, etc.), para direcionar genes de ação ou efetores (por exemplo, genes biossintéticos, enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico, etc.) (CABELLO; LODAYRO; ZURBRIGGEN, 2014). Para isso, frequentemente, genes alvo são identificados

e utilizados na transformação genética de plantas visando a principalmente conferir tolerância a estresses (DATTA, 2012).

O melhoramento genético de monocotiledôneas como milho (ISHIDA et al., 1996), sorgo (ZHAO et al., 2000) e cana de açúcar (ENRÍQUEZ-OBREGÓN et al., 1998) seja por métodos clássicos ou por engenharia genética é conhecido, porém devido à complexidade e tamanho do seu genoma faz com que estudos sejam desenvolvidos utilizando espécies modelo.

Dessa forma, o uso de plantas modelo do gênero *Setaria viridis* com metabolismo C₄ representa uma abordagem importante para a caracterização inicial de ativos biotecnológicos de interesse (SOOD; PRASSAD, 2017). As principais características que tornam essa planta tão interessante para planta modelo são: (i) genoma de tamanho reduzido (510 Mb), (ii) tempo de geração curto (9 a 12 semanas), (iii) plantas de pequeno porte (30 a 50 cm), (iv) propagação por meio de sementes, (v) facilidade de manejo, (vi) alta produção de sementes, (vii) facilidade de manipulação por meio de cultura de tecidos *in vitro*, (viii) disponibilidade de protocolos otimizados e eficientes de transformação genética mediados por *A. tumefaciens* ou biobalística e, por fim, disponibilidade das sequências dos genomas nuclear (JGI *Setaria viridis* v.2.1) e cloroplastidial (GenBank NCBI: KT289405), bem como seu transcriptoma (<http://sviridis.org/resources>) (DOUST; DIAO, 2017).

A engenharia genética torna-se uma ferramenta importante para (i) a superexpressão de genes proprietários validados em outras culturas, relacionados à tolerância a estresses abióticos, (ii) a superexpressão de genes proprietários validados na própria culturas, relacionados à tolerância a estresses abióticos e (iii) prospecção de promotores tecido-específico, estresse-induzido ou constitutivos para aplicações biotecnológicas diversas (BALTES; GIL-HUMANES; VOYTAS, 2017).

Duas diferentes abordagens de engenharia genética foram utilizadas neste trabalho, para que mecanismos de tolerância a seca pudessem ser estudados. Como foco inicial deste estudo tem-se a caracterização de genes considerados genes órfãos. As análises dos projetos de sequenciamento de plantas como *Coffea* sp., *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* demonstram uma alta porcentagem (cerca de 20-30%) de genes considerados genes órfãos, ou seja, genes que não apresentam nenhuma similaridade com as sequências depositadas nos bancos de dados. Infere-se que os genes órfãos tenham sua origem em processos de especiação, portanto poderiam estar interligados a vias de resposta únicas de organismos tolerantes ou suscetíveis a uma dada condição (TAUTZ; DOMAZET-LOSO, 2011).

Em *C. canephora* e *C. arabica* foram identificados e caracterizados alguns genes órfãos. Alguns desses genes possuem um perfil de expressão heterogênea quanto a tecidos e em diferentes tratamentos nas análises *in silico*. A análise do gene órfão *CcUNK8* e os dados de qPCR mostraram uma maior expressão em folhas submetidas a estresse hídrico, quando comparado a folhas em condições normais de irrigação. Logo, *CcUNK8* pode ser considerado um gene candidato a tolerância à seca (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Do potencial envolvimento desse gene na resposta à seca, gerou-se um interesse quanto a sua utilização em transgenia para estudo detalhado da sua possível função. Para isso, plantas transgênicas foram geradas e submetidas a déficit hídrico para análises subsequentes quanto à possível função desse gene.

Como segunda abordagem deste estudo, a identificação e caracterização *in silico* assim como a compreensão do perfil de expressão desses mesmos genes alvo que possuem um papel importante na resposta primária ao estresse foram utilizadas.

O ácido abscísico (ABA) é um dos fitormônios mais estudados em resposta a diversos tipos de estresses abióticos, regula uma diversidade de adaptações fisiológicas relacionadas com o déficit hídrico, destaca-se o ajuste osmótico, a condutividade hidráulica em raízes, fechamento e abertura de estômatos, limitação da transpiração e processo de murcha, compartimentalização iônica e regulação do crescimento de brotos e raízes (CUTLER et al., 2010).

As descobertas sobre a complexa sinalização na via de transdução de sinal do ABA fornecem informações sobre como ocorre a percepção e transmissão do sinal desencadeando diferentes eventos moleculares (MA et al., 2009; PARK et al., 2009). Dessa forma, a melhor identificação de genes ABA dependente associados com a resistência ou aumento da tolerância a fatores abióticos em *S. viridis*, poderá contribuir para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas, que poderão ser aplicadas em diversas espécies de gramíneas de importância econômica mundial.

No entanto, recentemente, dois grupos independentes desvendaram um novo receptor intracelular de ABA em *Arabidopsis thaliana*. As proteínas PYL/RCARs estão envolvidos na via de percepção e sinalização do ABA junto a fosfatases do tipo 2C (PP2C) e SNF-1 proteína quinase 2 (SnRK2). Em condições regulares de crescimento, os níveis celulares de ABA são baixos, as PP2Cs pertencentes ao clado A interagem com as SnRK2s subclasse III e ocorre a inibição da atividade das quinases. Já em alta concentração de ABA em células sob estresse osmótico, como seca e alta salinidade, o ABA é reconhecido por receptores do tipo PYL/PYR/RCAR que inibem a atividade das PP2Cs. O complexo formado por ABA-

PYL/PYR/RCAR-PP2C está apto a ativar proteínas SnRK2 (MA et al., 2009; PARK et al., 2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Setaria viridis* como planta modelo

Dentro do gênero *Setaria* estão listadas mais de 100 espécies, no entanto duas se destacam *Setaria italica* e *Setaria viridis*. As duas espécies são filogeneticamente próximas, a segunda espécie é considerada ancestral (KELLOG, 2017). São recentes os relatos de interesse na utilização de *Setaria viridis* como planta modelo para pesquisas básicas e aplicadas em Poaceae, uma vez que esta pertence ao mesmo grupo vegetal de culturas de importância econômica como o milho, sorgo e a cana-de-açúcar (BENNETZEN et al., 2012; BRUTNELL et al., 2010; DOUST et al., 2009).

Há uma série de características que tornam *S. viridis* promissora como planta modelo, entre elas estão: genoma pequeno (~515 Mb); ciclo de vida curto entre 9 a 12 semanas (dependendo das condições de fotoperíodo); é uma planta de pequeno porte; requer cuidados simples para seu desenvolvimento e crescimento; e um sistema reprodutivo que ocorre por meio de autofecundação (DOUST; DIAO, 2017).

S. viridis possui metabolismo fotossintético C4. Espécies com esse tipo de metabolismo possuem vantagens adaptativas aos estresses abióticos, tais como: seca, calor e frio, resultando em possíveis rendimentos elevados em comparação com as plantas de metabolismo fotossintético C3, devido a diferenças anatômicas e bioquímicas, em que o dióxido de carbono concentra-se em torno da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RubisCO) (COELHO; HUANG; BRUTNELL, 2017).

Com o sucesso e as limitações gerados após anos de utilização de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo, uma nova demanda levou ao estudo aprofundado de *Setaria viridis* como um sistema modelo alternativo para culturas de metabolismo C₄ alimentícias como milho, sorgo e cana-de-açúcar, e gramíneas bioenergéticas como *Miscanthus* (BENNETZEN et al., 2012; BRUTNELL et al., 2010; DOUST et al., 2009). Com os estudos de *S. viridis* duas importantes linhas de pesquisa foram aprofundadas, uma abordando a produtividade agrônoma que compreende características como: eficiência fotossintética, tamanho/arquitetura da planta, fisiologia e tolerância a estresses abióticos, a maioria dessas características possuem um sistema complexo de sinalização/resposta (BRUTNELL; BENNETZEN; VOGEL, 2015). A outra linha de pesquisa aborda o detalhamento dos mecanismos genéticos, que estão se tornando cada vez mais acessíveis com as tecnologias de sequenciamento de nova geração. Compreender como os *traits* funcionam em *S. viridis* pode

influenciar consideravelmente a probabilidade de manipulações genéticas bem sucedidas em culturas alimentícias e bioenergéticas economicamente importantes (BRUTNELL et al., 2010).

2.2 Genes órfãos

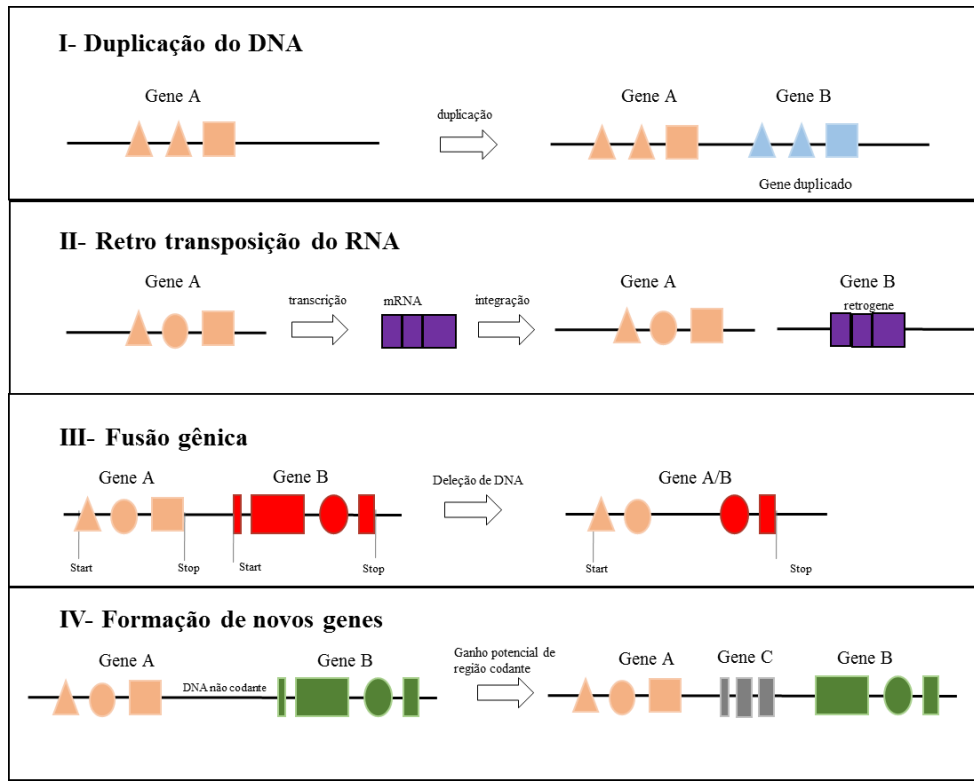
Os genes órfãos ou *no hits* foram identificados primeiramente no projeto genoma de levedura (DUJON, 1996). Estudos posteriores inferem que os genes órfãos representam uma fração substancial de cada genoma existente, o número total de genes órfãos em todas as linhagens evolutivas excede em muito o número de famílias de genes conhecidos. Por isso, é importante o estudo de como tais genes foram originados (TAUTZ; DOMAZET-LOSO, 2011).

Os genes órfãos não possuem similaridade com sequência presente nos genomas de outros organismos. De acordo com a definição mais aceita, são genes que não codificam para domínios de proteínas identificadas. Geralmente, as proteínas que não mostram qualquer similaridade de sequência em BLASTP com valores de corte ($E = e\text{-value}$) $E < 10^{-5}$ ou $E < 10^{-10}$ são classificadas como órfãs. Há evidências crescentes a partir de dados de sequenciamento de genomas e transcriptomas, que os genes órfãos apresentam uma restrita distribuição filogenética (KHALTURIN et al., 2009).

A comparação de sequências de DNA de um novo gene com a sequência correspondente em outra espécie que não apresenta tal gene, pode indicar o mecanismo que levou a sua divergência. O processo mais comum que dá origem para novos genes é a duplicação que pode ocorrer mediado por DNA ou mecanismos baseados em RNA. O primeiro envolve tipicamente um *crossing-over* desigual, o que pode levar à expansão em número de cópias de genes em famílias de genes pré-existentes (FIGURA 1). Cruzamentos também podem ocorrer entre elementos repetitivo intercalados, tais como elementos transponíveis, levando à duplicação de genes de cópia única e inserção de genes nos cromossomos não-homólogos (RANZ; PARSCH, 2012).

O segundo caso é a duplicação baseada em RNA, ocorre quando o mRNA de um gene existente é transcrito de forma reversa (RT) e inserido em um novo local no genoma. O terceiro mecanismo ocorre quando um novo gene é criado por meio da fusão de dois genes distintos para formar um gene quimérico, ou pela adição ou rearranjo de éxons que codificam proteína a partir de um gene pré-existente. O quarto mecanismo é a formação de uma nova proteína a partir de DNA não codificante (RANZ; PARSCH, 2012).

Figura 1 - Mecanismos de formação de novos genes, que podem ocorrer por quatro processos distintos, duplicação do DNA, retro transposição do RNA, fusão gênica e formação de novos genes em regiões não codantes.



Fonte: Adaptado de Ranz e Parsch (2012).

A elevada quantidade de dados de sequências de DNA e o desenvolvimento de ferramentas *in silico* para analisar e comparar os genomas permitiram a identificação de novos genes que são únicos para uma espécie.

Até o momento, estudos de caso têm centrado principalmente sobre a estrutura, o padrão de evolução da sequência e a caracterização preliminar da função dos genes recém evoluídos. Os estudos têm focado em avaliar as alterações da função gênica associados com fenótipos aberrantes, e estudos mais detalhados de como as proteínas codificadas são integradas às redes de interação proteína-proteína e quais funções irão desempenhar. O papel na determinação funcional de novos genes relacionando-os com a adaptação e divergência de espécies. Esses questionamentos deverão ser aprofundados em estudos envolvendo tais genes, e pode-se, dessa, forma desvendar as suas reais contribuições no fenótipo dos organismos (RANZ; PARSCH, 2012).

As análises de expressão de genes visando a identificar genes candidatos para tolerância à seca, foram feitas em folhas dos clones 14, 73 e 120 (tolerantes à seca) e do clone 22 (sensível à seca) de *Coffea canephora* Conilon cultivados em diferentes regimes hídricos

(irrigado vs. não-irrigado) (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Os genes órfãos foram identificados *in silico* de acordo com o tecido em que foram expressos em *C. canephora*. Com a busca de genes candidatos para a tolerância à seca, identificou-se um gene órfão *CcUNK8* que possui a expressão induzida em plantas submetidas ao déficit hídrico, um gene em potencial para transgenia em estudos de déficit hídrico.

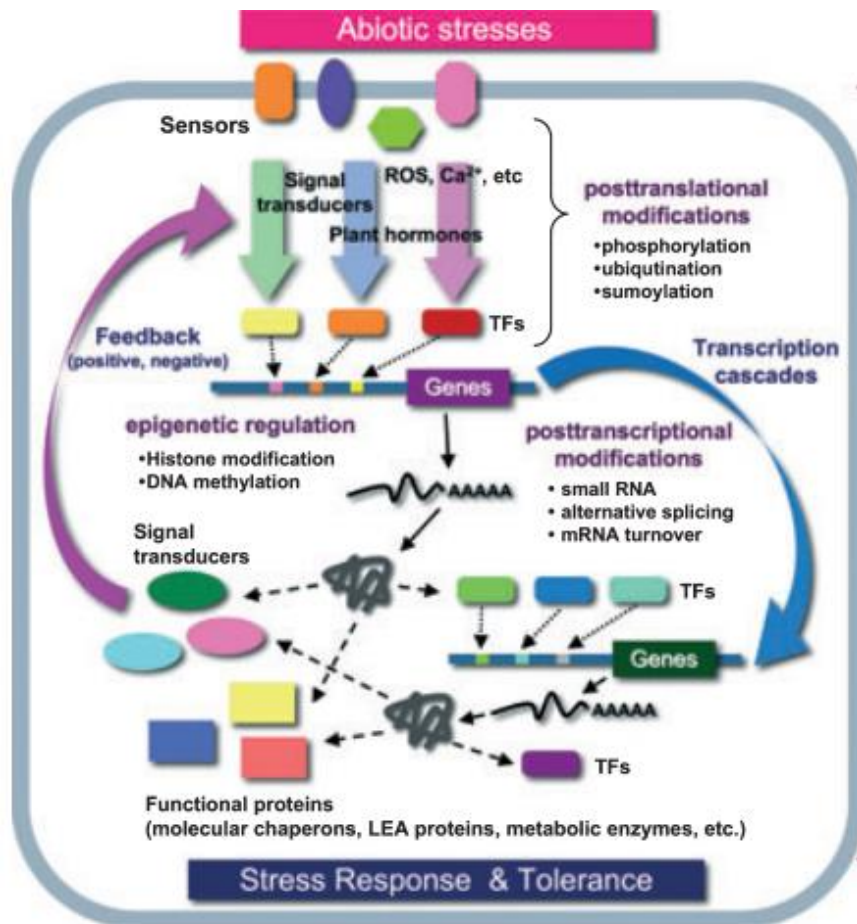
2.3 Estresse abiótico em plantas

As respostas ao estresse abiótico são importantes para organismos sésseis como as plantas, porque esse tipo de organismo não consegue sobreviver a menos que sejam capazes de se adaptar às mudanças ocorridas no meio ambiente. O termo estresse abiótico é definido como os efeitos ocorridos quando as condições ambientais adversas limitam o crescimento e produtividade das plantas (BOYER, 1982), dentre eles há uma amplitude de estresses que podem ocorrer devido aos inúmeros fatores que compõem as condições ambientais às quais as plantas estão submetidas, como alta luminosidade, alta intensidade de UV, baixas temperaturas, déficit hídrico, salinidade e exposição a metais pesados (SUZUKI et al., 2014).

A maior parte das informações fisiológicas de resposta ao estresse foram observadas em plantas modelo submetidas a condições controladas, entretanto essa abordagem frequentemente não se correlaciona diretamente com as condições de campo. Entretanto, o conhecimento exportado de plantas modelo torna-se a base para aplicação de transgenia de genes isolados e caracterizados que possuam papel importante na geração de cultivares responsivas a estresses abióticos.

Os efeitos oriundos do estresse em crescimento e expressão gênica de plantas é dose dependente, evidenciando a alta precisão que permite detectar o nível de estresse em que as plantas estão submetidas e as respostas específicas que serão geradas (CLAEYS et al., 2014). Uma resposta comum a diferentes estresses abióticos em que as plantas são submetidas é a redução da fotossíntese que está associada aos inúmeros danos ocorridos no metabolismo e crescimento. Em condições de estresse, diversos metabólitos são produzidos para gerar resposta ao estresse como osmoprotetores e outros que são respostas específicas como as fitoquelatinas (FIGURA 2). Além disso, a integração de estímulos ambientais e respostas fisiológicas é mediada por uma rede interconectada de hormônios vegetais como o ácido abscísico, jasmonato, ácido salicílico ou etileno que modulam as respostas aos estresses (PELEG; BLUMWALD, 2011).

Figura 2 - Modelo geral de resposta ao estresse abiótico.



Legenda: As células recebem sinais de estresse por meio de sensores, e os sinais são transmitidos para vias de sinalização, onde mensageiros secundários (hormônios vegetais), transdutores de sinal e reguladores transcricionais funcionam. Os genes induzidos por estresse são regulados por múltiplos sinais de estresse e alguns deles são regulados por fatores de transcrição (TFs) que são induzidos por estímulos de estresse, e cascata de transcrição. Alguns genes induzíveis pelo estresse codificam proteínas que estão diretamente envolvidas na tolerância ao estresse. Outros genes induzidos pelo estresse codificam proteínas reguladoras, como transdutores de sinal, que presumivelmente formam *feedback* positivos e negativos para regular as respostas ao estresse.

Fonte: Hirayama e Shinozaki (2010).

Estresse abiótico (seca, salinidade, temperaturas extremas, luz UV ou O₃), reduz a condutância estomática reduzindo a difusão de CO₂ pela câmara subestomática que limita a assimilação de carbono necessária para a manutenção do crescimento e desenvolvimento das plantas (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014). As plantas possuem diversos mecanismos para manter o sistema fotossintético funcional, e a medida fotossintética é comumente utilizada como um indicador de tolerância ao estresse abiótico em genótipos.

2.4 Déficit hídrico

Seca é considerada a mais devastadora dos estresses abióticos, e causa redução drástica na produtividade de grandes culturas (HARRISON et al., 2014). Prolongados períodos com baixa precipitação aliado a uma maior demanda de evapotranspiração levam ao déficit hídrico no campo (MISHRA; CHERKAUER, 2010). O déficit hídrico conseqüentemente gera falta de umidade suficiente para proporcionar um crescimento e desenvolvimento do ciclo de vida completo (MANIVANNAN et al., 2008).

A seca severa afeta principalmente o crescimento e desenvolvimento das plantas de maneira que ocorra uma redução substancial no acúmulo de biomassa e na taxa de crescimento da cultura. As principais conseqüências da seca nas plantas é a redução na taxa de divisão e expansão celular, tamanho da folha, crescimento radicular, conteúdo relativo de água e de nutrientes que diminuem a produtividade e a eficiência de uso de água (WUE) (FAROOQ et al., 2009; LI et al., 2009). Modelos climáticos preveem um aumento na intensidade e a frequência do déficit hídrico no cenário de mudanças climáticas globais (SOLOMON, 2007; WALTER et al., 2011).

O déficit hídrico estimula a biossíntese de ácido abscísico (ABA), que ocasiona uma redução da condutância estomática para minimizar as perdas com transpiração (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). A resposta da planta a um único estresse é detectada por diferentes órgãos e tecidos, e o sinal é transmitido para todo o indivíduo alterando o balanço hormonal, esse fator torna o déficit hídrico um estresse complexo que acarreta em conseqüências devastadoras para as plantas (FIGURA 3).

Setaria é sabidamente uma espécie tolerante a estresse abiótico, particularmente a seca. A eficiência de uso de água é descrito como superior ao do milho, trigo e sorgo (DOUST; DIAO, 2017). No entanto, as fases em que ela é mais sensível à seca é no final da fase vegetativa e início da fase reprodutiva (~35-50 dias após a germinação).

2.5 Estresse salino

Após anos de estudos, sabe-se que além de regiões de solos áridos e semiáridos do planeta, o cultivo irrigado intensivo deu origem a problemas com salinidade. O estresse salino é um fator limitante na produtividade de uma cultura (MAURYA; GOTHANDAM, 2014; ZÖRB et al., 2013), que pode alterar o conteúdo de água na planta e a pressão osmótica (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

O estresse salino desencadeia o estresse oxidativo, favorecendo a produção ou aumentando a disponibilidade de ROS (espécies reativas de oxigênio), alterando a síntese proteica (GEISSLER; HUSSIN; KORYO, 2009), e a eficiência fotossintética (MITTAL; KUMARI; SHARMA, 2012). Além disso, a salinidade associa-se ao aumento de alguns hormônios como ABA e ocasiona a diminuição de outros como auxina, citocininas e giberelinas (NIMIR et al., 2015).

Estresse salino e de seca se intensificam à medida que o solo fica saturado pela salinidade, reduzindo o potencial hídrico. Nesse cenário ocorre uma restrição das plantas em obter água e nutrientes, em tal condição, as plantas respondem de duas maneiras. Primeiramente, altas concentrações de Na^+ nas raízes ocasionam estresse osmótico e, em segundo lugar, ocorre uma alteração no equilíbrio de nutrientes essenciais gerando estresse iônico. Em uma situação de desequilíbrio dos íons Na^+ e Cl^- no solo pode dar origem a razões iônicas tóxicas de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, Na^+ / K^+ , $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ e $\text{Cl}^- / \text{NO}_3^-$ que substituem nutrientes essenciais e gerar competição pela absorção de nutrientes nas plantas (MUNNS; JAMES; LAUCHLI, 2006). O Na^+ externo possui um impacto negativo no influxo intracelular de K^+ , no entanto íons K^+ são um dos elementos essenciais requeridos para o crescimento. Níveis limitantes de íons K^+ podem ocasionar um distúrbio no balanço osmótico, levando à perda de funcionalidade dos estômatos (KUMAR et al., 2017).

O estresse salino induz o fechamento estomático que causa impacto direto na atividade fotossintética e na diminuição da transpiração, reduzindo assim a absorção de íons salinos tóxicos (BRUMOS et al., 2009; LÓPEZ-CLIMENT et al., 2008).

2.6 Estresse de frio

Dentre os muitos estresses abióticos em que as plantas podem ser submetidas no meio ambiente o estresse por baixas temperaturas é um deles, esse estresse pode limitar o crescimento e a distribuição geográfica das plantas, impactando na reprodução de culturas que possuem importância econômica. Na adaptação aos ambientes adversos, as plantas ativam mecanismos complexos para evitarem ou tolerarem ao estresse por frio (FIGURA 3). A aclimação ao frio é um dos mecanismos mais bem entendidos que contribuem para o aumento da tolerância em plantas. Durante o período de aclimação, ocorre a modulação de múltiplos processos morfológicos e fisiológicos com o objetivo de estabilizar a nova condição de homeostase celular e metabólica, que envolve ainda mudanças na homeostase dos

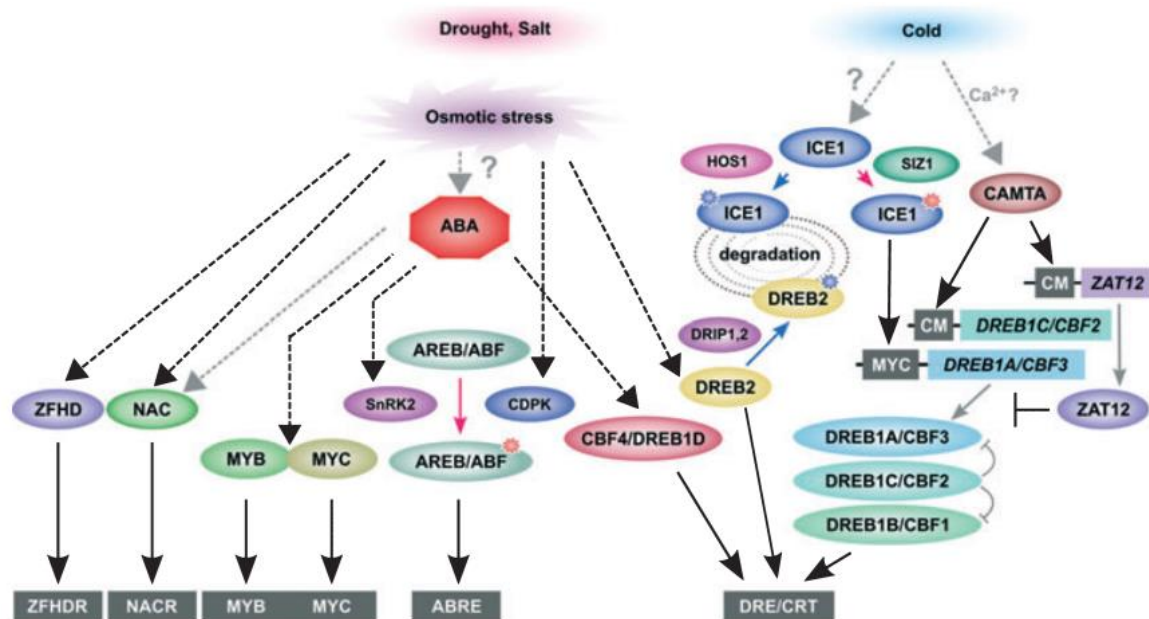
fitohormônios, permitindo a adaptação a condições adversas (HIRAYAMA; SHINOZAKI, 2010; THEOCHARIS; CLEMENT; BARKA, 2012; ZHU; DONG; ZHU, 2007).

Baixas temperaturas podem causar transtornos severos na homeostase do metabolismo e na fisiologia celular que podem levar à morte da planta. Estresse por frio pode ser dividido em estresse por resfriamento (<15°C e acima da temperatura de congelamento), e estresse por congelamento (abaixo da temperatura de congelamento). Estresse por resfriamento inibe a atividade de enzimas relacionadas à fotossíntese, respiração e processos bioquímicos como a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando danos oxidativos que podem resultar na acumulação de compostos tóxicos e na inibição de reações metabólicas (O'KANE; BOYD; BURDON, 1996; YANG et al., 2005). Enquanto o estresse por congelamento resulta na formação de cristais intracelulares que induzem a desidratação celular e o estresse osmótico, gerando danos na membrana celular e morte de tecidos (UEMURA; STEPONKUS, 1995; WEBB; STEPONKUS, 1993).

A maior parte das plantas de clima temperado são capazes de tolerar estresse por congelamento, quando previamente expostas a estresse por resfriamento. Este é o processo de aclimação ao frio (THOMASHOW, 1999). Durante o período de aclimação ao frio inicializa-se uma mudança global no transcriptoma, e as plantas tornam-se tolerantes às temperaturas de congelamento devido a acumulação de osmólitos em grande quantidade como os açúcares solúveis, proteínas anticongelamento, bem como alterando a composição da membrana, as duas últimas estratégias favorecem a proteção celular contra a desidratação (YAMADA et al., 2002).

