UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PEDRO BOSCARIOL FERREIRA

SCI1 e NtCDKG;2 atuam no ciclo celular, no processamento de RNAs e no desenvolvimento floral em *Nicotiana tabacum*

Ribeirão Preto

2020

PEDRO BOSCARIOL FERREIRA

SCI1 e NtCDKG;2 atuam no ciclo celular, no processamento de RNAs e no desenvolvimento floral em *Nicotiana tabacum*

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ferreira, Pedro Boscarol

SCI1 e NtCDKG;2 atuam no ciclo celular, no processamento de RNAs e no desenvolvimento floral em *Nicotiana tabacum* / Pedro Boscarol Ferreira; orientadora, Maria Helena de Souza Goldman. - 2020

310 f. : 35 il.

Tese (Doutorado em Ciências) - Program de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2020

Versão Original

Nome: Pedro Boscariol Ferreira

Título: SCI1 e NtCDKG;2 atuam no ciclo celular, no processamento de RNAs e no desenvolvimento floral em *Nicotiana tabacum*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2016/20486-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro a projetos do laboratório.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo suporte financeiro concedido para a participação de eventos científicos.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela oportunidade e suporte durante a realização do mestrado e do doutorado.

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilização da infraestrutura.

À Prof. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, por ter me acolhido há mais de 8 anos atrás, e me dado a oportunidade de explorar caminhos novos no laboratório. Também a agradeço por ser um exemplo profissional como pesquisadora e principalmente como professora. Agradeço pela correção da tese, e pelas sugestões importantes que contribuíram para que ela fosse escrita. Agradeço também o carinho e dedicação dentro e fora do laboratório.

À Dra. Greice Lubini, por estar do meu lado também há mais de 8 anos, primeiro me ensinando a trabalhar na bancada, depois sendo colega, muitas vezes em experimentos longos. Agradeço muito por ser uma companheira em todos os momentos. Agradeço imensamente pela ajuda durante a redação dessa tese, com as correções e sugestões valiosas. Também a agradeço por ser mais um exemplo de profissional e professora a ser seguido.

À Dr. Andréa Carla Quiapim, pelo auxílio imensurável durante a realização de todos os experimentos que fiz desde a iniciação científica. Seria impossível desenvolver esse

trabalho sem a sua participação. Também agradeço pelo companheirismo, e por sempre estar disposta a enfrentar clonagens difíceis.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, FFCFRP/USP, pela utilização de suas estruturas e recursos.

À Dra. Marcela Savoldi, técnica do Laboratório de Biologia Molecular da FCFRP-USP, pela ajuda na operação dos equipamentos e envio rápido dos resultados.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) – FMRP pela utilização dos aparelhos de microscopia confocal.

À Msc. Elizabete Rosa Milani, técnica do LMMC, pela ajuda no uso do microscópio confocal, e pelas discussões sobre os experimentos, que muitas vezes não foram como o esperado, mas deram luz a novos caminhos a explorar.

À Susie Adriana Penha Nalon, secretária do Departamento de Genética, pelo apoio, motivação, e informações imprescindíveis para o andamento e finalização do doutorado.

A todas as professoras e professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelas disciplinas formadoras oferecidas durante o doutorado.

Às professoras Dra. Nádia Monesi e Dra. Zilá Luz Paulino Simões e ao professor Dr. Klaus Hartmann Hartfelder, pelas importantes sugestões como membros da banca avaliadora da qualificação do doutorado.

Ao Dr. Juca Abramo Barrera San Martin, por todas as discussões sobre experimentos que tivemos, que me ajudaram a repensar muitos caminhos durante o doutorado. Agradeço principalmente pelo apoio e motivação, dentro e fora do laboratório. O tempo em que convivemos foi muito importante para o meu doutorado, e principalmente para a minha vida fora do laboratório.

Ao Dr. Edward José Strini, por também me ajudar desde minha entrada no laboratório. Agradeço principalmente pelo desenho experimental do RNA-seq, e pela preparação das amostras para tal.

À Dra. Cristiane de Paula Gomes Calixto, agradeço por me motivar nas análises de RNA-seq, e por disponibilizar a versão adiantada do programa para analisá-lo.

Ao Dr. Luiz Eduardo Vieira Del Bem, agradeço pelas instruções e motivação nas análises filogenéticas. Através dessas análises, descobri um campo muito inspirador na biologia.

À Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius, agradeço pelo auxílio no planejamento da expressão e análise de proteínas, uma jornada difícil, porém valiosa.

Ao Dr. Tiago Santana Balbuena, agradeço pelo auxílio nos experimentos de espectrometria de massas, que foram um aprendizado muito importante.

Ao Dr. Aureliano Bombarely, agradeço pelas informações valiosas que auxiliaram nas análises de RNA-seq.

A todos os membros do LBMP, agradeço pela companhia e convivência que tornaram o doutorado mais leve. Ao Vitor, agradeço pelas provocações que me fizeram pensar melhor sobre meus experimentos e conclusões precipitadas. À Vanessa (Poti), agradeço por sempre ser parceira, dentro e fora do laboratório. À Joelma, agradeço por nossas conversas, e por me aturar quando eu queria opinar nos seus experimentos. Ao Fábio, agradeço por sempre topar fazer experimentos diferentes, sua disposição é motivadora. Ao Rodrigo, agradeço pelos momentos de descontração. À Ana Laura, também agradeço pelos momentos de descontração. Esses são pequenos exemplos dos meus agradecimentos a todos vocês, mas saibam que foram e são muito importantes para mim.

Aos membros mais antigos do laboratório, também agradeço pela ajuda na formação científica e pessoal. À Lígia e à Hebreia, agradeço por me ajudarem na iniciação científica, e serem ótimas companheiras de almoço. Ao Amau, agradeço pelas conversas sobre experimentos e sobre a vida. Ao Leo, agradeço pela oportunidade de orientar parte de sua iniciação científica. À Pat, agradeço por ter sido um pilar todas as vezes que precisei durante o doutorado, dentro do laboratório e principalmente fora dele.

À minha mãe e ao meu pai, agradeço imensamente pela paciência, pelo amor, pelas conversas, e por tudo que não cabe aqui. Seu apoio e motivação sempre foram e são muito importantes para mim.

À minha avó Naide, agradeço pelo importante papel na minha vida. Seu interesse pelas flores sempre me motivou a entendê-las melhor.

À toda minha família agradeço pelo apoio, motivação, pelas distrações que tornaram esse processo mais leve, e pelas reuniões que apesar de poucas sempre são muito valiosas.

Aos meus amigos, também agradeço pelos momentos de distração, por me aturar quando falava dos meus experimentos, e por estarem comigo por tanto tempo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho, agradeço.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo e eventos importantes do desenvolvimento floral.	22
Figura 2. Redes moleculares da formação e terminação do meristema floral.	24
Figura 3. O ciclo celular em plantas e seus principais eventos.	30
Figura 4. Transição G1/S do ciclo celular de plantas.	32
Figura 5. Transição G2/M do ciclo celular de plantas.	33
Figura 6. Expressão de <i>SCI1</i> durante o desenvolvimento da flor de <i>N. tabacum</i>	35
Figura 7. Análise de componentes principais das amostras de RNA-seq.	66
Figura 8. Correlação entre os valores de diferença na expressão avaliados por RNA-seq e RT-qPCR.	69
Figura 9. Genes DE em estigmas/estiletes de plantas silenciando <i>SCI1</i> , que podem ser associados às diferentes fases do ciclo celular.	72
Figura 10. Expressão de <i>SCI1</i> durante o ciclo celular em cultura de células BY-2.	83
Figura 11. Análise de super-representação dos genes DE durante o ciclo celular de células BY-2.	84
Figura 12. Genes DE em plantas silenciando <i>SCI1</i> e suas possíveis relações com o desenvolvimento floral.	96
Figura 13. Genes DE em estigmas/estiletes de plantas silenciando <i>SCI1</i> que podem estar envolvidos em vias de processamento de RNAs.	103
Figura 14. Caracterização dos genes <i>NtSR30</i> e <i>AtSR30</i>	107
Figura 15. Comparação entre as sequências de aminoácidos das proteínas <i>NtSR30</i> e <i>AtSR30</i>	111
Figura 16. Análise de expressão diferencial de transcritos de <i>NtSR30</i> por RNA-seq.	113
Figura 17. Análise da presença de transcritos alternativos de <i>NtSR30</i>	115
Figura 18. Expressão de <i>NtCDKG;2</i> em diferentes tecidos de <i>N. tabacum</i> , por RNA-seq.	117
Figura 19. Diferenças nos tamanhos de sementes em plantas com expressão alterada de <i>NtCDKG;2</i>	118
Figura 20. <i>Western blot</i> de amostras de diferentes tecidos de <i>N. tabacum</i> com o anticorpo policlonal anti- <i>NtCDKG;2</i>	121

Figura 21. Identificação de peptídeos PEST na sequência de aminoácidos de NtCDKG;2.	123
Figura 22. Comparação dos elementos nas sequências de aminoácidos de NtCDKG;2, CDK11 e AtCDKG;2.	126
Figura 23. Conservação do domínio quinase de NtCDKG;2, CDK11 e AtCDKG;2.	130
Figura 24. Ensaio de duplo-híbrido em leveduras, mostrando que NtCDKF;1 interage com o domínio quinase NtCDKG;2.....	132
Figura 25. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de CDKGs em diferentes espécies de plantas.....	138
Figura 26. Gene repórter para avaliar o <i>splicing</i> em plantas.	148
 Figura A. 1. Gráficos de tendência de variância-média da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de estigmas/estiletos de <i>N. tabacum</i>	180
Figura A. 2. Gráficos da distribuição da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de estigmas/estiletos de <i>N. tabacum</i>	181
 Figura D. 1. Análise de PCA das amostras de RNA-seq do ciclo celular de BY-2..	266
Figura D. 2. Gráficos de tendência de variância-média da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de células BY-2	266
Figura D. 3. Gráficos da distribuição da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de células BY-2.....	267
Figura D. 4. Perfis de co-expressão gênica identificados durante o ciclo celular em BY-2.	269
 Figura E. 1. Detalhe do alinhamento de sequências de CDKGs de diferentes espécies de plantas.....	277
Figura E. 2. Árvore filogenética e representações das sequências de aminoácidos de CDKGs de plantas.....	278
Figura E. 3. Árvore filogenética e representações das sequências de aminoácidos de CDKGs de plantas.....	279

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para os experimentos de RT-qPCR e RT-PCR.	49
Tabela 2. Resultado do mapeamento das reads sequenciadas ao transcriptoma referência	65
Tabela 3. Termos GO da categoria “Processo Biológico” enriquecidos no experimento de RNA-seq.	70
Tabela 4. Descrição dos genes DE nas categorias “ciclo celular”, “replicação de DNA” e “reparo de DNA” ..	78
Tabela 5. Descrição dos genes DE na categoria “resposta à auxina”	86
Tabela 6. Descrição dos genes DE na categoria “desenvolvimento de estrutura reprodutiva”	90
Tabela 7. Descrição dos genes DE na categoria “processamento de RNAs”	100
Tabela 8. Transcritos produzidos pelos genes NtSR30 e AtSR30	109
Tabela 9. Descrição das sequências de CDKGs apresentadas na árvore da Figura 25.	141
Tabela B. 1. Genes DE em estigmas/estiletos de plantas silenciando SCI1 em comparação com a planta controle	184
Tabela C. 1. Lista dos 160 termos GO enriquecidos da categoria “Processo Biológico”	252
Tabela C. 2. Lista dos 43 termos GO enriquecidos da categoria “Função Molecular”	258
Tabela C. 3. Lista dos 54 termos GO enriquecidos da categoria “Componente Celular”	260
Tabela D. 1. Características das amostras de sequenciamento produzidas por Trolet et al. (2019)	265
Tabela D. 2. Tabela dos genes DE associados ao ciclo celular em estigmas/estiletos de plantas silenciando SCI1, com os seus perfis de co-expressão durante o ciclo em células BY-2	270
Tabela D. 3. Dados e resultados do teste hipergeométrico de enriquecimento de clusters	273

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i> – Complexo Promotor da Anáfase/Ciclossomo
BGI	<i>Beijing Genome Institute</i> - Instituto de Genômica de Pequim
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i> – Quinase Dependente de Ciclina
CPM	Contagens Por Milhão
C-terminal	Carboxi-terminal
DE	[genes] diferencialmente expressos
EK	Ácido Glutâmico/Lisina
FC	<i>Fold-change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i> - Taxa de Falso Descobrimento
FM	<i>Floral Meristem</i> – Meristema Floral
GA	<i>Gibberellic Acid/Gibberellins</i> - Giberelinas, Ácido Giberélico
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> - proteína verde fluorescente
GO	<i>Gene Ontology</i>
IM	<i>Inflorescence Meristem</i> – Meristema de Inflorescência
log ₂ FC	log ₂ (<i>Fold-Change</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i> - RNA mensageiro
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> - sinal de localização nuclear
NMD	<i>Nonsense-Mediated Decay</i> - Degradação Mediada por Mutações Nonsense
nt	nucleotídeos
N-terminal	Amino-terminal
ORF	<i>Open Reading Frame</i> - Qaudro aberto de leitura
pb	Pares de bases [de nucleotídeos]
PC	<i>Principal Component</i> - componente principal
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> - análise de componentes principais

PEST	Prolina, Ácido Glutâmico, Serina e Treonina
PTC	<i>Premature Termination Codon</i> - Códon de Terminação Prematura
RNAPII	RNA polimerase II
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i> - sequenciamento de RNAs em larga escala
RNP	Ribonucleoproteína
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i> - Motivo de reconhecimento de RNAs
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> - RNA ribossomal
RS	Arginina/Serina
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i> – Checagem da Montagem do Fuso Mitótico
SAM	<i>Shoot Apical Meristem</i> – Meristema Apical do Caule
SR	Serina/Arginina
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
TMM	<i>trimmed mean of M values</i> - média truncada de valores M
TPM	Transcritos Por Milhão

RESUMO

FERREIRA, Pedro Boscariol. SCI1 e NtCDKG;2 atuam no ciclo celular, no processamento de RNAs e no desenvolvimento floral em *Nicotiana tabacum*. 2020. Tese (Doutorado em Ciências - Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O desenvolvimento das flores é um processo complexo, e depende da coordenação entre os eventos de formação das identidades dos órgãos, proliferação, diferenciação e expansão celular. Caso ocorra com sucesso, esse processo produz a flor, estrutura reprodutiva das Angiospermas, a qual é essencial para o seu ciclo de vida. Um dos genes que participa do desenvolvimento floral é *SCI1* (*Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1*). Esse gene é expresso desde a formação do meristema floral, e perturbações na sua expressão foram capazes de alterar o tamanho final do pistilo, mais especificamente, dos estigmas e estiletos. Estas alterações de tamanho ocorreram devido a alterações na proliferação celular durante o desenvolvimento do pistilo. No mecanismo de ação de *SCI1*, é proposto que essa proteína iniba a ação de complexos CDK-Ciclina, os quais são importantes para a progressão do ciclo celular. Um dos alvos de inibição por *SCI1* é a CDK NtCDKG;2, que possivelmente participa da formação do fuso mitótico. Para melhor entender os mecanismos de ação de *SCI1* durante o desenvolvimento das flores, foi utilizada a estratégia de RNA-seq. Com essa técnica, foi possível identificar alterações na expressão gênica em estigmas/estiletos de plantas transgênicas de silenciamento de *SCI1*. Dentre os 1.510 genes diferencialmente expressos (DE), 72,8% estão *down*-regulados nessas plantas em comparação com a planta controle. Em uma análise funcional, 84 genes DE podem ser associados ao ciclo celular, 39 são genes de resposta à auxina, 99 participam do desenvolvimento floral e 47 tem potencial papel no processamento de RNAs. Dos genes de ciclo celular, 46% têm maior expressão nas fases S e G2 do ciclo, o que indica uma relevância de *SCI1* nessas fases. Além disso, foi detectada a expressão diferencial de transcritos alternativos do gene *NtSR30*, que codifica uma proteína reguladora de *splicing*. Em estudos prévios, *SCI1* foi associado ao *splicing* devido a suas proteínas parceiras de interação. Os resultados deste trabalho contribuem para a hipótese da participação de *SCI1* nesse processo. Adicionalmente, NtCDKG;2 também possui parceiras de interação envolvidas no *splicing*, como NtCycL1 e NtRSZ21. Segundo análises de sequências de aminoácidos, neste trabalho foi esclarecido que NtCDKG;2 é homóloga de CDKG;2 de *Arabidopsis thaliana* e de CDK11 de *Homo sapiens*, ambas com papéis descritos no *splicing*. Além disso, análises filogenéticas de CDKGs de plantas, sugerem que essa CDK tem origem profunda na filogenia das plantas verdes, o que demonstra sua importância para essas espécies. Adicionalmente, foi verificado que a proteína NtCDKG;2 possui isoformas presentes de forma tecido-específica em órgãos vegetativos e reprodutivos. Interessantemente, em uma análise do tamanho de sementes em plantas transgênicas de superexpressão e silenciamento do gene *NtCDKG;2*, foi possível detectar diferenças que indicam a participação desse gene no desenvolvimento

desses órgãos. Em suma, este trabalho foi capaz de identificar as possíveis vias moleculares nas quais *SCI1* participa durante o desenvolvimento floral. Ademais, foi identificada sua importância nas fases S e G2 do ciclo celular, e que *SCI1* pode estar envolvido na regulação do *splicing*, possivelmente regulando *NtCDKG;2*, o que contribui para a caracterização desses genes.

Palavras-chave: Desenvolvimento floral. Ciclo celular. *Splicing*. Auxina. RNA-seq. CDKs.

ABSTRACT

FERREIRA, Pedro Boscariol. *SCI1* and NtCDKG;2 have roles in cell cycle, RNA processing, and flower development in *Nicotiana tabacum*. 2020. Tese (Doutorado em Ciências - Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Flower development is a complex process which depends on the fine-tuned coordination of organ identity establishment, cell proliferation, differentiation, and expansion. If this process occurs successfully, a flower is produced, and this Angiosperms reproductive structure is essential for the plant life cycle. One of the genes that participates in flower development is *SCI1* (*Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1*). This gene is expressed since the formation of the floral meristem, and disturbances in its expression were able to alter the final size of the pistil, more specifically, of the stigmas and styles. These size changes occurred due to changes in cell proliferation during pistil development. Regarding the mechanism by which *SCI1* affects cell proliferation, it is proposed that it inhibits CDK-cyclin complexes, which are important components of cell cycle control. One of the targets of *SCI1* is the NtCDKG;2, a CDK possibly involved in the mitotic spindle assembly. To better understand the molecular network by which *SCI1* acts during flower development, an RNA-seq strategy was employed. With this approach, differential gene expression was detected in stigmas/styles of transgenic plants silencing the *SCI1* gene, compared to the wild type. Among the 1,510 differentially expressed (DE) genes, 72.8%% are downregulated when *SCI1* is silenced. Functional classification of the DE genes revealed that 84 of them are connected to the cell cycle, 39 are auxin responsive genes, 99 are involved in flower development, and 47 are related to RNA processing. Of the cell cycle genes, 46% have greater expression in the S and G2 phases of the cycle, which indicates a relevance of *SCI1* in these phases. In addition, the differential expression of alternative transcripts of the NtSR30 gene, which encodes a *splicing* regulatory protein, was detected. In previous studies, *SCI1* was associated with *splicing* due to its interacting partner proteins. The results of this work contribute to the hypothesis of the participation of *SCI1* in this process. Additionally, NtCDKG;2 also has interaction partners involved in *splicing*, such as NtCycL1 and NtRSZ21. According to analyzes of amino acid sequences, in this work it was clarified that NtCDKG;2 is homologous to CDKG;2 of *Arabidopsis thaliana* and CDK11 of *Homo sapiens*, both with roles described in *splicing*. In addition, phylogenetic analyzes of plant CDKGs suggest that this CDK has a deep origin in the phylogeny of green plants, which demonstrates its importance for these species. Additionally, it was verified that the protein NtCDKG;2 has isoforms present in tissue-specific form in vegetative and reproductive organs. Interestingly, in an analysis of the seed size in transgenic plants of overexpression and silencing of the NtCDKG;2 gene, it was possible to detect differences that indicate the participation of this gene in the development of these organs. In short, this work was able to identify the possible molecular pathways in which *SCI1* participates during floral development. Furthermore, its importance in the S and G2 phases of the cell cycle was

identified, and that SCI1 may be involved in the regulation of *splicing*, possibly regulating NtCDKG;2, which contributes to the characterization of these genes.