O ABA é sabidamente o hormônio do estresse e possui um papel crucial no estresse por desidratação. No entanto, estudos inferem que o ABA desempenha função na aclimação ao frio por desencadear respostas celulares e osmóticas específicas.

Figura 3 - Esquema das vias reguladoras envolvidas nas respostas à seca, salinidade e estresse frio.



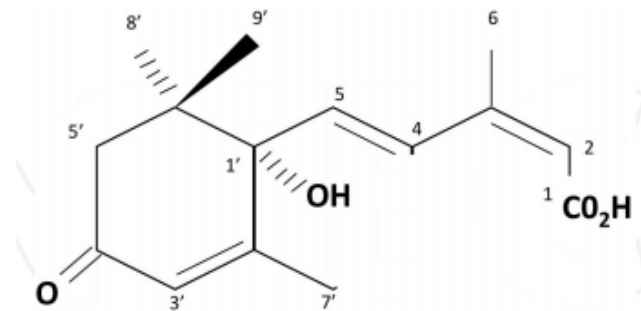
Legenda: Formas elípticas e caixas cinzas indicam proteínas funcionais e elementos *cis*, respectivamente. Linhas contínuas e linhas pontilhadas são *links* diretos ou indiretos, respectivamente. As linhas coloridas indicam modificações. As linhas pontilhadas cinzentas mostram conexões incertas. Fonte: Hirayama e Shinozaki (2010).

2.7 Estrutura, biossíntese e transporte do ácido abscísico (ABA)

O ácido abscísico, ou ABA, é composto por um anel de 6 carbonos. Sendo um sesquiterpeno (FIGURA 4) de quinze carbonos sintetizados, em parte, nos cloroplastos e em outros plastídios pela via do ácido mevalônico (NEWMAN; CHAPPELL, 1999). Esse fitohormônio foi descoberto em 1960 e inicialmente era denominado dormina ou absicisina, atualmente ABA é conhecido como um importante regulador de crescimento em plantas.

O ABA é um importante regulador de crescimento de plantas, e inclui desenvolvimento de sementes e embriões, desenvolvimento de mudas, crescimento vegetativo e reprodutivo, assim como manutenção da dormência de sementes (BARRERO et al., 2005; FUJII; ZHU, 2009). O principal papel desse hormônio é controlar o início e a manutenção da dormência de sementes e de gemas, e das respostas do vegetal ao estresse, principalmente o estresse hídrico. ABA também influencia outros aspectos do desenvolvimento de uma planta, por agir antagonicamente com outros hormônios vegetais (CUTLER et al., 2010; WASILEWSKA et al., 2008).

Figura 4 - Estrutura química do ácido abscísico (\pm) ABA.



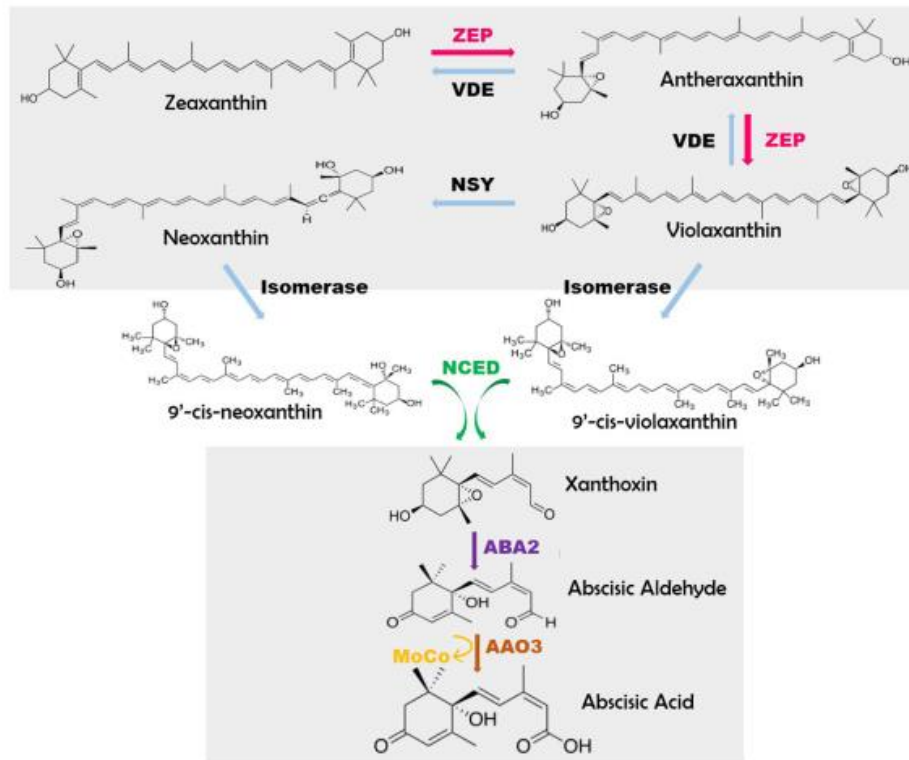
Fonte: Fernando e Schroeder (2016).

A estrutura molecular do ABA possui várias características importantes que facilitam sua função biológica. São elas, a cadeia lateral com as duas ligações duplas (FIGURA 4) e o estereocentro do ABA. A exposição à luz UV altera a conformação da forma ativa para a forma inativa (CUTLER et al., 2010).

O ácido abscísico pertence à classe de metabólitos conhecidos como isoprenoides, ou terpenoides. O isopentenilo (IDP) é um precursor de cinco carbonos (C5), molécula a partir da qual o ABA é derivado. Originalmente, acreditava-se que todos os isoprenoides eram sintetizados a partir do mevalonato (MVA) até que recentemente, uma via secundária foi identificada para a síntese de IDP, inicialmente em certas eubactérias e finalmente, em plantas superiores (NAMBARA; MARION-POLL, 2005). Várias enzimas que utilizam β -caroteno para sintetizar ABA estão envolvidas.

A via de conversão de β -caroteno em ABA é mediada por meio de enzimas catalizadoras (FIGURA 5). O estresse abiótico desencadeia a ativação de genes responsáveis pela biossíntese de ABA como zeaxantina epoxidase (ZEP), 9-cis-epoxycarotenoide dioxygenases (NCED), ABA aldeído oxidase (AAO) (TUTEJA, 2007).

Figura 5 - Via de biossíntese de ABA.



Fonte: Vishwakarma et al. (2017).

O transporte do ácido abscísico (ABA) dentro das plantas foi mostrado de várias maneiras, por exemplo, na utilização de ABA marcado com radioisótopo como marcador de plantas mutantes que possuíam deficiência de ABA e selvagens (EVERAT-BOURBOULOUX, 1982; FREY et al., 2004; HOLBROOK et al., 2002; IKEGAMI et al., 2009; ZEEVAART; BOYER, 1984). O ABA é sintetizado dentro das células. Assim, a primeira movimentação do ABA ocorre no transporte trans-membrana de dentro para o exterior das células responsáveis por sua síntese. O ABA foi detectado no xilema (HARTUNG; SAUTER; HOSE, 2002; TARDIEU; PARENT; SIMONNEAU, 2010), indicando que o ABA é exportado para o exterior das células após sua biossíntese. Uma vez exportado do local da biossíntese, o ácido abscísico pode ser transportado para células vizinhas ou atuar em células distantes induzindo respostas fisiológicas. Segundo o modelo proposto, os sítios de ligação do ABA podem ocorrer no interior ou na superfície da membrana plasmática (ALLAN et al., 1994; ANDERSON; WARD; SCHROEDER, 1994; SCHWARTZ; TUCKERS; ASSMANN, 1994; YAMAZAKI et al., 2003).

O papel do ABA no controle das respostas das plantas possivelmente desencadeie ações em vários níveis, incluindo alteração no perfil de transcritos, processamento de RNA,

modificações pós-transcricionais em proteínas, e metabolismo de receptores secundários. Aproximadamente 200 *loci* regulam a resposta ao ABA e milhares de genes são regulados por ABA em diferentes contextos (FINKELSTEIN, 2013).

2.7.1 Sistema tripartiteo: PYL-PP2C/SnRK

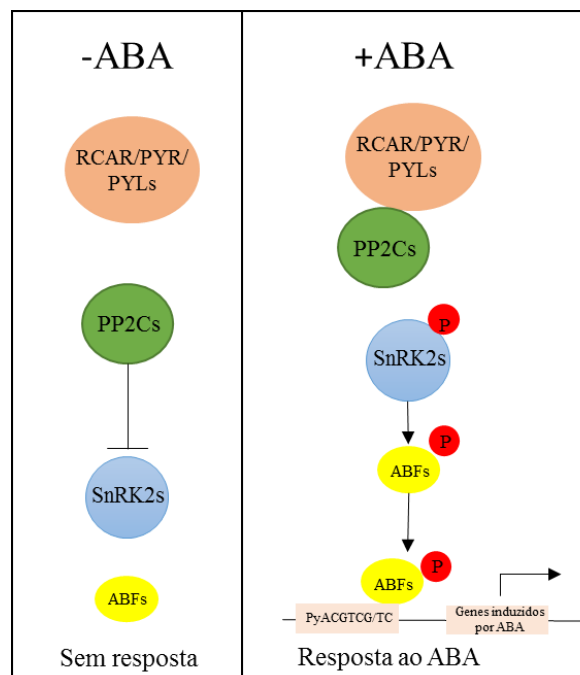
Designa-se por receptores, as proteínas que permitem a interação de determinadas substâncias com os mecanismos do metabolismo celular. A molécula que se liga a um receptor é chamada de um ligante, e pode ser um peptídeo ou outras moléculas pequenas, como hormônios (VENIS, 1985). Os receptores têm várias características como (i) alta afinidade com o ligante; (ii) ligação saturável e reversível; (iii) alta especificidade. Ao se ligar aos receptores da célula, a molécula ABA desencadeia para os mensageiros *downstream* da via e, ativando assim genes responsivos, que irão atuar na regulação da expressão de outros genes. Na via de sinalização do ABA, a percepção dos receptores de ABA é de suma importância (CUTLER et al., 2010).

Por meio da genética, diversas proteínas relacionadas à sinalização hormonal foram identificadas a partir do *screening* de mutantes de *Arabidopsis* com sensibilidade ao hormônio alterada. Muitos receptores de hormônios foram clonados utilizando esta metodologia (SANTNER; ESTELLE, 2009). No entanto, para o ABA não foi possível a obtenção de resultados positivos porque os receptores de ABA possuem redundância funcional ou efeitos pleiotrópicos, incluindo a letalidade de embriões ou gametas (SANTIAGO et al., 2012). Utilizando técnicas bioquímicas, proteínas que se ligam ao ABA (CHLH/ABAR/GUN5) foram as primeiras identificadas (SHEN et al., 2006), posteriormente proteínas acopladas G e receptores GCR2 (LIU et al., 2007), GTG1/GTG2 (PANDEY; NELSON; ASSMANN, 2009), também foram encontrados por evidência farmacológica.

Mediante a um agonista monitorado seletivo à ABA, pyrabactina (4-bromo-*N*-pyridin-2-yl methyl naphthalene-1-sulfonamide), foi possível identificar uma família de receptores solúvel em ABA nomeados de *PYRABACTIN RESISTANCE 1* (PYR1)-like (PYL) (PARK et al., 2009). Após descobertas recentes sob a transdução de sinal do ABA, indica-se que os primeiros eventos da via de sinalização ocorrem por meio de um módulo central de sinalização composto por três classes de proteínas: PYR/RCARs (regulatory components of ABA receptors), proteínas fosfatases do tipo 2Cs (PP2Cs), e Sucrose NonFermenting1-related proteína quinase 2 (SnRK2s). Nesse modelo, PYR/RCARs atuam como receptores de ABA, PP2Cs atuam como reguladores negativos da via e SnRK2s como reguladores positivos da

sinalização *downstream* (MA et al., 2009; PARK et al., 2009). Uma via de regulação negativa dupla é estabelecida, pelo complexo ABA-PYR/RCARs que inibem a atividade das fosfatases PP2C, e PP2Cs consequentemente inativam SnRK2s (PARK et al., 2009; UMEZAWA et al., 2010; VLAD et al., 2009). Assim, na ausência de ABA, as PP2Cs estão ativas e inibem a atividade de sinalização *downstream* das SnRK2. Na presença de ABA, PYR/RCARs interagem com PP2Cs e inibem a atividade das fosfatases, permitindo a ativação e fosforilação de proteínas SnRK2 com proteínas alvo (FIGURA 6).

Figura 6 - Componentes principais da via de transdução de sinal do ABA.



Fonte: Adaptado de Fernando e Schroeder (2016).

2.7.2 PYR/PYL/RCARs: Receptores de ABA

Os receptores de ABA, PYR/PYL/RCAR são proteínas membros de uma superfamília de proteínas solúveis de ligação-ligante, pertencentes à superfamília do domínio START (IYER; KOONIN; ARAVIND, 2001), nomeadas de Bet v I-fold superfamily (RADAUER; LACKNER; BREITENEDER, 2008). Nessa família gênica estão incluídos 13 genes homólogos similares ao PYR1, tais genes foram nomeados PYR-like 1 até PYR-like 13 (PYL1-PYL13) (PARK et al., 2009).

Mutantes de *pyr1* respondem normalmente ao ABA, sugerindo que a redundância funcional de outros membros da família pode mascarar a função do PYR1 na transdução do sinal do ABA. No entanto, o triplo e quadruplo mutante *pyr1 pyl1 pyl4* e *pyr1*

pyl1 pyl2 pyl4, respectivamente, demonstram insensibilidade ao ABA na germinação de sementes e crescimento de plântulas (PARK et al., 2009). O mutante quadruplo demonstra ainda insensibilidade ao ABA no fechamento estomático induzido por ABA (NISHIMURA et al., 2010) e nas respostas transcricionais mediadas por ABA (PARK et al., 2009). Estudos recentes mostram que um mutante sêxtuplo com seis receptores PYR/PYL nocauteados (PYR1, PYL1, PYL2, PYL4, PYL5 e PYL8), possui um fenótipo de alta insensibilidade ao ABA. A germinação e crescimento ocorrem mesmo em uma concentração de ABA de 100 μM , e suas folhas são excessivamente sensíveis à seca (GONZALEZ-GUZMAN et al., 2012). Plantas transgênicas superexpressando PYL1 ou PYL4 tornam o triplo mutante sensível ao ABA novamente, demonstrando a especificidade funcional da via de sinalização do ABA (PARK et al., 2009).

Em *Arabidopsis* a superexpressão dos genes PYL9/RCAR1, PYL5/RCAR8 e PYL8/RCAR3 produz um aumento na resposta ao ABA ou o aumento da tolerância à seca (MA et al., 2009; SAAVEDRA et al., 2010; SANTIAGO et al., 2009).

2.7.3 Fosfatases: PP2Cs

As proteínas fosfatases podem ser divididas em duas grandes subclasses: proteínas tirosina fosfatase (PTPs) e proteínas serina/treonina fosfatases. O genoma de *Arabidopsis* possui 76 proteínas fosfatases do tipo 2C, que são subdivididas em 10 grupos (A até J) (KERK et al., 2002; SCHWEIGHOFER; HIRT; MESKIENE, 2004). Utilizando alinhamento do sítio catalítico o clado A das PP2Cs é formado por dois subgrupos, o primeiro ABI1, ABI2, HAB1 e HAB2, e o segundo PP2CA/AHG3 e AHG1.

Estudos demonstram que as funções de ABI1 e ABI2 são redundantes como reguladores negativos da via de sinalização do ABA porque a perda das funções desses genes resulta em fenótipos de hipersensibilidade ao ABA assim como o fenótipo de um duplo mutante (GOSTI et al., 1999; MERLOT et al., 2001; SHEEN, 1998). ABI1 e ABI2 são responsáveis por aproximadamente 50% da indução da atividade das PP2Cs induzíveis por ABA, sugerindo que esses dois membros da família PP2C possuem uma função essencial na sinalização de PP2C mediada por ABA, porém outras PP2Cs também estão envolvidas na resposta da sinalização de ABA (MERLOT et al., 2001).

As fosfatases pertencentes à família de proteínas dependentes de metais ($\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (PPM) e PP2Cs do clado A que atuam como reguladores negativos na sinalização de ABA têm sido demonstradas após 2009 e, possivelmente, as funções das PP2Cs são altamente

conservadas em diferentes espécies (KOMATSU et al., 2009; SAEZ et al., 2004). Dois genes homólogos pertencentes ao clado B das PP2Cs também possuem atuação na sinalização de ABA (BEN-ARI, 2012).

2.7.4 Quinases: SnRK2

Proteínas de fosforilação reversível, catalisadas por proteínas quinases e fosfatases, representam a maior forma de modificação pós-tradicional reversível. Estudos bioquímicos e de genética molecular observam que as proteínas de fosforilação reversível estão envolvidas em quase todos os eventos principais do metabolismo celular (HUNTER, 1995).

Baseados em análises da origem evolutiva das quinases, SnRKs são pertencentes a superfamília CDPK-SnRK, que podem ser subdividas em três quinases SnRK1, SnRK2, e SnRK3 (HRABAK et al., 2003). As três subfamílias de SnRKs possuem alta identidade nas sequências dos domínios das quinases porém há divergências nos domínios C-terminal que são os prováveis reguladores das atividades desencadeadas por vias de sinalização de estresse e/ou variações no metabolismo (HALFORD; HEY, 2009; HRABAK et al., 2003).

Pelo menos, dez genes pertencentes a subfamília SnRK2 foram identificados no genoma de *A. thaliana*. Na superfamília de proteínas SnRK, as do tipo 2 possuem uma função importante na sinalização de ABA e podem ser divididas em três subclasses, que diferem entre si quanto a sua ativação em resposta ao ABA (BOUDSOCQ et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2005). As proteínas da subclasse classe I correspondem a genes não ativados por ABA, enquanto as proteínas da subclasse II são fracamente ativadas por ABA e proteínas da subclasse II são altamente ativadas por ABA.

A identificação do sistema tripartite da via de sinalização do ABA já foi identificado em algumas espécies de monocotiledoneas, no entanto em *S. viridis* ainda não foi reportado nenhuma identificação e caracterização deste sistema, o que se tornou o foco deste trabalho visto a importância de *S. viridis* como planta modelo para plantas de metabolismo C4.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, A. C. et al. Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in commelina guard cells. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1319-1328, Sept. 1994.
- ANDERSON, B. E.; WARD, J. M.; SCHROEDER, J. Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in commelina guard cells. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 104, p. 1177-1183, Dec. 1994.
- BALTES, N. K.; GIL-HUMANES, J.; VOYTAS, D. F. Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, New York, v. 149, p. 1-26, May 2017.
- BARRERO, J. M. et al. A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2071-2083, Aug. 2005.
- BEN-ARI, G. The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 8, p. 1357-1369, Aug. 2012.
- BENNETZEN, J. L. et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 555-561, Mar. 2012.
- BEVAN, M. W. et al. Genomic innovation for crop improvement. **Nature**, London, v. 543, p. 346-354, Mar. 2017.
- BOUDSOCQ, M. et al. Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, n. 4, p. 491-503, Mar. 2007.
- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, New York, v. 218, n. 4571, p. 443-448, Oct. 1982.
- BRUMOS, J. et al. Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive *Citrus* rootstocks. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 9, n. 3, p. 293-309, Aug. 2009.
- BRUTNELL, T. P.; BENNETZEN, J. L.; VOGEL, J. P. *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: model genetic systems for the grasses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, p. 465-485, Aug. 2015.
- BRUTNELL, T. P. et al. *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, Aug. 2010.
- CABELLO, J. V.; LODEYRO, A. F.; ZURBRIGGEN, M. D. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 26, p. 62-70, Apr. 2014.

- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 4, p. 551-560, Feb. 2009.
- CLAEYS, H. et al. What is stress?: dose-response effects in commonly used *in Vitro* stress assays. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 165, n. 2, p. 519-527, June 2014.
- COELHO, C.; HUANG, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* as a model for C₄ photosynthesis. In: _____. **Genomics and genetics: crops and models**. New York: Springer, 2017. v. 1, p. 291-300.
- CUTLER, S. R. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 651-679, Feb. 2010.
- DATTA, A. GM crops: dream to bring science to society. **Agricultural Research**, Washington, v. 1, p. 95-99, June 2012.
- DOUST, A.; DIAO, X. **Genetics and genomics of setaria**. New York: Springer, 2017. (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, 19).
- DOUST, A. N. et al. Foxtail millet: a sequence-driven grass model system. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 149, n. 1, p. 137-141, Mar. 2009.
- DUJON, B. The yeast genome project: what did we learn? **Trends in Genetics**, London, v. 12, p. 263-270, July 1996.
- ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G. A. et al. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, Berlin, v. 206, p. 20-27, Nov. 1998.
- EVERAT-BOURBOULOUX, A. Transport and metabolism of labelled abscisic acid in broad-bean plants (*Vicia faba* L.). **Physiology Plant**, Minneapolis, v. 54, p. 431-439, Apr. 1982.
- FAROOQ, M. et al. Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 195, n. 4, p. 237-246, Aug. 2009.
- FERNANDO, V. D.; SCHROEDER, D. F. Role of ABA in *Arabidopsis* salt, drought, and desiccation tolerance. In: _____. **Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives**. London: InTech, 2016. chap. 22.
- FINKELSTEIN, R. Abscisic acid synthesis and response. **The Arabidopsis Book**, Bethesda, v. 11, p. 1-36, Nov. 2013.
- FREY, A. et al. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 6, p. 958-964, Apr. 2004.

FUJII, H.; ZHU, J. K. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 20, p. 8380-8385, May 2009.

GEISSLER, N.; HUSSIN, S.; KORYO, H. W. Interactive effects of NaCl salinity and elevated atmospheric CO₂ concentration on growth, photosynthesis, water relations and chemical composition of the potential cash crop halophyte *Aster tripolium* L. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 65, p. 220-231, Mar. 2009.

GONZALEZ-GUZMAN, M. et al. *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 6, p. 2483-2496, June 2012.

GOSTI, F. et al. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 10, p. 1897-1909, Oct. 1999.

HALFORD, N. G.; HEY, S. J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. **Biochemical Journal**, London, v. 419, n. 2, p. 247-259, Apr. 2009.

HARRISON, M. T. et al. Characterizing drought stress and trait influence on maize yield under current and future conditions. **Global Change Biology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 867-878, Mar. 2014.

HARTUNG, W.; SAUTER, A.; HOSE, E. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 366, p. 27-32, Jan. 2002.

HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1041-52, Mar. 2010.

HOLBROOK, N. M. et al. Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 373, p. 1503-1514, June 2002.

HRABAK, E. M. et al. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 132, n. 2, p. 666-680, June 2003.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, Cambridge, v. 80, p. 225-236, Jan. 1995.

IKEGAMI, K. et al. Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 122, n. 2, p. 235-43, Mar. 2009.

ISHIDA, Y. et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, June 1996.

- IYER, L. M.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, New York, v. 43, n. 2, p. 134-144, May 2001.
- KELLOG, E. A. Evolution of *Setaria*. In: _____. **Genomics and genetics: crops and models**. New York: Springer, 2017. v. 1, p. 3-28.
- KERK, D. et al. The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, n. 2, p. 908-925, June 2002.
- KHALTURIN, K. et al. More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? **Trends in Genetics**, London, v. 25, n. 9, p. 404-413, Sept. 2009.
- KOBAYASHI, Y. et al. Abscisic acid-activated SnRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 939-949, Dec. 2005.
- KOMATSU, K. et al. Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella* patens. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 327-340, June 2009.
- KUMAR, J. et al. Transcriptional regulation of salinity stress in plants: a short review. **Plant Gene**, New York, v. 11, p. 160-169, Apr. 2017.
- LI, Y. et al. Climate change and drought: a risk assessment of crop-yield impacts. **Climate Research**, Oldendorf, v. 39, p. 31-46, May 2009.
- LIU, X. et al. G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. **Science**, New York, v. 315, p. 5, Mar. 2007.
- LOBELL, D. B.; FIELD, C. B. Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 2, n. 1, p. 1-7, Mar. 2007.
- LÓPEZ-CLIMENT, M. F. et al. Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in *citrus*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 62, n. 2, p. 176-184, Aug. 2008.
- MA, Y. et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science**, New York, v. 324, n. 5930, p. 1064-1068, May 2009.
- MANIVANNAN, P. et al. Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n. 6, p. 418-425, June 2008.
- MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, June 2012.

MAURYA, V. K.; GOTHANDAM, K. Factors influencing the salt stress tolerance in plants: an overview. **Research Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 9, n. 7, p. 79-88, Feb. 2014.

MERLOT, S. et al. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 295-303, Feb. 2001.

MITTAL, S.; KUMARI, N.; SHARMA, V. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, n. 54, p. 17-26, May 2012.

MISHRA, V.; CHERKAUER, K. A. Retrospective droughts in the crop growing season: implications to corn and soybean yield in the Midwestern United States. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 150, n. 7/8, p. 1030-1045, Apr. 2010.

MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LAUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 1025-1043, Mar. 2006.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, New York, n. 8, p. 199-216, Sept. 2010.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 165-185, June 2005.

NEWMAN, J. D.; CHAPPELL, J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, n. 34, p. 95-106, Sept. 1999.

NIMIR, E. A. N. et al. Comparative effects of gibberellic acid, kinetin and salicylic acid on emergence, seedling growth and the antioxidant defence system of sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) under salinity and temperature stresses. **Crop and Pasture Science**, Collingwood, n. 66, p. 145-157, Mar. 2015.

NISHIMURA, N. et al. PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 290-299, Jan. 2010.

O'KANE, D. G. V.; BOYD, P.; BURDON, R. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. **Planta**, Berlin, v. 198, p. 371-377, Aug. 1996.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Apesar de baixa fertilidade, mundo terá 9,8 bilhões de pessoas em 2050**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/apesar-de-baixa-fertilidade-mundo-tera-98-bilhoes-de-pessoas-em-2050/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

PANDEY, S.; NELSON, D. C.; ASSMANN, S. M. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 1, p. 136-48, Jan. 2009.

PARK, S. Y. et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science**, New York, v. 324, n. 5930, p. 1068-1071, May 2009.

PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 290-295, June 2011.

POLTRONIERI, P. et al. Nitric oxide: detection methods and possible roles during jasmonate regulated stress response. In: KHAN, M. N.; MOHAMMAD, M. M. F.; CORPAS, F. J. (Ed.). **Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology**. New York: Plant Sciences, 2014. p. 127-138.

RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, n. 1, p. 286, Oct. 2008.

RANZ, J. M.; PARSCH, J. Newly evolved genes: moving from comparative genomics to functional studies in model systems: how important is genetic novelty for species adaptation and diversification? **Bioessays**, Cambridge, v. 34, n. 6, p. 477-483, June 2012.

REDDY, P. P. Impacts of climate change on agriculture. In: _____. **Climate resilient agriculture for ensuring food security**. New York: Springer, 2015. p. 43-90.

ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 26, p. 115-124, Apr. 2014.

SAAVEDRA, X. et al. The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 152, n. 1, p. 133-150, Jan. 2010.

SAEZ, A. et al. Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 354-369, Feb. 2004.

SANTIAGO, J. et al. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. **Nature**, London, v. 462, n. 7273, p. 665-668, Dec. 2009.

SANTIAGO, J. et al. Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs. **Plant Science**, Shannon, v. 182, p. 3-11, Jan. 2012.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, London, v. 459, n. 7250, p. 1071-1078, June 2009.

SAVVIDES, A. et al. Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible? **Trends in Plant Science**, Oxford, n. 21, p. 329-340, Apr. 2016.

SCHWARTZ, A. W. W.; TUCKERS, E. B.; ASSMANN, S. M. Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 91, p. 5, Apr. 1994.

SCHWEIGHOFER, A.; HIRT, H.; MESKIENE, I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 236-243, May 2004.

SHEEN, J. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 3, p. 975-980, Feb. 1998.

SHEN, Y. Y. et al. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. **Nature**, London, v. 443, n. 7113, p. 823-826, Oct. 2006.

SOLOMON, S. **Climate change 2007: the physical science basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

SOOD, P.; PRASSAD, M. Genetic transformation of *Setaria*: a new perspective. In: _____. **The foxtail millet genome, compendium of plant genomes**. New York: Springer, 2017. p. 105-121.

SUZUKI, N. et al. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, Cambridge, v. 203, n. 1, p. 32-43, July 2014.

TARDIEU, F.; PARENT, B.; SIMONNEAU, T. Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 636-647, Apr. 2010.

TAUTZ, D.; DOMAZET-LOSO, T. The evolutionary origin of orphan genes. **Nature Review in Genetics**, London, v. 12, n. 10, p. 692-702, Aug. 2011.

THEOCHARIS, A.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. **Planta**, Berlin, v. 235, n. 6, p. 1091-1095, June 2012.

THOMASHOW, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 30, June 1999.

TUTEJA, N. Abscisic acid and abiotic stress signaling. **Plant Signaling and Behavior**, Bonn, v. 2, n. 3, p. 135-138, May/June 2007.

UEMURA, M. J. R. A.; STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 109, p. 15-30, Sept. 1995.

UMEZAWA, T. et al. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 11, p. 1821-1839, Nov. 2010.

VENIS, M. **Hormone binding sites in plants**. London: Longman, 1985.

VIEIRA, N. G. et al. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 6, n. 4, p. 181-190, Dec. 2013.

- VISHWAKARMA, K. et al. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. **Frontiers in Plant Science**, Minglin Lang, v. 8, p. 1-12, Feb. 2017.
- VLAD, F. et al. Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 10, p. 3170-3184, Oct. 2009.
- WALTER, J. et al. Do plants remember drought?: hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 34-40, Apr. 2011.
- WASILEWSKA, A. et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more. **Molecular Plant**, Saint Paul, v. 1, n. 2, p. 198-217, Mar. 2008.
- WEBB, M. S.; STEPONKUS, P. L. Freeze-induced membrane ultrastructural alterations in rye (*Secale cereale*) leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 101, n. 3, p. 955-963, Mar. 1993.
- XIONG, L.; ZHU, J. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. **Physiology Plant**, Minneapolis, v. 112, p. 152-166, June 2001.
- YAMADA, T. et al. Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. **Planta**, Berlin, v. 215, n. 5, p. 770-778, Sept. 2002.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 781-803, June 2006.
- YAMAZAKI, D. et al. Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 129-139, July 2003.
- YANG, M. T. et al. Chilling stress suppresses chloroplast development and nuclear gene expression in leaves of mung bean seedlings. **Planta**, Berlin, v. 221, n. 3, p. 374-385, June 2005.
- ZEEVAART, J. A.; BOYER, G. L. Accumulation and transport of abscisic acid and its metabolites in *Ricinus* and *Xanthium*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 74, p. 934-939, Apr. 1984.
- ZHAO, Z. et al. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, p. 789-798, Aug. 2000.
- ZHOU, C.; ELSHKAKI, A.; GRAEDEL, T. E. Global human appropriation of net primary production and associated resource decoupling: 2010-2050. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 52, p. 1208-1215, Feb. 2018.
- ZHU, J.; DONG, C. H.; ZHU, J. K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 290-295, June 2007.

ZÖRB, C. et al. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 2, p. 220-224, Jan. 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 - ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE ÓRFÃO *CCUNK8* DE *Coffea canephora* VIA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Setaria viridis***

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações para artigos ainda não submetidos.

RESUMO

No cafeeiro, mas também em outras espécies de plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*) e de microrganismos, as análises dos projetos de sequenciamento demonstram uma alta porcentagem (cerca de 20-30%) de genes considerados *no hits*, ou seja, genes para os quais nenhuma similaridade com as sequências depositadas nos bancos de dados é encontrada. Em *Coffea canephora* e *Coffea arabica* foram identificados e caracterizados alguns genes *no hits*. Infere-se que *no hits* possam ter se originado de processos de especiação, portanto poderiam estar interligados a vias de resposta únicas de organismos tolerantes ou susceptíveis a uma dada condição. Dados de expressão gênica relativa mostraram que o *no hit* *CcUNK8* apresentou maior expressão em folhas estressadas quando comparado a folhas controle de *C. canephora* sendo um gene candidato de tolerância à seca e foi então selecionado para transformação genética utilizando *Setaria viridis* como planta modelo. O T-DNA contendo o gene *CcUNK8* foi inserido em plantas de *Setaria viridis* por transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* e a expressão deste gene foi quantificada por meio de PCR em tempo real nos 27 eventos primários de transformação, os eventos apresentam níveis de expressão gênica variados entre si na geração T₀, subdividindo entre baixa, média e alta. Em alguns eventos foi observado um acúmulo de biomassa radicular se comparados a indivíduos não transformados.

Palavras-chave: *Coffea*. Expressão gênica. Genes órfãos. Seca. *Setaria viridis*. Transformação genética.

ABSTRACT

In the coffee tree, but also in other species like (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*) and microorganisms, the analyzes of the sequencing projects show a high percentage (about 20-30%) of genes considered *no hits*, that is, genes for which no similarity with the sequences deposited in the databases is found. *Coffea canephora* and *Coffea arabica* were identified and characterized some genes *no hits*. It is inferred that *no hits* may have originated from speciation processes, so they could be interconnected to single response pathways of organisms tolerant or susceptible to a given condition. Relative gene expression data showed that the *no hit* *CcUNK8* showed higher expression in stressed leaves when compared to control leaves of *C. canephora* being a candidate drought tolerance gene and was then selected for genetic transformation using *Setaria viridis* as a model plant. The T-DNA containing the *CcUNK8* gene was inserted into plants of *Setaria viridis* by genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of this gene was quantified by means of real-time PCR in the 27 primary transformation events, the events have varied levels of gene expression among them in the T₀ generation, subdividing between low, medium and high. In some events an accumulation of root biomass was observed when compared to untransformed individuals.

Keywords: *Coffea*. Gene expression. Orphan genes. Drought. *Setaria viridis*. Genetic transformation.

1 INTRODUÇÃO

A capacidade das plantas a se adaptarem aos diferentes estresses é diretamente ou indiretamente relacionada à habilidade de modificar o nível de fotossíntese, que altera processos bioquímicos e fisiológicos, e conseqüentemente o crescimento e desenvolvimento de toda a planta. Para minimizar os efeitos adversos causados pelo estresse e para completar o ciclo de vida, as plantas possuem diferentes respostas adaptativas (VERSLUES et al., 2006). A resposta das plantas ao déficit hídrico é altamente complexa, ocorrendo a ativação de respostas múltiplas envolvendo complexas interações gênicas e *crosstalk* com diversas vias moleculares.

As plantas apresentam mecanismos que as fazem resistir à seca os quais estão divididos em escape, retardo e tolerância. No escape, as plantas apresentam um rápido desenvolvimento fenológico completando seu ciclo de vida antes que o déficit se torne severo o suficiente para provocar danos. O retardo está relacionado à manutenção do turgor e volume celular, tanto pela presença de um sistema radicular abundante para absorção de água quanto pela redução da perda por transpiração. Por fim, tem-se a tolerância à seca que é um mecanismo da planta que permite manter seu metabolismo, mesmo com o déficit hídrico presente (VERSLUES et al., 2006).

As plantas podem também adaptar-se à seca a partir de mecanismos como ajustamento osmótico, ajustamento da parede celular, produção de folhas menores, redução da área foliar e aumento da densidade e profundidade das raízes. A redução da área foliar e o fechamento dos estômatos são mecanismos que limitam muito a produtividade, pois afetam a absorção de CO₂ e a interceptação de luz pela planta (ROSENTHAL et al., 1987). O estresse hídrico como dito faz com que o sistema radicular se torne mais denso e profundo o que possibilita a maior exploração do perfil do solo em busca de água, o que vai depender das características morfológicas e genotípicas de cada planta. Há evidências de que a raiz atua como sensor primário do déficit hídrico no solo, enviando assim um estímulo a parte aérea (BLACKMAN; DAVIES, 1985).

No intuito de entender os processos que levam algumas plantas a terem uma maior tolerância à seca, ocorreram avanços na descoberta e descrição de genes envolvidos nesse processo. Genes órfãos foram detectados em diversas espécies, como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (GUO et al., 2007; HORAN et al., 2008). Algumas dessas sequências não possuem nenhuma similaridade com sequências depositadas nos bancos de dados públicos, e são denominadas “*no hits*” ou genes órfãos (TAUTZ; DOMAZET-LOSO, 2011). O

aparecimento desses genes pode estar relacionado a respostas adaptativas específicas para cada espécie de condições adversas durante o processo evolutivo.

O gene *CcUNK8* (*UNKnown*) foi previamente identificado no genoma de *Coffea canephora* potencialmente envolvido no processo de tolerância à seca. As análises de expressão de genes utilizando *Coffea canephora* Conilon identificaram genes candidatos para tolerância à seca. Os estudos foram realizados em folhas dos clones 14, 73 e 120 (tolerantes à seca) e do clone 22 (sensível à seca) cultivados em diferentes regimes hídricos (irrigado vs. não-irrigado) (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Para todos os clones analisados, a expressão do gene *CcUNK8* sempre foi maior na condição de déficit hídrico que nas plantas irrigadas, particularmente nos clones tolerantes (14 e 73) que no clone sensível 22. Este *no hit* pode ser um gene que desempenha papel crucial em determinados processos biológicos do cafeeiro.

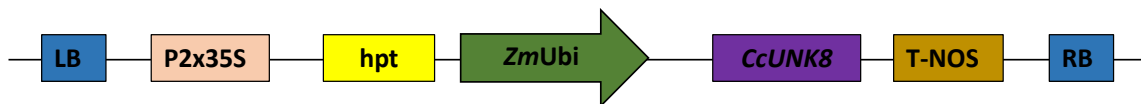
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura de tecidos e transformação genética de *Setaria viridis*

A construção contendo o gene *CcUNK8* encontra-se sob o controle do promotor constitutivo da ubiquitina de milho (*ZmUbi*) e integra também o gene *hpt* como agente seletivo, que confere resistência à higromicina. A construção foi sintetizada pela empresa DNA Cloning Service (FIGURA 1) e introduzida em *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 para a transformação genética de *Setaria viridis*.

Sementes maduras de *Setaria viridis* foram selecionadas para indução de calos embriogênicos em meio de indução de calos [CIM; consiste em sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 1 mg/L d-biotina, 0,5 mg/L piridoxina HCl, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 100 mg/L mio-inositol, 0,1 mg/L tiamina-HCl, 0,6 mg/L CuSO₄, 30 g/L sacarose, 2 mg/L 2,4-ácido diclorofenoxiacético, 0,5 mg/L kinetina e 4 g/L PhytigelTM, pH 5,8]. Calos embriogênicos foram utilizados para transformação genética mediada por *Agrobacterium*, de acordo com o protocolo de Martins et al. (2015). Os possíveis calos transgênicos resistentes a 30 mg/L higromicina foram transferidos para meio seletivo de regeneração [MRS; consiste em sais MS, 1 mg/L d-biotina, 0,5 mg/L piridoxina HCl, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 100 mg/L mio-inositol, 0,1 mg/L tiamina-HCl, 20 g/L sacarose, 2 mg/L kinetina, 150 mg/L Timentin[®], 30 mg/L higromicina B, 2 g/L PhytigelTM, pH 5,8]. As plantas regeneradas foram submetidas a análise molecular por meio de PCR para confirmação da presença do transgene.

Figura 1 - Representação esquemática do T-DNA clonado no vetor binário *p*bi** (DNA Cloning Service, Alemanha).



Legenda: O T-DNA é delimitado pelas bordas direita (RB) e esquerda (LB), contendo os promotores p2x35S (promotor duplicado do mosaico da couve-flor (Camv)) e *ZmUbi*-1 (promotor da ubiquitina de milho) que controlam a expressão do gene *hpt* e do cDNA *CcUNK8*, respectivamente.

Fonte: Da autora (2017).

2.2 Análise molecular

As plantas regeneradas que se mostraram resistentes à higromicina foram utilizadas para extração de DNA, utilizando o método CTAB modificado (DOYLE, 1987). A inserção do gene foi confirmada por meio de PCR utilizando os primers descritos na Tabela 1.

2.3 Análises da expressão por PCR quantitativo em tempo real

O RNA total de folhas foi isolado utilizando Trizol[®] (Thermo Fischer Sci.). O RNA total foi tratado com RQ1 RNase-free DNase (Promega), para eliminação de resíduos de DNA e posterior síntese reversa da primeira fita do DNA complementar (cDNA) com o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Sci.). Todos os processos acima listados foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

As análises de RT-qPCR foram realizadas utilizando Platinum[®] SYBR[®] Green, e as alíquotas de cDNA acima obtidas utilizadas como *template* da reação. O protocolo utilizado foi o recomendado por Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os pares de primers utilizados na reação estão descritos abaixo.

Tabela 1 - Pares de primers utilizados para RT-qPCR.

Primer	Sequência	
<i>SiCUL</i>	TTCATCACGAGGGACTACTT	Forward
	CTTGCCAACAACCACCAATC	Reverse
<i>SiSUI</i>	CCAGAGCTTGGACAGGTCATTTC	Forward
	ACAATGCCAGCCTGGACAA	Reverse
<i>CcUNK8</i>	GGCTGAAGCCAAATCTGCTA	Forward
	TCACATTTCCACGTGAATCC	Reverse

Fonte: Da autora (2017).

Os níveis de expressão relativa foram calculados utilizando q-Gene (MULLER, 2002). Os pares de primers *SiCUL* e *SiSUI* foram usados como genes de referência (MARTINS et al., 2016) e as médias geométricas das quantidades relativas (RQs) foram calculadas utilizando o *software* BestKeeper (PFAFFL et al., 2004). A eficiência individual de amplificação foi estabelecida por meio do LinRegPCR v.2013.0 na janela de linearidade (RAMAKERS et al., 2003).

2.4 Déficit hídrico

Plantas de diferentes eventos transgênicos contendo a construção UBI:*CcUNK8* foram germinados em meio MS seletivo e a linhagem não transgênica em meio MS. Após sete dias de germinação, houve o transplante dos indivíduos para potes com a capacidade de 0,2 L

contendo uma mistura de solo, vermiculita e substrato na proporção 3:1:0.5, respectivamente. O desenvolvimento das plantas ocorreu sem restrição no regime hídrico até a quarta fase de desenvolvimento (MARTINS et al., 2016). Na quarta fase de desenvolvimento, as plantas foram divididas em três grupos contendo seis indivíduos por evento que permaneceram em regimes hídricos diferenciados: controle de irrigação, estresse moderado e estresse severo. Para o estabelecimento dos regimes hídricos o primeiro grupo, controle de irrigação teve os vasos saturados de água e pesados. O peso inicial apresentado foi mantido durante todo o experimento. Nos demais regimes hídricos, os vasos foram saturados e pesados. A irrigação foi suspensa até o estabelecimento do nível de estresse desejado, para o seu estabelecimento, a perda de água no solo foi monitorada via diferença de peso e aspectos morfológicos. Após o estabelecimento dos níveis de estresse moderado e severo, procedeu-se com a pesagem dos vasos e a manutenção de água durante o experimento foi baseada no peso apresentado. Análises fisiológicas periódicas foram realizadas. As trocas gasosas foram medidas na folha bandeira (+1) utilizando o equipamento LI-6400XT, LICOR com a densidade do fluxo fotossintético fixado em $1.500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 400 ppm CO_2 , foi ainda utilizada uma luz de LED vermelho-azul como fonte interna de luz da câmara de medição. Ao final do experimento foram realizadas análises de biometria.

Tabela 2 - Eventos de *S. viridis* transformados com o gene *CcUNK8* utilizados no experimento de déficit hídrico e suas respectivas gerações. A análise de geração foi realizada por meio de teste de χ^2 .

Evento	Geração
6, 44, 52,36, 62	T1 Heterozigose
31, 32	T2 Homozigose

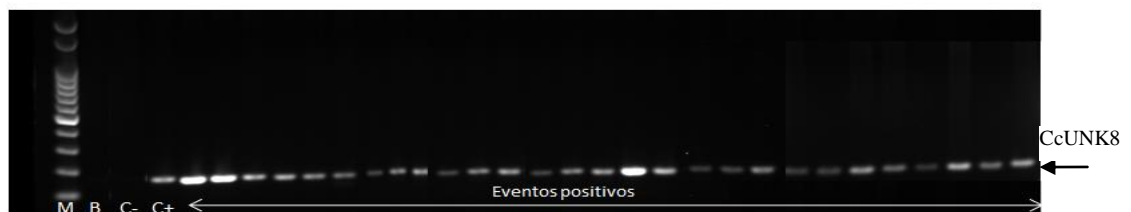
Fonte: Da autora (2017).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Transformação genética

Utilizando o vetor de transformação *ZmUbi:CcUNK8* calos embriogênicos de *S. viridis* foram transformados e regenerados em meio seletivo contendo 30 mg/L de higromicina B. Foram obtidas 27 possíveis plantas transgênicas oriundas de calos independentes. Após a extração do DNA, foi realizada a confirmação da integração do transgene no genoma das plantas regeneradas em meio seletivo, com o auxílio da técnica de PCR. Foi testada a integração do gene alvo *CcUNK8*, possibilitando a confirmação da sua inserção, por meio da presença do amplicon esperado de 171 pb. Todos os 27 possíveis eventos foram confirmados como mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Análise do produto de PCR de plantas *ZmUbi:CcUNK8*. **M**: Marcador 100 pb (InvitrogenTM); **B**: Branco; **C-**: planta não transgênica; **C+**: controle positivo (DNA plasmidial contendo a construção gênica *ZmUbi:CcUNK8*); em sequência os 27 eventos T₀ positivos.

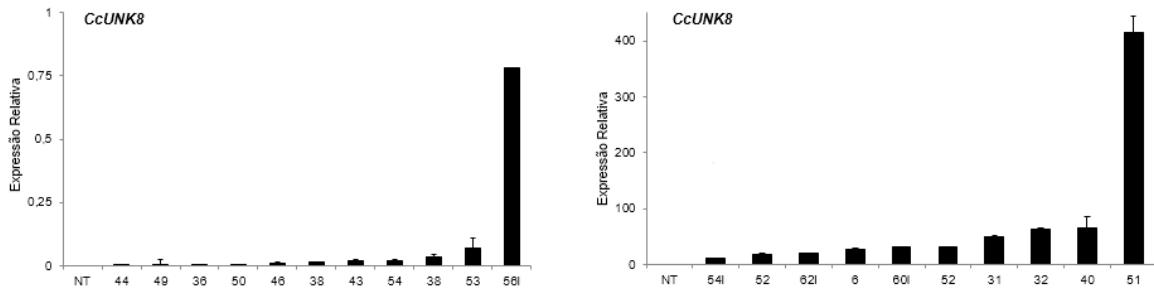


Fonte: Da autora (2017).

3.2 Análise da expressão do gene *CcUNK8* nas plantas transgênicas

Após a confirmação dos eventos transformados, procedeu-se com a análise da expressão gênica de *CcUNK8*. Como pode ser verificado na figura 3, dos eventos gerados na transformação genética foi possível detectar a expressão gênica em 17 eventos T₀. Os níveis de expressão do gene *CcUNK8* variam de 0,1 – 400 vezes mais expresso em relação à planta não transformada.

Figura 3 - Análise da expressão gênica relativa de folhas das plantas T₀ de *S. viridis* transformados com o vetor *ZmUbi:CcUNK8* comparados com plantas da linhagem não-transgênica (NT). Eixo X: eventos de transformação T₀, Eixo Y: Expressão relativa. As análises foram realizadas utilizando os genes *SiCUL* (culina) e *SiSUI* (fator de tradução SUI1) como genes endógenos.



Fonte: Da autora (2017).

O gradiente de expressão gênica encontrado nas plantas T₀ pode ser justificado pelo sítio de inserção do T-DNA, o número de cópias inseridas no genoma.

3.3 Déficit hídrico de *S. viridis* transformadas com o gene *CcUNK8*

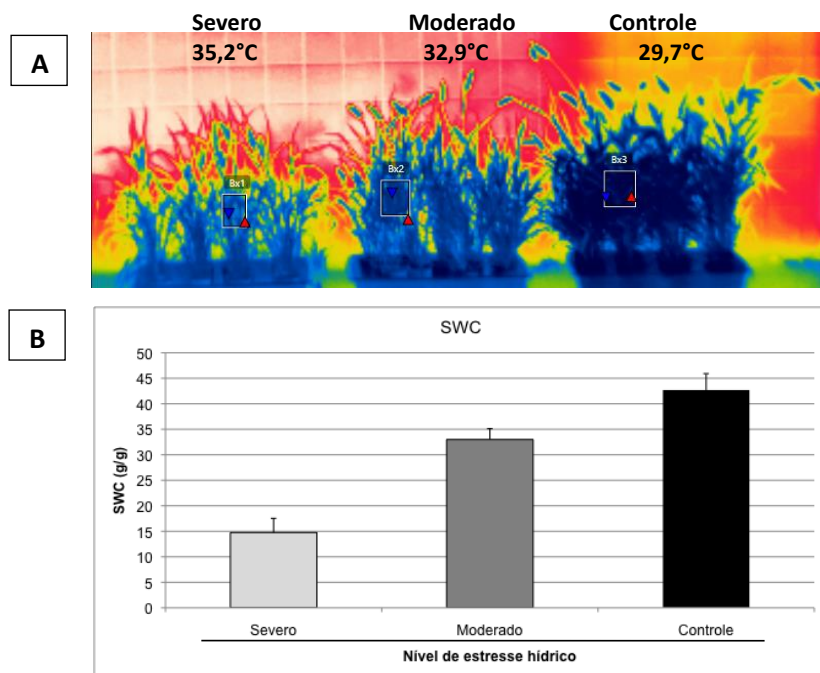
Em estudos prévios com o gene *CcUNK8* foi possível identificar *in silico*, por meio de bibliotecas de folhas de *Coffea canephora* com e sem estresse de seca a indução desse gene com o estresse de seca (VIEIRA et al., 2013). Mediante ao resultado prévio de expressão gênica e padrão de segregação mendeliana (dados não apresentados) eventos de transformação foram selecionados para análise em experimento de déficit hídrico. Diferentes níveis de estresse foram utilizados considerando que as plantas podem apresentar fenótipos diferenciados quando submetidas a delineamentos experimentais diversificados (GILBERT; MEDINA, 2016). As plantas encontravam-se na quarta fase de desenvolvimento (MARTINS et al., 2016).

Parâmetros fisiológicos como fotossíntese e trocas gasosas foram acompanhados a fim de monitorar o comportamento das plantas mediante ao estresse. As plantas transformadas e não transformadas foram submetidas a dois níveis de estresse (moderado e severo) e um controle de irrigação. No final de 28 dias em que as plantas foram submetidas a diferentes regimes hídricos, não foi possível identificar fenótipo diferenciado entre plantas transgênicas e a linhagem não transgênicas.

Para validar que os diferentes regimes hídricos propostos foram alcançados, o conteúdo de água no solo foi medido e correlacionado com foto térmica das plantas. A

imagem térmica evidencia por meio da diferença de coloração e também pela temperatura média, que há diferença entre a temperatura média apresentada por plantas de diferentes regimes hídrico. Corroborando ainda com o conteúdo de água no solo apresentado por cada regime hídrico (FIGURA 4).

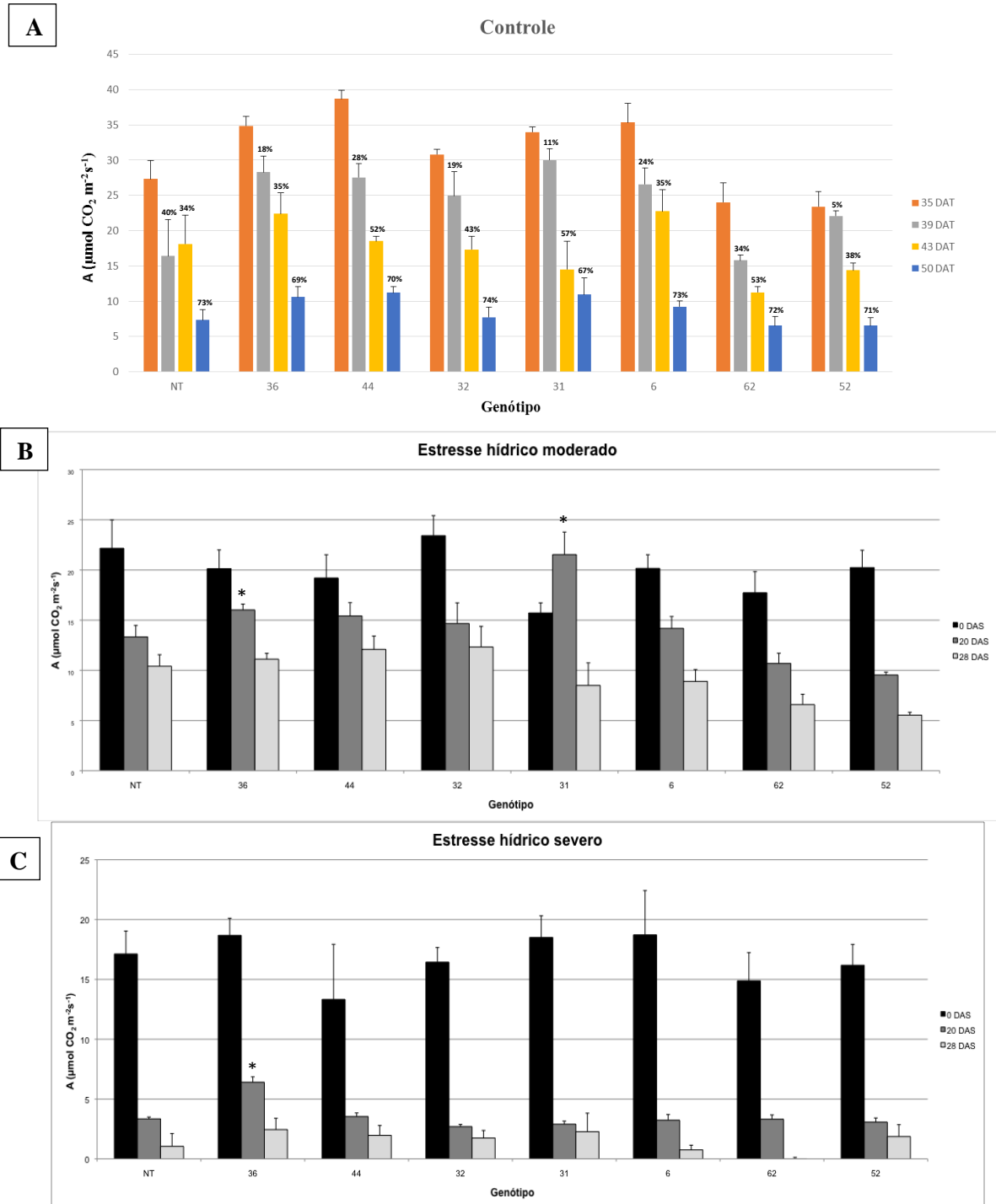
Figura 4 - (A) Imagem térmica representativa de plantas *S. viridis* (T_1 e T_2 - tabela 2) nos diferentes regimes hídricos com respectivas temperaturas médias. (B) Gráfico do conteúdo médio de água no solo das plantas de *S. viridis* em cada regime hídrico.



Fonte: Da autora (2017).

O déficit hídrico não afeta somente a morfologia das plantas, mas causa danos severos ao metabolismo ocasionando mudanças na fisiologia das plantas afetadas. Ajustes osmóticos como o acúmulo de solutos em vacúolos estão entre as principais alterações que podem ocorrer e auxiliar plantas a tolerarem melhor o déficit hídrico. Alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos como clorofila e carotenoides decrescem em níveis significativos quando as plantas se encontram em déficit hídrico intenso (AJITHKUMAR et al., 2013). Parâmetros fisiológicos como taxa fotossintética e trocas gasosas foram acompanhados e analisados ao longo do período de exposição das plantas nos diferentes regimes hídricos, visando a analisar se as plantas transgênicas apresentavam níveis maiores de fotossíntese quando em estresse se comparadas com as plantas da linhagem não transgênica (FIGURA 5).

Figura 5 - Gráficos com valores de eficiência fotossintética apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas (T₁ e T₂ - tabela 2) e a linhagem não transgênica (NT).



Legenda: (A) Fotossíntese das plantas de *S. viridis* transgênicas (T₁ e T₂ - tabela 2) e a linhagem não transgênica (NT) na condição controle de irrigação em 35, 39, 43 e 50 dias após o transplante (DAT) com os respectivos desvios padrão. Acima das barras encontram-se os valores da taxa de inibição em relação a medida inicial (35 DAT). (B) Fotossíntese das plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênicas (NT) na condição de estresse moderado no decorrer do período de 0, 20, 28 dias após estresse (DAS). (C) Fotossíntese das plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT) na condição de estresse severo no decorrer do período de 0, 20, 28 dias após estresse (DAS). (*) genótipos significativamente diferentes utilizando o Teste *t*.

Fonte: Da autora (2017).