Keywords: Flower development. Cell cycle. *Splicing*. Auxin. RNA-seq. CDKs.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Particularidades do modelo de estudo <i>Nicotiana tabacum</i>	20
1.2	Mecanismos moleculares do desenvolvimento floral	21
1.2.1	Início do desenvolvimento floral	23
1.2.2	Terminação do desenvolvimento floral	26
1.2.3	O hormônio auxina no desenvolvimento floral	27
1.3	A proliferação celular no desenvolvimento floral	28
1.3.1	Regulação do ciclo celular	29
1.4	Possíveis funções de <i>SCI1</i> no desenvolvimento floral	34
1.5	<i>NtCDKG;2</i> é uma CDK multifuncional	38
1.6	Hipótese inicial	43
1.7	Objetivos do trabalho	43
2	MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1	Análise de RNA-seq do silenciamento de <i>SCI1</i>	45
2.1.1	Desenho Experimental	45
2.1.2	Extração de RNA total	45
2.1.3	Sequenciamento	46
2.1.4	Quantificação da expressão gênica	46
2.1.5	Análise de Expressão Diferencial	47
2.1.6	Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos	47
2.2	Desenho de <i>primers</i>	48
2.2.1	<i>Primers</i> para RT-qPCR	48
2.2.2	<i>Primers</i> para RT-PCR	49
2.3	RT-qPCR	50
2.3.1	Análise de Eficiência de <i>Primers</i>	50
2.3.1.1	Extrações de RNA e síntese de cDNA	50
2.3.1.2	Teste de Eficiência	51
2.3.2	Expressão diferencial em plantas de silenciamento de <i>SCI1</i>	52
2.3.2.1	Cálculo dos valores de <i>Fold-change</i>	52
2.4	Comparação entre RNA-seq e RT-qPCR	53
2.5	RT-PCR de <i>NtSR30</i>	53

2.6 Análises de RNA-seq do ciclo celular de células BY-2	54
2.7 Análises da estrutura gênica de <i>NtSR30</i>	55
2.8 Expressão da proteína NtCDKG;2 em diferentes tecidos de <i>N. tabacum</i>	56
2.8.1 Extração de proteínas totais	56
2.8.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)	57
2.8.3 <i>Western Blot</i>	57
2.9 Teste de interação de NtCDKF;1 com os domínios de NtCDKG;2	58
2.10 Análise Fenotípica de Sementes	59
2.10.1 Material Vegetal	59
2.10.2 Medição do tamanho das sementes	60
2.11 Análises <i>in silico</i> de sequências de aminoácidos	61
2.12 Análises filogenéticas de CDKGs	61
3 Capítulo I - Análise do efeito do silenciamento de <i>SCI1</i> na expressão gênica em estigmas e estiletes	63
3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1.1 Análise da qualidade dos resultados do RNA-seq	64
3.1.2 O silenciamento de <i>SCI1</i> afeta negativamente a expressão da maioria dos genes diferencialmente expressos nos estigmas/estiletes de <i>N. tabacum</i>	66
3.1.3 Os genes diferencialmente expressos com o silenciamento de <i>SCI1</i> participam de diferentes processos biológicos	69
3.1.3.1 O silenciamento de <i>SCI1</i> afeta a expressão de genes que atuam em diferentes momentos durante o ciclo celular	71
3.1.3.1.1 A maioria dos genes de ciclo celular diferencialmente expressos possui expressão característica durante esse processo em células BY-2	81
3.1.3.2 <i>SCI1</i> pode ser um gene chave na via de sinalização por auxina ...	85
3.1.3.3 O silenciamento de <i>SCI1</i> afeta a expressão de genes chaves do desenvolvimento floral	89
3.1.3.4 O silenciamento de <i>SCI1</i> afeta genes que participam do processamento de RNAs, incluindo o <i>splicing</i>	100
3.1.4 Caracterização do fator de <i>splicing</i> NtSR30 em <i>N. tabacum</i>	105
3.1.4.1 Os genes <i>NtSR30</i> de <i>N. tabacum</i> e <i>SR30</i> de <i>A. thaliana</i> compartilham características estruturais, sugerindo que são homólogos funcionais	105
3.1.4.2 O silenciamento de <i>SCI1</i> afeta a expressão de transcritos alternativos de <i>NtSR30</i>	112
4 Capítulo II - Avanços na caracterização de NtCDKG;2.	116

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
4.1.1 O nível de expressão de NtCDKG;2 afeta o tamanho de sementes de <i>N. tabacum</i>.....	116
4.1.2 A proteína NtCDKG;2 possui diferentes isoformas nos órgãos de <i>N. tabacum</i>.....	119
4.1.3 NtCDKG;2 possui um peptídeo sinal PEST de degradação pelo proteassomo	122
4.1.4 Comparações das sequências de aminoácidos de NtCDKG;2, AtCDKG;2 e CDK11 de <i>H. sapiens</i>	124
4.1.5 A NtCDKF;1 interage com o domínio quinase de NtCDKG;2, sugerindo que seja sua ativadora	130
4.1.6 A evolução dos genes de CDKGs em plantas	133
4.1.6.1 Justificativas das escolhas de espécies	133
4.1.6.2 As CDKGs são um grupo conservado em plantas	136
5 CONCLUSÕES	144
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	146
6.1 Sugestões referentes ao Capítulo I.....	146
6.2 Sugestões referentes ao Capítulo II.....	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
APÊNDICE A	180
APÊNDICE B	183
APÊNDICE C	252
APÊNDICE D	264
APÊNDICE E	276
APÊNDICE F.....	280
Artigo científico para submissão em revista científica da área (Plant Science).	280

1 INTRODUÇÃO

1.1 Particularidades do modelo de estudo *Nicotiana tabacum*

Muitos dos mecanismos de desenvolvimento floral são conservados entre as Angiospermas, porém a maioria dos estudos aprofundados são provenientes da planta modelo *Arabidopsis thaliana* (THOMSON; WELLMER, 2019). Essa espécie pertence à família Brassicaceae (HOFFMANN, 2002) e é uma planta herbácea nativa do hemisfério norte, com ciclo de vida curto, de cerca de 2 meses. O genoma de *A. thaliana* é pequeno (aproximadamente 200 Mb) e é inteiramente sequenciado e anotado (CHENG et al., 2017; MEINKE, 1998). Apesar de haver conservação, nem todos os mecanismos descritos nessa espécie são idênticos em espécies com genomas mais complexos, que é o caso da grande maioria das angiospermas (CHEN F. et al., 2018). Assim, mais esforços vem sendo direcionados à caracterização do desenvolvimento floral em outras espécies (BECKER; ALIX; DAMERVAL, 2011; FENG et al., 2020; WANG et al., 2019). Como exemplo, em uma busca no agregador de publicações *PubMed* (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov), entre os anos 2000 a 2010 foram publicados 276 artigos sobre desenvolvimento floral em *A. thaliana*, e 219 em outras espécies. Já entre 2011 até outubro/2020 esses números foram de 442 artigos em *A. thaliana* (aumento de 160%) e 625 em outras espécies (aumento de 285%).

No presente trabalho, foi utilizada como modelo de estudo a planta *Nicotiana tabacum*, uma espécie típica de climas tropicais, que foi amplamente utilizada na pesquisa em genética molecular de plantas no passado (GEBHARDT, 2016). Essa planta pertence à família Solanaceae, a qual possui grande importância socioeconômica, visto que nela estão inclusas a planta-do-fumo (*N. tabacum*), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), a batata (*Solanum tuberosum*), a berinjela (*Solanum melongena*) e outros vegetais consumíveis (gêneros *Solanum* e *Capsicum*).

É importante ressaltar que *N. tabacum* é alotetraplóide ($n = 24$), resultado da hibridação interespecífica entre *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tomentosiformis* (SIERRO et al., 2013). Ademais, *N. tabacum* tem um genoma de aproximadamente 4,6 milhões de pares de bases, ainda em processo de anotação (EDWARDS et al.,

2017; SIERRO et al., 2014). A alotetraploidia é fonte de parte das dificuldades na anotação dos genes dessa espécie, principalmente devido à presença de genes homeólogos (EDWARDS et al., 2017; SIERRO et al., 2014). O termo homeólogo se refere a, segundo Glover, Redestig e Dessimoz (2016, tradução nossa):

genes ou cromossomos em uma espécie que se originaram por especiação [nos genomas parentais] e foram reunidos em um mesmo genoma através de [um evento de] alopoliploidização.

A presença de homeólogos é uma característica comum em genomas de plantas, devido a esse grupo ter uma história evolutiva na qual ocorrem diversos eventos de duplicação genômica (PANCHY; LEHTI-SHIU; SHIU, 2016). Segundo Panchy, Lehti-Shiu e Shiu (2016), após as duplicações genômicas que resultam na formação de genes homeólogos, ocorrem processos de perda, sub-funcionalização ou neofuncionalização desses genes. Bombarely et al. (2012) mostraram que, em *N. tabacum*, existe pouca evidência desses processos, e Edwards et al. (2017) mostraram que pares de genes homeólogos de *N. tabacum* são expressos em quantidades similares, provavelmente por se tratar de uma espécie resultante de um evento de poliploidização recente (LEITCH et al., 2008).

Em comparação com *A. thaliana*, existem muitas lacunas no conhecimento sobre os mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento floral de *N. tabacum*. Dessa forma, o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) da FFCLRP/USP se dedica ao estudo de genes preferencialmente ou exclusivamente expressos no pistilo de *N. tabacum*, na tentativa de elucidar os mecanismos que regulam seu desenvolvimento. Com isso, este trabalho busca contribuir para o estudo dessas vias de desenvolvimento nessa Solanaceae.

1.2 Mecanismos moleculares do desenvolvimento floral

Se traçada uma linha do tempo durante o desenvolvimento das flores, geralmente o florescimento é iniciado quando o meristema apical do caule (SAM - *Shoot Apical Meristem*) é convertido em um meristema de inflorescência (IM - *Inflorescence Meristem*) (Figura 1). Os meristemas são grupos de células indiferenciadas, organizadas em um centro organizacional (OC – *Organizing Center*). Nesses centros,

os meristemas mantêm o equilíbrio entre perda (diferenciação) e renovação (proliferação) das células indiferenciadas, através de redes regulatórias complexas (CHANG et al., 2020). Nas raízes e partes aéreas, meristemas apicais estão presentes durante toda a vida da planta, sendo responsáveis pela produção e renovação de seus órgãos (FERRÁNDIZ et al., 2000; GASSER, 1991).

Figura 1. Linha do tempo e eventos importantes do desenvolvimento floral.

SAM: Meristema apical do caule; IM: Meristema de inflorescência; FM: Meristema floral. Fonte: Modificado de Alvarez-Buylla et al. (2010).

Após os primeiros processos de diferenciação, o IM produz meristemas florais (FM - *Floral Meristem*), cujas células indiferenciadas estão destinadas a produzir apenas primórdios de órgãos florais, sendo chamado de meristema determinado (Figura 1; HAN et al., 2014; LENHARD et al., 2001). Nesse meristema, ocorrem processos que garantem a identidade correta dos órgãos florais e seu crescimento (SABLOWSKI, 2015). Dessa forma, nesse momento altera-se o equilíbrio entre proliferação e diferenciação celular, priorizando a organogênese e depois o término das células com capacidade proliferativa (meristemáticas) (SABLOWSKI, 2007; XU et al., 2019). O meristema floral é o único que sofre esse processo de terminação, ou seja, a cessão de renovação de células indiferenciadas após a determinação dos órgãos (LENHARD et al., 2001; PRUNET et al., 2009). Após a terminação do meristema floral, os processos de diferenciação e expansão celular coordenam o crescimento dos órgãos

florais até a sua maturidade (SABLOWSKI, 2015). Ao final desse processo é formada uma flor madura.

De maneira geral, os órgãos da flor madura podem ser divididos em órgãos estéreis (ou perianto) e órgãos reprodutivos (SPORNE, 1974). No perianto estão o cálice (conjunto de sépalas) e a corola (conjunto de pétalas). Já os órgãos reprodutivos são denominados de androceu, ou órgão masculino (conjunto de estames) e de gineceu, ou órgão feminino (um ou mais pistilos) (SPORNE, 1974). A regulação do desenvolvimento desses órgãos é essencial para a reprodução da planta, uma vez que por eles se determina o tamanho, forma, posição e função finais dos órgãos florais (MOUBAYIDIN; ØSTERGAARD, 2017; THOMSON; WELLMER, 2019). A seguir, algumas redes moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento floral de *A. thaliana* serão descritas, com foco em processos abordados ao longo desse trabalho.

1.2.1 Início do desenvolvimento floral

A convergência de vias de sinalização de florescimento, como o fotoperíodo, a termossensibilidade, a via autônoma, e das giberelinas permitem a expressão de fatores de transcrição no SAM, que regulam o início da transição entre a fase vegetativa e a fase reprodutiva (THOMSON; WELLMER, 2019; WILS; KAUFMANN, 2017). Em *A. thaliana*, a proteína *FLOWERING LOCUS T* (FT), interage com *FLOWERING LOCUS D* (FD) e juntas ativam a expressão de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* (SOC1) em regiões do meristema que, nesse momento, passa a ser chamado de IM (Figura 2A; WILS; KAUFMANN, 2017). Nesse meristema, os contínuos sinais de promoção floral estimulam a ação dos supracitados fatores de transcrição, e seus alvos promovem o início da formação de FMs nos flancos do IM (Figura 2A).

O surgimento do FM ocorre pela ação coordenada dos pares FT-FD e SOC1-AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24) (LIU; THONG; YU, 2009; WILS; KAUFMANN, 2017). Esses promovem a expressão dos fatores de transcrição *APETALA1* (AP1) e *LEAFY* (LFY), que ativam um ao outro em um mecanismo de *feedback* positivo, para manter

a identidade do FM (Figura 2A; LIU; THONG; YU, 2009; WILS; KAUFMANN, 2017). A auxina é um fitormônio essencial para a formação dos FMs, pois através da ativação de AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (ARF5), promove a expressão de *LFY* (Figura 2A; THOMSON; WELLMER, 2019; WILS; KAUFMANN, 2017). Em sequência, o fator ARF5 ativa os fatores de transcrição AINTEGUMENTA (ANT) e AINTEGUMENTA-LIKE 6 (AIL6), os quais intensificam a expressão de *LFY* e promovem a proliferação celular para o crescimento do FM (Figura 2A; DENAY et al., 2017; TEO et al., 2014). Apesar de ser induzido por auxina, *LFY* inibe a síntese desse hormônio, via repressão da expressão dos genes *YUCCA1* (*YUC1*) e *YUC4*, que participam da biossíntese de auxina (Figura 2A; LI et al., 2013).

Figura 2. Redes moleculares da formação e terminação do meristema floral.

IM: meristema de inflorescência; FM: meristema floral; OC: Centro de organização do meristema floral. Setas: indicam regulação positiva; Linha com final perpendicular: indica regulação negativa; Linhas pontilhadas: mecanismo indireto. Em **A**: *YUCCA1* (*YUC1*), *YUCCA4* (*YUC4*), *AUXIN RESPONSE FACTOR 5* (*ARF5*), *AINTEGUMENTA* (*ANT*), *AINTEGUMENTA-LIKE 6* (*AIL6*), *LEAFY* (*LFY*), *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS* (*ARRs*), *BLADE ON PETIOLE 1/2* (*BOP1/2*), *GIBBERELIC ACID* (*GA*), *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*),

SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL), FLOWERING LOCUS T (FT), FLOWERING LOCUS D (FD), SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1); AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24). Em B: AUXIN RESPONSE FACTOR 3 (ARF3), YUCCA4 (YUC4), AGAMOUS (AG), CRABSCRAW (CRC), KNUCKLES (KNU), WUSCHEL (WUS), LEAFY (LFY), Polycomb Group (PcG), SUPERMAN (SUP). Fonte: modificado de Thomsom & Wellmer (2019), com dados adicionais de Li et al. (2013) e Teo et al. (2013).

Nos FMs, LFY e AP1 regulam diversos alvos, dentre os quais estão genes envolvidos na homeostase dos fitormônios giberelinas (GAs, Figura 2A; (LI et al., 2013; WILS; KAUFMANN, 2017). As giberelinas promovem a expressão dos fatores de transcrição *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* e também de *LFY* que, num mecanismo de *feedback*, promovem a redução da concentração de GAs de forma a aumentar a expressão de AP1 (Figura 2A; YU et al., 2012). O microRNA *miR156* é importante nesse passo, pois regula negativamente a expressão de genes *SPL*, controlando diversos processos em plantas, incluindo a repressão do florescimento (revisado em JEYAKUMAR et al., 2020; ZHENG et al., 2019). É interessante notar que, como representado na Figura 2, muitos desses mecanismos sofrem regulação em *loops* de *feedback* positivos e negativos em diversas camadas, e apenas alguns estão sendo utilizados como exemplo.

Um dos mecanismos pelos quais AP1 mantém a identidade do FM é por sua ação contrária ao fator de transcrição *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, responsável pela formação e manutenção de meristemas através do estímulo da biossíntese de citocininas (CHUNG et al., 2019; KANRAR; ONGUKA; SMITH, 2006). Depois do crescimento do FM, um centro de organização com células meristemáticas é estabelecido pela expressão de *WUSCHEL (WUS)* e *CLAVATA3 (CLV3)* via indução por citocininas mediada por STM (DURBAK; TAX, 2011; KANRAR; ONGUKA; SMITH, 2006). Esse mecanismo é possível pois ARF5 e LFY inibem reguladores negativos da resposta a citocininas, dos quais se destaca TYPE-A RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7), quando AP1 não mais age no FM (Figura 2A) (DENAY et al., 2017).

Depois do FM, AP1 tem sua expressão restrita às margens do FM, onde age como gene de identidade de sépalas e pétalas ao mudar seus parceiros de interação (THOMSON; WELLMER, 2019; WILS; KAUFMANN, 2017). No FM, os parceiros de AP1 são AGL24 e SVP, os quais agem reprimindo a expressão de genes de identidade de órgãos florais. Quando os órgãos começam a se desenvolver, AP1 interage com SEPALLATA 3 (SEP3) e AGAMOUS (AG), reprimindo a expressão de SVP, AGL24 e

SOC1, e ativando outros genes de identidade (THOMSON; WELLMER, 2019; WILS; KAUFMANN, 2017). A partir desse momento, processos de diferenciação que determinam quais órgãos serão formados são os mais importantes. A diferenciação é regulada por um conjunto de fatores de transcrição da família MADS-box, que agem até a terminação floral. Esse mecanismo é explicado através de um modelo chamado ABCDE, no qual cada classe é responsável pela identidade de determinados órgãos (revisado em THEISSEN; MELZER; RUÜMLER, 2016; THOMSON; WELLMER, 2019).