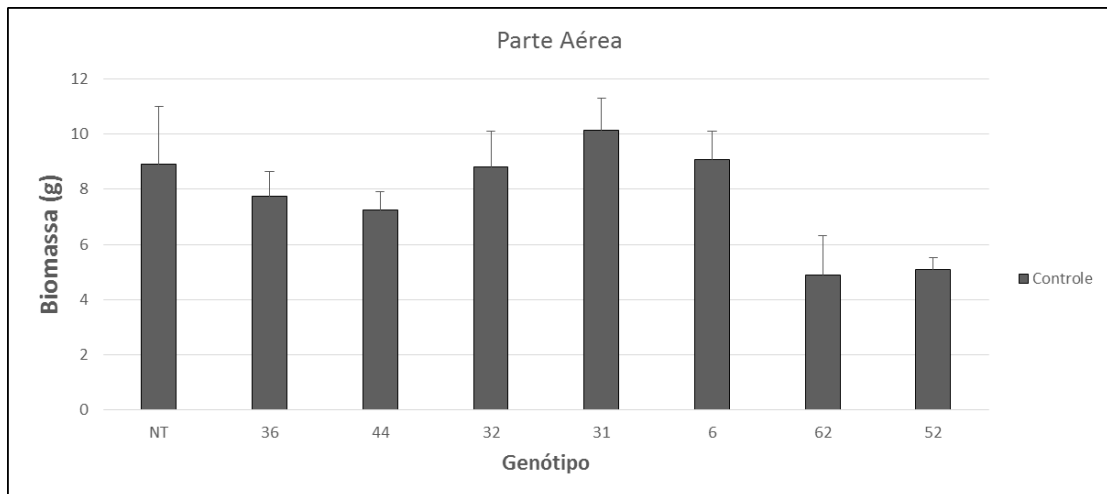
As plantas na condição controle de irrigação tiveram um decréscimo na fotossíntese devido ao envelhecimento das folhas, em que ocorre uma diminuição natural dos pigmentos fotossintéticos. É possível observar que as plantas que se encontravam em déficit hídrico apresentaram fotossíntese inicial homogênea. Após o estabelecimento do estresse os níveis de fotossíntese decaíram na maioria dos genótipos em ambos os regimes hídricos. No estresse severo, a taxa fotossintética aproxima-se de zero, podendo se correlacionar diretamente ao nível baixo de água disponível no solo. O evento 36 apresenta taxa fotossintética maior que o NT em ambos os regimes hídricos em 20 DAS, enquanto o evento 31 possui fotossíntese significativamente maior que o NT no estresse moderado em 20 dias após estresse (DAS).

No mesmo período, foi analisada a taxa de transpiração apresentada por todas as plantas nos diferentes regimes hídricos. Os dados de transpiração (não apresentados) seguem a mesma tendência dos dados de fotossíntese (FIGURA 5).

Ao término do ciclo de vida das plantas que foram submetidas aos diferentes regimes hídricos, análises de biometria foram realizadas. Parâmetros como biomassa, número de perfilhos e número de inflorescências foram mensurados a fim de analisar se as plantas submetidas aos diferentes regimes hídricos apresentavam algum fenótipo correlacionado ao tratamento a que foram submetidas.

O acúmulo de biomassa aérea nas plantas submetidas ao controle de irrigação e, portanto, mantidas sob irrigação durante todo o experimento não apresentou nenhum ganho significativo de biomassa. É possível observar que não existe nenhum evento que se comporte de maneira superior quanto ao acúmulo de biomassa quando comparado com o não transformado (FIGURA 6). Os eventos 62 e 52 apresentam maior biomassa quando comparados ao não transformado. Nos dados referentes aos regimes hídricos moderado e severo, houve uma normalização em relação a condição controle de irrigação e estão apresentados como o percentual de inibição de biomassa.

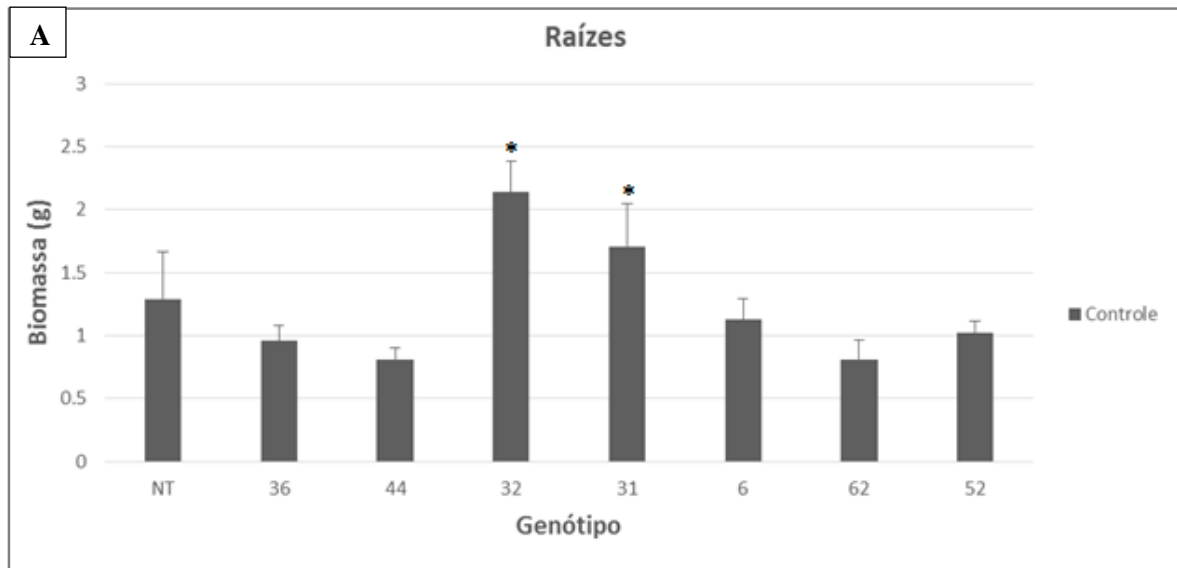
Figura 6 - Gráficos com valores de biomassa da parte aérea apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT).



Legenda: (a) Biomassa de parte aérea das plantas de *S. viridis* transgênicas (T_1 e T_2 - tabela 2) e a linhagem não transgênica (NT) na condição controle de irrigação com os respectivos desvios padrão. Fonte: Da autora (2017).

As análises de biomassa radicular apresentam na condição controle de irrigação um ganho significativamente maior dos eventos 32 e 31 comparados ao não transformado. Os demais eventos não possuem acúmulo significativo de biomassa radicular (FIGURA 7). No regime moderado, o percentual de inibição de alguns eventos mostrou-se significativo com perfis diferenciados. Os eventos 36 e 44 apresentam uma menor taxa de inibição em relação ao não transformado, todavia os eventos 32 e 31 apresentam uma taxa de inibição maior que o não transformado.

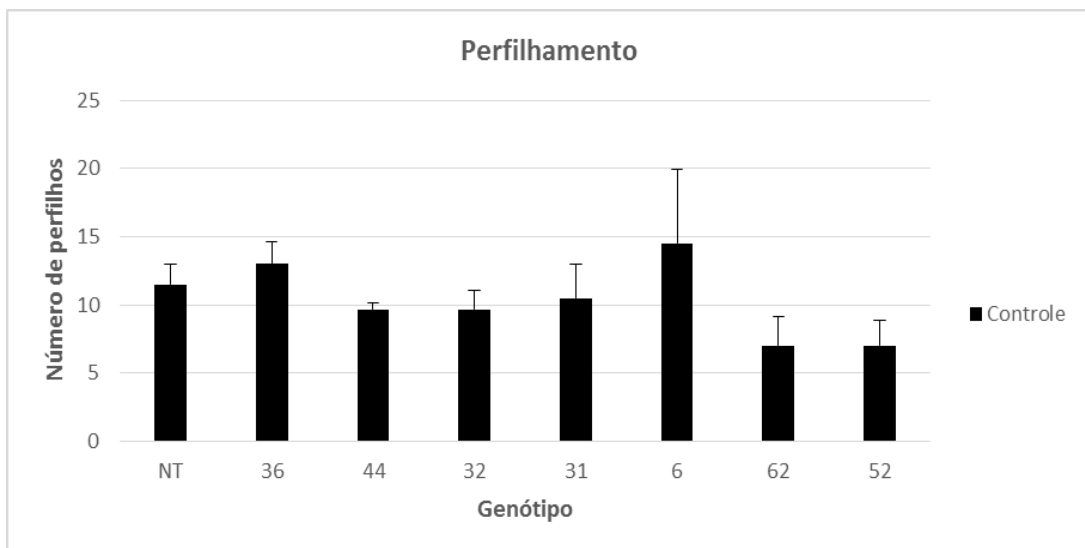
Figura 7 - Gráficos com valores de biomassa de raiz apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT).



Legenda: (a) Biomassa de raiz das plantas de *S. viridis* transgênicas (T_1 e T_2 - tabela 2) e não transformadas (NT) na condição controle de irrigação com os respectivos desvios padrão. (b) Taxa de inibição da biomassa de raiz em relação ao controle das plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT) na condição de estresse moderado e severo com os respectivos desvios padrão. (*) genótipos significativamente diferentes utilizando teste.

Fonte: Da autora (2017).

Figura 8 - Gráficos com número de perfilhos apresentados pelas plantas de *S. viridis* transgênicas e a linhagem não transgênica (NT).



Legenda: Número de perfilhos das plantas de *S. viridis* transgênicas (T_1 e T_2 - tabela 2) e a linhagem não transgênica (NT) na condição controle de irrigação com os respectivos desvios padrão.

Fonte: Da autora (2017).

Análise do número de perfilhos foi realizada ao final do experimento. As plantas do controle de irrigação não apresentaram nenhuma diferença significativa das plantas não transformadas (FIGURA 8).

Para uma análise mais abrangente dos resultados, é preciso relacionar taxa fotossintética, taxa de crescimento, bem como o regime hídrico das plantas, uma vez que o único fator extrínseco que houve variação foi a disponibilidade de água no substrato. Mudanças nos valores de fotossíntese, bem como na taxa de crescimento nas plantas dos diferentes eventos de *S. viridis* em estudo, que tiveram a irrigação suspensa, são uma consequência da disponibilidade de água no substrato, que se refletiu no potencial hídrico foliar (dados não mostrados). Sabe-se que normalmente ocorre numa situação de déficit hídrico em plantas devido aos seguintes eventos: fechamento estomático, aumento da temperatura foliar, diminuição do conteúdo relativo de água e, concomitantemente, do potencial hídrico, redução da taxa de crescimento, diminuição da concentração de clorofila e, por último, mudanças em variáveis relacionadas ao aparato fotoquímico.

A taxa fotossintética inicial manteve-se próximo aos valores retratados na literatura indicando que as plantas estavam saudáveis e não apresentavam estresse hídrico inicialmente. No controle de irrigação o decaimento das taxas de fotossíntese deve-se à senescência foliar aonde os níveis de clorofila decaem refletindo no nível de fotossíntese. Nas plantas que foram mantidas sob estresse, o decaimento da taxa fotossintética relaciona-se com a degradação da clorofila, o estresse severo onde a disponibilidade de água no solo é próxima de zero as plantas têm a sua taxa fotossintética também decrescida a níveis próximos de zero. O evento 36 destaca-se quanto às taxas fotossintéticas apresentadas em 20 DAS no estresse moderado e severo, entretanto a superioridade na fotossíntese não é refletida nos parâmetros biométricos avaliados. Os eventos 32 e 31, que apresentam biomassa radicular significativamente maior que o não transformado na condição controle de irrigação, possuem taxa de fotossíntese maior que a linhagem não transgênica. No entanto outros eventos possuem taxas de fotossíntese superiores à linhagem não transgênica, porém não tiveram sua biomassa aumentada. O acúmulo de biomassa radicular dos dois eventos superiores pode estar relacionado a uma maior eficiência no uso da água (WUE), que pode ser uma adaptação fisiológica que provoque um aumento na biomassa. O acúmulo de biomassa nesses eventos pode ser uma característica que se apresente como dose dependente do gene, considerando o fato do gene estar em homozigose nesses eventos, enquanto os demais eventos encontram-se em heterozigose. A avaliação do número de perfilhos não se correlaciona diretamente com os fenótipos apresentados, nem com as análises fisiológicas realizadas.

4 CONCLUSÃO

Utilizando a construção *ZmUBI:CcUNK8* para transformação genética de *S. viridis*, foram gerados 27 eventos de transformação que em análise de expressão gênica demonstraram um gradiente de expressão na geração T₀ podendo ser subdividido em baixa, média e alta. Por meio da expressão gênica, eventos de transformação foram analisados quanto à função putativa do gene de tolerância à seca, e não foi possível identificar um fenótipo de tolerância nas plantas transgênicas quando comparadas as plantas não transgênicas.

Os resultados gerados desse trabalho nos fazem inferir que o gene *CcUNK8* proveniente de *coffea canephora* nas condições analisadas não demonstrou estar envolvido no aumento da tolerância à seca de plantas transgênicas de *S. viridis*. A não funcionalidade desse gene no aumento da tolerância à seca em plantas de *S. viridis* pode estar correlacionado com a maquinaria necessária para o seu funcionamento, visto que esse gene é proveniente uma espécie dicotiledônea e foi inserido em uma espécie monocotiledônea. Por ser um gene exclusivo de *C. canephora* fatores evolutivos podem estar associados com a dependência de outros genes para que o gene *CcUNK8* desempenhe as funções preditas *in silico*.

As análises de expressão gênica demonstram que o gene foi expresso em todos os eventos de transformação gerados, no entanto estudos para identificar se a proteína corresponde foi traduzida não foram realizados. A ausência de estudos correlacionados a presença e possível função da mesma poderiam demonstrar se a falta de fenótipo poderia ser correlacionada a não tradução da proteína, ou a se ocorresse a tradução as hipóteses pelas quais ela não estaria desempenhando a sua função predita. Assim como o gene pode atuar em um conjunto gênico específico que não estava presente em *S. viridis*, é possível que a proteína necessite de um complexo proteico para desempenhar a sua função.

REFERÊNCIAS

- AJITHKUMAR, G. et al. Multimodal bioimaging using a rare earth doped Gd₂O₂S: Yb/Er phosphor with upconversion luminescence and magnetic resonance properties. **Journal of Materials Chemistry A Mater Energy Sustain**, Cambridge, v. 1, n. 11, p. 1561-1572, Mar. 2013.
- BLACKMAN, P.; DAVIES, W. Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 39-48, Jan. 1985.
- DOYLE, J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11-15, 1987.
- GILBERT, M. E.; MEDINA, V. Drought adaptation mechanisms should guide experimental design. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 639-647, Aug. 2016.
- GUO, W. J. et al. Significant comparative characteristics between orphan and nonorphan genes in the rice (*Oryza sativa L.*) genome. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 2007, p. 1-7, Apr. 2007.
- HORAN, K. et al. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 147, n. 1, p. 41-57, May 2008.
- MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, June 2012.
- MARTINS, P. K. et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-10, June 2016.
- MARTINS, P. K. et al. A simple and highly efficient Agrobacterium-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. **Biotechnology Reports**, Lund, v. 6, p. 41-44, June 2015.
- MULLER, P. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. **Biotechniques**, Natick, v. 32, p. 1378-1379, June 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.
- PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509-515, Mar. 2004.
- RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Limerich, v. 339, n. 1, p. 62-66, Mar. 2003.

ROSENTHAL, W. et al. Water deficit effects on transpiration and leaf growth. **Agronomy Journal**, Madison, v. 79, n. 6, p. 1019-1026, Nov. 1987.

TAUTZ, D.; DOMAZET-LOSO, T. The evolutionary origin of orphan genes. **Nature Review in Genetics**, London, v. 12, n. 10, p. 692-702, Aug. 2011.

VERSLUES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 523-539, Feb. 2006.

VIEIRA, N. G. et al. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 6, n. 4, p. 181-190, Dec. 2013.

**ARTIGO 2 - IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CORE ABSCISIC
ACID (ABA) SIGNALLING COMPONENTS AND THEIR GENE EXPRESSION
PROFILE IN RESPONSE TO ABIOTIC STRESSES IN *Setaria viridis***

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo formatado de acordo com a revista *Plant and Cell Physiology*.

Abstract

Abscisic acid (ABA) is an essential phytohormone that regulates growth, development and adaptation of plants to environmental stresses. In Arabidopsis and also other higher plants, it was already shown that the mechanism of ABA signal transduction involves three core components namely PYR/PYL/RCAR ABA receptors (PYLs), type 2C protein phosphatases (PP2Cs) and class III SNF-1-related protein kinase 2 (SnRK2s). In the present study, we reported the identification and characterization of the core ABA signalling components in *Setaria viridis*, an emerging plant model for cereals and feedstock crops presenting C4 metabolism. This led to the identification of eight *PYL* (*SvPYL1* to 8), twelve *PP2C* (*SvPP2C1* to 12) and eleven *SnRK2* (*SvSnRK2.1* through *SvSnRK2.11*) genes in the *S. viridis* genome. In order to study the gene expression profiles of these genes, two different *S. viridis* genotypes (A10.1 and Ast-1) were submitted to drought, salinity and cold stresses, in addition to application of exogenous ABA. For the different treatments and plant genotypes, differential gene expression profiles were found, demonstrating the variations of ABA stress responses within the same species. These differential responses to stresses demonstrated by *S. viridis* accessions were also assessed by physiological measurements such as photosynthesis, stomatal conductance and transpiration rate. This study allows a comprehensive analysis of gene regulation of the core ABA signalling components in *Setaria viridis* submitted to different treatments and provides suitable targets for genetic engineering of C4 plants aiming tolerance to abiotic stresses.

Keywords: Abiotic stress - Abscisic acid - *PYL/SnRK2/PP2C* – *Setaria viridis*

Introduction

Abscisic acid (ABA) is a phytohormone involved in the control of many aspects of plant growth and development including embryo maturation, cell division and elongation, seed dormancy, germination, root growth and floral induction (Lopez-Molina et al. 2001, Finkelstein et al. 2002, 2008, Cutler et al. 2010, Miyakawa et al. 2013). In addition, ABA also responds to a variety of environmental stresses, including biotic and abiotic stresses such as drought, cold and salinity (Sah et al. 2016, Vishwakarma et al. 2017, Yoshida et al. 2014). Chemically, ABA is a sesquiterpene synthesized in plants from the carotenoid β -carotene, via multiple enzymatic reactions that involves zeaxanthin oxidase (ZEP), 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED), ABA-aldehyde oxidase (AAO) and molybdenum cofactor sulfurase (MCSU) (Nambara and Marion-Poll 2005). In abiotic stress conditions, ABA levels increase, leading to a signalling cascade that ultimately activates plant adaptation responses to stress (Xiong et al. 2002). The ABA-activated signalling network has recently emerged, and the identification of ABA receptors is among the most important advances in stress signalling in the past decade (Cutler et al. 2010, Zhu 2016).

ABA receptors were first uncovered in *Arabidopsis*, where three core components have been identified: the ABA receptor PYR/PYL/RCAR (PYL) protein family, the negative regulator type 2C protein phosphatase (PP2C) and the positive regulator class III SNF-1-related protein kinase 2 (SnRK2). Some of these receptors were also identified in other plant species such as sorghum, maize and rubber tree (Dalal and Inupakutika 2014, Fan et al. 2016, Guo et al. 2017). PYR proteins were identified through genetic analyses, which found that PYR1 (from *Pyrabactin Resistance 1*) and members of its 13 relative proteins (*Pyrabactin Resistance 1-Like*; PYL) are necessary for proper ABA signal transduction in *Arabidopsis* (Park et al. 2009). This study also demonstrated that PYR1 binds to ABA and inhibits the group A protein phosphatases 2Cs (clade A PP2Cs), whose members include the proteins ABA-insensitive 1 and 2 (ABI1, ABI2) and *Hypersensitive to ABA 1* (HAB1). The genetic evidences demonstrated so far suggest that the PP2Cs act as negative regulators of ABA-dependent pathways, and this function appears to be conserved from *Arabidopsis* to moss (Komatsu et al. 2009). The main targets of PP2Cs identified to date are related to protein kinases implicated as positive regulators of ABA signalling (Komatsu et al. 2009, Cutler et al. 2010). Among these kinases, the class III SNF-1-related protein kinases 2 (SnRK2s) are the most implicated kinases for positive ABA signalling, especially because of the strong phenotype observed for the triple mutant *snrk2.2/2.3/2.6* in *Arabidopsis*, which could germinate and grow on 50 μ M ABA, an abnormal phenotype demonstrated by ABA-insensitive mutants (Fujii et al. 2007). Some evidence has been shown that the SnRK2s can directly

phosphorylate members of the ABF/AREB/ABI5 clade of bZIP transcription factors, promoting ABA-induced gene expression (Johnson et al. 2002, Kobayashi et al. 2005, Furihata et al. 2006, Fujii et al. 2007). In summary, ABA binds to a PYL protein, resulting in inhibition of PP2Cs through the ABA-PYL-PP2C complex. This complex leads to accumulation of phosphorylated SnRK2s, which leads to phosphorylation of ABA-responsive element binding factors (ABFs) and subsequent ABA gene expression for appropriate cellular responses (Cutler et al. 2010).

Some important crops used as sources of food and feedstock belong to the Panicoideae subfamily and include cereal grains and grasses such as sugarcane (*Saccharum* spp.), maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and switchgrass (*Panicum virgatum*) (Sage and Zhu 2011). Abiotic stresses such as cold, drought and salinity are among the most deleterious environmental stresses in these crops, responsible for great yield losses worldwide (Pereira 2016). Despite of the advancements achieved in these crops towards the comprehension of the molecular and biochemical pathways associated with abiotic stresses, the complexity of the genome and the long generation times required for reliable studies has been hindering the progress of these studies. In this context, *S. viridis* has emerged as a suitable C4 model species for molecular and genetic studies. It is a short, fast-growing, C4 metabolism plant, with its genome sequence available, making it a suitable model plant for genetic studies (Brutnell et al. 2010, Bennetzen et al. 2012). Moreover, *S. viridis* is highly responsive to *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation, with well-established transformation protocols (Brutnell et al. 2010, Martins et al. 2015b) and more recently, spike-dipping methods have also been proposed (Martins et al. 2015a, Saha et al. 2016). Genetically engineered *S. viridis* plants can be used in a proof-of-concept approaches to evaluate phenotypes related to important agricultural traits such as abiotic stress tolerance, resistance to pathogens and improved yield and biomass (Fahlgren et al. 2015, Muthamilarasan et al. 2015, Muthamilarasan and Prasad 2015) and the promising genes could be further transferred to a target crop.

In the present study, we report the identification and characterization of the ABA receptors *PYL* and the core signalling components *PP2C* (clade A) and *SnRK2* gene families in *S. viridis*. Since phenotypic variability in natural accessions of *S. viridis* has been reported (Li and Yang 2008, Layton and Kellogg 2014, Saha et al. 2016), we used two different *S. viridis* genotypes (A10.1 and Ast-1) to study gene expression of core ABA signalling components under drought, salinity, cold and exogenous ABA application. A total of 8 PYLs (*SvPYL1* through *SvPYL 8*), 12 PP2Cs (*SvPP2C1* through *SvPP2C 12*) and 11 SnRK2s (*SvSnRK2.1* through *SvSnRK2.11*) were found in *S. viridis* genome. Differential gene expression was found for the different treatments and accessions, demonstrating that even within the same species the abiotic stress responses can be

variable. Gas exchange measurements and image phenotyping analysis also demonstrated that the two accessions studied have slightly different responses to abiotic stresses. This study provides suitable targets for genetic engineering of C4 plants aiming tolerance to abiotic stresses.

Results

Genome-wide identification and characterization of the core ABA signalling components in *S. viridis*

The search for *PYR/PYL*, *PP2C* and *SnRK2* genes in *S. viridis* genome was performed using two different strategies. For both strategies applied, similar number of genes was found. Based on amino acid sequences of *S. viridis*, eight, twelve and eleven putative genes of *PYR/PYL*, *PP2C* and *SnRK2* were identified, respectively (Supplementary Fig 1) and described separately below. The complete set of gene orthology for *Setaria viridis* (Sv) *PYLs*, *PP2Cs* and *SnRK2s*, in comparison with *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os) and *Sorghum bicolor* (Sb) is presented in Table S1.

SvPYLs of S. viridis

The *PYR/PYL* genes identified were designated as *SvPYL1* through *SvPYL8*. The size of their corresponding SvPYL proteins ranged from 141 to 220 amino acids (aa), with molecular weight (MW) from 15.11 to 23.67 KDa and pI from 5.24 to 8.88 (Table 1). They contained the polyketide cyclase 2 domain (PF10604) localized between the positions 43-213 aa (Fig. 1A). It was also possible to identify in SvPYL proteins a conserved motif 1 related to the well-known “GATE” and “LATCH” loop regions and motifs 2-3 involved in ABA binding (Fig. 1A; Fig. 3A).

A phylogenetic analysis was performed based on similarities to PYL proteins from *Arabidopsis* (AtPYLs), *Oryza sativa* (OsPYLs) and *Sorghum bicolor* (SbPYLs), which divided SvPYLs in subfamilies I, II and III (Fig. 2A). SvPYL1-3, SvPYL4-6 and SvPYL7-8 were classified as subclass III, II and I, respectively. Except to SvPYL7, all SvPYL proteins identified have ortholog proteins in *Arabidopsis* (Table S1). Intron-exon analysis of *SvPYL* genes demonstrated that only genes clustered into subfamily I have 2 introns while those from subfamilies II and III did not present intronic regions (Fig. 3B).

SvPP2Cs of S. viridis

In total, 12 *SvPP2C* genes, designated as *SvPP2C1* to *SvPP2C12*, were identified in *S. viridis* genome (Fig 2B). Three isoforms were observed for *SvPP2C2* (*SvPP2C2.1*, *SvPP2C2.2* and *SvPP2C2.3*) while two isoforms were

found for *SvPP2C3* (*SvPP2C3.1* and *SvPP2C3.2*) and *SvPP2C7* (*SvPP2C7.1* and *SvPP2C7.2*). The size of SvPP2C proteins ranged from 117 (*SvPP2C2.3*) to 479 (*SvPP2C10*) amino acids with MW between 12.47 to 49.71 KDa and pI ranging from 4.35 to 8.50 (Table 1). Based on Pfam analysis, a protein domain PF00481 was identified and conserved in all putative SvPP2C proteins. Furthermore, we were able to identify in SvPP2Cs the binding residues for PYL and the cofactors Mn^{2+}/Mg^{2+} in the motifs 2, 3, 5 and 7 (Fig. 3A). Excepted *SvPP2C2.2*, *SvPP2C2.3*, *SvPP2C3.2* and *SvPP2C11*, SvPP2Cs sequences contain well-characterized functional residues and domain regulators of ABA necessary to interaction with PYLs and SnRK2s proteins (Fig. 1B). Analysis of proteins demonstrated that SvPP2Cs have orthologs mainly in *O. sativa* (OsPP2Cs) and *S. bicolor* (SbPP2Cs), with exception to *SvPP2C8* and *SvPP2C11* (Table S1). Intro-exon analysis showed a variable numbers of introns in *SvPP2C* genes, with the predominance of three introns in the majority of the genes (Fig. 3B).

SvSnRK2s of S. viridis

Based on the presence of Pfam domain PF0069 and similarity with query sequences, 11 non-redundant *SnRK2* genes (named from *SvSnRK2.1* to *SvSnRK2.11*) were found in *S. viridis* genome. *SnRK2.4* was the only gene presenting two isoforms, (named *SvSnRK2.4.1* and *SvSnRK2.4.2*). The length of putative SvSnRK2 proteins ranged from 295 to 454 aa, with MW from 33.43 to 51.67 KDa and pI from 4.73 to 8.30 (Table 1). Excepted to *SvSnRK2.4.2* protein, which lacks the ATP-binding loop domain, all these phosphatases contained the five important conserved motifs, including: (1) the ATP-binding domain (motif 5), (2) the activation loop (motif 2), (3) the PP2C interface residues (also called SnRK2 box), (4) the motif I (motif 6) and (5) ABA box domains, (Fig. 1C; Fig 3A). The bootstrap values deduced from the phylogenetic analysis revealed that SvSnRK2s were divided into subclasses I, II and III (Fig 2C). The Subclass I includes *SvSnRK2.6*, *SvSnRK2.7*, *SvSnRK2.8*, *SvSnRK2.10* and *SvSnRK2.11*, with the predominance of eight introns in their corresponding genes (Fig. 3B). The *SvSnRK2.4*, *SvSnRK2.5* and *SvSnRK2.9* were classified into subfamily II, with these genes containing mostly eight introns (Fig. 3B). Finally, subfamily III comprised the genes *SvSnRK2.1*, *SvSnRK2.2* and *SvSnRK2.3*, with genes containing 7 to 8 introns (Fig. 3B). Orthologs of *SvSnRK2s* genes could be found in *S. bicolor* and/or *O. sativa* (Table S1 and Fig. 3C).

Analysis of *cis*-acting regulatory elements (CARE) of putative promoter regions in *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes was performed using PlantCARE database. With exception to *SvPYL1* gene, the putative promoter regions for remaining (n=7) *SvPYL* genes analysed presented at least one of the following

DNA binding domains: MYB binding site (MBS), low temperature responsive element (LTRE) and ABA-responsive element (ABRE) (Fig. 4). The ABRE DNA motif was predominant in the promoter region of *SvPYL* subfamily I (*SvPYL7-8*), with at least four of these *cis*-elements present in these sequences. Regarding the subfamily II, MYB, LTE and ABRE elements were found in *SvPYL4* and *SvPYL5* promoter regions while one MBS was found in *SvPYL6* promoter region.

All putative promoter regions of *SvPYLs*, *SvPP2Cs* and *SvSnRK2s* genes analysed contain the ABRE element. This DNA motif was present up to 18 times in the promoter region of the *SvPP2C5* gene (Fig. 4). Regarding the *SvSnRK2* promoter regions, at least two different CAREs were found, excepted in *SvSnRK2.1*, *SvSnRK2.4.1* and *SvSnRK2.4.2* promoter regions. The MBS element was not detected only in *SvSnRK2.4* promoter region (Fig. 4).

Physiological responses of two natural accessions of *S. viridis* to abiotic stresses and exogenous ABA application

Physiological plasticity was already reported for different accessions of *S. viridis* that occur naturally in different world locations (Layton and Kellogg 2014, Li and Yang 2008, Saha et al. 2016). Here, we evaluated the physiological responses of two *S. viridis* genotypes (A10.1 and Ast-1) under well-watered conditions and submitted to drought, salinity, cold and exogenous ABA application. The accession A10.1 is originated from United States and it is the genotype frequently used for genetic transformations (Brutnell et al. 2010, Martins et al. 2015a, b, Saha et al. 2016), while the accession Ast-1 originates from Azerbaijan (GRIN, USDA website, www.ars-grin.gov) (Fig 5).

Gas exchange measurements revealed that physiological responses of A10.1 and Ast-1 to drought stress and exogenous ABA application were slightly different (Fig.6A, B). In drought conditions, the genotype A10.1 achieved the minimum photosynthetic rate (*A*) after 36 h of water deprivation, while the accession Ast-1 reached the minimum *A* after 45h (Fig. 6A). In addition, Ast-1 plants were able to re-establish ~65% of the initial photosynthesis 4 h after rehydration, while A10.1 plants could re-establish ~55% of initial *A* in the same condition (Fig. 6A). These results suggest that, at least in our experimental conditions, Ast-1 genotype can be slightly more resistant to dehydration than A10.1 plants. Interestingly, the photosynthetic rate of Ast-1 plants was not affected after 24 h of drought exposure, but the stomatal conductance (g_s) and the transpiration rate (*E*) decreased at this time point (Fig. 6A). Exogenous application of ABA had different effects on A10.1 and Ast-1 plants. As 100 μ M ABA was able to inhibit *A* by ~40% in A10.1 plants, only ABA concentration levels at 200 μ M were able to cause a significant *A* inhibition in Ast-1 plants, suggesting that the accession A10.1 could be

more responsive (sensitive) to ABA when compared to Ast-1 (Fig. 6B). Under salinity and cold conditions, A , g_s and E were similar between the accessions, as shown in Fig. 6C, D. In both genotypes, 100 mM NaCl treatment caused an inhibition of ~30% of A after 96 h, while 200 mM NaCl was able to inhibit A by the double, ~60% of initial A (Fig. 6C). In our experiments, *S. viridis* plants of A10.1 and Ast-1 genotypes were grown in controlled conditions at 25°C. The gradual decrease of temperature induced a linear inhibition of A , with the minimum A rate achieved at 5°C in both accessions. However, during cold treatment g_s and E presented a bell-shaped curve response, decreasing at 15°C and 5°C, but increasing at 10°C in both genotypes (Fig. 6D).

Gene expression profile of putative core ABA signalling components in *S. viridis* accessions submitted to different abiotic stresses

To investigate the expression pattern of *S. viridis* *PYL*, *PP2C* and *SnRK2* genes, qRT-PCR experiments were performed in leaves of A10.1 and Ast-1 plants submitted to drought, salinity, cold and exogenous ABA application. The tissues were collected during the time course of the treatments, based on the physiological responses observed previously (Fig. 6). All data represent the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (0 h). Conventionally, we designated low, moderate and strong up- or downregulation as being 2-3, 4-10 and >10-fold change of expression related to controls, respectively (Fig. 7).

Drought stress

For drought treatment, the transcripts were analysed at 0 (control), 24, 39 and 45 h after stress application, with differential expression patterns observed between the two genotypes (Fig. 7A). In the results obtained for A10.1 accession, it was verified low levels of expression of the *SvPYL4* and 7, while the expression of *SvPYL1*, 2, 3 and 8 was significant in control conditions. Overall, the drought stress downregulated the expression of *SvPYLs*, and *SvPYL2* and 3 greatly increased their expression after re-watering, when the transcript levels were compared to the last time point of drought (Fig. 7A and Fig. S2). For Ast-1 accession, we observed downregulation of *SvPYL3* transcripts in drought conditions, while the expression *SvPYL1*, 4, and 7 genes was upregulated. Expression of *SvPYL1* increased after 39 h of drought stress, but these levels decreased when the photosynthesis rate reached its minimum (Fig. 6A). During re-watering of Ast-1 plants, expression of *SvPYL2* and 4 appeared slightly upregulated when compared to dehydrated plants (Fig. 7A and Fig. S2).

Concerning the ABA core signalling components, all *SvSnRK2s* (except *SvSnRK2.1*) and all *SvPP2Cs* (except *SvPP2C2.2*, *11* and *12*), responded to drought in at least one time point analysed in A10.1 plants (Fig. 7A and Fig S2). In this genotype, *SnRK2* genes presented differential expression patterns, some of them being upregulated (like *SvSnRK2.3*, *4.1/4.2*, *5*, *6*, *9*, *10* and *11*) and the others slightly down-regulated (like *SvSnRK2.2*, *7* and *8*), mainly in early (24 h) or late (45 h) stages of drought. Regarding the *PP2C* genes of group A, expression of *SvPP2C1* and *SvPP2C8* decreased slightly in A10.1 plants in early stages of drought treatment, while it appeared upregulated for *SvPP2C2.1*, *3.1/3.2*, *4*, *5*, *6*, *7.1/7.2*, *9* and *10* genes. In Ast-1 genotype, excepted *SvSnRK2.7* and *8*, and excepting *SvPP2C3.1/3.2*, *8* and *12* genes, the expression profile of all remaining *SvSnRK2* and *SvPP2C* genes were significantly upregulated in response to drought in at least one time point (Fig. S3). In addition, expression of most of *SvSnRK2* and *SvPP2C* genes upregulated under drought conditions appeared downregulated during re-watering.

Salt treatment

For salt treatment, the transcripts were analysed 48, 72 and 96 hours after the addition of 200 mM NaCl, which was the salt concentration that significantly affected the physiological traits in both genotypes (Fig. 6C). Except *SvPYL* genes, A10.1 plants largely activated the core ABA signalling genes during salt stress (Fig. 7C, Fig S2). For this genotype and excepted for *SvPP2C1* and *2.2* genes, expression profiles of *SvSnRK2.3*, *4.1/4.2*, *9*, *10*, *11* genes and of all *SvPP2C* genes demonstrated that they were upregulated in 48 h of salt treatment. In addition, expression of *SvSnRK2.7* and *8* was downregulated under salt stress. On the other hand, expression of *SvPYL3*, *5* and *6*, *SnRK2.8*, *9* and *11*, and *SvPP2C2.1*, *3.2* and *12* genes was slightly upregulated in at least one time point under salt treatment in Ast-1 plants, (Fig. 7C and Fig S5).

Cold Treatment

For cold treatment transcript analyses, the tissues were collected 24 h after the achievement of the desirable temperature (15, 10 and 5°C). In A10.1 plants under cold stress, *SvPYL1*, *2*, *3*, *7* and *8* were downregulated (Fig. 7D, Fig. S2). For this genotype submitted to temperatures below 15°C, transcripts of *SvSnRK2.4.1/4.2*, *5* and *9* genes appeared slightly upregulated while those of *SvPP2C4*, *5*, *7.1/7.2* and *10* genes were strongly upregulated. Regarding Ast-1 plants, *SvPYL* genes appeared to be low responsive to cold, with *SvPP2C3.2* and *8* being weakly upregulated (Fig. 7D and Suppl. Fig S2). Overall, *SvSnRK2* genes were upregulated (~2-3 fold) during cold stress (Fig S2). Interestingly, the isoforms *SvSnRK2s 4.1* and *4.2* were downregulated in Ast-1 plants at

15°C but the decrease in the temperature led to the upregulation of these genes (Fig. S6). Moreover, 8 out of 14 *SvPP2C* genes in Ast-1 plants under cold stress were slightly upregulated, but *SvPP2C7.1* demonstrated the same pattern as *SvSnRK4.1/4.2*, being downregulated at 15°C and upregulated at lower temperatures (Fig. S6).

Treatment by exogenous ABA

Finally, expression levels of genes of ABA signalling components were analysed in plants under exogenous ABA treatment. The tissues were collected after 2, 4 and 6 h after ABA application at 100 µM and 200 µM, according to physiological responses observed for A10.1 and Ast-1 plants, respectively (Fig. 6B). *PYL* receptor genes responded differently between A10.1 and Ast-1, as observed in Fig. 7B and Fig. S2.

In A10.1 accession, *SvPYL8* was significantly downregulated after ABA application, while in Ast-1 significant downregulation was observed for *SvPYL3* and *4*. In A10.1 plants, *SvPYL4* was upregulated in a time course-dependent manner under ABA treatment, while *SnRK2.3* was strongly downregulated after 2 h of exogenously applied ABA (Fig. 7B and Fig. S4). However, *SvSnRK2.3* was weakly upregulated in Ast-1 accession in the same time, demonstrating contrasting effects of ABA application among the genotypes. The *PP2C* genes were mostly upregulated in both genotypes, especially after 2 h of ABA application (Fig. 7B and Fig.S4).

ABA accumulation in *S. viridis* submitted to abiotic stresses

An increase in ABA levels was detected in leaves of Ast-1 and A10.1 plants after all treatments, as expected. The results were expressed as the ratio of the peak areas obtained for the samples (A_{ABA}) and peak areas from internal standard (A_{IS}), as showed in Fig. 8. During drought and cold stresses, A10.1 plants showed an increase of ~3-fold in leaf ABA levels, with the double observed for Ast-1 (Figs. 8A,D). In salt stress conditions, these results were inverted, with Ast-1 plants having a 2-fold increase in ABA levels higher than A10.1 plants (Fig. 8C). In plants treated by exogenous ABA, the levels of ABA accumulation drastically increased when compared to non-treated plants (Fig. 8B). As the concentration of exogenous ABA used in Ast-1 plants was 2-fold higher than the concentration used for the A10.1 genotype, ABA accumulation was also the double in Ast-1 plants. These data suggest low levels of ABA turnover in *S. viridis* after exogenous ABA treatment.

Discussion

The core ABA signalling components are promising targets for plant genetic engineering towards improving important agricultural traits such as plant biomass, yield and tolerance to abiotic stresses, as this phytohormone

is involved in many aspects of plant growth, development and responses to environmental changes. Some monocot, C₄ plants including maize, sorghum, switchgrass and sugarcane consist of important crops for human and animal feeding, in addition to their use as biofuels feedstock (Akashi and Nanasato 2018). In general, genetic transformation of these plants is laborious and time-consuming, in addition to genome sequences not fully annotated, making functional genomics studies more difficult. Thus, the use of model plants with fast growth and short life cycles, suitable transformation protocols and genome fully available is pivotal to accelerate genomic studies and, if possible, translate them to target crops. In this context, *S. viridis* emerged as a powerful model for C₄ plants, as demonstrated by a diverse array of studies (for a review, see Huang, 2016). In order to better characterize this model plant, the main objectives of the present work were to identify, characterize and perform a comprehensive analysis of the gene expression pattern of its core ABA signalling system that includes the pyrabactin-like receptors (PYL), Ser/Thr phosphatases (clade A PP2Cs) and Snf1-related protein kinases (SnRK2s). In this study, two different accessions of *S. viridis*, (A10.1 and Ast-1) were used and submitted to drought, salt and cold stresses, in addition to exogenously applied ABA, in order to analyse possible differences in the gene expression of this core ABA signalling system within the species.

Eight putative *SvPYL* genes were found in the *S. viridis* genome. These genes encode proteins containing the polyketide cyclase 2 domain (PF10604), which is a subfamily of Bet v 1-like superfamily, characterized by presence of a hydrophobic cavity that acts as ABA binding site (Cutler et al. 2010). Our analysis revealed that *Setaria* has the same number of *SvPYL* genes found in sorghum (Dalal and Inupakutika 2014), but a lower number compared to maize, which contains 11 PYL genes (Fan et al. 2016), and to the more distant *A. thaliana*, which has 14 PYL receptors genes (Park et al. 2009). Besides the conserved domain PF10604, plant PYL proteins characterised up to now are known to have the ‘GATE’ and the ‘LATCH’ conserved domains, which are β sheet loops present in all PYL protein sequences. The results presented here also demonstrated that the eight putative *SvPYL* proteins also contain these domains. The binding of ABA lead to conformational changes of these ‘GATE’ and ‘LATCH’ domains, which in turn facilitate ABA-mediated interaction of PYL with the protein phosphatases PP2Cs (Melcher et al. 2009). In *Arabidopsis*, PP2C genes are categorized into 13 subfamilies, from A to L (Schweighofer et al. 2004, Xue et al. 2008), where the clade A subfamily consisting of 9 proteins, contains 6 PP2Cs that act as negative regulators of ABA signalling (Cutler et al. 2010). Based on the presence of highly conserved amino acid residues involved in PYL and SnRK2 protein interaction, in the binding of the cofactors Mn^{2+}/Mg^{2+} and constituting the domain PF00481, we found 12 putative PP2C-encoding genes in *S. viridis* genome, all of them clustering in the clade A of other plant species PP2Cs (Santiago et al. 2012, Soon

et al. 2012, Dalal and Inupakutika 2014). However, in 4 (SvPP2Cs2.2/2.3, 3.2 and 11) out of 12 SvPP2Cs proteins, the amino acid residues involved for PYL and SnRK2 interactions were not found, suggesting that these proteins are not functional. The high orthology of SvPP2Cs with other plant PP2C deduced from the phylogenetic analyses indicate their close evolutionary relationship.

The modulation of signal transduction pathways is often controlled by reversible phosphorylation of proteins. In this regard, the subclass III plant-specific sucrose non-fermenting 1-related subfamily 2 (SnRK2) protein kinases have been implicated in ABA signaling as important modulators (Cutler et al. 2010). In *Setaria*, it was identified eleven putative SnRK2 genes. This was based on the presence of conserved domains such as PF0069, ATP-binding loop, activation loop, PP2C interface residues, SnRK2 box and ABA box (Dalal and Inupakutika 2014, Ng et al. 2011, Soon et al. 2012, Yoshida et al. 2006). Similar number of *SnRK2* genes was also identified in other higher plants such as Arabidopsis, maize and sorghum, where 10 *SnRK2s* were found in each species (Dalal and Inupakutika 2014, Fan et al. 2016). Because all the genes coding for the core factors of ABA signalling system were identified in *Setaria*, this system should function as described for other plants, with binding of PYL proteins to PP2Cs (and therefore inhibiting these phosphatases) in the presence of ABA, which in turn allows accumulation of phosphorylated SnRK2s responsible for subsequent phosphorylation of ABA-responsive element binding factors (ABFs) (Yoshida et al. 2015). The ABFs are responsible for the activation of ABA-related genes, which control different aspects of plant growth, development and responses to environmental changes.

To gain insight on global gene expression of identified ABA core components in *Setaria* under abiotic stresses, qRT-PCR experiments were performed using RNA extracted from leaves of A10.1 and Ast-1 genotypes of *S. viridis* submitted to different abiotic treatments. The time points chosen for gene expression analysis were based on the physiological traits, particularly to select plants showing decreased rates of photosynthesis after the stress application. The expression profiles of most of the genes coding for the core ABA signalling components were quite variable throughout the time between the different treatments and between the two *Setaria* genotypes. Our data was represented as the fold change of gene expression in relation to the beginning of the experiments (time 0h), and in this context it is worth to note that even in control conditions most of the core ABA signalling components have variable expression levels throughout the time. This may indicate that *PYLs*, *SnRK2s* and *PP2Cs* regulate their expression levels to maintain plant homeostasis even when plants are not submitted to drastic environmental changes. As the application of ABA and the cold treatment did not drastically changed the expression profile of *S. viridis* *PYL*, *PP2C* and *SnRK2* genes, we will focus the discussion on these core ABA

signalling components under drought and salt stresses. However, it is worth noting that physiological responses (Fig. 6) and accumulation of endogenous ABA levels (Fig. 8) were observed in all conditions tested, and the gene expression profile obtained is probably reflecting our specific experimental conditions.

Regulation of SvPYL genes

In all conditions tested, expression levels of the *SvPYL* genes may be considered low or downregulated, compared to those of *SnRK2* and *PP2C* genes. It is described that in some species such as *A. thaliana* and *Zea mays*, *PYR/PYL/RCAR* genes are usually expressed constitutively or immediately after the perception of stress signals to sense changes in ABA (Fujita et al. 2009, Cutler et al. 2010, Yoshida et al. 2015, Fan et al. 2016). Because our expression analysis was performed based on decreased rates of photosynthesis after the stress application, it is possible that the stresses were perceived before any physiological penalties could be observed, partially explaining the low levels or the downregulation of *SvPYL* gene expression determined in our experimental conditions. The most distinctive results from *PYL* gene expression analysis were noticed in salinity conditions, where the majority of the genes were downregulated in A10.1 plants in contrast to Ast-1 genotype, which did not demonstrate decrease in most of the *PYL* transcript levels when compared to control plants (Fig. 7). The gene expression responses in drought, cold and exogenously applied ABA were also different between Ast-1 and A10.1 plants, suggesting that one of the genotypes could be more sensitive to ABA changes. In fact, to inhibit the photosynthesis rate to the same levels, it was necessary the application of 2-fold ABA concentration in Ast-1 plants, reinforcing the differences in ABA sensitivity between these two *Setaria* accessions. Contrasting expression levels were observed when some *SvPYL* and *SvPP2C* genes are compared in drought and stress conditions (Fig. S2). This result can be clearly observed for *SvPYL2* and *SvPP2C10* genes in both accessions, with *SvPYL2* downregulated while *SvPP2C10* was upregulated during drought conditions, but inverting the expression pattern after plant rewatering (Fig. S2). In *Arabidopsis*, the orthologs of *SvPYL2* (*AtPYL2*) and *SvPP2C10* (*AtHAB1*) are known to interact to activate ABA-signalling responses and confer drought resistance (Cao et al. 2013, 2017). Contrasting expression of *PYL* and *PP2C* genes have already been demonstrated in *Arabidopsis*. For instance, it was demonstrated, using a systems biology approach, that *AtPYL4* and its *PP2C* partners *ABI1*, *HAB1*, *HAI1* and *AHG3* have opposed expression patterns in the presence of ABA (Kilian et al. 2007, Lumba et al. 2014). The recovery of *S. viridis* after rewatering (Fig. 6) and the responses obtained for gene expression analysis of *SvPYL2* and *SvPP2C10* render these genes promising targets for drought tolerance in grasses.

Regulation of SvPP2C genes

The group-A phosphatase *PP2C* genes were largely activated in drought conditions in both *S. viridis* genotypes and in A10.1 plants under salt stress (Fig. 7A, C). As key negative regulators of ABA signaling, it is worth noting that expression of most of *SvPP2C* genes was strongly upregulated under all abiotic stress conditions tested. Yoshida et al. (2015) already reported that transcriptional regulation mediated by group-A PP2Cs was extremely important for ABA signalling. In addition to SnRK2s, these phosphatases could also interact with transcription factors and other phosphatases and kinases, altering their activities in response to abiotic stresses. In this regard, it was described that AtPP2Cs interact with kinases such as SnRK3/CIPK and the mitogen-activated kinase kinase kinase $\delta 4$ (MAP3K $\delta 4$). Ohta et al. (2003) demonstrated that two Arabidopsis group A PP2Cs, ABI2 and ABI2, interact with several SnRK3/CIPKs, which are members of the SnRK3/calcieneurin B-like (CBL)-interacting protein kinase (CIPK) families, responsible for mediating various signalling pathways through interactions with CBL proteins. Moreover, it has been shown that SnRK3.17/CIPK3 is involved in the induction of gene expression in response to ABA, cold and high salinity (Kim et al. 2003), indicating that these proteins might be involved in PP2C-mediated ABA signalling. Therefore, it is thought that group-A PP2Cs might form a complex signalling network not only with SnRK2, but with a myriad of proteins such as kinases, phosphatases, transcription factors and metabolic enzymes, to fine-tune ABA signalling in plants under abiotic stresses (Yoshida et al. 2015). This fine-tuning is extremely important to balance between the positive effects of ABA on plant survival during stress and the detrimental effects of this hormone on plant development and growth. Our results on gene expression analysis show that PP2Cs are the most responsive components of the core ABA-signalling network in *S. viridis* under abiotic stresses, corroborating the importance of PP2Cs to the fine-tuning of the complex ABA responses in monocot plants.

Regulation of SnRK2 genes

The *SnRK2* kinase genes were differentially expressed in *S. viridis*, depending on the accession and the stress applied (Fig. 7). Similar results were obtained when expression patterns of wheat *SnRK2* genes were analysed under similar conditions, with ABA application showing the weakest stress response among the treatments (Zhang et al. 2016). It was observed that *SvSnRK2.4*, *SvSnRK2.9*, *SvSnRK2.10* and *SvSnRK2.11* were the genes most up-regulated under drought and salt stresses in *S. viridis*, especially in Ast-1 accession. The protein orthology analysis revealed that *SvSnRK2.4* and *SvSnRK2.11* have similarity with *AtSnRK2.7/AtSnRK2.8* and *AtSnRK2.9*, respectively, while *SvSnRK2.9* and *SvSnRK2.10* did not demonstrate orthology with other

Arabidopsis kinases (Table S1). However, SvSnRK2.9 and SvSnRK2.10 have orthology with the SbSnRK2.9 and SbSnRK2.10 kinases identified in sorghum (Dalal and Inupakutika 2014). Interestingly, the most responsive *SvSnRK2* genes to drought and salt stresses do not belong to the subclass III (*SvSnRK2.1*, *SvSnRK2.2* and *SvSnRK2.3*), but to the subclasses I (*SvSnRK2.10* and *SvSnRK2.11*) and II (*SvSnRK2.4* and *SvSnRK2.9*). SnRK2 members of the subclass III are known to be strongly activated by ABA, acting as positive regulators of ABA signalling (Mustilli et al. 2002, Yoshida et al. 2002, Yoshida et al. 2006, Fujii et al. 2007). However, in agreement with our analysis in *S. viridis*, *SnRK2* genes from subclasses I and II were upregulated in the phylogenetically related plant sugarcane (*Saccharum officinarum*) submitted to NaCl and PEG treatments (Li et al., 2017). In addition, subclass II SnRK2s 2.7 and 2.8 from *Arabidopsis*, which have high orthology with SvSnRK2.4, have been demonstrated to participate in the regulation of some drought-responsive genes involving the ABA-responsive element binding factors AREB/ABF (Mizoguchi et al. 2010). More recently, protein-protein interactions studies revealed that homo- and heteromerization of OST1 (subclass III AtSnRK2.6) with AtSnRKs 2.2, 2.3 and 2.8 occurred during osmotic stress in *Arabidopsis*. In addition, several OST1-complexed proteins were identified as type 2A protein phosphatase (PP2A) subunits, suggesting that broad interaction network between SnRK2-type protein kinases and PP2A-type protein phosphatases other than the well-established interactions of SnRK2-type protein kinases with PP2Cs can occur (Waadt et al. 2015). The high responsiveness of subclasses I and II *SvSnRK2* genes in our experimental conditions reinforces the results described above, especially because these SvSnRK2 genes were strongly downregulated after plant rewatering, suggesting the involvement of SvSnRKs 2.4, 2.9, 2.10 and 2.11 in drought responses of *S. viridis*. Yeast two-hybrid studies and other protein-protein interaction analysis will help to corroborate this complex ABA signalling network involved in abiotic stress responses in monocot plants.

In addition to the differential gene expression patterns of the core ABA signalling network components observed for A10.1 and Ast-1 accessions, it was also demonstrated that different genotypes have distinctive physiological responses under abiotic stresses (Fig. 6). The different physiological responses observed for A10.1 and Ast-1 accessions under drought stress were already demonstrated in a study by Saha et al. (2016) and, as discussed by the authors, these differential responses are probably due to distinctive osmotic adjustments that ultimately lead to changes in the root and leaf radial water movement (Saha et al. 2016, Sade et al. 2014). As radial water movement through the xylem can be determined by anatomical and morphological structures, the different physiological responses between the accessions is not surprising, since A10.1 and Ast-1 have distinguishing morphology (Fig. 5). Obviously, other factors such as cellular components could be responsible for the

physiological responses during osmotic stresses in plants, for instance aquaporins membrane water channels, chaperones and osmolytes (Sade et al. 2014, Zhu et al. 2016). Moreover, the differences in gene expression and physiological traits in response to abiotic stresses observed between A10.1 and Ast-1 genotypes may reflect the different geographical locations from where these accessions are originated, since the environmental factors by which these genotypes are submitted are also different. Thus, the distinctive responses of A10.1 and Ast-1 plants reflect the diverse adaptive mechanisms that allow plants to survive under adverse environmental conditions.

In summary, the present study allows a comprehensive analysis of gene regulation of the core ABA signalling components in *Setaria viridis* submitted to different treatments and provides suitable targets for genetic engineering of C4 plants aiming tolerance to abiotic stresses.

Materials and Methods

Identification of ABA receptor PYR/PYL/PP2C/SnRK2 in *Setaria viridis*

Two strategies were used to identify the core ABA components in the genome of *Setaria viridis*. In the first strategy, a total of 2,819, 17,744 and 1,586 protein sequences corresponding to PYR/PYL, PP2C protein phosphatases and SnRK2s, available in the National Center for Biotechnology (NCBI), were downloaded, respectively. Tblastn searches were performed using a e-value cutoff set to 10^{-10} against genome files downloaded from Phytozome v10.2 database (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). The redundant sequences were removed using a custom Perl. After removal of the redundant sequences, putative sequences were screened for the existence of domains by Pfam (Sonnhammer et al. 1997). The specific domain observed was the polyketide cyclase2 domain (PF10604) to PYR/PYL, PF00481 to PP2Cs and SnRK-specific Pfam domain (PF0069). Protein sequences with no catalytic domain were excluded from the dataset. Molecular weight (MW), theoretical isoelectric point (pI) and protein length (aa) were manually calculated using the EXPASy server (<http://web.expasy.org/protparam/>). Position of domain was predicted in HMMSCAN (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>).

The second strategy searched *PYR/PYL/RCAR*, *PP2C* and *SnRK2* genes from *S. viridis* and their orthologs in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* in the GreenPhyl platform (<http://www.greenphyl.org/>) using the keywords *PYL/PYR/RCAR*, *PP2C* and *SnRK2*. We identified a total of 35, 45 and 54 sequences for *PYL/PYR/RCAR*, *PP2C* and *SnRK2*, respectively. BLASTn searches were carried out using these sequences as query against the *S. viridis* genome (e-value < e^{-10}) to isolate *Sv* genes that were further translated to compare their corresponding polypeptides with those of other species using the MAFFT program (Katoh and Toh 2008), available on the Galaxy instance (Goecks et al. 2010) of the South Green Platform (<http://www.southgreen.fr/>).

The conserved amino acids were identified using the GeneDoc program (<http://www.nrbsc.org/old/gfx/genedoc/>). Genes that did not contain specific domains were removed. To perform phylogenetic analyses, the families were extended by searching for homolog proteins in complete proteomes of interest (i.e. *S. viridis* and *A. thaliana*). Firstly, a Hidden Markov Model (HMM) profile was built using hmmbuild of the HMMER software package (Durbin et al. 1998) from the core polypeptides of the family, aligned with the MAFFT program (Katoh and Toh 2008), using a maximum of 100 iterations, and cleaned with GBLOCKS (Castresana 2000). Secondly, the complete proteome was screened with this profile using hmmsearch to extract the family sequences.

Phylogenetic, exon/intron and motif analysis

For phylogenetic analysis, amino acid sequences of putative PYL, PP2C and SnRK2 proteins of *S. viridis*, *S. bicolor*, *O. sativa* and *A. thaliana* were analysed. The genes of *S. viridis* were named based on numbering of *S. bicolor* and *A. thaliana* orthologs genes, estimated in Proteinortho v5.11 with an algebraic connectivity threshold of 0.1 and e-value of 10^{-5} (Lechner et al. 2011). Sequences were aligned with MUSCLE program and phylogenetic trees were constructed using FastTree 2.1.5 program (Price et al. 2010). The trees were visualized using the online program ITOL (<https://itol.embl.de/>). The sequences data of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes were deposited in the GenBank database under the mnemonic numbers MG766907 to MG766942. The exon/intron structure of these gene was examined using Gene Structure Display Server (GSDS: <http://gsds.cbi.pku.edu.cn>). Pfam prediction and conserved evolutionary domains were analysed using Multiple Em for Motif Elicitation (MEME Suite 4.11.1) server software (Bailey et al. 2009).

Promoter analysis

The 1500 bp promoter sequences of ABA signalling core components were retrieved using a custom script in Perl language. The analysis to identify cis-acting regulatory elements (CARE) ABRE, LTRE and MBS in the upstream DNA sequence were investigated by PlantCARE program (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot et al. 2002).

Plant material

Seeds of *S. viridis* accessions A10.1 and Ast-1 were germinated in pots containing latosoil, substrate (Plantmax®) and vermiculite (Agrifloc, Brasil Minérios) in a mixture of 3:1:0.5 (w/w/w). Plants were

maintained in a growth chamber (Conviron PGW40) under 16 h photoperiod of $450 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and 65% relative humidity.