1.2.2 Terminação do desenvolvimento floral

Quando o meristema floral, através do modelo ABCDE de estabelecimento dos órgãos florais, produz primórdios dos mesmos, o desenvolvimento chega no passo de terminação floral. Esse processo consiste na terminação das células meristemáticas, sinalizando que os órgãos já estão determinados. Dessa forma, os processos seguintes são os de crescimento e amadurecimento desses órgãos. No processo de terminação do FM, um dos genes mais estudados nesse processo é AG.

O fator de transcrição AG integra a formação dos padrões florais e a atividade meristemática, agindo em vias independentes para esse fim (SUN et al., 2009). A expressão de AG tem início no FM e no decorrer do desenvolvimento se restringe aos primórdios do androceu e do gineceu, onde regula principalmente a formação do pistilo (Ó'MAOILÉIDIGH, 2018; SUN et al., 2009). Durante o início do desenvolvimento floral, logo após a formação do FM, WUS e LFY promovem a expressão de AG no centro da estrutura que se tornará a flor (Figura 2B; SUN et al., 2009; THOMSON; WELLMER, 2019). Ao mesmo tempo, AG começa a sinalizar a terminação do meristema através da repressão da expressão de WUS (Figura 2B; Ó'MAOILÉIDIGH, 2018; SUN et al., 2009). A repressão da expressão de WUS por AG ocorre direta e indiretamente. A via direta ocorre durante o início do desenvolvimento, quando AG se liga ao promotor de WUS onde, através do recrutamento de CURLY LEAF (CLF), estimula a deposição de marcas repressoras H3K27me3 (LIU et al., 2011). A via indireta ocorre mais tarde e adiciona outra camada de repressão, quando AG induz a expressão de KNUCKLES (KNU), um fator de transcrição que reprime WUS (SUN et

al., 2009). A junção desses mecanismos culmina na extinção da expressão de WUS, promovendo a terminação floral (Figura 2B).

É importante mencionar que a atividade de AG na repressão de WUS é dose-dependente, e os genes *ULTRAPETALA1* (ULT1), *PERIANTHIA* (PAN), *RbBP5-LIKE* (RBL) e *SQUINT* (SQN) são alguns dos necessários para manter altos os níveis de AG (WILS; KAUFMANN, 2017; XU et al., 2019). Mutantes *pan*, por exemplo, apresentam fenótipo de indeterminância estendida do meristema apical do caule (DAS et al., 2009; WYNN et al., 2014). PAN regula a expressão de AG de forma tecido-dependente, tendo papel de repressão nas sépalas e de ativação no pistilo (WILS; KAUFMANN, 2017). Nesse passo, também é importante ressaltar a importância da auxina, a qual promove a expressão de AUXIN RESPONSE FACTOR 3 (ARF3), que contribui para a repressão de WUS por AG (Figura 2B; LIU et al., 2014).

1.2.3 O hormônio auxina no desenvolvimento floral

Como foi brevemente mencionado nos dois últimos itens, as auxinas estão diretamente envolvidas com a formação do FM e sua terminação, juntamente das citocininas (Figura 2; ALONI et al., 2006; CHENG; ZHAO, 2007; THOMSON; WELLMER, 2019). Além disso, auxinas são particularmente importantes para o desenvolvimento do gineceu, sendo encontradas em grandes concentrações nos estiletes durante esse processo (MARSCH-MARTÍNEZ; DE FOLTER, 2016; SIMONINI; ØSTERGAARD, 2019). A síntese localizada de auxina é mediada por genes da família *YUCCA*, e a perturbação na expressão desses genes afeta o número e tamanho de órgãos florais, bem como a fertilidade da planta (CHENG; ZHAO, 2007; ZHAO, 2018). Após a síntese, genes que controlam o transporte de auxina são importantes, como *PIN-FORMED1* (*PIN1*) e *PINOID* (*PID*), por exemplo, que controlam a concentração desse hormônio em regiões específicas (YAMAGUCHI et al., 2014). Mutantes de perda de função de *PIN1*, *PID* são incapazes de produzir botões florais em *A. thaliana* (CHENG; ZHAO, 2007; OKADA et al., 1991). Como mencionado no item anterior, no FM o fator ARF5 induz a expressão de *LFY*, o qual age em conjunto com ANT e AIL6 para manter a identidade desse meristema (Figura 2A). Nesse processo ANT, AIL6 e LFY estimulam o transporte de auxina (estímulo da

expressão de *PID*) e sua sinalização (estímulo da expressão de genes *IAA*), ao mesmo tempo que inibem sua síntese (repressão de *YUC1* e *YUC4*) (Figura 2A; (LI et al., 2013; YAMAGUCHI et al., 2013, 2014).

A família AUXIN RESPONSE FACTOR, à qual pertence ARF5, tem outros membros com papéis importantes no desenvolvimento floral. Os genes *ARF3* e *ARF4*, por exemplo, agem em uma via paralela à ARF5 promovendo o desenvolvimento de todos os órgãos florais, principalmente do gineceu (NEMHAUSER; FELDMAN; ZAMBRYSKI, 2000; PEKKER; ALVAREZ; ESHED, 2005). Adicionalmente, ARF3 e ARF4 reprimem a expressão do gene de pluripotência *STM*, mencionado no item anterior, via deacetilação de histonas, e regulam a formação do FM (CHUNG et al., 2019; ROTH et al., 2018). Outros membros dessa família, como ARF1, ARF2, ARF6, ARF8, ARF11, e ARF17 também possuem diferentes papéis durante o desenvolvimento floral em *A. thaliana* (ELLIS et al., 2005; GOETZ et al., 2006; LIU et al., 2018; NAGPAL et al., 2005; SCHRUFF et al., 2006; VARAUD et al., 2011; WANG et al., 2017). Dessa forma, destaca-se a importância da via de sinalização por auxina no controle do desenvolvimento floral.

1.3 A proliferação celular no desenvolvimento floral

A proliferação celular é um dos processos biológicos mais importantes para as plantas com sementes pois, em contraste com os animais, o desenvolvimento de seus órgãos ocorre continuamente durante todo seu ciclo de vida (GUTIERREZ, 2016; INZÉ; DE VEYLLDER, 2006). Durante o desenvolvimento floral, em específico, o controle preciso da proliferação é essencial para a produção dos órgãos florais de maneira organizada, em número, tamanho e posição corretos (GUTIERREZ, 2016; SABLONSKI, 2015; THOMSON; WELLMER, 2019). O ciclo celular é o processo que produz novas células durante a proliferação, e esse também é finamente regulado por diversos mecanismos (INZÉ; DE VEYLLDER, 2006). Interessantemente, a regulação desse processo tem extensa participação de fitormônios, principalmente auxinas e citocininas (GUTIERREZ, 2016; PERROT-RECHENMANN, 2010).

No desenvolvimento floral, vários genes que participam desse processo tem efeitos diretos e indiretos na proliferação celular. Um exemplo é *SUPERMAN* (*SUP*), que controla a proliferação na fronteira entre o pistilo e os estames em desenvolvimento, através de seus efeitos nas vias de sinalização de auxinas e citocininas (LYU; CAO, 2018). O gene *ARF2* é outro exemplo, e se expressa em resposta à auxina, afetando a proliferação celular durante o desenvolvimento floral (SCHRUFF et al., 2006). Os genes *ANT* e *AIL6* também tem efeitos na proliferação celular e podem ser ligados à via de sinalização por auxina (KRIZEK, 2009; KRIZEK; EADDY, 2012). O gene *CUP-SHAPED COTYLEDON 2* (*CUC2*) é expresso nas fronteiras entre órgãos florais, onde inibe o ciclo celular para assegurar a identidade desses órgãos (LI et al., 2020). Além desses exemplos, vários genes de identidade influenciam os padrões de proliferação celular na flor em desenvolvimento (JENIK; IRISH, 2000). Apesar disso, muitos dos mecanismos diretos da influência desses genes no ciclo celular durante o desenvolvimento floral ainda são elusivos.

1.3.1 Regulação do ciclo celular

Para melhor entender a regulação da proliferação celular, é interessante observar como sua unidade básica, o ciclo celular, é regulada. O ciclo de divisão pode ser separado em 4 principais fases: G1, S, G2 e M (Figura 3; (FRANCIS, 2007; INZÉ; DE VEYLDER, 2006). As fases G1 (*Gap 1*) e G2 (*Gap 2*) são intervalos, ou “*gaps*”, entre as fases de replicação do DNA (S, de síntese) e da divisão propriamente dita (M, de mitose). Nesses intervalos, as células crescem e monitoram se as fases precedentes ocorreram precisamente e, caso contrário, mecanismos de reparação são efetivados (DE VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007; FRANCIS, 2007). A fase M pode ser novamente dividida em Prófase, Metáfase, Anáfase, Telófase e Citocinese (Figura 3; FRANCIS, 2007). Na Prófase, o DNA duplicado se condensa formando os cromossomos, os quais se organizam até ficar na região central da célula (plano de divisão), o que marca a Metáfase (FRANCIS, 2007). Caso todos os cromossomos estejam ligados corretamente, eles são separados durante a Anáfase (FRANCIS, 2007). Após a separação, as novas células começam a se reorganizar na Telófase, e

o ciclo celular se completa quando as células se separam na Citocinese (FRANCIS, 2007).

Figura 3. O ciclo celular em plantas e seus principais eventos.

Fonte: Ferreira (2016).

A regulação do ciclo celular é orquestrada por complexas redes bastante conservadas entre os eucariotos (FRANCIS, 2007; GUTIERREZ, 2016). Pontos-chave dessa regulação, ou *checkpoints*, se encontram principalmente na transição entre as fases G₁/S e G₂/M (Figuras Figura 4 e Figura 5; INZÉ; DE VEYLDER, 2006). Além desses, dois outros *checkpoints* podem ser destacados: o *checkpoint* da integridade de DNA e o *checkpoint* do fuso mitótico (Figuras Figura 4 e Figura 5; FRANCIS, 2007; INZÉ; DE VEYLDER, 2006). Componentes-chave dos *checkpoints* são os complexos proteicos heterodiméricos formados por proteínas Ciclinas (Cyc) e Quinases Dependentes de Ciclinas (CDKs – *Cyclin-Dependent Kinases*) (INZÉ; DE VEYLDER, 2006). As proteínas quinases adicionam grupos fosfato à cadeia lateral de resíduos de aminoácidos de outras proteínas, processo chamado de fosforilação. Assim, podem alterar a atividade das mesmas, marcá-las para degradação, mudar sua localização subcelular e modificar a dinâmica do complexo onde se encontram (MORGAN, 2007). As CDKs recebem esse nome porque geralmente só são ativas

quando associadas às ciclinas. Essas, por sua vez são assim nomeadas devido à forma cíclica na qual são sintetizadas e degradadas durante o ciclo celular (MORGAN, 2007). Os diferentes complexos CDK-Cyc fosforilam uma plethora de substratos em cada fase do ciclo e, dessa forma, exercem grande controle na progressão do mesmo, sendo essenciais principalmente nos *checkpoints* (FRANCIS, 2007; INZÉ; DE VEYLDER, 2006).

De forma resumida, podemos destacar os principais eventos regulatórios que ocorrem durante o ciclo celular. Na fase G1, é iniciada a transcrição de genes os quais codificam componentes da via de replicação do DNA (Figura 4A; FRANCIS, 2007). Esse processo é controlado principalmente por fatores de transcrição da família *E2 Factor* (E2F), que se encontram em estado inativo no início de G1 (Figura 4A; FRANCIS, 2007). Sua inatividade se dá pela ligação inibitória de proteínas *Retinoblastoma-Related* (RBR) que, ao serem fosforiladas pelo complexo CDKA-CycD3, se desligam dos E2Fs (Figura 4A; FRANCIS, 2007). A partir desse momento, são transcritos os alvos de E2Fs, e o ciclo segue para a fase S. Nessa fase subsequente, os eventos regulatórios principais são o reconhecimento de sítios de replicação, o licenciamento da replicação, e a formação do replissomo (Figura 4A; FRANCIS, 2007). O reconhecimento dos sítios é mediado pelo complexo ORIGIN OF REPLICATION (ORC), enquanto o licenciamento depende de proteínas do complexo MINICHROMOSOME MAINTANENCE (MCM) (Figura 4B). Depois desse momento, outros complexos são recrutados ao DNA e é formado o replissomo, que realiza a replicação do DNA (Figura 4B).

Figura 4. Transição G1/S do ciclo celular de plantas.

A – Eventos que ocorrem em G1 e na transição G1/S. **B** – Principais eventos no início da fase S. Fonte: Modificado de Francis, 2007.

Continuando a progressão do ciclo, na transição S/G2, após a replicação do DNA, ocorre o *checkpoint* de integridade do DNA (Figura 5A; FRANCIS, 2007; INZÉ; DE VEYLDER, 2006). Nesse momento, o ciclo pode ser parado caso erros de replicação ou danos ao DNA sejam encontrados, em um mecanismo que envolve principalmente a quinase WEE1 (Figura 5A; DE SCHUTTER et al., 2007). A mesma via que ativa WEE1 promove a expressão de proteínas da via de reparo de DNA. O mecanismo de ação de WEE1 na parada do ciclo celular envolve a fosforilação inibitória de complexos CDK-ciclina precedendo a mitose. Quando não mais existe a sinalização de erros no DNA, a progressão do ciclo é estimulada pela desfosforilação dos complexos CDK-ciclina. Durante a metáfase, outros complexos CDK-ciclina

asseguram a formação correta do fuso mitótico, que organiza os cromossomos no plano de divisão (Figura 5B; FRANCIS, 2007). Nesse momento, o *checkpoint* do fuso mitótico (SAC – *Spindle Assembly Checkpoint*) é ativado caso ocorram erros na montagem do fuso (CAILLAUD et al., 2009). Proteínas importantes do SAC incluem as BUDDING UNINHIBITED BY BENZYMIDAZOL (BUB), que se associam aos microtúbulos, e promovem a inibição do complexo chamado Ciclossomo ou Complexo Promotor da Anáfase (APC/C – *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*). Até a correção de prováveis erros, complexos CDK-ciclina e securinas-separase inibem a progressão do ciclo (CAILLAUD et al., 2009; FRANCIS, 2007). Corrigidos os erros, a anáfase é iniciada pela degradação de ciclinas B e da securina, o que resulta, respectivamente, na degradação das CDKs e na atividade da separase, que permite a separação das cromátides-irmãs (Figura 5B; FRANCIS, 2007; KOMAKI; SCHNITTGER, 2017). Depois da anáfase, o ciclo termina passando pela telófase e as células-filhas são separadas na citocinese (FRANCIS, 2007). Ao final da fase M, ciclinas e outras proteínas da fase M são degradadas, permitindo o início de um novo ciclo (FRANCIS, 2007).

Figura 5. Transição G2/M do ciclo celular de plantas.

A – Eventos que ocorrem em G2 e na transição G2/M. **B** – Principais eventos no início da fase M.
Fonte: Modificado de Francis, 2007.

É interessante notar que existe uma ligação direta do controle do ciclo celular por auxinas. Como exemplo, a adição de auxina sintética em culturas celulares de *A. thaliana* e *N. tabacum* promove o ciclo celular, pois estimula a expressão de CDKA-CycD3, bem como reprime a expressão dos inibidores de CDKs KIP-RELATED PROTEIN 1 (KRP1) e KRP2 (DEWITTE et al., 2003; HARASHIMA et al., 2007; HEMERLY et al., 1993). Também foi descrito o efeito positivo de auxinas em fatores de transcrição da família E2F, indispensáveis para a replicação de DNA, que ocorre na fase S do ciclo celular (MAGYAR et al., 2005). Além disso, outros mecanismos do ciclo celular são afetados por auxinas (revisados em PERROT-RECHENMANN, 2010) e muitos genes de resposta à auxina são diferencialmente expressos durante o ciclo celular (BREYNE et al., 2002; MENGES et al., 2005).

1.4 Possíveis funções de *SCI1* no desenvolvimento floral

O gene *SCI1* (*Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1*) foi identificado e descrito no laboratório em que o presente trabalho foi desenvolvido. Esse gene foi inicialmente identificado como preferencialmente expresso no pistilo de *N. tabacum* (DEPAOLI et al., 2011). O nome *SCI1* foi atribuído devido ao fenótipo de plantas transgênicas de silenciamento de *SCI1*, as quais apresentam estigmas e estiletes maiores que plantas controle, resultado de um número elevado de células. Em comparação, plantas de superexpressão de *SCI1* possuem estigmas menores que a planta controle, resultado de um menor número de células. Esses fenótipos se repetem em *A. thaliana*, quando é alterada a expressão do gene *AtSCI1* (DEPAOLI; DORNELAS; GOLDMAN, 2014). Dessa forma, o nome de *SCI1* é devido à sua inibição da proliferação celular. Para exercer essa função, DePaoli et al. (2012) propuseram que *SCI1* é um inibidor de complexos CDK-ciclina. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que *SCI1* interage com duas CDKs, NtCDKB1;1 e NtCDKG;2, e duas ciclinas, NtCycB1;1 e NtCycL1;1 (STRINI, 2014). Além disso, em ambas *N. tabacum* e *A. thaliana*, *SCI1* pode ser associado à via de sinalização por auxinas, sendo afetado por e afetando genes dessa via (DEPAOLI; DORNELAS; GOLDMAN, 2014; DEPAOLI; GOLDMAN; GOLDMAN, 2012).

Recentemente, Cruz (2018) identificou que a expressão de *SCI1* se inicia com a formação do FM em *N. tabacum* (Figura 6A). Após esse estágio, *SCI1* é detectado nos primórdios de todos os órgãos florais (Figura 6B;C) e, acompanhando o avanço do desenvolvimento desses, sua expressão passa a se restringir aos primórdios mais internos (Figura 6D). Dessa forma, após a determinação dos órgãos, a expressão de *SCI1* se restringe aos lóculos e ao ápice do ovário, em uma região que dará origem ao estilete e estigma (Figura 6D). Após a formação dos estiletes e estigmas, a expressão é detectada em níveis decrescentes até a flor atingir a antese (DEPAOLI et al., 2011). De acordo com Cruz (2018), as células dos lóculos e do ápice do ovário são as últimas com características meristemáticas, e representam as últimas células do FM.

Figura 6. Expressão de *SCI1* durante o desenvolvimento da flor de *N. tabacum*.

A – Meristema floral; **B** – estágio “-7” do desenvolvimento floral; **C** – estágio “-6” do desenvolvimento floral; **D** – estágio “-5” do desenvolvimento floral. **s.:** sépalas; **p.:** pétalas; **a.:** anteras; **dm.:** domínio meristemático; **c.:** carpelos; **lo.:** lóculos do ovário; **e.:** células que originarão o estilete/estigma. Em cinza: representação da estrutura; Em roxo: expressão de *SCI1* detectada por hibridização *in situ*. Fonte: Autoria própria, baseado nos dados de Cruz (2018).

Também foi descrito por Cruz (2018) que as proteínas homólogas de AG e WUS em *N. tabacum*, NAG1 e NtWUS, se ligam à região promotora do gene *SCI1*. Adicionalmente, ambos os mRNAs de NAG1 e *SCI1* se co-expressam com padrões similares desde o meristema floral até depois da formação do pistilo (CRUZ, 2018). Complementarmente, foi demonstrado que a proteína recombinante SCI1-GFP,

expressa sob controle da região promotora de *SCI1*, corrobora com os padrões observados para o mRNA de *SCI1* (CRUZ, 2018).

Outra camada de regulação da expressão de *SCI1* envolve auxina. Em mutantes de *A. thaliana yuc2yuc6* e *np1*, que são deficientes em auxina, *AtSCI1* é menos expresso, e ambos compartilham o fenótipo de estigmas e estiletes maiores observados em mutantes *sci1^{-/-}* (DEPAOLI; DORNELAS; GOLDMAN, 2014). Adicionalmente, *SCI1* também afeta a expressão de genes de resposta à auxina. Em *N. tabacum*, plantas transgênicas de superexpressão de *SCI1* apresentam níveis elevados dos genes de resposta à auxina *NtARF8*, *NtIAA13* e *NtIAA19* (DEPAOLI; GOLDMAN; GOLDMAN, 2012).

Como mencionado anteriormente, no interactoma de *SCI1* são encontradas proteínas relacionadas ao ciclo celular, como *NtCDKB1;1*, *NtCycB1;1*, *NtCycL1;1* *NtCDKG;2*, reforçando a possibilidade de *SCI1* ser um inibidor de complexos ciclina-CDK (DEPAOLI et al., 2011; STRINI, 2014). Ademais, Strini et al. (submetido) mostram que durante o ciclo celular na cultura de células BY-2, *SCI1*-GFP é majoritariamente observada nos nucléolos durante a intérfase. Já durante a mitose, *SCI1*-GFP é degradada, via proteassomo, precedendo a metáfase, e reaparece durante a telófase (STRINI et al., submetido). Esse padrão é comum a proteínas as quais precisam ser degradadas para que ocorra a progressão do ciclo, como é o caso da quinase *NtWEE1* (COOK et al., 2013). Adicionalmente, a utilização do inibidor de proteassomo MG132 é capaz de evitar a degradação de *SCI1*-GFP (STRINI et al., submetido). O MG132 tem efeito geral no ciclo celular em alta concentração, visto que, com esse tratamento em células BY-2, as mesmas ficam paradas em metáfase (GENSCHIK et al., 1998).

A *NtCDKG;2*, encontrada como parceira de interação de *SCI1*, pertence à classe CDKG da família das CDKs de plantas (DUDITS et al., 2018). Como será abordado mais adiante, *NtCDKG;2* é uma CDK multifuncional. Entretanto, no que diz respeito ao ciclo celular, foram encontradas evidências de sua participação na formação do fuso mitótico (FERREIRA, 2016; LUBINI, 2016; THOMÉ, 2016, 2018). Lubini (2016) e Ferreira (2016) observaram que a proteína GFP-*NtCDKG;2* se localiza espalhada no nucleoplasma durante a intérfase, porém após a desestruturação do núcleo, essa proteína está associada à região dos cromossomos condensados durante a metáfase e anáfase. Além disso, *NtCDKG;2* interage com proteínas importantes para a

formação do fuso mitótico, como a Nt β -tubulina 6 e NtRanBP1 (LUBINI, 2016; THOMÉ, 2018). Dessa forma, é provável que, durante a metáfase, SCI1 seja degradada e deixe de inibir NtCDKG;2, a qual teria papel na regulação do fuso mitótico durante a metáfase e anáfase.

Somadas às parceiras de interação de SCI1 com papel no ciclo celular, Pinoti (2016) descreveu parceiras com potencial participação no *splicing*. Dentre essas parceiras, destacam-se NtU2A', NtSR45, NtRS2Z33, NtDEAD-BOX35, NtHEN2 e NtCycl1;1 (LUBINI, 2016; PINOTI, 2016). Dessas, NtCDKG;2 também interage com NtU2A', NtDEAD-BOX35 e NtCycl1;1 e, adicionalmente, com NtRSZ21 (FERREIRA, 2016; THOMÉ, 2016). A proteína NtU2A' é parte da ribonucleoproteína (RNP) U2, um componente constitutivo do spliceossomo (LORKOVIĆ; HILSCHER; BARTA, 2004). Já NtSR45, NtRS2Z33 e NtRSZ21 são proteínas ricas em Serinas e Argininas (SR), e fazem parte da família SR de fatores de *splicing* (BARTA; KALYNA; REDDY, 2010). A NtDEAD-BOX35 é da família DEAD-box de helicases de RNAs, as quais podem ser associadas a diferentes processos envolvendo RNAs, incluindo o *splicing*, no qual possuem funções nas etapas de montagem do pré-spliceossomo, bem como na progressão do *splicing* (CORDIN; BEGGS, 2013). Quanto à NtHEN2, trata-se de uma proteína de outra família de helicases de RNAs, DExH-box, que compõe o exossomo, o qual tem como uma de suas funções a degradação de transcritos com *splicing* incompleto (LANGE et al., 2014). Além disso, as helicases de ambas as famílias DEAD-box e DExH-box podem mediar o *splicing* através da mudança conformacional do spliceossomo via desentrelaçamento de RNAs e a quebra de interações RNA-proteína (LIU; CHENG, 2015). Quanto aos papéis de NtCDKG;2 e NtCycl1;1 no *splicing*, esses serão abordados mais adiante, na descrição de NtCDKG;2.

Evidências adicionais da associação entre SCI1 e *splicing* se encontram no fato de que Strini (2014) e Pinoti (2016) demonstraram que SCI1-GFP co-localiza com marcadores de *splicing speckles*, como as proteínas CypRS64-RFP e SRP34a-RFP (KOROLEVA et al., 2009). Além disso, na sequência de aminoácidos de SCI1 são encontradas características interessantes, que são a presença de dois dipeptídeos Arginina-Serina (RS) e cinco dipeptídeos Ácido glutâmico-Lisina (EK) (PINOTI et al., em preparação). Os dipeptídeos RS estão presentes em proteínas que atuam no metabolismo de RNAs, como é o caso das proteínas da família SR supracitadas (BARTA; KALYNA; REDDY, 2010). Já os dipeptídeos EK simulam o estado fosforilado

dos dipeptídeos SR, característica que foi associada, em *Homo sapiens*, à regulação de proteínas SR com efeito de inibição ou estímulo de sua atividade (BARNARD et al., 2002; LI et al., 2003).

É importante destacar que as proteínas SR formam uma família de proteínas indispensáveis ao *splicing* constitutivo e alternativo de mRNAs (BARTA; KALYNA; REDDY, 2010; REDDY et al., 2013; RICHARDSON et al., 2011). Além dessa função, proteínas SR também participam da exportação nuclear de mRNAs, conferindo estabilidade aos mesmos, participam da tradução, e outros processos envolvendo RNAs (HUANG; STEITZ, 2005; LONG; CACERES, 2009; ZHONG et al., 2009). A maioria dos genes que codifica proteínas SR coincidentemente é passível de muitos eventos de *splicing* alternativo (AS – *Alternative Splicing*), e produzem uma plethora de transcritos alternativos (KALYNA; BARTA, 2004). É proposto que proteínas SR sejam alvo de diversas vias de sinalização e que, através do AS modulam respostas a diferentes condições ambientais e de desenvolvimento, regulando a quantidade de proteínas SR funcionais e do *splicing* global (BARTA; KALYNA; LORKOVIĆ, 2008; DUQUE, 2011). Dessa forma, a participação de SCI1 no *splicing* e suas possíveis consequências no controle da proliferação celular e no desenvolvimento floral são alvos de estudo do laboratório no qual este trabalho foi desenvolvido.

1.5 NtCDKG;2 é uma CDK multifuncional

Como mencionado no item acima, a interação entre SCI1 e NtCDKG;2 pode envolver a participação de ambas essas proteínas no ciclo celular e no *splicing*. Por esse motivo, a caracterização de NtCDKG;2 também é um tópico de estudo do LBMP. A NtCDKG;2 é parte da classe CDKG das CDKs de plantas, as quais se dividem em oito classes, de CDKA a CDKG e similares a CDK (CKL, *CDK-Like*) (TANK; THAKER, 2011). Nessas classes, as diferentes CDKs podem ser associadas a diversos processos biológicos. As CDKAs e CDKBs, por exemplo, têm papel principalmente no controle do ciclo celular (DE VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007). No caso das CDKDs e CDKF, a maioria dos trabalhos as descreve como reguladoras da transcrição realizada pela RNA polimerase II (RNAPII) (HAJHEIDARI et al., 2012). Adicionalmente, CDKF atua como uma quinase ativadora de CDKs (CAK – *CDK-*

Activating Kinase) e pode aumentar a atividade de CDKAs durante o ciclo celular (UMEDA; SHIMOTOHNO; YAMAGUCHI, 2005). Já as CDKCs e CDKE, em conjunto com CDKDs e CDKF são associadas ao controle co-transcricional do processamento de RNAs, via fosforilações do domínio carboxi-terminal (CTD) da subunidade RPB1 da RNAPII (UMEDA; SHIMOTOHNO; YAMAGUCHI, 2005). Finalmente, a classe CDKG é composta por CDKs cujos papéis vêm recentemente sendo desvendados em plantas.

No genoma de *A. thaliana*, a classe CDKG possui dois membros: a CDKG;1 e a CDKG;2 (MENGES et al., 2005; VAN LEENE et al., 2007). Já no genoma de *N. tabacum* existem quatro genes que codificam CDKGs (FERREIRA, 2016). Desses, um deles codifica a NtCDKG;2 (*LOC107826481* no NCBI), em estudo em nosso laboratório, o qual tem como homeólogo o gene *LOC107817252*, que produz uma proteína muito similar à NtCDKG;2 (FERREIRA, 2016). Adicionalmente, os outros dois genes – *LOC107803236* e *LOC107820065* – formam outro par de homeólogos, e codificam CDKGs com características similares à NtCDKG;2, porém possuem um domínio amino-terminal (N-terminal) mais extenso (FERREIRA, 2016). Em cada um dos genomas das espécies parentais de *N. tabacum*, de *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis*, existem dois genes que codificam CDKGs (FERREIRA, 2016). Nessas espécies são encontrados um representante de cada par de homeólogos encontrados em *N. tabacum*, um codificando uma proteína similar a NtCDKG;2, e o outro codificando uma CDKG com N-terminal mais extenso. Dessa forma, a presença de quatro sequências codificando CDKGs em *N. tabacum* é explicada por sua alotetraploidia (SIERRO et al., 2014; FERREIRA, 2016).

É interessante destacar que, em *A. thaliana*, os genes codificando *AtCDKG;2* e *AtCDKG;1* possuem uma característica interessante: *AtCDKG;1* é um retrogene, possível fruto da retroduplicação de *AtCDKG;2* (NIBAU et al., 2020a). Isso significa que esse gene foi duplicado no genoma a partir da retro-transcrição do mRNA processado de *AtCDKG;2*, seguida de reinserção no genoma (NIBAU et al., 2020a; PANCHY et al., 2016). Esse fato é evidente quando se observa a estrutura dos genes codificando CDKGs nessa espécie: *AtCDKG;1* contém apenas um éxon compondo a sequência codificadora (CDS) de *AtCDKG;1* (HUANG et al., 2013), em contraste com *AtCDKG;2*, que contém 6 éxons (MA et al., 2015). Segundo Ciomborowska et al. (2013), retrogenes estão sob o efeito de seleção purificadora relaxada, o que permite

a esses genes adquirir novas funções, através de mutações mais rápidas. Esse processo é evidenciado em *A. thaliana*, pelo fato de que AtCDKG;1 e AtCDKG;2 possuem redundância parcial de função e de padrão de expressão, possível evidência do processo de subfuncionalização desse par de CDKGs em *A. thaliana* (NIBAU et al., 2020a). Segundo Svensson, Arvestad e Lagergren (2006), genes retroduplicados (retrogenes) geralmente são espécie-específicos. Como evidência da especificidade de AtCDKG;1 em *A. thaliana*, em Ferreira (2016), foi demonstrado que os quatro genes de CDKGs de *N. tabacum* codificam sequências de aminoácidos as quais possuem maior similaridade com AtCDKG;2 de *A. thaliana*, e não com AtCDKG;1. Complementarmente, também se verificou que nenhuma das solanáceas analisadas (*Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum* e *Solanum tuberosum*) possuem homólogas de AtCDKG;1, uma vez que todas são mais similares à AtCDKG;2 (FERREIRA, 2016).

No que diz respeito às funções de CDKGs, até o momento foram descritos seus papéis no ciclo celular, no *splicing*, e na regulação do florescimento. Quanto ao ciclo celular, em *A. thaliana*, ambas CDKGs se expressam durante esse processo (MENGENS et al., 2005), e interagem com proteínas-chaves de regulação do ciclo (VAN LEENE et al., 2010), porém não foram descritos seus mecanismos de ação. Em *N. tabacum*, como citado anteriormente, NtCDKG;2 é encontrada durante todo o ciclo celular, e pode ter função na organização do fuso mitótico (LUBINI, 2016; THOMÉ, 2018). Em relação ao florescimento, Ma et al. (2015) verificaram que mutantes de *A. thaliana* com perda de função de CDKG;2 possuem um adiantamento desse processo. Os autores explicam esse fenótipo mostrando que nesses mutantes ocorrem alterações na expressão de diferentes genes que regulam o florescimento: *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *FT*, *SOC1*, *AP1* e *LFY*. Em *N. tabacum*, NtCDKG;2 interage com proteínas cujas homólogas em *A. thaliana* participam da regulação do florescimento, como é o caso de NtDNAJ3, NtFRIGIDA-like 3 e NtHOMEBOX 22 (FERREIRA, 2016; THOMÉ, 2016).

Em *A. thaliana*, os esforços de caracterização de CDKGs vêm se concentrando na participação dessas CDKs no *splicing*. Nesse universo, ambas CDKG;1 e CDKG;2 foram implicadas na regulação do *splicing* global, através do controle do processamento do mRNA de *AtU2AF65A*, um componente do spliceossomo (CAVALLARI et al., 2018). Nesse processo, CDKG;2 regula o *splicing* de CDKG;1, o

qual pode produzir transcritos que codificam proteínas com porções N-terminal de tamanhos diferentes (CAVALLARI et al., 2018). Cavallari et al. (2018) verificaram que a proporção de transcritos alternativos de *CDKG;1* é alterada de forma temperatura-dependente. Como resultado, as diferentes isoformas de *CDKG;1* afetam o processamento de *AtU2AF65A*, resultando em um impacto global no *splicing* (CAVALLARI et al., 2018). Adicionalmente, *CDKG;1* também participa diretamente do *splicing* do gene *CalS5* (*CALLOSE SYNTHASE 5*) através de sua interação com a proteína SR RS2Z33 (HUANG et al., 2013). Nesse processo, a ausência de *CDKG;1* limita o processamento adequado de *CalS5*, e resulta na formação defeituosa da parede celular dos grãos-de-pólen (HUANG et al., 2013). Em comparação, *CDKG;2* tem papel específico no *splicing* do gene *FLOWERING LOCUS M* (*FLM*), e em mutantes de perda de função de *CDKG;2*, a proporção dos transcritos alternativos de *FLM* é alterada (NIBAU et al., 2020b). Segundo os autores, os efeitos de *CDKG;2* no florescimento notados por Ma et al. (2015) podem ser explicados por essas alterações no *splicing* de *FLM*, que é um regulador do florescimento (NIBAU et al., 2020b). Tanto *CDKG;1* quanto *CDKG;2* tem seu funcionamento no *splicing* dependente de sua associação com a ciclina CycL1 (CAVALLARI et al., 2018; HUANG et al., 2013; MA et al., 2015; NIBAU et al., 2020b). A CycL1 possui uma característica singular entre as ciclinas, a qual consiste na presença de uma região rica em Argininas e Serinas (RS; XU et al., 2012), que, como citado anteriormente, é uma característica de proteínas envolvidas no processamento de RNAs.

Em *N. tabacum*, ainda não foi demonstrada a participação direta de NtCDKG;2 no *splicing*, porém muitas evidências de homologia com as CDKGs de *A. thaliana* são encontradas. Primeiramente, é importante destacar que tanto *CDKG;1*, *CDKG;2* e NtCDKG;2 possuem uma região N-terminal extensa, onde são encontrados dipeptídeos RS. Enquanto *CDKG;1* tem quatro dipeptídeos RS, *CDKG;2* tem seis dipeptídeos RS no N-término (HUANG et al., 2013; MA et al., 2015). Já NtCDKG;2 possui cinco desses dipeptídeos (FERREIRA, 2016). A interação com fatores de *splicing*, como proteínas SR, depende da presença de um ou mais motivos RS na região N-terminal, uma característica comum a CDKs envolvidas no *splicing*, tanto em plantas como em mamíferos (HU et al., 2003; HUANG et al., 2013; KITSIOS et al., 2008). Essa característica explica parcialmente a participação das CDKGs de *A. thaliana* no *splicing*, e estudos de localização de *CDKG;1* e *CDKG;2* permitem

associá-las a *splicing speckles* no nucleoplasma (HUANG et al., 2013; MA et al., 2015). O mesmo padrão é observado para NtCDKG;2 em *N. tabacum*, a qual co-localiza com os marcadores de *splicing speckles* AtSRp34-RFP e AtCypRS64-RFP (LUBINI, 2016). Adicionalmente, NtCDKG;2 interage com NtCycL1;1, ciclina homóloga de CycL1 de *A. thaliana* (FERREIRA, 2016). Maiores evidências de homologia encontram-se no fato de que CDKG;2 e NtCDKG;2 compartilham parceiras de interação as quais têm envolvimento no *splicing*, que é o caso de U2A' e RSZ21 em *A. thaliana* (VAN LEENE et al., 2010), e NtU2A' e NtRSZ21 em *N. tabacum* (FERREIRA, 2016; THOMÉ, 2016).

Convém mencionar que, em *A. thaliana*, a CDKG;2 interage com CDKF;1 (BORUC et al., 2010; VAN LEENE et al., 2007, 2010), e essa interação ocorre entre suas homólogas em *N. tabacum*, NtCDKG;2 e NtCDKF;1 (LUBINI, 2016). Em *N. tabacum*, essa interação foi encontrada em um *screening* de duplo-híbrido em leveduras (Y2H) para encontrar parceiras de interação de NtCDKG;2 (LUBINI, 2016). Posteriormente, essa interação foi confirmada por Y2H quantitativo (THOMÉ, 2016), e por Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC – *Bimolecular Fluorescence Complementation*) (FERREIRA, 2016). Como mencionado anteriormente, a CDKF;1 de *A. thaliana* é uma CAK, que ativa as CDKs e as CDKAs, bem como atua na regulação da transcrição por fosforilações no domínio CTD da RNAPII (HAJHEIDARI et al., 2012; UMEDA; SHIMOTOHNO; YAMAGUCHI, 2005). Curiosamente, a NtCDKG;2 além de interagir com NtCDKF;1, também tem como parceiras de interação as subunidades NtRPB4 e NtRPB7 da RNAPII, bem como o domínio CTD (FERREIRA, 2016). Em suma, o conjunto de informações sobre as CDKGs de *A. thaliana* e *N. tabacum* as coloca como CDKs multifuncionais. Tendo em vista que o gene *NtCDKG;2* é expresso de maneira ubíqua em diferentes tecidos de *N. tabacum* (LUBINI, 2012), sua interação com SCI1 pode ocorrer em aspectos específicos do desenvolvimento da flor.

Finalmente, é importante mencionar que, durante a caracterização de NtCDKG;2, Lubini (2016) observou que, em folhas de *N. tabacum*, não é possível detectar a isoforma completa predita dessa CDK. Nesse tecido estão presentes duas isoformas menores que a NtCDKG;2 completa (LUBINI, 2016). A autora explica essas isoformas através da comparação de NtCDKG;2 com a homóloga das CDKGs em *H. sapiens*, a CDK11 (LUBINI, 2016). Nesse modelo, as isoformas menores de

NtCDKG;2 seriam produzidas por dois mecanismos: i) a tradução alternativa do mRNA de *NtCDKG;2*; ii) a clivagem da isoforma completa em folhas (LUBINI, 2016). Adicionalmente, a dificuldade em obter NtCDKG;2 completa em folhas é uma limitação experimental, visto que a sua expressão nesse tecido é útil para diferentes experimentos de caracterização dessa CDK.