Abiotic stress treatments and physiological measurements

Before the application of abiotic stresses to *S. viridis* accessions, plants were grown in pots in a growth chamber under the conditions described above until the reproduction phase (RP; 32 days after planting DAP) (Martins et al. 2016). Plants were watered to field capacity every day and fertilized (once a week) with a solution of $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ Plantafol® N:P:K (20:20:20). Physiological measurements were performed in the flag leaf using an open gas exchange system with a 6 cm^2 clamp-on leaf cuvette (LI-6400XT, LICOR). Photosynthetic photon flux density (PPFD) was fixed at $1.500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 400 ppm CO_2 , using a red-blue LED light source built into the leaf cuvette.

Drought stress treatment

Water stress (WS) was applied in both genotypes by withholding the water supply to pots containing 32 DPG plants for 44 h. We monitored the net photosynthesis rate for a total period of WS, until a decay of the photosynthesis rate could be observed. After the period of WS the plants were re-watered, with monitoring of net photosynthesis rate. A well-watered (WW) set of plants in the field capacity for both accessions were grown under the same conditions with similar irrigation and fertilization regimes as described before. Portion of leaves was collected from water-stressed, re-watered and control plants and frozen immediately in liquid nitrogen, being stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ for further analysis.

Salt stress treatment

For the salt treatment, different concentrations of NaCl were used for the observation of physiological responses in both accessions. The NaCl concentrations used were 0 (unstressed), 50, 100 and 200 mM for A10.1 and Ast-1 genotypes. The plants were irrigated with salt solution every day until field capacity. The photosynthesis was then measured every 24 h until 96 h after the application of NaCl solution. Leaf portions were collected during the treatment in 0, 24, 48, 72 and 96 h, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ for further analysis.

Exogenous ABA treatment

In the dose-dependent assay, plants in the RP were treated with 0 (control), 50 and 100 μM of exogenous ABA ((\pm) ABA, Sigma) for A10.1 accession and 0, 100 and 200 μM exogenous ABA for Ast-1 for 6 h. The net photosynthetic rate was measured at 2 h intervals until 6 hours after the application of ABA solution. Leaves were collected after 0, 2, 4 and 6 h treatment, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analysis.

Cold stress treatment

For imposing the cold stress, the plants were submitted to decay of $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ per day in temperature. The initial temperature was $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the final temperature reached $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. During the cold stress the light intensity was the same throughout the experiment. Photosynthesis analysis was performed every 24 h in different temperatures ($25, 20, 15, 10$ and $5\text{ }^{\circ}\text{C}$) and control group plants were kept at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sample leaves were collected in all temperatures, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analysis.

RNA isolation and cDNA synthesis

About 200 mg of starting material was used for RNA isolation. Total RNA was isolated using TRIzol Reagent (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed using RQ1 RNase-free DNase (Promega), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Uniscience), and RNA integrity was verified in agarose gel electrophoresis. Reverse transcription reaction was carried out with $1\text{ }\mu\text{g}$ of total RNA and oligo (dT) in a total volume of $20\text{ }\mu\text{l}$ using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), following the manufacturer's recommendations. cDNA samples were diluted (1:20) prior to use in RT-qPCR assays.

qRT-PCR experiments

Primers of ABA receptor were designed using the software Primerquest (<https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>). RT-qPCR was carried out in a 96-well optical plate with a StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Reactions were performed using Platinum SYBR Green PCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen), $0.2\text{ }\mu\text{M}$ of each primer and $1\text{ }\mu\text{l}$ of diluted cDNA (1:20) in a final volume of $10\text{ }\mu\text{l}$. The following thermal cycling condition was used for all amplifications: 2 min at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ min, 20 sec at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 40 amplification cycles of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 sec, and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 sec. After 40 cycles, the melting curve and amplification curve were checked to evaluate specific amplification. The relative

expression levels of these genes were analysed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak 2008), using the cullin (*SvCUL*), clathrin adaptor complex (*SvCAC*), translation factor SUI1 (*SvSUI*), eukaryotic initiation factor 4-alpha (*SveIF4 α*) and elongation Factor 1-alpha (*SveEF1 α*) genes as the internal controls (Martins et al. 2016). The amplified primers and internal controls were listed in supplementary materials (Table S2).

ABA extraction

Leaf samples from all treated samples and controls in the final set point of analysis were collected and freeze-dried. Subsequently, 150 mg of powdered plant materials were extracted at 4 °C for 12 h under agitation in 10 ml of 80% methanol. Before the extraction, 50 μ l of 3,5-Dichloro-4-hydroxybenzoic acid 0.1 g.l⁻¹ (Sigma) was added (internal standard; IS). The extracts were centrifuged at 4 °C at 10000 g for 5 min. The supernatant was evaporated, and then aqueous residue was adjusted to 5 ml with water before passed through preconditioned C18 SPE cartridges (3 ml, 500 mg), with 3mL deionized water, followed by 3 mL methanol. The cartridges were washed with 1 ml 20% methanol containing 0.1% (v/v) formic acid and the retained phytohormones were eluted with 1 ml 80% methanol. The extract was evaporated in vacuum at room temperature and adjusted for 300 μ l with water.

ABA detection by HPLC-(ESI)- MS

The samples of *S. viridis* submitted to abiotic stresses and the controls were analysed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) for determination of ABA accumulation in leaves. The samples were analysed in a Shimadzu[®] Nexera XR, equipped with LC-20AD- XR pumps, coupled to a Bruker Daltonics[®] Amazon SL mass spectrometer with an Ion Trap analyzer and the data acquisition were carried out with the Compass Data Analysis data system (Bruker Daltonics[®]). Chromatographic analysis of the leaf sample extracts for determination of ABA proportion was performed on an Agilent[®] Eclipse Plus C18 RRHD analytical column (2.1 mm internal diameter \times 50 mm length, 1.8 μ m particle size) placed in an oven maintained at 40 °C using 0.1% formic acid as solvent A and methanol plus 0.1% formic acid as solvent B with the following gradient elution program: at 0 min, it started with 20% B which was increased to 50% B in 8 min, then to 100% B in 8.5 min, continued at 100% B to 12 min for washing and was equilibrated back to 20% B from 12.1 min to 15 min at a solvent flow rate of 0.3 mL/min. Electrospray ionization method was used for mass spectrometry under the following conditions: spray voltage (negative mode= 4000 V); temperature of the capillary 180 °C. The MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode was used for determination of ABA and IS. ABA and IS were

monitored at m/z transitions of 263 → 153, 219; 204.6 → 160.7, respectively. The normalized collision energies for ABA and IS were 0.30 and 0.35, respectively.

References

- Akashi, K., Nanasato, Y. (2018) Recent progress in the genetic engineering of biofuel crops. In: Kumar, A., Ogita, S., Yau, Y.Y. (eds) *Biofuels: greenhouse gas mitigation and global warming*. Springer 327-339.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., et al. (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37: W202-208.
- Bennetzen, J.L., Schmutz, J., Wang, H., Percifield, R., Hawkins, J., Pontaroli, A.C., et al. (2012) Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nat. Biotechnol.* 30: 555-561.
- Brutnell, T.P., Wang, L., Swartwood, K., Goldschmidt, A., Jackson, D., Zhu, X.G., et al. (2010) *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. *Plant Cell* 22: 2537-2544.
- Cao, M., Liu, X., Zhang, Y., Xue, X., Zhou, X.E., Melcher, K., et al. (2013) An ABA-mimicking ligand that reduces water loss and promotes drought resistance in plants. *Cell Res.* 23: 1043–1054.
- Cao, M., Liu, X., Zhang, Y., Xue, X., Huan Huang, X., Zhou, X.E., et al. (2017) Combining chemical and genetic approaches to increase drought resistance in plants. *Nat. Commun.* 8: 1183.
- Castresana, J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17: 540-552.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. and Abrams, S.R. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Ann. Rev. Plant Biol.* 61: 651-679.
- Dalal, M. and Inupakutika, M. (2014) Transcriptional regulation of ABA core signaling component genes in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Mol. Breed.* 34: 1517-1525.
- Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A., Mitchison, G. (1998) *Biological sequences analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acid*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fahlgren, N., Feldman, M., Gehan, M.A., Wilson, M.S., Shyu, C., Bryant, D.W., et al. (2015) A versatile phenotyping system and analytics platform reveals diverse temporal responses to water availability in *Setaria*. *Mol. Plant* 8: 1520-1535.
- Fan, W., Zhao, M., Li, S., Bai, X., Li, J., Meng, H., et al. (2016) Contrasting transcriptional responses of PYR1/PYL/RCAR ABA receptors to ABA or dehydration stress between maize seedling leaves and roots. *BMC Plant Biol.* 16: 99.

- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L. and Rock, C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15-S45.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. and Steber, C. (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 387-415.
- Fujii, H., Verslues, P.E. and Zhu, J.K. (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 485-494.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., et al. (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 2123-2132.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., et al. (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1988-1993.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J.; Galaxy Team. (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11: 8.
- Guo, D., Zhou, Y., Li, H.L., Zhu, J.H., Wang, Y., Chen, X.T., et al. (2017) Identification and characterization of the abscisic acid (ABA) receptor gene family and its expression in response to hormones in the rubber tree. *Sci. Rep.* 7: 45157.
- Huang, P., Shyu, C., Coelho, C. P., Cao, Y., and Brutnell, T. P. (2016). *Setaria viridis* as a model system to advance millet genetics and genomics. *Front. Plant Sci.* 7:1781.
- Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D. and Walker-Simmons, M.K. (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol.* 130: 837-846.
- Katoh, K., Toh, H. (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform.* 9: 286-298.
- Kilian, K., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50:347-363.
- Kim, K.N., Lee, J.S., Han, H., Choi, S., Joo Go, S., Yoon, I.S. (2003) Isolation and characterization of a novel rice Ca²⁺-regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts *Plant Mol. Biol.* 52: 1191.

- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., et al. (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J.* 44: 939-949.
- Komatsu, K., Nishikawa, Y., Ohtsuka, T., Taji, T., Quatrano, R.S., Tanaka, S., et al. (2009) Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* 70: 327-340.
- Layton, D.J. and Kellogg, E.A. (2014) Morphological, phylogenetic, and ecological diversity of the new model species *Setaria viridis* (Poaceae: Paniceae) and its close relatives. *Am. J. Bot.* 101: 539-557.
- Lechner, M., Findeiß, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P.F. and Prohaska, S.J. (2011) Proteinortho: Detection of (Co-) orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics* 12: 9.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, et al. (2002) PlantCARE, a database of plant promoters and their cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* 30: 325–327.
- Li, C., Nong, Q., Xie, J., Wang, Z., Liang, Q., Solanki, M.K., et al. (2017) Molecular characterization and co-expression analysis of the *SnRK2* gene family in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Sci. Rep.* 7: 17659.
- Li, H.Y. and Yang, Y.F. (2008) Phenotypic plasticity of life history characteristics: quantitative analysis of delayed reproduction of green foxtail (*Setaria viridis*) in the Songnen plain of China. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 641-647.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S. and Chua, N.H. (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4782-4787.
- Lumba, S., Toh, S., Handfield, L.F., Swan, M., Liu, R., Youn, J.Y., et al. (2014) A mesoscale abscisic acid hormone interactome reveals a dynamic signaling landscape in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 29: 360-372.
- Martins, P.K., Mafra, V., de Souza, W.R., Ribeiro, A.P., Vinecky, F., Basso, M.F., et al. (2016) Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. *Sci. Rep.* 6: 28348.
- Martins, P.K., Nakayama, T.J., Ribeiro, A.P., Cunha, B., Nepomuceno, A.L., Harmon, F.G., et al. (2015a) *Setaria viridis* floral-dip: A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Biotechnol. Rep.* 6: 61-63.

- Martins, P.K., Ribeiro, A.P., Cunha, B., Kobayashi, A.K. and Molinari, H.B.C. (2015b) A simple and highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. *Biotechnol. Rep.* 6: 41-44.
- Melcher, K., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., et al. (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462: 602-608.
- Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Tanokura, M. (2013) Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends Plant Sci.* 18: 259-266.
- Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y., (2010) Two closely related Subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression, *Plant Cell Physiol.*, 51: 842–847.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., Giraudat, J. (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089–3099.
- Muthamilarasan, M., Bonthala, V.S., Khandelwal, R., Jaishankar, J., Shweta, S., Nawaz, K., et al. (2015) Global analysis of WRKY transcription factor superfamily in *Setaria* identifies potential candidates involved in abiotic stress signaling. *Front. Plant Sci.* 6: 910.
- Muthamilarasan, M. and Prasad, M. (2015) Advances in *Setaria* genomics for genetic improvement of cereals and bioenergy grasses. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1-14.
- Nambara, E. and Marion-Poll A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 165-185.
- Ng, L.M., Soon, F.F., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Suino-Powell, K.M., et al. (2011) Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 21259-21264.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., Zhu, J.K. (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 11771–11776.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., et al. (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071.
- Pereira, A. (2016) Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Front. Plant Sci* 7:1123.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P. (2010) FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* 5: e9490.

- Sade, N., Shatil-Cohen, A., Attia, Z., Maurel, C., Boursiac, Y., Kelly, G., et al. (2014) The role of plasma membrane aquaporins in regulating the bundle sheath-mesophyll continuum and leaf hydraulics. *Plant Physiol.* 166: 1609-1620.
- Sah, S.K., Reddy, K.R. and Li, J. (2016) Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Front. Plant Sci.* 7: 571.
- Sage, R.F., Zhu, X-G (2011) Exploiting the engine of C4 photosynthesis. *J Exp Bot.* 9: 2989-3000.
- Saha, P., Sade, N., Arzani, A., Rubio Wilhelmi, M.D.M., Coe, K.M., Li, B., et al. (2016) Effects of abiotic stress on physiological plasticity and water use of *Setaria viridis* (L.). *Plant Sci.* 251: 128-138.
- Santiago, J., Dupeux, F., Betz, K., Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., et al. (2012) Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs. *Plant Sci.* 182: 3-11.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protoc.* 3: 1101-1108.
- Schweighofer, A., Hirt, H. and Meskiene, I. (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236-243.
- Sonnhammer, E.L., Eddy, S. R., Durbin, R. (1997) Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 28: 405-420.
- Soon, F.F, Ng, L.M., Zhou, X.E., West., G.M., Kovach, A., Tan, M.H., et al. (2012) Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* 335: 85-88.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., et al. (2017) Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Front. Plant Sci.* 8: 161.
- Waadt, R., Manalansan, B., Rauniyar, N., Munemasa, S., Booker, M.A. Brandt, B., et al. (2015) Identification of open stomata1-interacting proteins reveals interactions with sucrose non-fermenting1-related protein kinases2 and with type 2A protein phosphatases that function in abscisic acid responses. *Plant Physiol.* 169: 760-779.
- Xiong, L., Schumaker, K.S. and Zhu, J.-K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: S165-S183.
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehrling, J., Ni, F., Jakab, S., et al. (2008) Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 9: 550.

- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Alonso, J., et al. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 43: 1473–1483.
- Yoshida, T., Mogami, J. Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: 133-139.
- Yoshida, T., Mogami, J. Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015) Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. *Plant Cell Physiol.* 56: 1043-1052.
- Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., et al. (2006) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among *Arabidopsis* protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* 140: 115-126.
- Zhang, H., Li, W., Mao, X., Jing, R., Jia, H. (2016) Differential activation of the wheat SnRK2 family by abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 7: 420.
- Zhu, J.K. (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167: 313-324.

FIGURES AND TABLE

Table 1 List of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes and their features.

Gene Name	Chr	Start position	Final position	aa	pI	MW	PFAM	GeneBank ID
SvPYL1	9	34761413	34763538	207	5.24	22.13	48-192	MG766913
SvPYL2	1	2710051	2713429	201	5.97	21.75	43-180	MG766914
SvPYL3	4	35821353	35821973	206	6.71	22.13	52-198	MG766907
SvPYL4	9	46321820	46323300	220	6.62	22.93	70-213	MG766908
SvPYL5	3	15949957	15951675	204	8.88	21.58	56-197	MG766909
SvPYL6	5	39467969	39468592	207	6.75	22.70	51-194	MG766910
SvPYL7	3	5043188	5045597	141	8.74	15.11	47-131	MG766912
SvPYL8	1	1156602	1160325	211	5.92	23.67	55-198	MG766911
SvPP2C1	3	8481733	8485238	451	4.99	47.10	176-434	MG766927
SvPP2C2.1	6	387891	391296	444	5.03	47.08	113-396	MG766928
SvPP2C2.2	6	387891	391296	328	5.24	35.25	132-281	MG766929
SvPP2C2.3	6	389629	391657	117	4.35	12.47	1-104	MG766930
SvPP2C3.1	7	785451	790598	451	5.30	47.17	119-410	MG766931
SvPP2C3.2	7	786886	790598	354	6.72	36.81	116-354	MG766932
SvPP2C4	2	25703196	25705262	376	6.80	39.38	78-364	MG766933
SvPP2C5	5	40142449	40144716	401	5.87	42.51	87-390	MG766934
SvPP2C6	3	16922545	16924778	422	7.05	43.93	85-411	MG766935
SvPP2C7.1	9	47906442	47908435	397	5.69	42.35	71-330	MG766936
SvPP2C7.2	9	47906340	47908359	397	5.69	42.35	71-330	MG766937
SvPP2C8	1	1190419	1194718	358	5.79	38.52	105-345	MG766938
SvPP2C9	3	11944691	11947945	381	5.28	40.63	58-364	MG766939
SvPP2C10	5	25838987	25843846	479	4.73	49.71	176-462	MG766940
SvPP2C11	5	33933094	33934782	226	6.08	23.68	44-226	MG766941
SvPP2C12	3	9748111	9750887	398	8.50	41.23	89-376	MG766942
SvSnRK2.1	9	4714220	4719224	366	4.81	41.48	28-284	MG766915
SvSnRK2.2	9	11263105	11266229	362	4.73	40.73	23-279	MG766916
SvSnRK2.3	3	46484835	46487553	375	4.94	41.55	37-293	MG766917
SvSnRK2.4.1	9	41982274	41986678	344	5.10	39.13	4-260	MG766918
SvSnRK2.4.2	9	41982637	41986678	295	4.94	33.43	2-211	MG766919
SvSnRK2.5	2	44725651	44730688	339	5.30	38.47	4-260	MG766920
SvSnRK2.6	1	26704997	26709453	454	8.30	51.67	94-350	MG766921
SvSnRK2.7	7	19178334	19183417	358	6.00	40.99	4-260	MG766922
SvSnRK2.8	3	274209	277259	379	5.99	43.05	4-260	MG766923
SvSnRK2.9	9	35394567	35397834	333	5.40	37.90	5-261	MG766924
SvSnRK2.10	3	18332249	18337532	360	5.68	41.77	4-260	MG766925
SvSnRK2.11	5	41261960	41266866	362	6.06	42.34	4-260	MG766926

Chr: Chromosome location; aa: length of amino acids; pI: isoelectric point; MW: molecular weight;

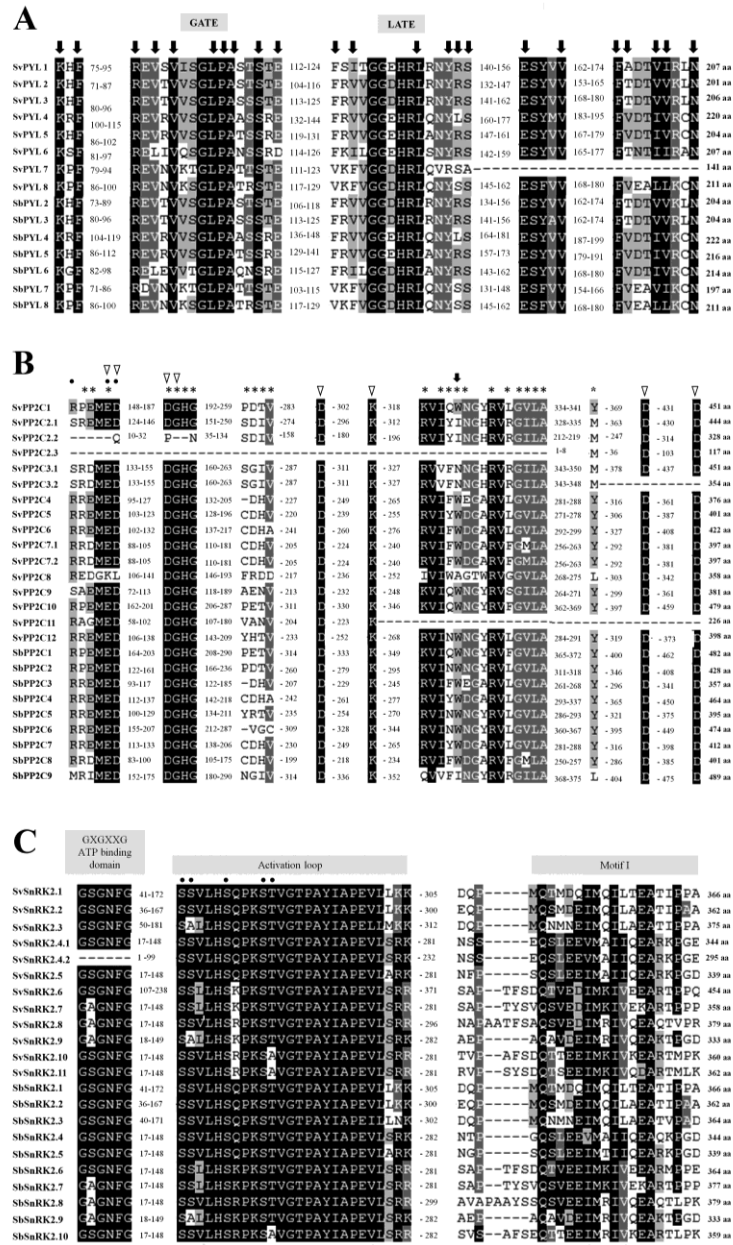


Fig 1 Sequence alignment of *S. viridis* SvPYL, SvPP2C and SvSnRK2 proteins and SbPYL, SbPP2C and SbSnRK2 from *Sorghum bicolor*. For each protein, total length is indicated in amino acids (aa). Conserved residues are shaded with black or grey shading. (A) Sequence alignment of the eight characterized SvPYL and SbPYL receptors. Conserved residues and residues involved in ligand binding in ABA receptors are marked by black arrows, and the Gate and Latch domains are indicated. (B) Sequence alignment of the 12 SvPP2Cs and the nine characterized SbPP2Cs. Residues involved in interaction of ABA, PYLs and Mg⁺/Mg²⁺ ions are marked by black arrows, asterisks and triangles, respectively. Phosphatase sites are marked with black points. (C) The subclass III SvSnRK2 amino acid sequences are compared with the predicted amino acid sequences of SbSnRK2s. The functional domains ATP binding site, activation loop and motif I are indicated. The phosphatase sites are marked with black points.

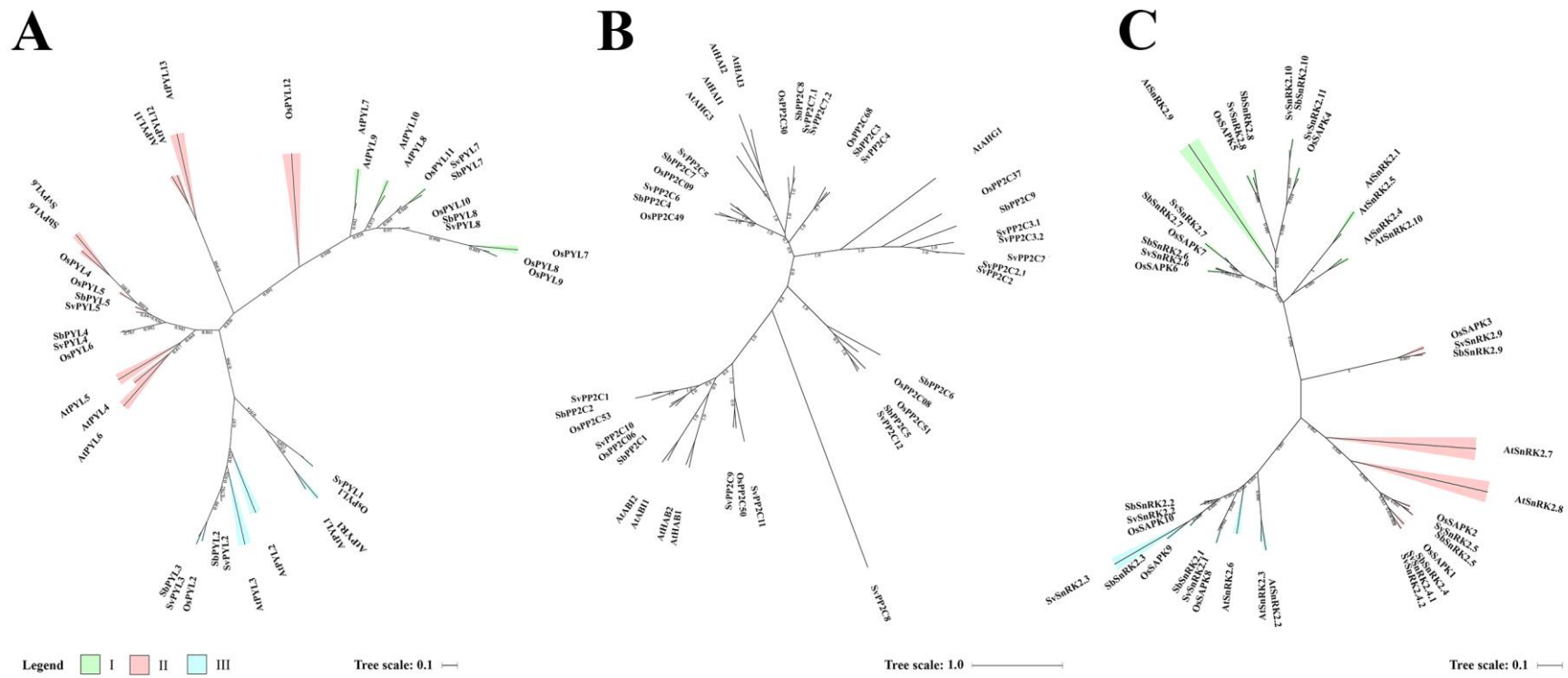


Fig 2 Phylogenetic analysis of ABA core signalling protein components from *Setaria viridis*. Maximum likelihood phylogeny of functionally characterised (A) SvPYL (B) SvPP2C (C) SvSnRK2 proteins and their close homologs from *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Sorghum bicolor* (*Sb*) and *Oryza sativa* (*Os*). The phylogenetic tree was constructed using FastTree 2.1.5 program. Branch colour scale represents SH-like local support (red to lower values and green to higher values).

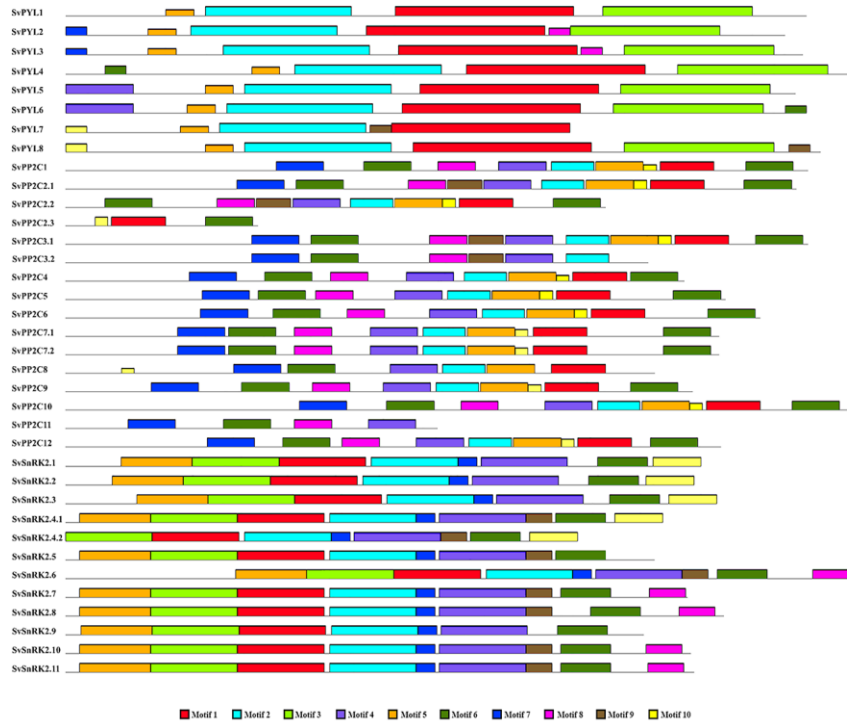
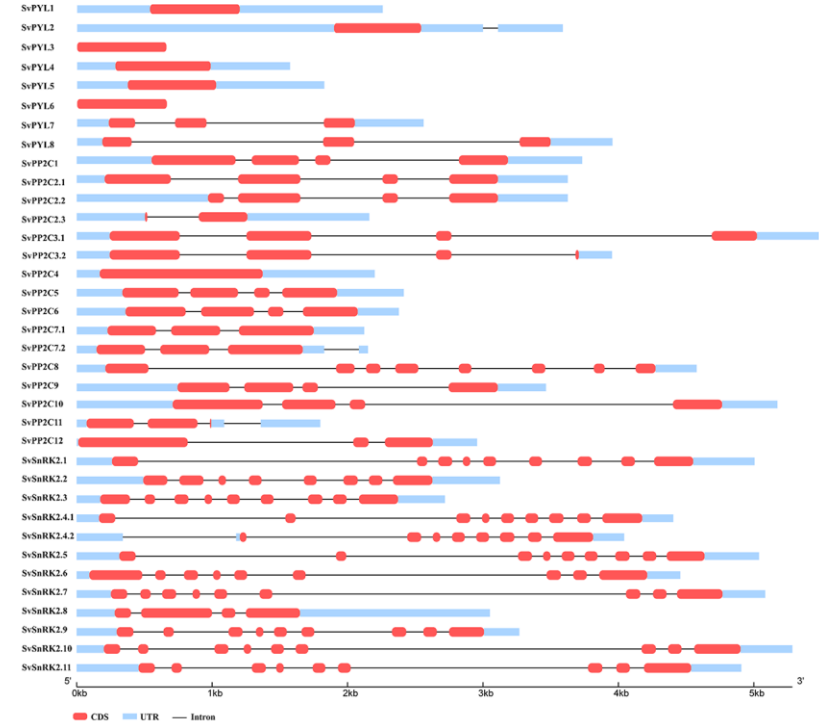
A**B**

Fig 3 (A) MEME analysis of 10 conserved motifs of SvPYL, SvPP2C and SvSnRK2 proteins. Different colour boxes correspond to different motifs. (B) Gene structure of ABA core signalling components. Filled boxes and single lines show exons and introns, respectively.