1.6 Hipótese inicial

Com o conjunto de informações apresentado, pode-se considerar a hipótese de que ambas SCI1 e NtCDKG;2 estejam envolvidas na regulação do ciclo celular através do controle do *splicing*, durante o desenvolvimento floral. Nessa hipótese, no meristema floral, a expressão de SCI1 é regulada pela via de sinalização por auxina e pelos fatores de transcrição NAG1 (AGAMOUS) e NtWUS (WUSCHEL). Em contraponto, SCI1 promove a expressão de genes de resposta à auxina (ARFs) e inibidores da resposta de auxina (Aux/IAAs), formando um *loop* de regulação. Quando é expresso, SCI1 pode inibir NtCDKG;2 e, de alguma forma, afetar a proliferação celular durante o desenvolvimento floral. Além disso, SCI1 pode estar inibindo ou promovendo o *splicing*, mediado por interações com suas parceiras envolvidas nesse processo. Em comparação, NtCDKG;2 também pode estar afetando o *splicing* e a transcrição, através de suas parceiras de interação. Ambos esses processos podem ter impactos no desenvolvimento floral, que podem ser de promoção ou repressão, dependendo dos genes envolvidos.

1.7 Objetivos do trabalho

Dada a hipótese apresentada, este trabalho teve como objetivo geral identificar os mecanismos nos quais SCI1 e NtCDKG;2 estão envolvidos para desempenhar a regulação do desenvolvimento floral. Para isso, foram propostos como objetivos específicos:

A) Verificar se existe expressão diferencial de genes entre plantas de silenciamento de *SC11* e plantas controle.

B) Analisar se os genes diferencialmente expressos afetam processos biológicos que podem explicar o fenótipo resultante do silenciamento de *SC11*.

C) Analisar se ocorrem diferenças em alternantes de *splicing* em plantas selvagens e de silenciamento de *SC11*.

D) Investigar a ação de *NtCDKG;2* em sementes de plantas transgênicas com expressão alterada de *NtCDKG;2*.

E) Verificar a existência de diferentes isoformas de *NtCDKG;2* nos órgãos vegetativos e reprodutivos de plantas selvagens.

F) Analisar a sequência de *NtCDKG;2*, e comparar com as sequências homólogas em outras espécies e identificar possíveis domínios conservados.

G) Realizar a análise das CDKGs durante a evolução de plantas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análise de RNA-seq do silenciamento de *SCI1*

2.1.1 Desenho Experimental

Para avaliar possíveis diferenças na expressão gênica entre uma linhagem transgênica de *N. tabacum* silenciando *SCI1* através de interferência de RNA (linhagem 14.2 - DEPAOLI, 2010) e a planta selvagem, foram escolhidos 3 indivíduos de cada linhagem para a extração do RNA total de seus estigmas e estiletes. De cada indivíduo foram coletados, em nitrogênio líquido, estigmas e estiletes dos estádios 1 a 6 (segundo KOLTUNOW, 1990). Partes iguais em massa de cada estágio foram unidas, depois divididas para formar três amostras biológicas para cada tipo de planta. É importante a utilização de réplicas biológicas para aumentar a confiabilidade das estimações feitas através dos programas de análise de RNA-seq.

2.1.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído com o kit *miRCURY™ RNA Isolation Kit – Cell & Plant* (Exiqon), seguindo as instruções do fabricante, resultando em 3 amostras para cada condição (denominadas SR1-A, SR1-B, SR1-C e RNAi-A, RNAi-B e RNAi-C). As amostras foram analisadas no aparelho *BioAnalyzer Agilent 660 Nano* (Agilent Technologies) para avaliar a qualidade do RNA extraído. Para isso foram utilizados 200 ng de cada amostra, e todos os RNAs ficaram com qualidade entre de 9.3-9.5 RIN (*RNA Integrity Number*).

2.1.3 Sequenciamento

Após a análise de integridade, os RNAs totais foram enviados ao *Beijing Genomics Institute* (BGI). No BGI, as amostras foram enriquecidas para RNAs com caudas poli-A através da utilização de *beads* magnéticas fusionadas a Oligo (dT). Posteriormente, as amostras enriquecidas foram submetidas à fragmentação química, através de um tampão de fragmentação (composição desconhecida, propriedade intelectual do BGI).

Depois da fragmentação, foi feita a síntese de cDNAs utilizando hexâmetros randômicos, seguida da purificação do cDNA, reparação de extremidades e adenilação das extremidades 3'. Em seguida, foram ligados os adaptadores de sequenciamento (próprios da empresa), e selecionados fragmentos com média de 200 pares de base, e só então as amostras seguiram para o sequenciamento no sequenciador *Illumina HiSeq™ 2000* (Illumina). O controle de qualidade e quantidade das amostras foi feito utilizando os equipamentos *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) e *ABI StepOnePlus Real-Time PCR System* (Life Technologies).

O sequenciamento foi realizado no modo *paired-end*, sendo obtidas sequências (*reads*) de 90 nucleotídeos (nt) da extremidade esquerda (*Forward reads*) e 90 nt da extremidade direita (*Reverse reads*) de um mesmo fragmento, permitindo maior confiabilidade no alinhamento de sequências em análises posteriores. O resultado do sequenciamento bruto de dados contém *reads* “sujas”, com pedaços de adaptadores, nucleotídeos com má qualidade de sequenciamento ou nucleotídeos não identificados (Ns). A limpeza das sequências foi feita utilizando um programa interno do BGI, e apenas as sequências limpas foram utilizadas nos experimentos seguintes.

2.1.4 Quantificação da expressão gênica

A quantificação da expressão foi feita com o programa *Salmon v2.0* (PATRO et al., 2017) que mapeia as *reads* ao transcriptoma referência, e repete esses alinhamentos através de *bootstrapping*, para diminuir variações nos dados de quantificação. O transcriptoma referência utilizado foi o mais recente para *N. tabacum*,

disponível no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Acesso: GCF_000715135.1_Ntab-TN90). Foi utilizada a anotação do mesmo genoma para fazer as associações entre transcritos e os genes que os codificam. Os parâmetros do programa foram os *default*, com exceção do parâmetro *--bias* para detectar e corrigir a quantificação caso as *reads* possuíssem algum viés de sequência. O passo de *bootstrapping* foi feito com 100 repetições.

2.1.5 Análise de Expressão Diferencial

A análise da expressão diferencial foi feita com o programa *ThreeDRNAseq*, na versão de linha de comando (CALIXTO et al., 2018; GUO et al., 2019). Os dados foram importados utilizando o pacote R *tximport* com o método *lengthScaledTPM* (SONESON; LOVE; ROBINSON, 2016). Nesse passo, as quantificações dos transcritos foram mapeadas nas unidades gênicas (*transcript to gene mapping*), permitindo a comparação de expressão de genes entre as amostras. Os dados foram pré-processados para eliminar transcritos de baixa expressão, removendo aqueles com expressão menor que 1 Contagem por Milhão (CPM), em pelo menos uma das amostras de sequenciamento (CPM *cut* > 1). Depois, os dados foram normalizados pelo método TMM (Média truncada de valores de M – BULLARD et al., 2010).

A análise de expressão diferencial foi feita comparando as amostras de plantas de silenciamento de *SCI1* com as de plantas selvagens, no programa *ThreeDRNAseq*, com a *pipeline limma-voomWeights* (LIU et al., 2015; RITCHIE et al., 2015). Como método de ajuste de p-valores para FDR (Taxa de Falso Descobrimento) foi escolhido o de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Os valores de corte utilizados foram, para FDR < 0.05 e para valores de $\log_2(\text{Fold-Change}) > |1|$.

2.1.6 Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos

Para realizar a classificação funcional dos genes diferencialmente expressos (DE), foi feita uma análise de enriquecimento de termos *Gene Ontology* (GO) com genes

homólogos de *A. thaliana*. Essa estratégia foi adotada porque a anotação de GOs de *N. tabacum* é incompleta. Dessa forma, como os genes de *A. thaliana* são mais extensivamente anotados no banco de dados Gene Ontology, podem apontar mais eficientemente as funções que os genes DE representam.

Para encontrar possíveis homólogos, foi feita uma análise de similaridade através do programa *BLASTX* v2.10.1+ (CAMACHO et al., 2009), encontrando equivalências entre as sequências nucleotídicas de *N. tabacum* e sequências de aminoácidos de *A. thaliana*. Com esse fim, foi utilizada a anotação mais recente de *A. thaliana* (Araport11 - CHENG et al., 2017). Foram consideradas equivalências situações em que o alinhamento satisfizesse três condições: (1) cobertura do alinhamento > 30%; (2) identidade de sequência > 30%; (3) Valor do “e-value” < 0.00005. Com a lista de equivalentes em *A. thaliana*, essa foi submetida a uma análise de enriquecimento com o programa *agriGO* v2.0 (TIAN et al., 2017), utilizando como corte *p*-valores < 0.001, e como referência a anotação de GOs mais recente de *A. thaliana* (TAIR2017). Os portais *ThaleMine* (bar.utoronto.ca/thalemine), *Google Scholar* (scholar.google.com) e *PubMed* (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) foram utilizados para consultar a literatura que sustenta as anotações GO de *A. thaliana*. Além disso, os mesmos portais foram empregados para buscas na literatura relevantes sobre os genes diferencialmente expressos possivelmente já estudados em *N. tabacum*.

2.2 Desenho de *primers*

As sequências dos *primers* descritos abaixo estão detalhadas na Tabela 1.

2.2.1 *Primers* para RT-qPCR

Os *primers* para validar a expressão de genes por RT-qPCR foram desenhados com base nas sequências do banco de dados NCBI. Foram desenhados *primers* que amplificassem sequências de tamanho entre 80-150 pares de bases, sempre que possível na região 3'-UTR comum aos transcritos do mesmo gene. Essa escolha foi feita pois, como *N. tabacum* é um alotetraplóide, muito de seus genes formam pares

de homeólogos. O desenho de *primers* na região 3'-UTR permite distinguir entre esses pares mais facilmente. Nos casos em que não foi possível desenhar os *primers* nessa região, os mesmos foram desenhados na região codificadora, o mais próximo o possível da extremidade 3'. Todos os *primers* desenhados possuem temperatura de anelamento entre 60-70°C, ideais para as reações de RT-qPCR. A especificidade dos *primers* para cada gene foi conferida com a ferramenta *Primer-BLAST* (YE et al., 2012), para garantir que amplificariam apenas o gene desejado.

2.2.2 Primers para RT-PCR

Para as reações de RT-PCR de *NtSR30*, foram desenhados *primers* nos éxons 10 e 11, flanqueando os íntron 10, onde são preditos eventos de *splicing* alternativo nesse gene, segundo alinhamentos feitos com as sequências encontradas no banco de dados NCBI. A especificidade dos *primers* também foi verificada com a ferramenta *Primer-BLAST* (YE et al., 2012).

Tabela 1. Primers utilizados para os experimentos de RT-qPCR e RT-PCR.

Experimento	Gene	Nome	Sequência 5'-3'
RT-qPCR	NtKRP3	qPCR_KIP3_Fw	CGACCACAGAAAGACCAAGAA
		qPCR_KIP3_Rv	CCAACAGAGCGAGACACTAAA
	NtSR30	qPCR_SR30_Fw	CTAGAAACTGTTCTGGGTGCTT
		qPCR_SR30_Rv	AGATGAAATGCTTATAGCAGAGAGT
	NtCYCB1;2	qPCR_CYCB1;2_Fw	CTAGCAGCATCGTCCGTTTA
		qPCR_CYCB1;2_Rv	CTGATCTTCTGAGTAGCCAGTATG
	NtCDC45	qPCR_CDC45_Fw	GTGAGAAAGGAGCAAGGATGA
		qPCR_CDC45_Rv	CCGTGGCTTCCCACATATT
	NtMCM4	qPCR_MCM4_Fw	CAGGGAGCAGAAGTTGATATGT
		qPCR_MCM4_Rv	GGGCAGATAGTGAAGAAGACTG
	NtCUC3	qPCR_CUC3_Fw	GCAGGCTAACACAACAATGAAA
		qPCR_CUC3_Rv	GCATCCCTTCTATGCCTACTAAA
	NtRecQ4A	qPCR_Q4A_Fw	CTTCTGCTGCACCTCAATCT
		qPCR_Q4A_Rv	ACCGTCTCCAGCTTCTTTAAC
	NtBUB3.1	qPCR_BUB3.1_Fw	CCATGAGCCAGATGCCATAA
		qPCR_BUB3.1_Rv	GGATCGAGGAGCTTCTGAAATAG
RT-PCR	NtWEE1	qPCR_WEE1_Fw	TAGGTAGTCGGGAGTACAGAAG
		qPCR_WEE1_Rv	CTTCCGCCAGCTCAATCTAA
	NtH2A.1	qPCR_H2A.1_Fw	GACCAACGGGAAACTGAAGA
		qPCR_H2A.1_Rv	GATGCAGCAACAACCAAGAC
RT-PCR	NtMED1	qPCR_MED1_Fw	CCTGGAGATTCTTTGAGGAACA
		qPCR_MED1_Rv	CTGGTCTGGCTTTGCTTAGTA

Experimento	Gene	Nome	Sequência 5'-3'
	NtPP2A-5	qPCR_PP2A5_Fw	CCATCTGCTGTCGAGATATGAG
		qPCR-PP2A5_Rv	GGACCTGGCCTAGCATATTAC
	NtRAD9A	qPCR_RAD9A_Fw	TGATGCCACCTTGGTACTTG
		qPCR_RAD9A_Rv	GGGCCTGTCTTCCATCATTAG
	NtWOX1	qPCR_WOX1_Fw	GCCGATGCTAACTCGAATAGT
		qPCR_WOX1_Rv	CCGGTCTCTAGATCCCTTAGTT
	NtGAPDH	GAPDHFW_qPCR	GCATCTTTGATGCCAAGGCTGGA
		GAPDHRV_qPCR	TCGAGTGCTGTAGCCCATTTCGTT
	NtRPL2	RPL2qPCR_Fw	CGGGTGTGTCACTTTCCGTTACC
		RPL2qPCR_Rv	ATACCCTCAGCAGCCACGAAC
RT-PCR	NtSR30	NtSR30-spliced-Fw	GTCCTCGACGGAGCTATAGC
		NtSR30-spliced-Rv	GTGACAGTGGAGATCTGGATC

Fonte: Autoria própria.

2.3 RT-qPCR

Os experimentos de RT-qPCR descritos a seguir foram delineados e analisados com base no documento “Requerimentos Mínimos para a Publicação Experimentos de PCR em Tempo Real Quantitativo”, ou MIQE - *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (BUSTIN et al., 2009).

2.3.1 Análise de Eficiência de *Primers*

Anterior ao experimento de RT-qPCR com as amostras utilizadas para o RNA-seq, foi feita a avaliação da eficiência de amplificação de cada par de *primers* a serem utilizados. Essa análise está descrita nos próximos dois itens.

2.3.1.1 Extrações de RNA e síntese de cDNA

Para as análises de eficiência de *primers* foram utilizados cDNAs de estigmas e estiletes de plantas selvagens de *N. tabacum* **diferentes dos utilizados para o RNA-seq**. Estigmas e estiletes dos estádios 1 a 6 (segundo KOLTUNOW, 1990) foram utilizados em massas iguais para produzir um *pool* de estádios, similar ao

procedimento feito para o RNA-seq. Desse *pool* de estádios, o RNA foi extraído com *TRIzol* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com instruções do fabricante. Desse material, 5 µg foram tratados com DNase I (Thermo Fisher Scientific) para remoção de contaminação com DNA genômico.

O RNA total livre de DNA foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA com o *kit SuperScript™ III* (Invitrogen). Ao RNA total foi adicionado oligo (dT)V (1mM) e dNTPs (10mM). As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos para desnaturação das estruturas secundárias e incubadas em gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se *First-strand Buffer* (1x), DTT (10mM), *RNase out* (20 U) e da enzima *SuperScript™ III* (200 U). As reações foram incubadas em termociclador a 50°C por 40 minutos e a 55°C por 20 minutos. Em seguida, a reação foi inativada, aquecendo-se o tubo a 70°C por 15 minutos e os cDNAs sintetizados foram armazenados a -20°C.

2.3.1.2 Teste de Eficiência

Foi utilizada uma concentração fixa de *primers* (0,125 µM), e reações em duplicata foram feitas utilizando 6 diferentes concentrações (sem diluição, 1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:49) do cDNA gerado com descrito acima. As reações de RT-qPCR foram preparadas com o agente intercalante *SYBR Green*, com o *kit GoTaq® qPCR Master Mix for Dye-Based Detection* (Promega), pela Dra. Andrea Carla Quiapim (LBMP - FFCLRP/USP). Foram feitas reações de 10 µL em placas *MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate* (Thermo Fisher Scientific). Todas as reações foram feitas em duplicata, incluindo os controles sem cDNA (*No Template Control* – NTC).

O aparelho utilizado para as reações e leitura dos dados foi o *7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument* (Applied Biosystems), gentilmente cedido para uso pelo Prof. Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP/Ribeirão Preto). A placa foi analisada no modo *Standard Curve*, com o programa de ciclos: (1) 95°C, 1 min; (2) 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os dados foram analisados no programa *7500 Fast Software v2.3* e exportados para o programa *Microsoft Excel* para as análises estatísticas posteriores.

Após a corrida, foram construídas curvas-padrão para cada par de *primers*, determinando sua eficiência de amplificação (Apêndice 10). Todos os pares de *primers* tiveram eficiência maior que 85%, sendo o intervalo ideal entre 90-110% (BUSTIN et al., 2009). Com as curvas-padrão, também foi possível determinar a diluição ideal de cDNA necessária para que a detecção da amplificação ocorresse entre o Cq 5-25 (BUSTIN et al., 2009).

Foi determinado que a diluição 1:4 do cDNA era suficiente para os genes *NtH2A.1*, *NtMCM4*, *NtRAD9A*, *NtPP2A-5*, *NtBUB3.1*, *NtCYCB1;2* e *NtRecQ4A*; e o cDNA sem diluição foi necessário para os genes *NtCDC45*, *NtKRP3*, *NtMED1*, *NtWOX1*, *NtWEE1*, *NtSR30* e *NtCUC3*. Como controle foram utilizados os genes *NtGLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (NtGAPDH)* e *NtRIBOSOMAL PROTEIN L2 (NtRPL2)*.

2.3.2 Expressão diferencial em plantas de silenciamento de *SCI1*

Com essas informações, foi feito o experimento de RT-qPCR utilizando cDNAs provenientes das mesmas amostras de RNAs utilizadas no RNA-seq. Para isso, os mesmos métodos descritos acima foram utilizados, com exceção de que a placa foi analisada no modo *Comparative CT*. Nesse modo o programa de ciclos utilizados foi: (1) 50°C, 1 min; (2) 95°C, 10 min; (3) 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Foi adicionado o passo de dissociação, de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 15 s e 60°C por 15 s.