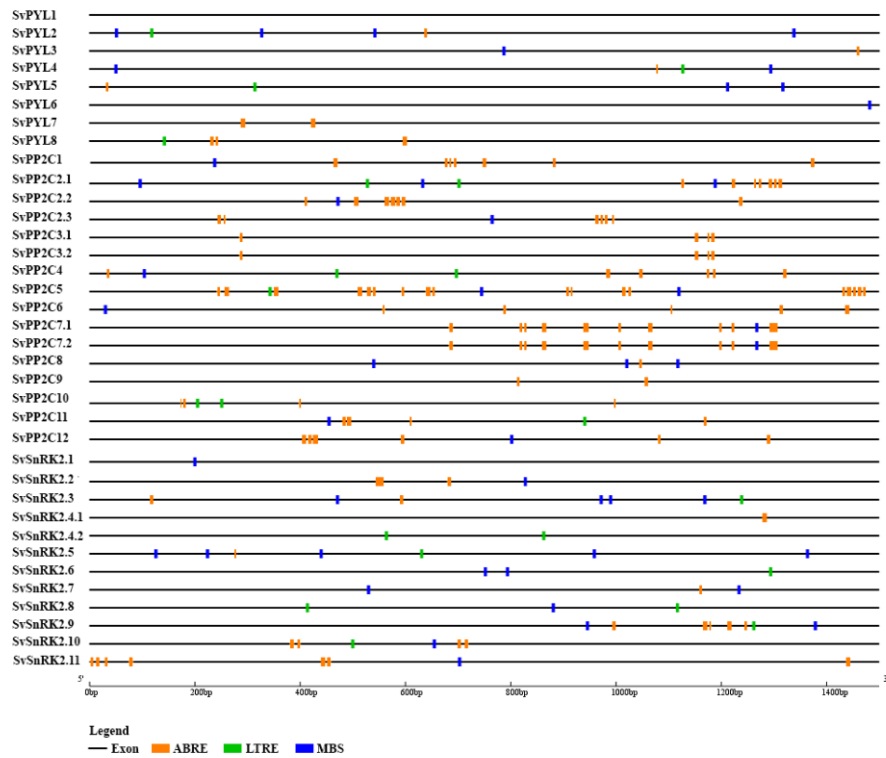


Fig 4 *Cis*-elements in the putative promoter regions of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes related with ABA-responsive element (ABRE), low temperature-responsive element (LTRE) and MYB binding site (MBS).



Fig 5 *Setaria viridis* accession A10.1 (left) and Ast-1 (right) in the reproductive stage (RP), 32 days post-germination (DPG).

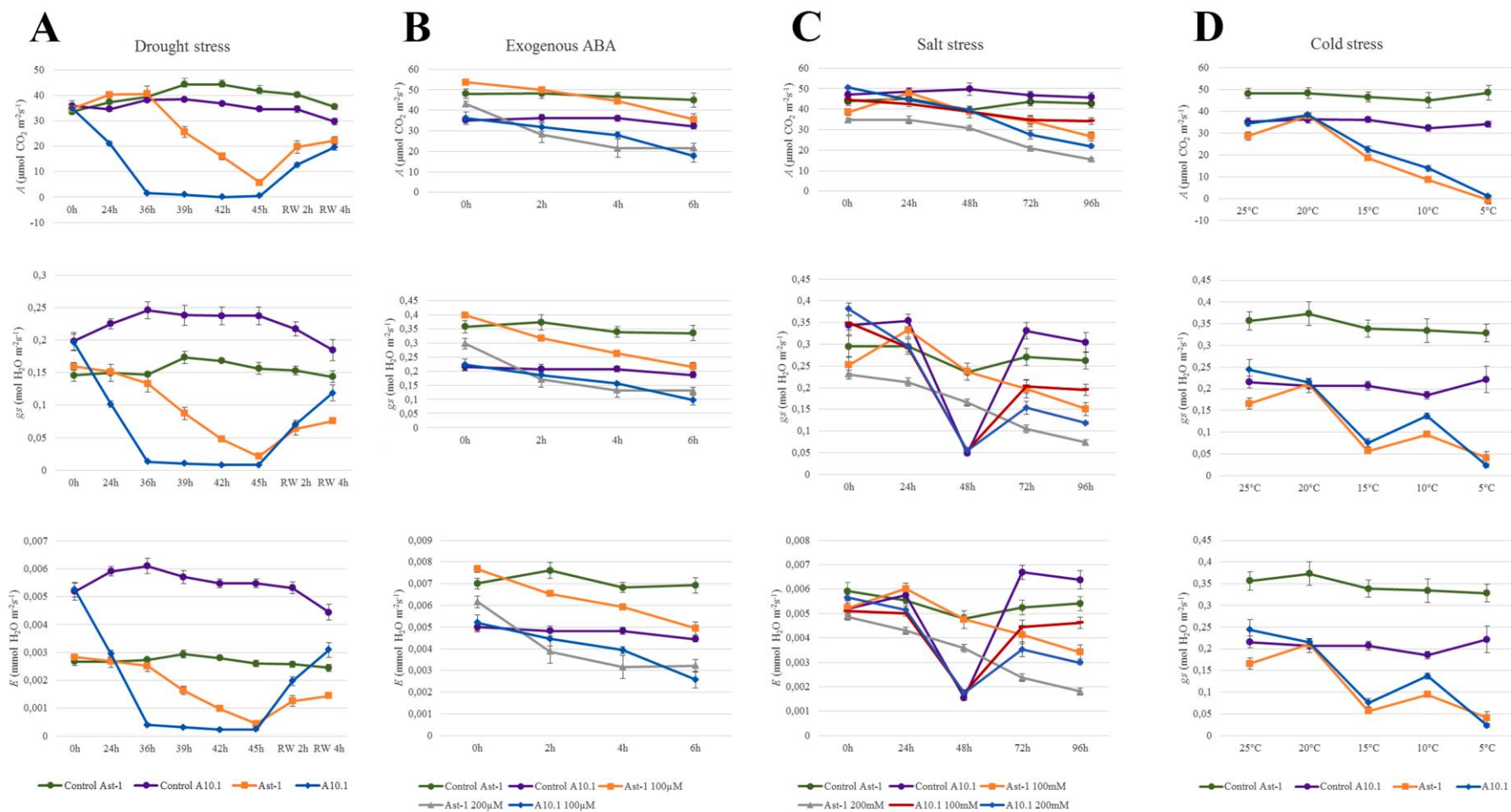


Fig 6 Physiological responses of *S. viridis* accessions submitted to abiotic stresses and exogenous ABA treatment. Photosynthesis (A), stomatal conductance (g_s) and transpiration rate (E) are shown for drought (A), exogenous ABA application (B), salt stress (C) and cold stress (D).

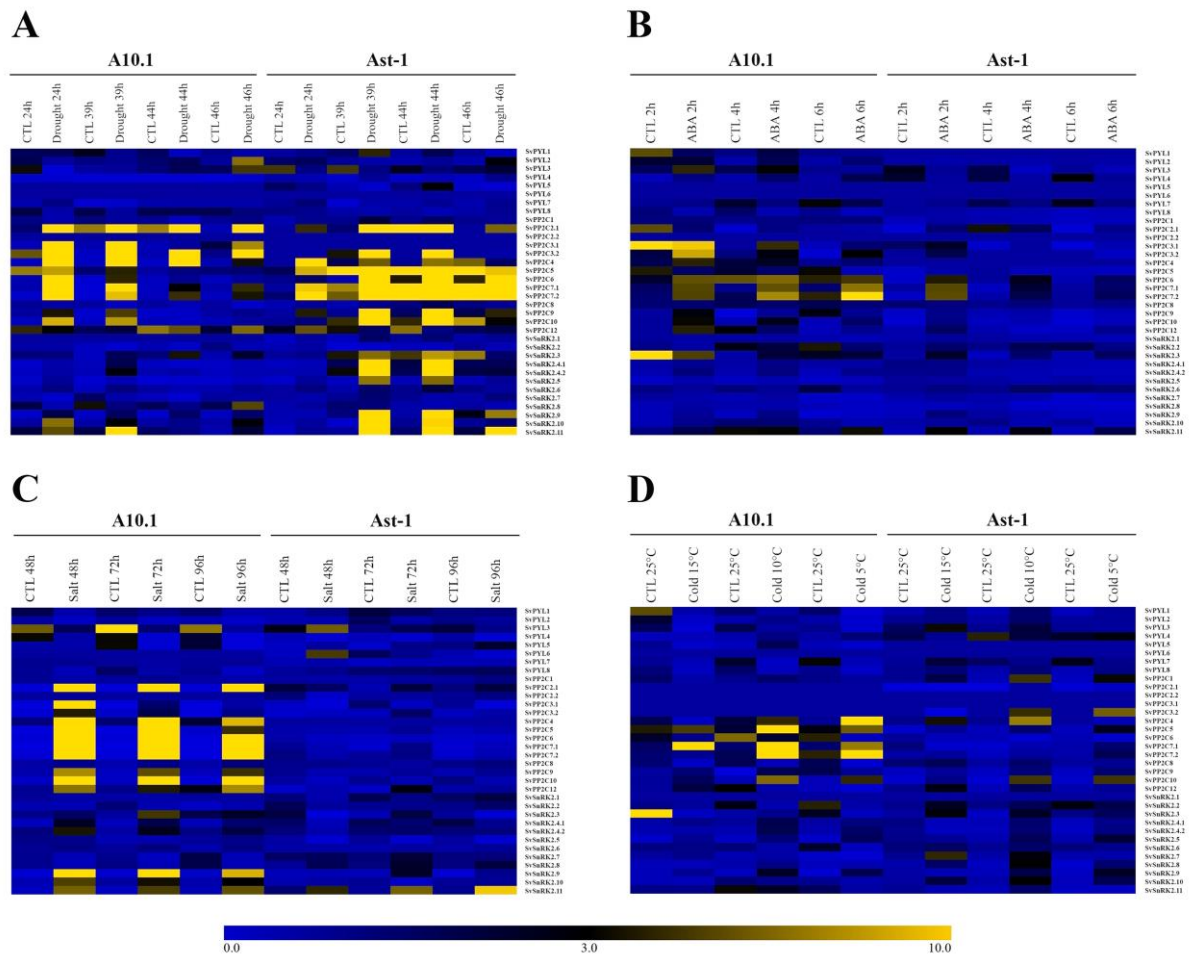


Fig 7 Expression profile of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes in different abiotic stresses in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis*. The heat map shows the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (control; 0 h). (A): drought stress, (B): exogenous ABA treatment, (C): salt stress, (D): Cold stress. CTL represent the control of the experiment (untreated samples).

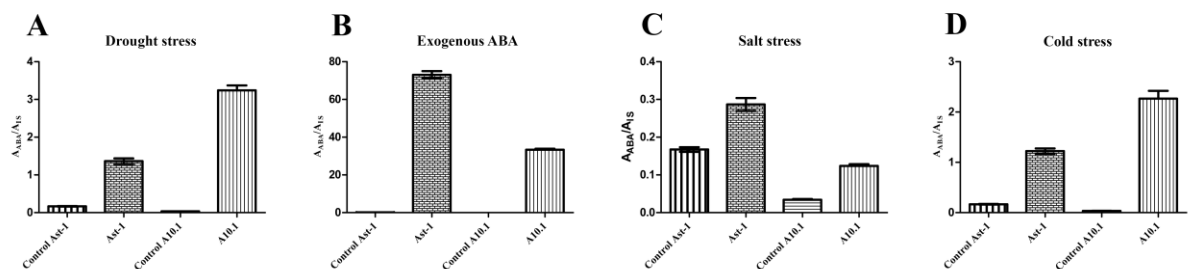


Fig 8 LC-MS analysis of ABA leaf accumulation in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis* submitted to (A) drought, (B) exogenous ABA, (C) salt and (D) cold. The results are shown as the peak areas ratio obtained from samples and peak areas obtained from the internal standard (A_{ABA}/A_{IS}).

SUPPLEMENTAL DATA

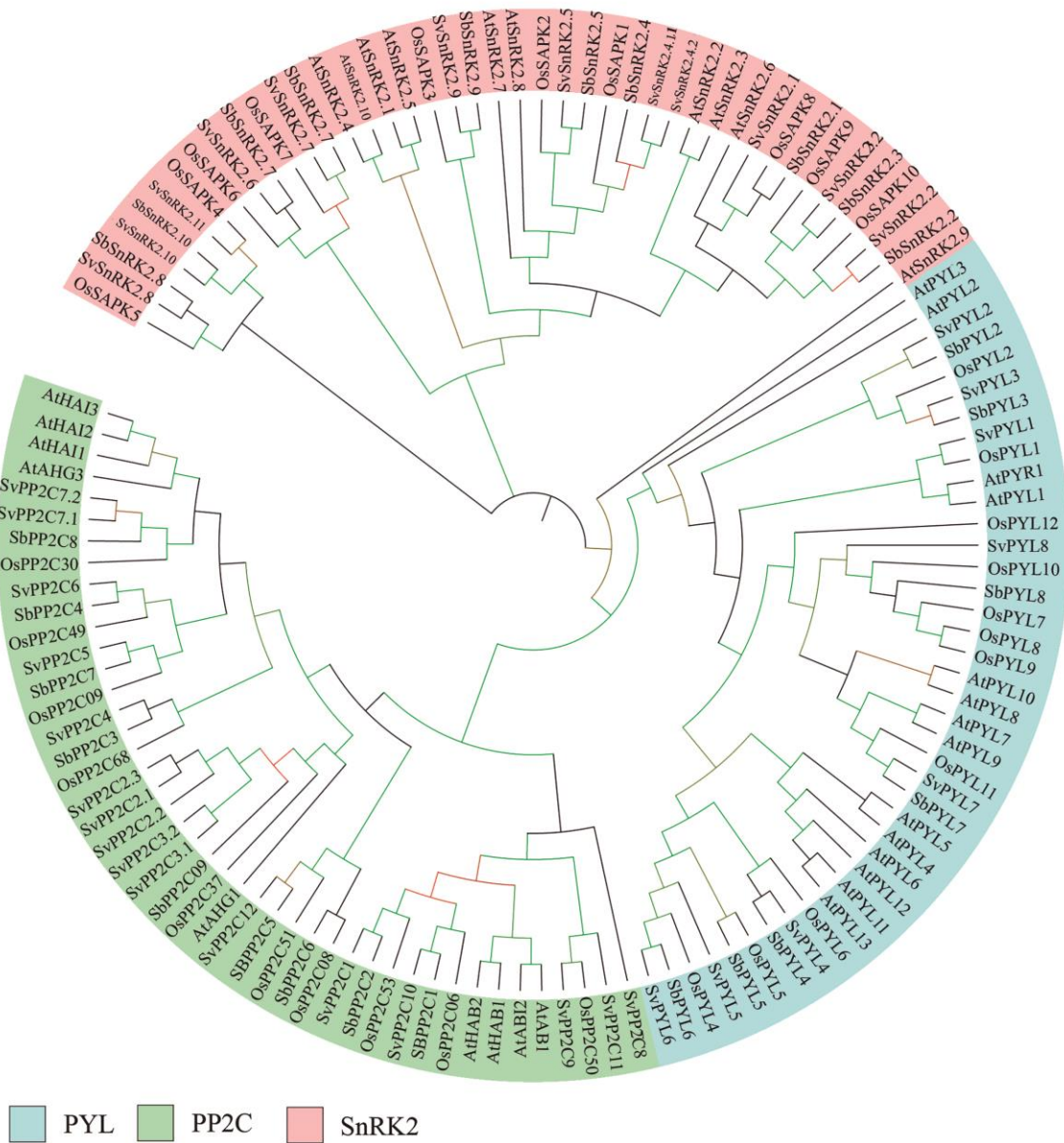


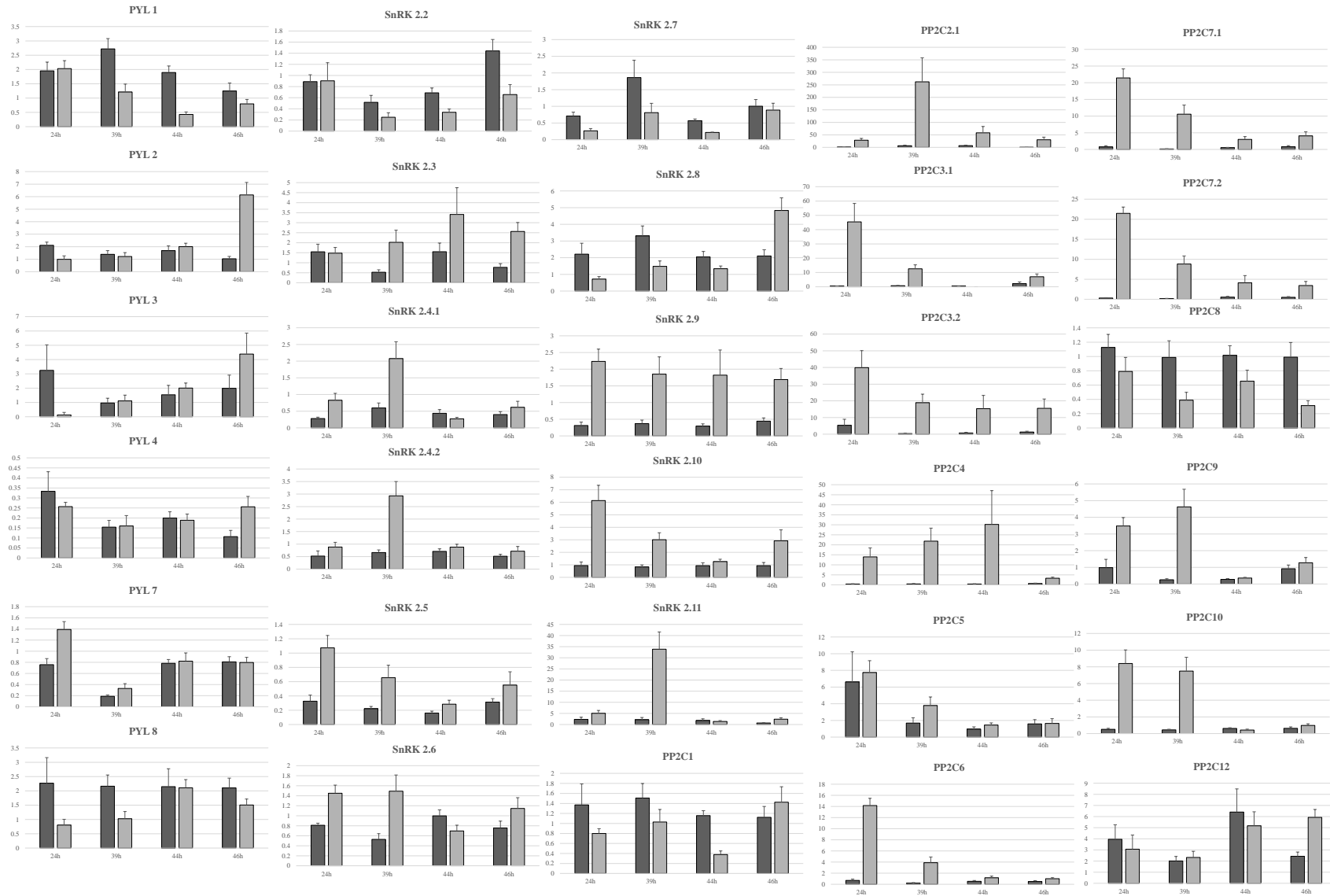
Fig S1 Phylogenetic analysis of ABA core signalling components from *S. viridis*. Maximum likelihood phylogeny of functionally characterized SvPYL / SvPP2C / SvSnRK2 proteins and their close homologs from *Arabidopsis thaliana* (At), *Sorghum bicolor* (Sb) and *Oryza sativa* (Os). The phylogenetic tree was constructed using FastTree 2.1.5 program. Branch colour scale represents SH-like local support (red to lower values and green to higher values).

<i>Sv genes</i>	Drought		Rewatering		Salt stress		Cold stress		Exogenous ABA	
	A10.1	Ast-1	A10.1	Ast-1	A10.1	Ast-1	A10.1	Ast-1	A10.1	Ast-1
<i>PYL 1</i>	L	L			E					
<i>PYL 2</i>	E				E				L	
<i>PYL 3</i>	E	E			E	E				E
<i>PYL 4</i>	E	L			E	E			*	E
<i>PYL 5</i>					L	E				
<i>PYL 6</i>						E				
<i>PYL 7</i>	E	E								
<i>PYL 8</i>	E				E				E	
<i>PP2C1</i>	E	E								
<i>PP2C2.1</i>	L	L			E	L				
<i>PP2C2.2</i>		L								
<i>PP2C3.1</i>	E				E	E			L	L
<i>PP2C3.2</i>	E				E	L			E	E
<i>PP2C4</i>	E	E			E					
<i>PP2C5</i>	L	L			E				E	
<i>PP2C6</i>	E	L			E				E	E
<i>PP2C7.1</i>	E	L			E			*	E	E
<i>PP2C7.2</i>	E	L			E				E	E
<i>PP2C8</i>	L				L					
<i>PP2C9</i>	E	L			E				E	E
<i>PP2C10</i>	E	L			E	E			E	E
<i>PP2C 12</i>					E	L			E	E
<i>SnRK 2.1</i>		E								
<i>SnRK 2.2</i>	L									
<i>SnRK 2.3</i>	L	L			L				E	E
<i>SnRK 2.4.1</i>	L	L			E	E		*		
<i>SnRK 2.4.2</i>	L	L			E	E		*	E	
<i>SnRK 2.5</i>	E	L				E			E	
<i>SnRK 2.6</i>	E	E								
<i>SnRK 2.7</i>	E				E					
<i>SnRK 2.8</i>	E				E	E				
<i>SnRK 2.9</i>	E	L			E	L			E	E
<i>SnRK 2.10</i>	E	L			E					
<i>SnRK 2.11</i>	L	L			E	L				E

Down	Up	No change
2-3	2-3	p > 0.05
4-10	4-10	
>10	>10	

Fig S2 Expression profile of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes in different abiotic stresses in two accessions of *S. viridis* (A10.1 and Ast-1). The figure shows the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (control; 0h). * $P > 0.05$, unpaired t test.

A



B

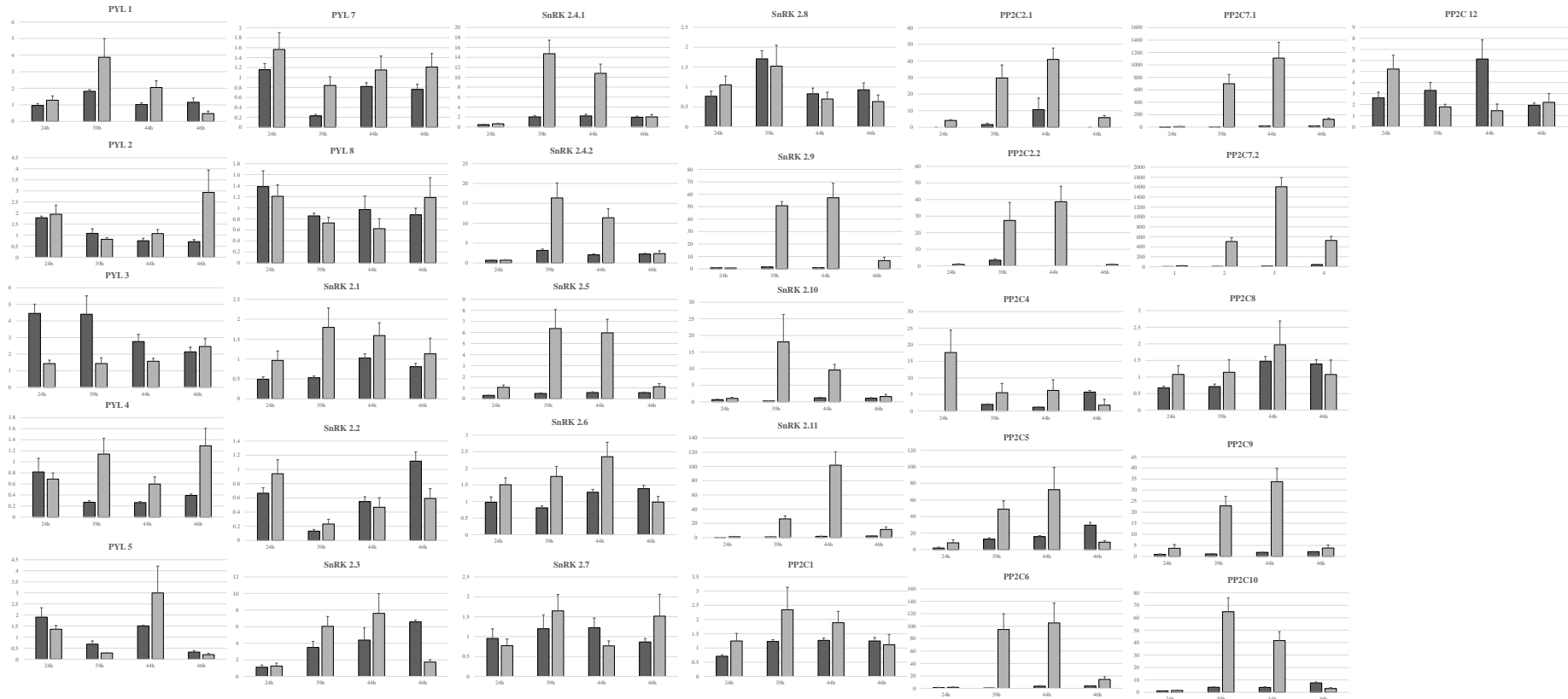
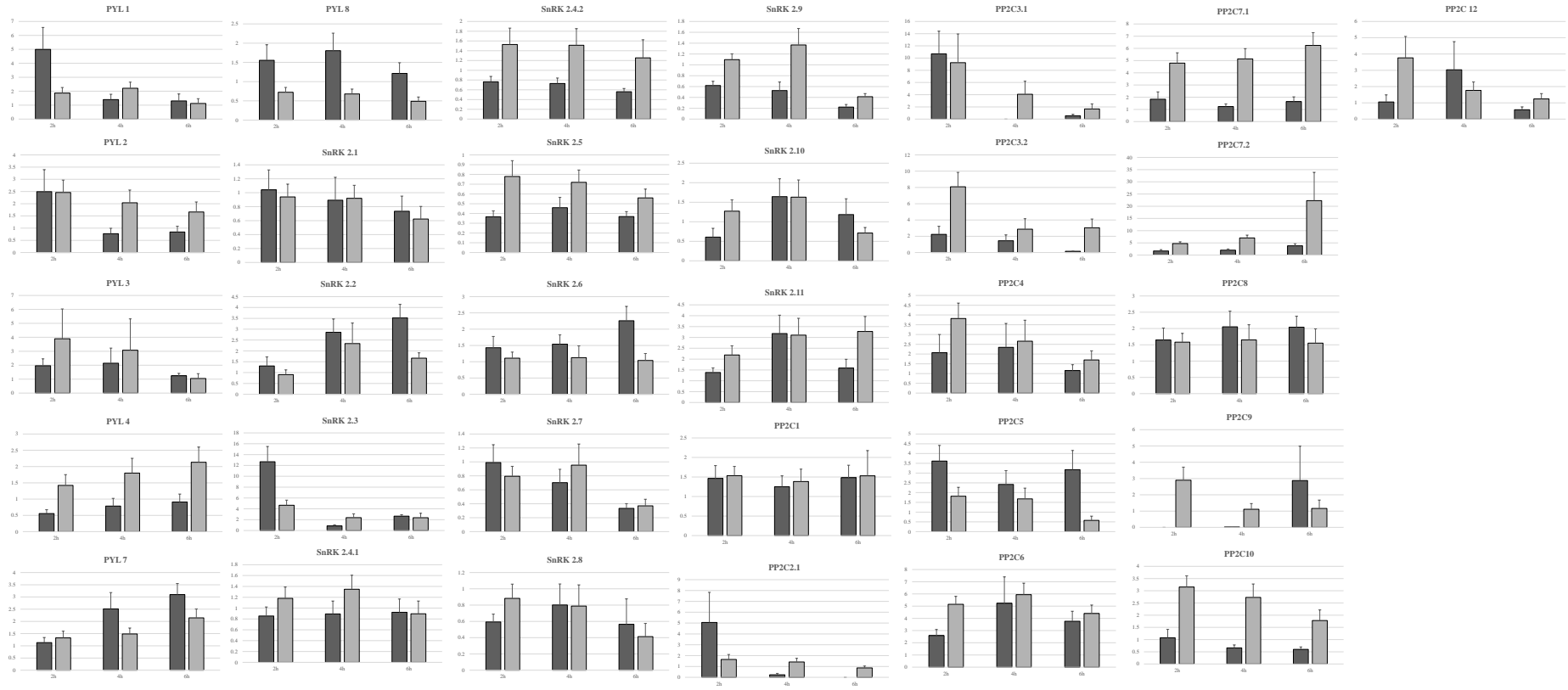


Fig S3 Expression profile of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes in different abiotic stresses in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis*. The graphics shows the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (control; 0 h). (A):A10.1 with drought stress. (B) Ast-1 with drought stress.

A



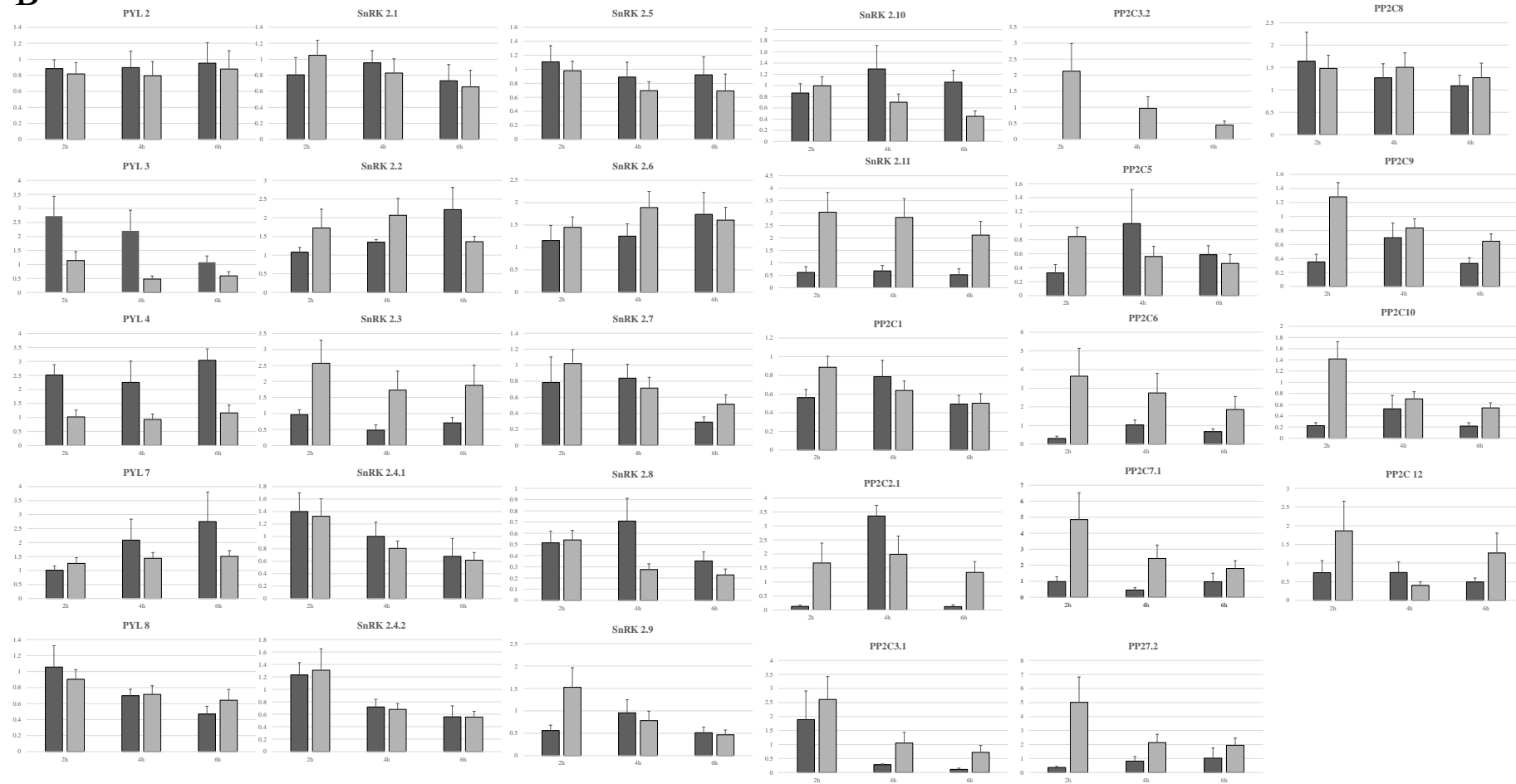
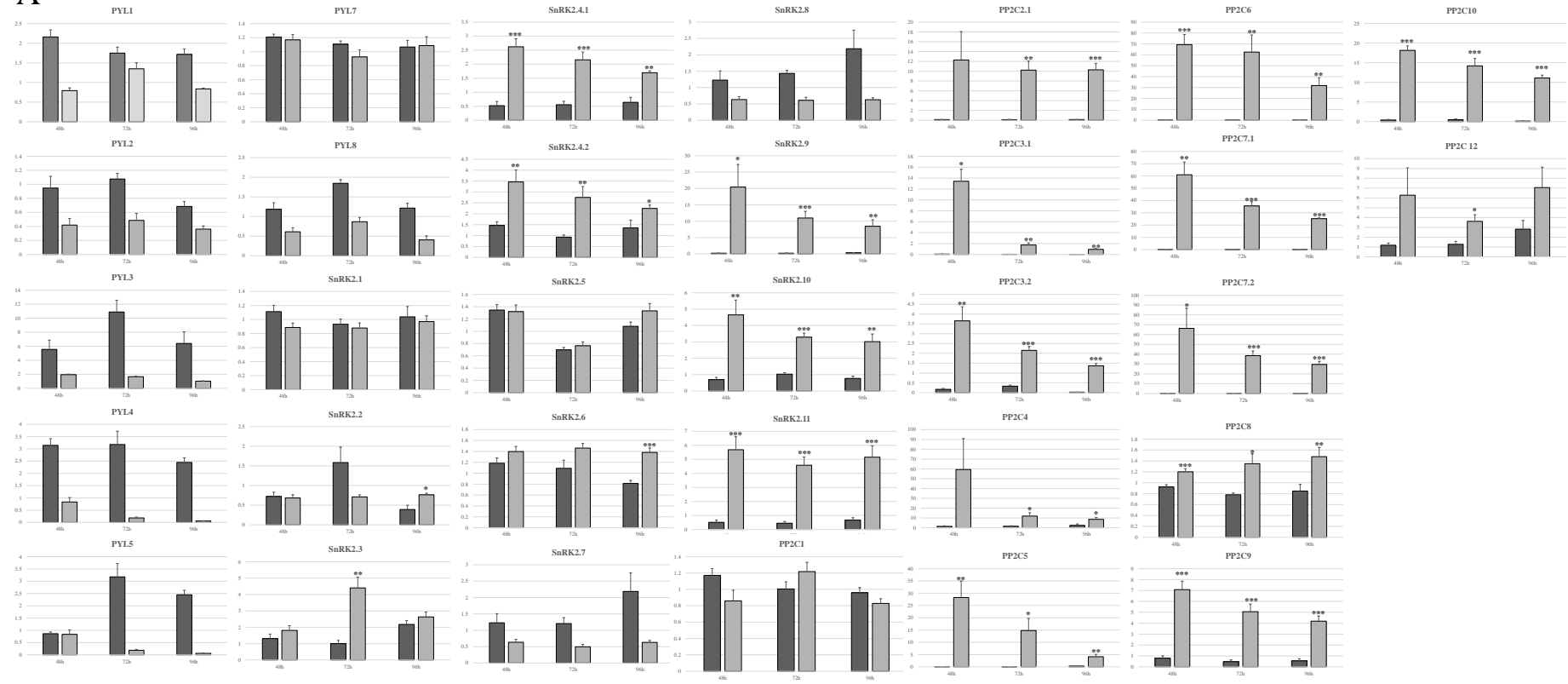
B

Fig S4 Expression profile of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes in different abiotic stresses in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis*. The graphics shows the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (control; 0h). (A) A10.1 treated with exogenous ABA. (B) Ast-1 treated with exogenous ABA.

A



B

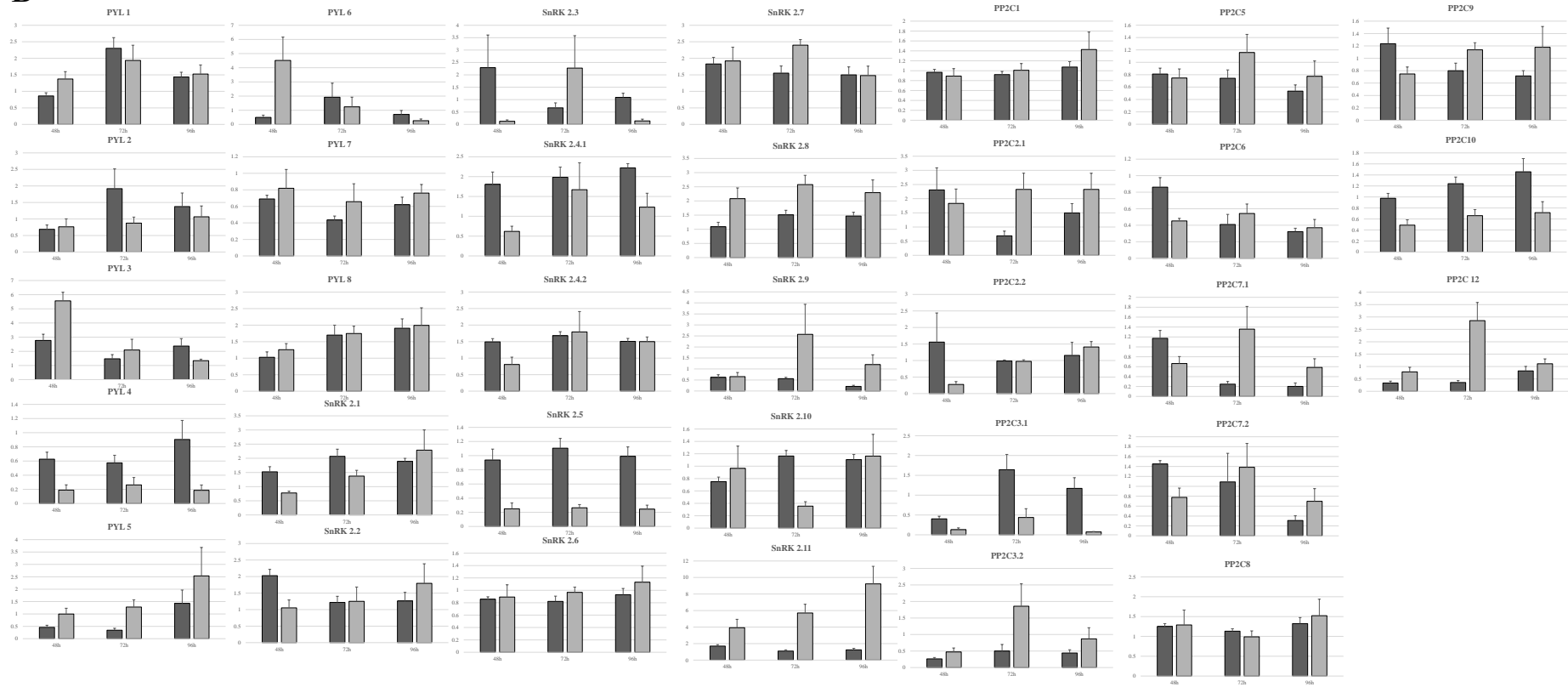
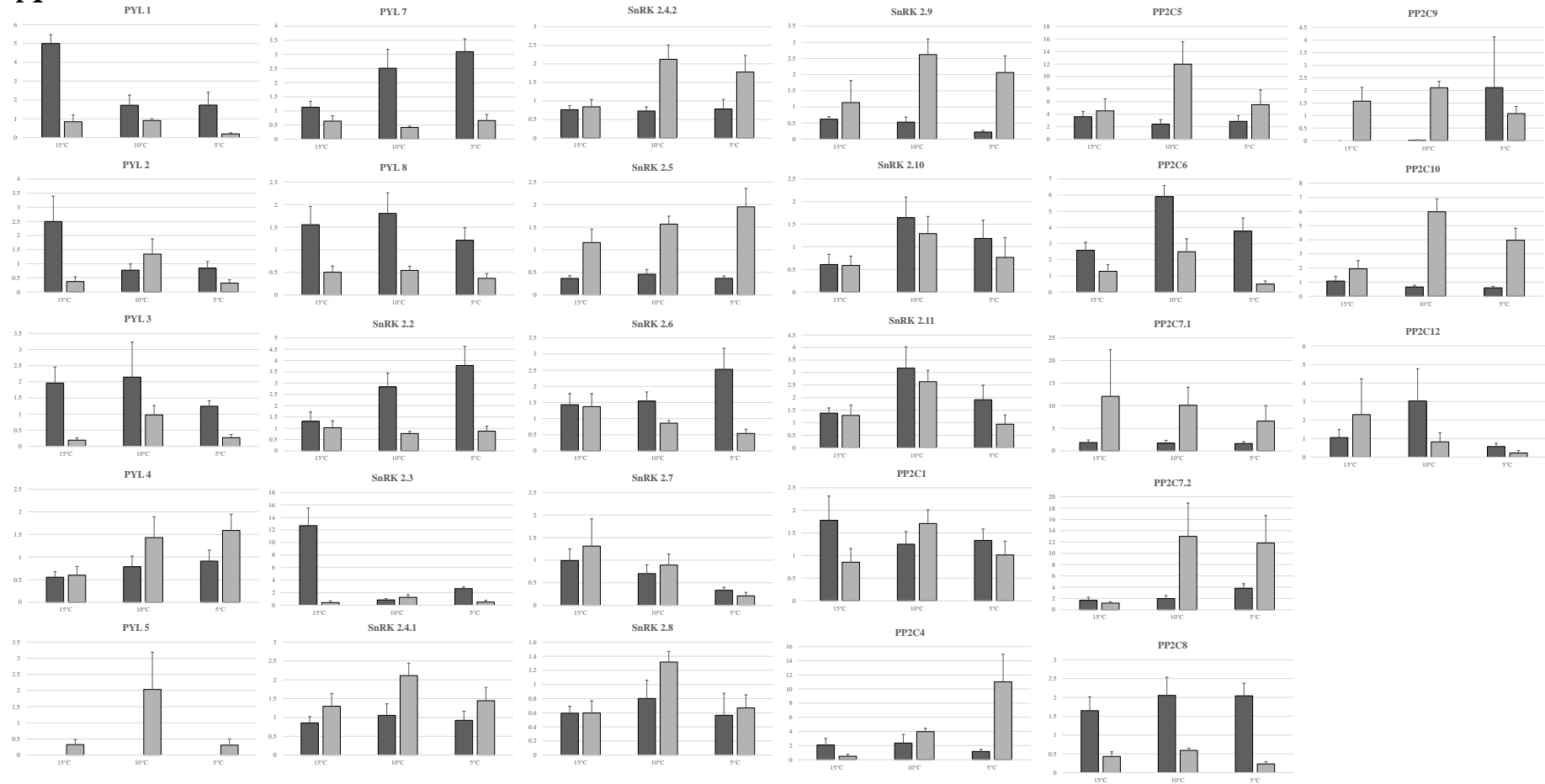


Fig S5 Expression profile of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes in different abiotic stresses in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis*. The graphics shows the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (control; 0 h). (A) A10.1 treated with salt stress. (B) Ast-1 treated with salt stress.

A

B

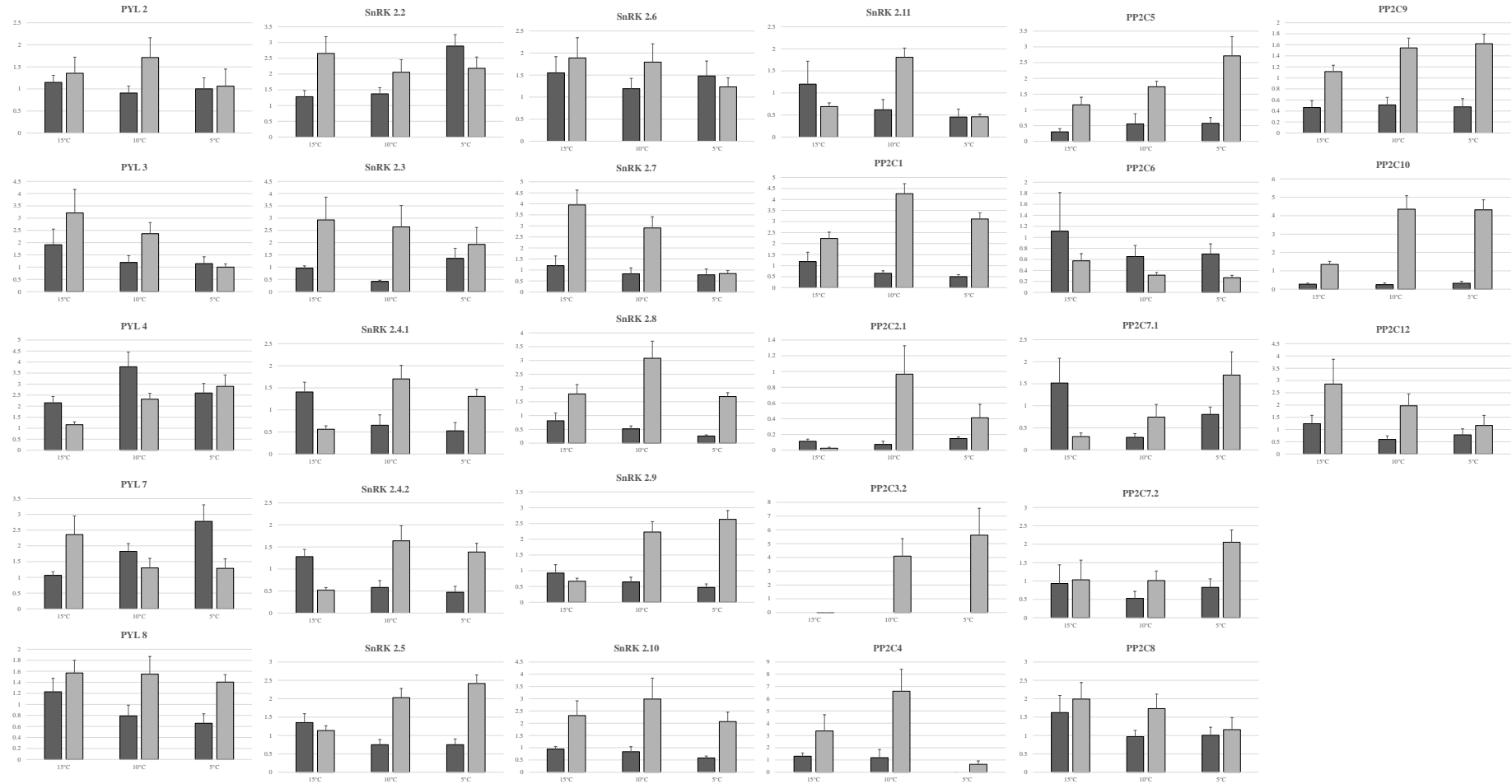


Fig S6 Expression profile of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes in different abiotic stresses in A10.1 and Ast-1 accessions of *S. viridis*. The graphics shows the fold-change in expression of genes when compared to non-stress conditions at the beginning of the experiment (control; 0 h). (A) A10.1 treated with cold stress. (B) Ast-1 treated with cold stress.

Table S1 Orthologs of *SvPYL*, *SvPP2C* and *SvSnRK2* genes compared to those of *S. bicolor* and/or *O. sativa*, and *A. thaliana*.

# Species	Genes	Alg.-Com.	Os_PP2C	Sv_PP2C	Sb_PP2C	At_PP2C
4	4	1	OsPP2C06	SvPP2C10	SbPP2C1	AtHAB1
3	5	0.166	OsPP2C08,OsPP2C51	SvPP2C12	SbPP2C6,SbPP2C5	*
4	9	0.14	OsPP2C09,OsPP2C30	SvPP2C7.2,SvPP2C7.1,SvPP2C5	SbPP2C8,SbPP2C7	AtHAI3,AtHAI2
4	5	0.166	OsPP2C37	SvPP2C3.1,SvPP2C2.1	SbPP2C9	AtAHG1
3	3	1	OsPP2C49	SvPP2C6	SbPP2C4	*
2	2	1	OsPP2C50	SvPP2C9	*	*
4	4	1	OsPP2C53	SvPP2C1	SbPP2C2	AtABI2
3	3	1	OsPP2C68	SvPP2C4	SbPP2C3	*
# Species	Genes	Alg.-Com.	Os_PYL	Sv_PYL	Sb_PYL	At_PYL
3	4	0.5	OsPYL1	SvPYL1	*	AtPYR1,AtPYL1
4	5	0.4	OsPYL10	SvPYL8	SbPYL8	AtPYL9,AtPYL8
3	3	1	OsPYL11	*	SbPYL7	AtPYL7
4	5	0.166	OsPYL2	SvPYL2	SbPYL3,SbPYL2	AtPYL2
4	4	0.5	OsPYL4	SvPYL6	SbPYL6	AtPYL6
4	4	0.5	OsPYL5	SvPYL5	SbPYL5	AtPYL5
4	4	1	OsPYL6	SvPYL4	SbPYL4	AtPYL4
2	2	1	*	SvPYL3	*	AtPYL3
# Species	Genes	Alg.-Com.	Os_SnRK2	Sv_SnRK2	Sb_SnRK2	At_SnRK2
4	8	0.25	OsSAPK8,OsSAPK10	SvSnRK2.2,SvSnRK2.1, SvSnRK2.3	SbSnRK2_1,SbSnRK2_2	AtSnRK2_6,AtSnRK2_3
3	3	0.667	OsSAPK4	SvSnRK2.10	SbSnRK2_10	*
4	8	0.113	OsSAPK2,OsSAPK1	SvSnRK2.5,SvSnRK2.4.1	SbSnRK2_4,SbSnRK2_5	AtSnRK2_7,AtSnRK2_8
4	10	0.544	OsSAPK7,OsSAPK6	SvSnRK2.7,SvSnRK2.6	SbSnRK2_6,SbSnRK2_7	AtSnRK2_5,AtSnRK2_4,AtSnRK2_10,AtSnRK2_1
4	5	0.2	OsSAPK5	SvSnRK2.11,SvSnRK2.8	SbSnRK2_8	AtSnRK2_9
3	3	1	OsSAPK3	SvSnRK2.9	SbSnRK2_9	*
2	2	1	OsSAPK9	*	SbSnRK2_3	*

Table S2 Sequence of the primer pairs used for RT-qPCR analyses.

Gene name	<i>S. viridis</i> Phytozome ID	Primer Sequences (5' - 3')
PYL 1 ou PYL1	Sv 9G318000	F: GCGAGGTCAGCGTCATC R: GGTGATGGAGAAGCCGAAG
PYL 2	Sv 1G031000	F: GTTGGTGACATCGACTGAAATG R: GACTGCAGGGATAAGGATAG
PYL 3	Sv 4G251800	F: CGTCGTCGTCGAGTCCTA R: TCTGGAGGTTGAGCCTGA
PYL 4	Sv 9G441100	F: TCGTCGTGGAGTCCTACAT R: CTGGAGGTTGCACCTGAC
PYL 5	Sv3G213000	F: CGTGGTGGTCGAGTCGTA R: CAGCGACTGGAGGTTGC
PYL 6	Sv 5G374800	F: AGTCCTACGTGGTGGATGTA R: GACCCATAACCTTGCGTTCTA
PYL 7	Sv 3G077900	F: TGAGACATGCTACTTTGTCGAG R: GAGCGGTGATGTAGGAGATTG
PYL 8	Sv 1G013800	F: GTGATCGAGTCCTTCGTTGTG R: CGACTTGAGGTTGCACTTGA
SnRK2.1	Sv 9G078200	F: CTGGAGAACACACTGCTAGATG R: GGTCCTCCACATGACCATAC
SnRK2.2	Sv 9G167300	F: CATTGCTCCTGAGGTTCTTCT R: GATCTTGGCACTCTGGAGATATG
SnRK2.3	Sv 3G387400	F: TCCCGACTATGTCCATGTATCT R: ACGAACCAAGGATGGCTTATT
SnRK2.4.1	Sv 9G384100.1	F: TGCACTGCTGGGAGATTTAG R: GTGGTGCAACACTACCATCTA
SnRK2.4.2	Sv 9G384100.2	F: GAACCTGCCCATGAGATGA R: CTGGATGATCGCCATGACTT
SnRK2.5	Sv 2G405700	F: GTTGTGCTAACTCCACACA R: TTGGTCATCCTCGCTAAATCTC
SnRK2.6	Sv 1G194000	F: GGGAGAATTACGATTAGGGAGATTAG R: GGGCACTGTTGTCCTTCTT
SnRK2.7	Sv .7G108300	F: CTGTGGAGTGACCCTTTATGT R: GGTTCTGATCTCCCTAATTGT
SnRK2.8	Sv 3G004100	F: GCAGTACAAGATTCCAGAGTATG R: GGGTTTGCACGAAGATG
SnRK2.9	Sv 9G323900	F: GAATATGCTGCTGGTGGAGAG R: CAAGGAGGGTGTCTCAAGTTTA
SnRK2.10	Sv 3G235900	F: GGGTGATCCTAACTCCAACAC R: TTGCTCATCCTCGCTAAACC
SnRK2.11	Sv 5G400900	F: GTGGGAGCATAACCATTTGA R: GGAACCATGGATGGCTCTTTA
PP2C1	Sv 3G124100	F: AGCCAAACAGGGAAGATGAG

Gene name	<i>S. viridis</i> Phytozome ID	Primer Sequences (5' - 3')
PP2C2.1	Sv 6G004900.1	R: GATCGGGACATGGCAAGAA
		F: GTGATCTACATCAACGGCCATC
PP2C2.2	Sv 6G004900.2	R: ATCTCAGGCTCAGCGATCA
		F: ATGCGTGGCAGCAAGTTA
PP2C3.1	Sv 7G004500.1	R: ATTCGGAAGGTGCTGGAATG
		F: GTCGAGCAAGGTGAAGAAGTAG
PP2C3.2	Sv 7G004500.2	R: GCCGCCAGAACCTGATG
		F: GTCGAGCAAGGTGAAGAAGTAG
PP2C4	Sv 2G184100	R: CTCAGCGCACC ACTTCT
		F: GACGAGTGCCTCATCCTG
PP2C5	Sv 5G384400	R: TCGAACTCCGAGACCACTT
		F: GACGCAGGTTGGAGATGAG
PP2C6	Sv 3G223900	R: CGTCAAAGACGCCAAAGAAAT
		F: GACGCCGTGTCCATCAG
PP2C7.1	Sv 9G463500.1	R: AGGATCAGGAACTCGTCCTC
		F: CCATTGGCGACAGCTACC
PP2C7.2	Sv 9G463500.2	R: ACCTCGTTGCTCACCAC
		F: CTGAAGCCGTTTCGTGATCT
PP2C8	Sv 1G014100.1	R: CTAGCTAGAACCAAGCATTCCA
		F: ACAGGATCGATGAGCGAAAG
PP2C9	Sv 3G168300.1	R: TTGATCGCGACATAGCAAGTAT
		F: GAGCCTGACAGAAAGGATGAG
PP2C10	Sv 5G211600	R: GACCGTGACATTGCAAGAAC
		F: CTAACAGGGAGGATGAGTATGC
PP2C12	Sv3G141300	R: TGGCCAGGATGAGGAACT
		F: CCACTGATCACAAGGTGACTAC
CUL	Sevir.3G038900	R: CTTGCCAACAACCACCAATC
		F: TCTCATCACGAGGGACTACTT
CAC	Sevir.1G284400	R: GTATGATCCTGCTCTCGTGATG
		F: CTGCTTCTGGTCTTCGTGTT
EFL1	Sevir.3G272400	R: CTCGTGGTGCATCTCAACTGA
		F: TGGTATGCTTGTACCTTTGGT
EFL4	Sevir.1G088000	R: ACCACTCCTCCAGAACATAGA
		F: GTCTGCTAAGGTGCTGGATAAA
SUI	Sevir.2G348300	R: ACAATGCCAGCCTGGACAA
		F: CCAGAGCTTGGACAGGTCATTC