2.3.2.1 Cálculo dos valores de *Fold-change*

Para determinar as diferenças da expressão utilizando os dados de qPCR, foi utilizado o método de $\Delta\Delta Cq$ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008). Esse método compara os valores médios de Cq do gene-alvo com os valores médios de Cq dos genes de referência (ΔCq) em cada tratamento (plantas silenciando *SCI1* e selvagens). O $\Delta\Delta Cq$ é calculado com a diferença entre os ΔCq da amostra tratada (silenciamento) em

relação ao controle (planta selvagem). Com o $\Delta\Delta Cq$ é calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, que descreve a quantidade de expressão diferencial para cada gene alvo.

O desvio-padrão (dp) é calculado em passos: (1) cálculo do dp entre as replicatas técnicas e biológicas (6 valores) para cada gene em cada condição; (2) cálculo do desvio padrão do ΔCq pela fórmula $dp_{\Delta Cq} = \sqrt{(dp_1^2 + dp_2^2)}$, onde dp_1 e dp_2 são os desvios-padrão do gene analisado e do gene de referência, respectivamente; (3) o desvio-padrão de $\Delta\Delta Cq$ é o mesmo do desvio-padrão de ΔCq da condição a ser avaliada (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008). Com isso, o valor de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ pode ser calculado de acordo com os $\Delta\Delta Cq$ máximo e mínimo, mostrando a variação existente.

2.4 Comparação entre RNA-seq e RT-qPCR

Para verificar a relação entre as duas técnicas de quantificação de expressão diferencial, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. O coeficiente foi calculado com os parâmetros *default* do pacote *ggpubr* para R (<http://www.sthda.com/english/rpkgs/ggpubr>). Os valores utilizados na análise foram os de $\log_2(\text{Fold-change})$ do RNA-seq e de $\Delta\Delta Cq$ do experimento de RT-qPCR.

2.5 RT-PCR de *NtSR30*

Em primeira instância, foi determinada a concentração ideal de cDNA para ser utilizada no experimento de PCR. Para isso, foram feitas reações de PCR utilizando os mesmos cDNAs de estigmas e estiletos de plantas selvagens e de plantas silenciamento de *SC1* utilizados para o RNA-seq. Foram utilizadas 3 concentrações de cDNAs diferentes nesse passo - sem diluição, 1:4, e 1:9.

As reações foram feitas com o *kit KAPA Taq PCR* (Kapa Biosystems), num total de 20 μL , e submetidas a 30 ciclos de PCR (95°C por 15 s, 55°C por 45 s, 72°C por 60 s). Os produtos das reações foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% com *SYBR-Safe* 1X (Thermo Fisher Scientific), numa corrente de 120V por 3

horas. Para ambas as amostras, foi determinado que a diluição 1:4 foi o suficiente para atingir a amplificação necessária para detectar diferentes transcritos de *NtSR30*.

Em seguida, foram montadas reações de PCR nas mesmas condições anteriores com a diluição do cDNA determinada (1:4). Essas reações foram submetidas a 26-36 ciclos (10 reações/condição), com a intenção de melhor detectar os transcritos de *NtSR30*. As reações foram separadas por eletroforese em gel de agarose 2%, como descrito acima. Após a eletroforese, o gel foi fotografado em transiluminador UV.

2.6 Análises de RNA-seq do ciclo celular de células BY-2

A quantificação da expressão de genes nas amostras de diferentes fases do ciclo celular de células de *N. tabacum* BY-2 foi feita utilizando o programa *Salmon* v2.0 (PATRO et al., 2017), com dados de sequenciamento produzidos por Trolet et al. (2019), disponíveis no banco de dados SRA (*Sequence Read Archive* - Arquivo de Sequências; trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/; registro SRP164893). Resumidamente, foram utilizadas as amostras de sequenciamento de três réplicas de cada fase do ciclo celular - G1, S, G2, M - totalizando em 12 amostras. Os sequenciamentos foram feitos no modo *paired-end*, com *reads* de 75 pb, na plataforma *Illumina HiSeq 4000* (TROLET et al., 2019). Para a quantificação foi utilizado o mesmo transcriptoma referência citado acima, e as análises de expressão foram feitas, como descrito acima, com o programa *ThreeDRNAseq* na versão linha de comando (CALIXTO et al., 2018; GUO et al., 2019).

Os dados de expressão em Transcritos Por Milhão (TPM) para cada gene em cada uma das 12 amostras foram utilizados como dados de entrada para uma análise de agrupamento (ou clusterização). O agrupamento dos genes de acordo com seus perfis de expressão durante o ciclo celular foi feito com o programa *clust v1.10.8* (ABU-JAMOUS; KELLY, 2018). Os parâmetros utilizados foram: *clust genes_tpm.tsv -n 101 3 4 -r Replicates.txt -t 5.0 -d 3*, onde: “-n 101 3 4” indica que os dados devem ser normalizados para gerar um escore-Z; “-t 5.0” indica que os grupos deve ter pouca variação da expressão, mesmo que menos genes se encaixem neles; já “-d 3” significa

que genes devem ter expressão maior que 1 TPM em pelo menos 3 amostras para serem considerados. O restante dos parâmetros foram os *default*.

Para analisar se existe enriquecimento de algum grupo dentre os genes DE da categoria ciclo celular no RNA-seq de estigmas e estiletes de plantas silenciando *SC11* e plantas selvagens, foi feita a distribuição hipergeométrica para cada agrupamento (ou *cluster*). Dos 84 genes DE de ciclo celular, 65 possuem grupos de co-expressão durante o ciclo. Utilizando esses valores, e comparando com a referência, de todos os genes de BY-2 com perfis de co-expressão, a distribuição hipergeométrica indica quais grupos podem ser considerados enriquecidos nas amostras. Os valores do teste hipergeométricos foram corrigidos pelo método de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), para gerar valores de FDR. Foram considerados enriquecidos grupos com $FDR < 0.05$.

2.7 Análises da estrutura gênica de *NtSR30*

As sequências dos transcritos de *NtSR30* (LOC107761364) foram alinhadas com a sequência genômica equivalente utilizando o programa *Splign* v2.1.0 (KAPUSTIN et al., 2008). Esse programa permite observar detalhadamente os eventos de *splicing* que ocorrem em cada transcrito. Em seguida, foram preditos os quadros abertos de leitura (ORFs), com o programa *ORF Finder* (ncbi.nlm.nih.gov/orffinder - (SAYERS et al., 2020).

Esse programa também produz traduções das sequências codificadoras encontradas, as quais foram utilizadas para construir as representações gráficas das proteínas, baseando-se também na identificação de domínios com os programas *InterProScan* (ebi.ac.uk/interpro/search/sequence - JONES et al., 2014) e *CD-Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004). Comparações entre as sequências de aminoácidos de *NtSR30* e *AtSR30* foram feitas com alinhamentos no programa *MAFFT* (mafft.cbrc.jp/alignment/server - KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2017). As informações do gene *AtSR30* foram obtidas do banco de dados ThaleMine e do trabalho de Palusa, Ali e Reddy (2007).

2.8 Expressão da proteína NtCDKG;2 em diferentes tecidos de *N. tabacum*

2.8.1 Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais de diferentes tecidos vegetais, foram utilizadas plantas de *N. tabacum* selvagens (Petit Havana SR1), das quais foram coletados diferentes tecidos, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Foram coletados raízes, folhas e caules em diferentes estádios de desenvolvimento, os quais foram misturados para obter uma amostra representativa de cada tecido. Quanto aos órgãos florais, sépalas, pétalas, anteras, estigma/estiletos e ovários foram separados de flores em diferentes estádios de desenvolvimento (do 3 ao 11, segundo divisão de Koltunow (1990). Novamente, os órgãos de diferentes estádios foram unidos em amostras representativas para cada um. As sementes utilizadas foram coletadas de frutos maduros.

A extração de proteínas foi feita com o método de precipitação com Ácido Tricloroacético e Acetona (TCA-Acetona) de acordo com Mechin, Damerval e Zivy (2007). Brevemente, os tecidos congelados foram pulverizados na presença de nitrogênio líquido e imediatamente colocados em solução de precipitação [ácido tricloroacético 10%, 2-mercaptoetanol 0,07%, em acetona]. Foi utilizada a proporção de 1,8 mL de solução para cada 200 mg de tecido (9:1 v/w). A precipitação ocorreu por 1 h a -20°C, e depois foram feitas 3 lavagens com acetona gelada + 2-mercaptoetanol 0,07% nas mesmas condições.

O precipitado resultante foi secado por centrifugação a vácuo por 30 min utilizando o equipamento *Savant™ SpeedVac™ SPD1030P1* (Thermo Fisher Scientific) no modo automático. Após esse passo, o precipitado foi alcalinizado com NaOH 0,2 M por 1 min na proporção de 20 µL para cada 200 mg de tecido inicial. Depois, foi feita a solubilização com a solução SSSB [uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, DTT 20 mM], na proporção de 480 µL para cada 200 mg de tecido inicial.

Após a extração, as amostras foram quantificadas com reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad 5000006), de acordo com as instruções do fabricante. Para a curva-padrão foi utilizada Albumina de Soro Bovino

(BSA - B9001, New England Biolabs) nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 14 µg/mL.

2.8.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)

Foram utilizados 25 µg de proteína total de cada tecido para a separação de proteínas por massa molecular. Com base na quantificação, as amostras foram diluídas em solução SSSB para ficar com volumes iguais, e foram acrescidas de Tampão de Amostra de Laemmli 4X [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,2%; 2-mercaptoetanol 4%] em quantidade suficiente para atingir a diluição de 1X. Depois, foram desnaturadas a 100°C por 5 minutos. Essas foram então aplicadas em dois géis de poliacrilamida/Tris-Glicina em gradiente de concentração 4-20% (*Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels* - BioRad). Os géis foram submetidos a eletroforese em tampão de corrida [Tris-base 25 mM; SDS 0,05%; glicina 0,2 M] e voltagem de 120 V continuamente por 1 h para a separação das proteínas.

Dos dois géis produzidos, um deles foi corado para verificar o padrão de separação das proteínas totais. O método de Coomassie coloidal foi empregue para esse fim, e seu limite mínimo de detecção é de 1 ng de proteína por banda (CANDIANO et al., 2004). Brevemente, o gel foi fixado em solução [etanol 40%, ácido acético 10%] por 30 min. Depois, foi incubado em solução de Coomassie Coloidal [Brilliant Blue G-250 0,12%, sulfato de amônio 10%, ácido fosfórico 10%, metanol 20%] por 1-18 h. Depois de corado, o gel foi lavado com água deionizada e mantido em solução de ácido acético 5%.

2.8.3 Western Blot

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas do gel para membrana de PVDF (*Amersham™ Hybond® P* PVDF 0.45 - GE10600023, GE Healthcare), através de transferência molhada em tampão de transferência [Tris-base

25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%]. A transferência foi feita com uma corrente de 100 V por 1 hora e 15 minutos. A eficiência do procedimento foi verificada por coloração transiente com a solução [Ponceau S 0,5%, ácido acético 1%] por 2 min. Após esse passo, a membrana foi lavada com água deionizada até a remoção completa do corante.

A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio [1% Blocking Reagent (Roche) diluído em TBST [Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 0,05%]] por 2 horas, temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes de 10 minutos com tampão TBST. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-CDKG;2 (LUBINI, 2016) diluído 1:2700 em solução de bloqueio, permanecendo nessa solução de um dia para o outro a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 10 minutos com o tampão TBST e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP (*anti-rabbit IgG-HRP*, Sigma A0545) diluído 1:10000 em solução de bloqueio. Após a ligação dos anticorpos secundários, a membrana foi lavada novamente 3 vezes por 10 minutos em tampão TBST.

A revelação do Western Blot foi feita com reação de quimiluminescência, de acordo com protocolo gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva (FMRP-USP). Em sala escura, foram misturadas as soluções 1 e 2 (Solução 1: [Tris-HCl 100 mM pH 8.5, Luminol (3-aminofalidrazida) 1,25 mM, ácido p-coumárico 0,2 mM], e Solução 2 [Tris-HCl 100 mM pH 8.5, H₂O₂ 0,01%]), as quais foram colocadas sobre a membrana a ser marcada por 2 minutos. A membrana foi posicionada dentro de um plástico, em um cassete de autorradiografia sob um filme (*Amersham HyperfilmTM ECL* - 28906836, GE Healthcare). O filme foi exposto a membrana por 5 minutos, e foi revelado e fixado utilizando soluções comerciais (Solução reveladora: 8610248; Solução fixadora: 1562826; CARESTREAM).

2.9 Teste de interação de NtCDKF;1 com os domínios de NtCDKG;2

Os experimentos de Y2H para avaliar a interação entre NtCDKF;1 e os diferentes domínios de NtCDKG;2 foi feito como descrito em De Folter e Immink

(2011). Resumidamente, células de levedura da cepa PJ69-4a foram co-transformadas com os dois plasmídeos de cada teste pelo método de acetato de lítio. Os plasmídeos utilizados codificam AD-NtCDKF;1, DBD-NtCDKG;2, DBD-NtCDKG;2 Δ 1-320 (NtCDKG;2 Δ RS) e DBD-NtCDKG;2 Δ 340-669 (NtCDKG;2 Δ QUINASE). As construções com domínios deletados foram feitas e confirmadas por Lubini (dados não publicados).

Os testes entre NtCDKF;1 e as três versões de NtCDKG;2 foram avaliados em meios de seleção para o gene repórter *HIS3*. Como controles de auto-ativação foram utilizadas transformações contendo o plasmídeo de interesse junto de um plasmídeo codificando AD-ccdB-Cm^R ou DBD-ccdB-Cm^R, equivalentes a plasmídeos “vazios”. Também foram utilizados os controles de interação do sistema *ProQuest™ Yeast Two-Hybrid System (Invitrogen)*. Todos os testes foram feitos em triplicata biológica.

2.10 Análise Fenotípica de Sementes

2.10.1 Material Vegetal

Foram analisados quatro tipos de plantas, todas da espécie *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1. O tipo selvagem foi utilizado como controle não-transgênico, e plantas transgênicas com a construção P35S::EGFP-T35S-Kan^R (linhagem 4.2 - STRINI, 2014) foram utilizadas como controle de transgenia (de modo que possíveis fenótipos sejam associados a alteração no gene de estudo e não da presença de um transgene). Para avaliar os efeitos de alteração na expressão de *NtCDKG;2*, foram utilizadas plantas transgênicas com a construção P35S::NtCDKG;2-T35S-Kan^R (linhagens 9.2, 11.1 e 32.2 - LUBINI, 2012) superexpressando o gene *NtCDKG;2*, e plantas transgênicas com a construção P35S::NtCDKG;2(1-127)-intron-antisenseNtCDKG;2(127-1)-Kan^R (linhagens 54A, 119A, 123A - LUBINI, 2012) silenciando o gene *NtCDKG;2*.

Sementes dessas plantas foram esterilizadas através de vapor de cloro (BENT, 2006). Depois, foram germinadas em meio de cultura Murashigue-Skoog (MS), suplementado com o antibiótico canamicina no caso das plantas transgênicas. O

crescimento inicial ocorreu em estufa de temperatura e luminosidade controlada, a 26 °C e fotoperíodo de 16 horas claro/8 horas escuro. Após 2 semanas, as plântulas foram transferidas a vidros maiores, contendo o mesmo meio de cultura, onde foram mantidas por 3 semanas nas mesmas condições de crescimento anteriores. Após esse período, as plantas foram transferidas a um substrato orgânico (Bioplant), onde continuaram até se recuperar da transferência do meio artificial para o substrato. Após esse período, as plantas foram transferidas para vasos maiores contendo o mesmo substrato, e mantidas em casa de vegetação, com duas irrigações diárias, e submetidas as condições ambientais de temperatura e luminosidade. Após o florescimento, foi feita a autopolinização controlada das flores.

Para isso, flores maduras que não sofreram ântese foram emasculadas, e grãos-de-pólen de flores abertas foram transferidos ao estigma das flores manipuladas. Canudos de plástico foram utilizados para isolar os estigmas polinizados, evitando polinizações cruzadas. Os frutos resultantes foram coletados após sua maturação, e armazenados em envelopes de papel até que secassem completamente. As sementes resultantes da autopolinização foram utilizadas para as análises fenotípicas.

2.10.2 Medição do tamanho das sementes

Para avaliar o efeito da alteração da expressão do gene *NtCDKG;2*, foi utilizada uma variação do método de Herridge et al. (2011). Para obter as imagens das sementes das diferentes plantas analisadas, elas foram dispostas sob um esteromicroscópio acoplado a uma câmera (modelo *Leica M205A*). As sementes foram dispostas de modo a não encostarem umas nas outras, e foram capturadas imagens com os mesmos parâmetros de iluminação e captura em todos os casos, para evitar alterações nas medições provenientes de parâmetros diferentes.

As imagens obtidas foram processadas com o programa *Fiji-ImageJ* 2.1.0/1.53c (SCHINDELIN et al., 2012). Nele, essas foram transformadas em imagens de 8-bit em escala de cinza. As sementes foram destacadas com a ferramenta *Threshold*, com os mesmos parâmetros para todas as imagens. O passo seguinte foi

utilizar a ferramenta *Analyze Particles*, de modo a produzir medições de perímetro e área para cada partícula (semente) analisada. Os dados foram concatenados em uma tabela para posterior análise estatística.

Os dados correspondentes as áreas das sementes de cada tipo de planta foram analisados no programa R, onde foi aplicado o teste ANOVA de um fator para avaliar a diferença entre as amostras. O teste Tukey foi aplicado para verificar a probabilidade das diferenças par-a-par entre as linhagens, com intervalo de confiança de 95% (p -valor < 0,05).

2.11 Análises *in silico* de sequências de aminoácidos

Para analisar as diferentes sequências de aminoácidos apresentadas neste trabalho, diferentes estratégias foram empregadas. De maneira geral, alinhamentos de sequências foram feitas com o programa *MAFFT* (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2017), utilizando sempre parâmetros *default*. Para analisar a presença de domínios quinase, foi utilizado o programa *CD-Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004). Para identificar a presença de peptídeos PEST, foi utilizado o programa *pepfind* (bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepfind; RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000). Análises da presença de dipeptídeos RS foram feitas manualmente.

2.12 Análises filogenéticas de CDKGs

As análises filogenéticas com NtCDKG;2 foram feitas para melhor compreender a história evolutiva das CDKGs em plantas. Para isso, foram utilizadas as sequências de aminoácidos de NtCDKG;2, AtCDKG;1, AtCDKG;2 para realizar uma busca com o programa *BLASTP* v2.10.1+ (CAMACHO et al., 2009) em um banco de dados preparado com sequências de aminoácidos das espécies *Arabidopsis thaliana* (Araport11), *Nicotiana tabacum* (TN90 - NCBI), *Populus trichocarpa* (Pop_tri_v3 - NCBI), *Oryza sativa* subsp. *japonica* (IRGSP-1.0), *Sorghum bicolor* (NCBIv3), *Zostera marina* (v2.1 - NCBI), *Amborella trichopoda* (AMTR1.0 - NCBI), *Selaginella*

moellendorffii (v1.0 – NCBI), *Physcomitrella patens* (Phypa V3 – NCBI), *Marcanthia polymorpha* (v3.1 - NCBI), *Chlamydomonas reinhardtii* (v5.5 - NCBI), e *Klebsormidium nitens* (ASM70883v1 - NCBI).

A busca foi feita com um valor de corte *e-value* < 0.00001, resultando em 534 sequências com similaridade às 3 sequências buscadas. Desse conjunto, foram removidas sequências duplicadas com o programa *skipredundant* resultando em 334 sequências não-redundantes. Também foram removidas sequências menores que 75% do tamanho de AtCDKG;1, a menor proteína das 3 buscadas, resultando em 192 sequências com mais de 459 aminoácidos.

Nesse conjunto, foi feita uma busca manual para remover sequências resultantes de *splicing* alternativo do mesmo gene, sendo mantida a maior isoforma de cada uma. O conjunto final possui 181 sequências, as quais foram alinhadas com o programa *MAFFT* com os parâmetros `--thread 10 --threadtb 5 --threadit 0 --reorder --allowshift --unalignlevel 0.0 --leavegappyregion --maxiterate 1000 --retree 1 --globalpair input`.

O alinhamento resultante foi submetido a uma análise filogenética por máxima verossimilhança com o programa *PhyML v3.0* (GUINDON et al., 2010) utilizando a seleção automática de modelo de substituição (método SMS), com o critério de seleção *AIC* (*Aikake Information Criterion*). A árvore inicial foi feita pelo método *BIONJ*, com melhoramento de árvores por *NNI* (*Nearest-Neighbor Interchange*) e suporte de clados feito com *aBayes*, um método rápido de verossimilhança (GUINDON et al., 2010).

A árvore obtida, contendo todas as sequências, foi utilizada para selecionar sequências que se agruparam com suporte de clados > 0.9 com as sequências de AtCDKG;1, AtCDKG;2 e NtCDKG;2. Essas 22 sequências foram re-alinhadas e utilizadas para construir a árvore final, utilizando os mesmos métodos anteriores.

3 Capítulo I - Análise do efeito do silenciamento de *SC11* na expressão gênica em estigmas e estiletes

3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tentativa de compreender as consequências do silenciamento do gene *SC11* e seu papel na regulação da proliferação celular durante o desenvolvimento do pistilo, realizou-se um experimento de sequenciamento de RNAs em larga escala (RNA-seq). Nesse experimento, comparou-se a expressão de genes nos estigmas e estiletes de plantas transgênicas com silenciamento de *SC11* (linhagem *SC11 Ri14.2* - DEPAOLI et al., 2011) com a expressão em plantas controle não-transgênicas (cultivar *Petit Havana SR1*). Para isso, foram utilizadas 3 réplicas biológicas de cada condição, denominadas de *RNAi_A*, *RNAi_B* e *RNAi_C* para amostras de silenciamento de *SC11*, e *SR1_A*, *SR1_B* e *SR1_C* para amostras de plantas controle. Cada amostra de RNA foi preparada de uma mistura de estigmas/estiletes dos estádios 1 a 6 do desenvolvimento do pistilo (segundo Koltunow et al., 1990), em massas proporcionais. Os estádios foram escolhidos devido à expressão alta de *SC11* no início do desenvolvimento do pistilo (DEPAOLI et al., 2011), portanto é esperado que nesse momento os efeitos do seu silenciamento sejam mais significativos.

As amostras foram preparadas para o sequenciamento, no Grupo BGI (Beijing Genome Institute), por meio da seleção de RNAs com caudas poli-adeniladas, seguida de síntese de cDNAs. Os cDNAs foram processados para gerar fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases (pb). A seguir, os fragmentos foram sequenciados na plataforma *Illumina HiSeq 2000* (Illumina). O sequenciamento foi realizado no modo *paired-end*, o qual produz sequências das extremidades dos diferentes fragmentos de cada um dos cDNAs. Dessa forma, para cada fragmento é realizado um sequenciamento *forward* e um *reverse*, e essas sequências são chamadas de pares. Depois é feita a limpeza das *reads*, removendo sequências de adaptadores e bases de baixa qualidade. Portanto, no final desse processo, cada par de *reads* consistiu em duas sequências de 90 bases cada. O sequenciamento em pares (*paired-end*) é vantajoso pois permite o alinhamento mais acurado em análises subsequentes em comparação com o sequenciamento de uma única extremidade

(NAKAZATO; OHTA; BONO, 2013). Toda a análise de bioinformática das *reads* foi feita ao longo do presente trabalho.

3.1.1 Análise da qualidade dos resultados do RNA-seq

Para determinar a expressão de genes em cada amostra de sequenciamento, foi utilizada a estratégia de mapeamento de *reads* ao transcriptoma referência de *N. tabacum* com o programa *Salmon* (PATRO et al., 2017). Com esse método, a expressão gênica é determinada pela soma da expressão dos transcritos quantificadas com o mapeamento. Esse método é um dos mais utilizados e eficientes para analisar a expressão gênica baseada em RNA-seq (SRIVASTAVA et al., 2020). É importante salientar aqui que em espécies alotetraplóides, como é o caso de *N. tabacum*, é comum a presença de genes homeólogos, os quais produzem transcritos muito similares (EDWARDS et al., 2017). Nesse caso, é possível que *reads* tenham similaridade com transcritos provenientes de dois genes homeólogos, gerando mapeamentos ambíguos. Dessa forma, o método utilizado possibilita estimar a abundância dos genes considerando a incerteza causada por mapeamentos ambíguos de *reads* (HU et al., 2020).

Neste trabalho, mais de 85% das *reads* foram mapeadas no transcriptoma referência de *N. tabacum* em todas as amostras, como descrito na Tabela 2. Essa alta porcentagem demonstra que nossas amostras de sequenciamento estavam em boa condição, permitindo as análises de expressão posteriores. Por outro lado, porcentagens baixas de mapeamento (<70%) podem indicar diversos problemas experimentais. Dentre eles, a limpeza ineficiente das *reads* (retirada de nucleotídeos de baixa qualidade e adaptadores de sequenciamento), contaminações com rRNAs (má seleção de mRNAs) ou DNA humano (má manipulação), além da degradação parcial dos RNAs (LEE, 2015).

Tabela 2. Resultado do mapeamento das reads sequenciadas ao transcriptoma referência, com o programa *Salmon* (PATRO et al., 2017). **Amostras:** SR1_A, SR1_B e SR1_C – 3 amostras biológicas de plantas controle sequenciadas; RNAi_A, RNAi_B e RNAi_C – 3 amostras biológicas de plantas de silenciamento de *SCI1* sequenciadas. **Pares de reads:** número de pares de 90 b em cada amostra. **Reads alinhadas:** porcentagem de sequências que possuem correspondentes no transcriptoma referência.

Amostra	Condição	Pares de Reads	Reads alinhadas
SR1_A	Controle (SR1)	52.057.560	87,54%
SR1_B		47.717.370	87,31%
SR1_C		54.032.527	88,34%
RNAi_A	Silenciamento de <i>SCI1</i>	52.275.799	87,94%
RNAi_B		53.685.914	87,62%
RNAi_C		46.602.819	88,14%

Fonte: Autoria própria.

Outra medida de avaliação da qualidade do sequenciamento é a análise de componentes principais das amostras (PCA – *Principal Component Analysis*). Essa análise é capaz de projetar a variância da quantificação de milhares de genes em dimensões chamadas de componentes principais (PCs). Genes altamente expressos em uma amostra, mas que são muito pouco expressos em outra amostra biológica, por exemplo, são a causa de alta variância registrada nos PCs. Depois do cálculo dos PCs, a análise os classifica em ordem de mais alta variância para a mais baixa (PC1 contém mais variância que PC2 e assim por diante). Com isso, os PC1 e PC2 geralmente refletem as maiores variâncias em um experimento (GUO et al., 2019). Como resultado, a PCA permite detectar amostras com perfis de expressão similares. Essa medida é um bom indicativo da semelhança entre réplicas biológicas, ao mesmo tempo que mostra a diferença entre as condições analisadas.

A PCA das amostras utilizadas neste trabalho mostrou que houve agrupamento das mesmas de acordo com a sua condição experimental (Figura 7). O componente PC1 mostra que 41,21% dos genes têm alta variância de expressão entre as amostras analisadas, enquanto PC2 representa 25,79% dos genes com a segunda mais alta variância. Segundo a análise, o componente PC1 mostra que também existe alguma variância entre as amostras de uma mesma condição, o que é comum entre réplicas biológicas (BLAINEY; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2014). Em suma, as análises do RNA-

seq mostram que os dados são de ótima qualidade e permitem os estudos de expressão gênica.

Figura 7. Análise de componentes principais das amostras de RNA-seq.

Eixo x: PC1 representa 41,21% dos genes, os quais possuem alta variância de expressão entre as amostras analisadas. Eixo y: PC2 representa 25,79% dos genes com a segunda mais alta variância de expressão. A análise mostra que as três réplicas biológicas se agrupam de acordo com suas condições experimentais. Fonte: Autoria própria.

3.1.2 O silenciamento de *SCI1* afeta negativamente a expressão da maioria dos genes diferencialmente expressos nos estigmas/estiletos de *N. tabacum*

Para verificar se existe expressão diferencial de genes entre estigmas e estiletos de plantas de silenciamento de *SCI1* e plantas controle, utilizou-se o método *edgeR-limma* (RITCHIE et al., 2015; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009) no programa *ThreeDRNAseq* (GUO et al., 2019). Nesse método, o primeiro passo consiste na filtragem de genes, eliminando aqueles com baixa expressão, ou seja, genes com menos de 1 Contagem Por Milhão (CPM < 1) na soma das amostras. A unidade CPM representa a quantidade de *reads* mapeadas ao gene, dimensionada pelo número de

fragmentos sequenciados $\times 10^6$ (SHA; PHAN; WANG, 2015). Assim, a CPM leva em conta a cobertura do sequenciamento na quantificação da expressão e permite comparar variações entre réplicas de uma mesma condição (SHA; PHAN; WANG, 2015). No presente trabalho, foi utilizado um valor de filtro pouco restritivo, no intuito de identificar genes pouco expressos, os quais podem ter impactos no desenvolvimento da planta. Com isso, dos 69.187 genes presentes na anotação de *N. tabacum*, 42.360 (61,2%) tiveram expressão maior que 1 CPM no conjunto de amostras analisado (APÊNDICE A). Esse número indica que os sequenciamentos representam uma grande quantidade de genes de *N. tabacum*. Essa informação é importante, pois a sub-representação de genes em experimentos de RNA-seq pode indicar problemas na cobertura do sequenciamento (GARCÍA-ORTEGA; MARTÍNEZ, 2015).

O segundo passo do método *edgeR-limma* consiste na normalização dos valores de CPM pelo método de média truncada de valores M (TMM - *trimmed mean of M values* - ROBINSON; OSHLACK, 2010). De acordo com Robinson e Oshlack (2010, p. 6, tradução nossa):

A normalização TMM é um método simples e efetivo para estimar os níveis relativos da produção de RNAs a partir de dados de RNA-seq. O método TMM estima fatores de escala entre as amostras, que podem ser incorporados aos métodos estatísticos utilizados atualmente para a análise de expressão diferencial.

Esse passo é importante pois, caso não seja realizada a normalização, os artefatos intrínsecos ao método de RNA-seq dificultam a comparação da expressão gênica (ROBINSON; OSHLACK, 2010).

Após a normalização, o terceiro passo do método *edgeR-limma* consiste na análise da expressão diferencial. Essa análise é feita com um modelo linear, levando em conta a influência da cobertura de sequenciamento de cada amostra na expressão dos genes (LIU et al., 2015; RITCHIE et al., 2015). A expressão diferencial foi considerada significativa para genes com Taxa de Falso Descobrimento (FDR – *False Discovery Rate*) menor que 0.05, calculada com o método Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Complementarmente, foram considerados diferencialmente expressos, genes com valores de $|\log_2(\text{Fold-change})|$ maiores que 1.

Como resultado da aplicação do método *edgeR-limma*, a análise de expressão diferencial identificou 1.510 genes diferencialmente expressos (DE) entre as duas

condições analisadas. Desses genes, 1.097 (72,65%) possuem expressão reduzida e 413 genes (27,35%) possuem aumento da expressão nos estigmas/estiletes de plantas silenciando *SCI1*, em comparação com a planta controle. Isso significa que *SCI1* possa agir direta ou indiretamente na regulação positiva de pelo menos dois terços dos genes DE nessas condições. Os resultados completos da análise de expressão diferencial encontram-se no APÊNDICE B.

Dos genes DE, 14 foram escolhidos para confirmar se as diferenças de expressão, estimadas no experimento de RNA-seq, são reproduzíveis por RT-qPCR, utilizando uma análise de correlação linear (Pearson). Os genes escolhidos apresentam funções interessantes para pesquisas do LBMP, e pertencem às categorias “ciclo celular”, “*splicing*” e “desenvolvimento floral”. São eles: *NtKINASE INHIBITOR PROTEIN 3* (*NtKRP3*), *NtMINICHROMOSOME MAINTENANCE 4* (*NtMCM4*), *NtMEDIATOR COMPLEX SUBUNIT 1* (*NtMED1*), *NtDNA HELICASE RecQ 4A* (*NtRecQ4A*), *NtPROTEIN PHOSPHATASE 2A CATALYTIC SUBUNIT 5* (*NtPP2A-5*), *NtCELL DIVISION CONTROL 45* (*NtCDC45*), *NtHISTONE 2A* (*NtH2A*), *NtCYCLIN B1;2* (*NtCycB1;2*), *NtRAD9A*, *NtBUB3.1* e *NtWEE1*, representando o ciclo celular; *NtSERINE/ARGININE RICH PROTEIN 30* (*NtSR30*), representando o *splicing*; e *NtWUSCHEL-like HOMEODOMAIN 1* (*NtWOX1*) e *NtCUP-SHAPED COTYLEDON 3* (*NtCUC3*), representando o desenvolvimento floral. Suas funções estão mais bem descritas nos itens 3.1.3.1, 3.1.3.3, e 3.1.3.4 deste trabalho.

Para todos esses 14 genes, os resultados de RT-qPCR corroboram os dados de expressão diferencial encontrados através de RNA-seq (Figura 8A). Isso significa que todos os genes *down*-regulados (com expressão reduzida) em um experimento também se mostraram *down*-regulados através da outra técnica e o mesmo ocorreu com os genes *up*-regulados (com expressão aumentada). Adicionalmente, o coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a relação linear (SIMON; MOORE, 1996) entre os valores encontrados nos dois experimentos. Como resultado, foi encontrado o valor de $R^2 = 0,93$ com um p -valor = $3,5 \times 10^{-8}$ (Figura 8B). De acordo com Everaert et al. (2017), esse valor demonstra que existe alta correlação entre os valores obtidos por RNA-seq e aqueles encontrados pelo RT-qPCR.

Figura 8. Correlação entre os valores de diferença na expressão avaliados por RNA-seq e RT-qPCR de 14 genes entre plantas de silenciamento de *SCI1* e as plantas controle.

A - Comparação dos valores de diferença na expressão encontrados por cada método. Em laranja: valores de $\log_2FC$ encontrados pelo método de RNA-seq; em azul: valores de $\Delta\Delta Cq$ encontrados pelo método de RT-qPCR. Barras: desvio-padrão. **B** – Análise de correlação de Pearson, com p -valor = $3,5 \times 10^{-8}$. Em cinza = intervalo de confiança. Fonte: Autoria própria.

3.1.3 Os genes diferencialmente expressos com o silenciamento de *SCI1* participam de diferentes processos biológicos

Para realizar a classificação funcional dos genes DE, fizemos uma análise de enriquecimento de termos *Gene Ontology* (GO) com seus homólogos de *A. thaliana*. Os termos GO compõem um conjunto de vocábulos unificado para a classificação de genes, de acordo com as suas funções publicadas ou predições *in silico* (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2019). Esse método foi escolhido pois a anotação de GOs de *N. tabacum* está incompleta e, utilizando *A. thaliana*, é possível obter um panorama mais completo das funções afetadas por *SCI1*.

Isto posto, os homólogos em *A. thaliana* dos genes DE de *N. tabacum* foram determinados por análises de similaridade de sequências utilizando o programa *BLASTX* (CAMACHO et al., 2009). Com essa análise, identificamos que dos 1.510 genes DE, 1.184 genes de *N. tabacum* correspondem a 1.087 putativos homólogos em *A. thaliana* (APÊNDICE B). Neste caso, é preciso destacar que *N. tabacum* é uma

espécie alotetraplóide e *A. thaliana* é uma espécie diplóide. Portanto, alguns genes de *N. tabacum* são pares de homeólogos dos genomas ancestrais, os quais são considerados homólogos de um mesmo gene de *A. thaliana*.

A análise de enriquecimento de termos GO dos 1.087 putativos homólogos de *A. thaliana*, correspondentes aos genes DE, resultou em 257 termos GO enriquecidos. Desses, 160 pertencem à categoria “Processo Biológico”, 43 à categoria “Função Molecular” e 54 à categoria “Componente Celular”. Os termos da categoria “Processo Biológico” são os mais interessantes para este trabalho, visto que apontam quais processos são perturbados pelo silenciamento de *SC11*. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da análise de enriquecimento para os seguintes termos: “ciclo celular (*cell cycle*)”, “replicação de DNA (*DNA replication*)”, “reparo de DNA (*DNA repair*)”, “resposta à auxina (*response to auxin*)”, “desenvolvimento de estrutura reprodutiva (*reproductive structure development*)” e “processamento de RNAs (*RNA processing*)”. Os genes pertencentes a esses termos foram escolhidos para investigações mais aprofundadas, visto que reforçam as hipóteses propostas ao funcionamento de *SC11*. Os resultados completos da análise de termos GO podem ser encontrados no APÊNDICE C. É importante ressaltar que alguns genes estão incluídos em mais de uma categoria, visto que podem ser associados a diferentes funções. Essa sobreposição se reflete na repetição de alguns genes nas tabelas apresentadas durante as seções seguintes.

Tabela 3. Termos GO da categoria “Processo Biológico” enriquecidos no experimento de RNA-seq. **Número de genes DE:** número de genes presentes na lista de genes DE (somente homólogos de *A. thaliana*) que se associam ao termo. **Número na referência:** número total de genes de *A. thaliana* associados com o termo. **p-valor:** probabilidade do enriquecimento ocorrer ao acaso. **FDR:** Taxa de falso descobrimento - correção do p-valor para evitar falsos positivos.

Termo GO	Descrição	Número de genes DE	Número de genes no genoma de referência	p-valor	FDR
GO:0007049	cell cycle	54	558	3.20E-09	1.80E-06
GO:0006260	DNA replication	19	146	1.10E-05	0.001
GO:0006281	DNA repair	26	295	0.00015	0.0079
GO:0009733	response to auxin	31	407	0.00042	0.019
GO:0048608	reproductive structure development	83	1265	5.50E-06	0.0006
GO:0006396	RNA processing	45	693	0.00069	0.028

Fonte: Autoria própria.

Nas quatro próximas seções estão descritos exemplos de genes DE, separados de acordo com os termos GO aos quais pertencem. A nomenclatura utilizada para os genes representa sua descrição no banco de dados NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/gene). Visto que esse banco não possui abreviações para os genes, nos casos em que os genes homólogos entre *N. tabacum* e *A. thaliana* possuem nomes idênticos, as abreviações foram feitas com base no banco de dados ThaleMine (bar.utoronto.ca/thalemine). Além disso, para distinguir os pares de homeólogos de *N. tabacum* foram adicionadas as letras “a” e “b”.

Para todos os genes descritos, o valor de $\log_2FC$ [$\log_2(Fold-Change)$] representa quantas vezes a expressão está alterada. Por exemplo, um valor de $\log_2FC$ de “1,5” (*up-regulado*) significa que o gene em questão está 2,83 ($2^{1,5}$) vezes expresso nas plantas de silenciamento de *SC1/1*, em comparação com a planta controle. Em contraste, um valor de “-1,5” (*down-regulado*) significa que o gene está 0,35 ($2^{-1,5}$) vezes expresso nas mesmas condições. No decorrer deste trabalho, o valor de $\log_2FC$ é colocado entre parênteses após o nome ou abreviação do gene DE, em sua primeira menção.

3.1.3.1 O silenciamento de *SC1/1* afeta a expressão de genes que atuam em diferentes momentos durante o ciclo celular

Dentre os genes DE, 84 podem ser associados ao ciclo celular e aos processos relacionados de replicação e reparo do DNA. Nesse grupo, 81 genes se encontram *down-regulados*, em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC1/1*, e possuem variação do $\log_2FC$ entre -2,16 e -1,01 (Tabela 4). Por outro lado, 3 desses genes estão *up-regulados*, com $\log_2FC$ variando entre 1,19 e 4,24 (Tabela 4). Na Figura 9 estão representados os genes DE associados ao ciclo celular, separados de acordo com as fases em que podem atuar.

À primeira vista, chamam a atenção quatro ciclinas: *NtCyclinB1;2* ($\log_2FC = -1,63$), *NtCycD3;1* (-2,16), *NtCycC1;2* (-1,17), e *NtCycL1;1* (-1,14). As ciclinas *CycB1;2* e *CycD3;1* já foram descritas no ciclo celular de *N. tabacum* e *A. thaliana*. Em *N. tabacum*, *NtCycB1;2* atua na transição G2/M do ciclo celular (SCHNITTGER et al.,

2002) e, em *A. thaliana*, AtCycB1;2 foi descrita como essencial para induzir a mitose e como parte do APC/C (FÜLÖP et al., 2005). Já a ciclina NtCycD3;1 participa das transições G1/S e G2/M em *N. tabacum* (BREYNE et al., 2002; KAWAMURA et al., 2006). Em contraponto, em *A. thaliana* AtCycD3;1 parece estar envolvida apenas na transição G1/S (MENGENS et al., 2006).

Figura 9. Genes DE em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC1/1*, que podem ser associados às diferentes fases do ciclo celular.

Em vermelho: genes *down-regulados* em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC1/1* em comparação com a planta controle. Em azul: genes *up-regulados*. G1: *gap 1*; S: síntese; G2: *gap 2*; M: mitose. A distribuição dos genes de acordo com as fases do ciclo celular foi feita de acordo com suas putativas funções, com base na literatura de seus homólogos de *A. thaliana*. Fonte: Autoria própria.

A ciclina AtCycC1;2 de *A. thaliana* é expressa em folhas durante a proliferação celular (BEEMSTER et al., 2005), e em flores durante o seu desenvolvimento (AGRAWAL; JIŘÍ; THAKUR, 2020). Ela também é constantemente expressa durante o ciclo celular (MENGENS et al., 2005), porém nenhuma função específica nesse processo foi determinada. Além disso, em *A. thaliana* ela é um componente do complexo *Mediator* (AGRAWAL; JIŘÍ; THAKUR, 2020). Esse complexo participa da

transcrição gênica mediada pela RNA polimerase II, função indispensável para o desenvolvimento da planta (AGRAWAL; JIŘÍ; THAKUR, 2020).

Em *A. thaliana*, a ciclina AtCycL1 é expressa durante o ciclo celular (MENGES et al., 2005; VAN LEENE et al., 2010), porém papéis específicos nesse processo não foram descritos. Os esforços para sua caracterização nessa espécie vêm sendo concentrados em seu envolvimento no *splicing* (CAVALLARI et al., 2018; MA et al., 2015; NIBAU et al., 2020; XU et al., 2012). Em *N. tabacum*, a ciclina NtCycL1;1 é parceira de interação da CDK NtCDKG;2, e ambas essas proteínas interagem com SCI1 (FERREIRA, 2016; LUBINI, 2016; PINOTI, 2016). A interação entre essas três proteínas é um dos alvos de estudo no laboratório no qual este trabalho foi desenvolvido. Ainda não é totalmente compreendido como essas proteínas participam da regulação do ciclo celular, porém SCI1 é um potencial inibidor de complexos ciclina-CDK (DEPAOLI; GOLDMAN; GOLDMAN, 2012). Adicionalmente, a participação de NtCycL1;1-NtCDKG;2 e de SCI1 no *splicing* em *N. tabacum* vem sendo investigada no laboratório (STRINI, 2014; PINOTI et al., em preparação). A *down*-regulação de um gene que codifica uma parceira de interação de *SCI1* não necessariamente é um efeito direto do silenciamento desse gene. Dessa forma, o efeito de *SCI1* sobre o ciclo celular ou o *splicing* (discutido posteriormente no item 3.1.3.4, p.100), pode indiretamente afetar a expressão dessa ciclina.

Ciclinas são expressas durante o ciclo celular e geralmente promovem sua progressão (DE VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007). Reiterando, *SCI1* foi descrito como um inibidor do ciclo celular, cujo silenciamento resulta no aumento do número de células nos estigmas/estiletos (DEPAOLI et al., 2011). Dessa forma, esperava-se que a expressão de ciclinas fosse maior quando *SCI1* estivesse silenciado. Entretanto, foi observada a *down*-regulação de ciclinas nas plantas de silenciamento de *SCI1*. Essa contradição pode ser explicada pelo fato de SCI1 ser expresso desde o meristema floral (CRUZ, 2018), antes da diferenciação dos órgãos, a qual se inicia previamente ao estágio -7 (CRUZ, 2018; KOLTUNOW et al., 1990). Adicionalmente, DePaoli et al. (2011) observaram uma aparente aceleração do desenvolvimento do pistilo em plantas de silenciamento de *SCI1*. Nesse contexto, é importante evidenciar que o desenvolvimento de órgãos florais ocorre em três processos subsequentes: a formação dos padrões de identidades dos órgãos, seu crescimento e a diferenciação celular (BÖGRE; MAGYAR; LÓPEZ-JUEZ, 2008; SABLÓWSKI, 2015). Assim, a

aparente aceleração do desenvolvimento em plantas de silenciamento de *SCI1* pode ser um resultado do aumento da proliferação de células na ausência desse inibidor desde antes do estágio -7. É preciso destacar que o experimento de RNA-seq foi realizado com estigmas/estiletos dos estádios 1 a 6 de desenvolvimento, nos quais o pistilo já está diferenciado. Ou seja, a *down*-regulação de ciclinas pode significar sua sub-representação, caso a proliferação celular não mais seja o processo predominante no crescimento desse órgão nesses estádios. Apesar disso, pode-se argumentar que a sub-representação de ciclinas consiste exatamente em um reflexo do que ocorre nos estádios iniciais de desenvolvimento quando *SCI1* está silenciado. Ou seja, a *down*-regulação de ciclinas observada pode ser interpretada como menores taxas de proliferação nos estádios 1 a 6 em estigmas/estiletos de plantas de silenciamento de *SCI1*, em comparação com o controle.

Outro gene DE, *NtWEE1* (-1,93), também está *down*-regulado em plantas de silenciamento de *SCI1*. Em *N. tabacum*, esse gene codifica uma quinase importante que atua nos pontos de checagem (*checkpoints*) do ciclo celular (COOK et al., 2013). A proteína NtWEE1 é detectada principalmente na transição entre as fases S/G2, onde atua no *checkpoint* de integridade do DNA (COOK et al., 2013). Segundo Cook et al. (2013), NtWEE1 é capaz de inibir complexos CDK-ciclina durante a fase S do ciclo. Com isso, ocorre a parada do ciclo celular, permitindo a atuação da via de reparo de DNA (NISA et al., 2019). Cook et al. (2013) também verificaram a localização de AtWEE1-GFP durante as diferentes fases do ciclo celular na cultura de células BY-2 de *N. tabacum*. O padrão de localização dessa quinase é similar ao padrão observado para SCI1-GFP no mesmo tipo celular por Strini et al. (submetido). Em ambos os estudos, as proteínas AtWEE1-GFP e SCI1-GFP são degradadas logo antes da metáfase e reaparecem durante a telófase. Assim, esses dados sugerem que as funções de NtWEE1 e SCI1 estejam conectadas, principalmente se for considerado seu papel na inibição de complexos ciclina-CDK.

Outro gene interessante é *NtCYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 3* (*NtKRP3*, -1,57). Esse gene é um homólogo de *KRP3* de *A. thaliana*, membro da classe ICK/KRP de inibidores de CDKs. Em *A. thaliana*, mutantes quintuplos *krp1/krp2/krp3/krp4/krp7* apresentam aumento na expressão de genes dependentes de fatores de transcrição da família *E2 Factor* (E2F), os quais promovem o ciclo celular na transição G1/S (CHENG et al., 2013). Entretanto, Cheng et al. (2013) verificaram

que existe redundância na função de KRPs, visto que mutantes de apenas uma KRP não apresentam fenótipos dissidentes da planta selvagem. Dessa forma, a *down*-regulação de *NtKRP3* não necessariamente reflete a alteração direta do ciclo celular.

Curiosamente, 13 genes de *N. tabacum*, cujos homólogos em *A. thaliana* são alvos da regulação por E2Fs (CHENG et al., 2013; VANDEPOELE et al., 2005), estão *down*-regulados nas plantas com *SCI1* silenciado, são eles: *NtMINICHROMOSOME MAINTANENCE 4* (*NtMCM4*, -1,42), *NtMCM7* (-1,46), *NtMCM9* (-1,23), *NtCELL DIVISION CONTROL 45* (*NtCDC45*, -1,27), *NtATP-DEPENDENT DNA HELICASE Q 1* (*NtRECQ1*, -1,24), *NtSISTER CHROMATID COHESION 1 HOMOLOG 3* (*NtSYN3*, -1,57), *NtF-BOX-LIKE 17* (*NtFBL17*, -1,48), *NtDUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1* (*NtDUT1*, -1,62; *NtDUT1-like*, -1,62), *NtMUTS HOMOLOG 6* (*NtMSH6*, -1,13), *NtDNA POLYMERASE ETA* (*NtPOLε*, -1,28), *NtPOLLEN SEMI-STERILITY1* (*NtPSS1*, -1,42), e *NtBARELY ANY MERISTEM 3* (*NtBAM3*, -1,13).

Os genes *NtMCM4*, *NtMCM7* e *NtMCM9* codificam subunidades do complexo MINICHROMOSOME MAINTENANCE (TUTEJA et al., 2011). Ademais, dois genes que codificam outra subunidade desse complexo estão *down*-regulados em plantas silenciando *SCI1*: *NtMCM10* (-1,06), e *NtMCM10-like* (-1,33). Adicionalmente a esses cinco genes, *NtORIGIN OF REPLICATION COMPLEX 1* (*NtORC1*, -1,22), *NtORC5* (-1,21), *NtCDC45*, *NtFLAP ENDONUCLEASE 1* (*NtFEN1*, -1,57) e *NtMEIOSIS DEFECTIVE1* (*NtMEI1*, -1,11) podem ser importantes para a replicação do DNA, durante as fases G1 e S do ciclo celular, como demonstrado para seus homólogos em *A. thaliana* (SHULTZ et al., 2007). Esses resultados sugerem que possa haver uma redução da proliferação celular nos estádios 1 a 6 do desenvolvimento dos estigmas/estiletos nos quais *SCI1* está silenciado. Dessa forma, assim como a sub-representação de ciclinas indica que o papel de *SCI1* no controle do ciclo celular antecede os estádios analisados, a *down*-regulação desse grupo de genes envolvidos na replicação de DNA reforça essa hipótese.

Genes de reparo de DNA também podem estar envolvidos no ciclo celular e alguns genes DE se encaixam nessa categoria. Além dos supracitados *NtMCM4*, *NtMCM7*, *NtMCM9*, *NtSYN3*, *NtMSH6*, *NtCDC45*, *NtDUT1*, *NtDUT1-like*, *NtFEN1*, e *NtPOLε*, estão também nessa categoria os seguintes genes: *NtRAD9A* (-1,04), *NtBREAST CANCER ASSOCIATED RING DOMAIN 1* (*NtBARD1*, -1,24), *NtMICRORCHIDIA 6* (*NtMORC6*, -1,05), *NtDNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION 2*

(*NtDRT102*, -1,41), *NtGAMMA-RESPONSE GENE 1* (*NtGR1*, -1,09), *NtPOLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1* (*NtPARP1*, -1,30), *NtSTRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 5* (*NtSMC5*, -1,14), *NtFACT COMPLEX SUBUNIT SPT16* (*NtSPT16a*, -1,79 e *NtSPT16b*, -1,19), *NtATP-DEPENDENT DNA HELICASE 2 SUBUNIT KU80* (*NtKU80*, -1,22), *NtSTICHEL* (*NtSTI*, -1,07), *NtMMS AND UV SENSITIVE 81* (*NtMUS81*, -1,14), *NtXERODERMA PIGMENTOSUM COMPLEMENTATION GROUP B 1* (*NtXPB1*, -1,02), *NtuvrB-like* (-1,20), *NtREV1* (-1,06) e os 3 membros da família *DNA Helicase Q* (*NtRecQI*, *NtRecQ4A*:-1,36, and *NtRecQSim*:-1,07). Essa lista totaliza 28 genes *down*-regulados. Ainda nessa classificação, dois genes codificando homólogos de *DNA-3-METHYLADENINE GLYCOSYLASE (MAG)*, estão *up*-regulados: *NtMAGa* (4,24) e *NtMAGb* (1,19) e, em *A. thaliana*, esses genes estão provavelmente envolvidos com o reparo por excisão de base (SANTERRE; BRITT, 1994).

Os genes alvo de fatores de transcrição E2F, mencionados acima, são essenciais para a replicação de DNA que ocorre na fase S do ciclo celular. Logo após a replicação, no final da fase S e em G2, os genes de reparo de DNA participam da correção de possíveis erros que possam ocorrer durante a fase precedente (NISA et al., 2019). Assim, bem como foi proposto para os genes DE alvos de E2Fs, é possível argumentar que a *down*-regulação de 28 genes com potencial envolvimento em vias de reparo de DNA seja reflexo da menor taxa de proliferação celular nos tecidos em que *SCI1* está silenciado.

Outro gene importante na categoria de “ciclo celular” é *NtBUB3.1* (-1,37), *down*-regulado e homólogo de *BUB3.1* de *A. thaliana*. A proteína BUB3.1 participa do *checkpoint* do fuso mitótico (*Spindle Assembly Checkpoint* - SAC), e também da citocinese (CAILLAUD et al., 2009). Adicionalmente, merecem destaque os genes *down*-regulados *NtEXTRA SPINDLE POLES 1* (*NtESP1*, -1,37) e *NtCELL DIVISION CYCLE 20.2* (*NtCDC20.2*, -1,03). O gene *NtESP1* tem como homólogo em *A. thaliana* o gene *ESP*, o qual codifica uma separase e, portanto, regula a separação das cromátides-irmãs após a formação correta do fuso mitótico (WU et al., 2010). Já o gene *NtCDC20.2* tem como homólogo em *A. thaliana* o gene *CDC20.1*, o qual interage com proteínas do SAC e participa da progressão do ciclo celular (KEVEI et al., 2011). Complementarmente, três homólogos de genes que marcam o plano de divisão celular em *A. thaliana* estão *down*-regulados no RNA-seq. Eles correspondem à proteína

ativadora da GTPase Ran, *RanGAP1* (*NtRANGAP1*, -1,40), à proteína *TANGLED* de ligação a microtúbulos (*NtTAN1*, -1,52) e à *PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 2* (*NtPOK2*, -1,72), uma cinesina (XU et al., 2008).

Em conjunto, estão *down*-regulados genes que participam do *checkpoint* do fuso mitótico e da marcação do plano de divisão. Esse resultado aponta para um relaxamento da regulação desses mecanismos em estigmas/estiletos de plantas silenciando *SC11*. Isso pode acontecer pois, como as evidências anteriores sugerem, pode haver menos proliferação celular quando *SC11* está silenciado, nos estádios de desenvolvimento analisados. Dessa forma, com uma menor quantidade de células em divisão, menor é a necessidade da expressão de genes que regulam o *checkpoint* do fuso mitótico.

Assim como é o caso da maioria dos genes mencionados nessa seção, suas funções não foram estudadas em *N. tabacum*, e as propostas de seu funcionamento são baseadas em sua homologia com genes de *A. thaliana*. Apesar disso, existe alta conservação de genes que participam dos processos do ciclo celular entre eucariotos (BRASIL et al., 2017; CROSS; BUCHLER; SKOTHEIM, 2011; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013; NISA et al., 2019), o que traz confiança para as propostas feitas. Em suma, os resultados da análise de expressão diferencial apontam para uma *down*-regulação generalizada de genes associados com o ciclo celular em estigmas/estiletos dos estádios 1 a 6, nos quais *SC11* está silenciado. É importante reiterar que, no momento no qual o experimento foi delineado, o conhecimento sobre a expressão de *SC11* estava limitado à sua presença elevada nos estádios escolhidos. Com isso, descobertas mais recentes sobre sua expressão, que se inicia antes da diferenciação dos órgãos reprodutivos (CRUZ, 2018), trazem informações importantes para a interpretação dos resultados. Devido a presença de *SC11* restrita a regiões meristemáticas durante o desenvolvimento da flor (CRUZ, 2018), sua função na regulação da proliferação deve ter impacto maior anterior ao estágio -7. Portanto, a *down*-regulação observada em genes do ciclo celular, da replicação do DNA, de reparo de DNA e da regulação da mitose nos estádios 1 a 6 é uma consequência da ausência prévia de *SC11*, seja por mecanismos diretos ou indiretos.

Tabela 4. Descrição dos genes DE nas categorias “ciclo celular”, “replicação de DNA” e “reparo de DNA”. A tabela está organizada em ordem dos genes menos expressos em plantas silenciando *SC1* para os mais expressos. **Núm. Acesso:** número de acesso do gene no banco de dados NCBI; **Araport:** número de acesso do putativo homólogo do gene em *A. thaliana*; **log₂FC:** valores de log₂(Fold-Change). Em **negrito** estão destacados os genes os quais tiveram sua expressão testada por RT-qPCR (Figura 8).

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107793085	cyclin-D3-1-like	NtCycD3;1	AT3G50070	-2.16
LOC107805674	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8a	AT1G02065	-1.95
LOC107766674	wee1-like protein kinase	NtWEE1	AT1G02970	-1.93
LOC107778560	FACT complex subunit SPT16-like	NtSPT16a	AT4G10710	-1.79
LOC107825899	DNA topoisomerase 2-like	NtTOPII	AT3G23890	-1.77
LOC107766219	phragmoplast orienting kinesin 2-like	NtPOK2	AT3G19050	-1.72
LOC107803598	65-kDa microtubule-associated protein 5-like	NtMAP65-5	AT5G55230	-1.70
LOC107765238	dof zinc finger protein DOF3.4-like	NtOBP1a	AT3G50410	-1.64
LOC107822562	G2/mitotic-specific cyclin S13-7-like	NtCycB1;2	AT1G76310	-1.63
LOC107824833	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase-like	NtDUT1-like	AT3G46940	-1.62
LOC107824504	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	NtDUT1	AT3G46940	-1.62
LOC107774597	cyclin-dependent kinase inhibitor 3-like	NtKRP3	AT5G48820	-1.57
LOC107789894	sister chromatid cohesion 1 protein 3-like	NtSYN3	AT3G59550	-1.57
LOC107775913	CDT1-like protein a, chloroplastic	NtCDT1A	AT2G31270	-1.57
LOC107791227	flap endonuclease 1-like	NtFEN1	AT5G26680	-1.57
LOC107777444	TPR repeat-containing protein ZIP4-like	NtZIP4	AT5G48390	-1.54
LOC107784059	microtubule-binding protein TANGLED-like	NtTAN1	AT3G05330	-1.52
LOC107781415	cellulose synthase-like protein D5	NtCSLD5	AT1G02730	-1.48
LOC107778480	F-box/LRR-repeat protein 17-like	NtFBL17	AT3G54650	-1.48
LOC107774668	DNA replication licensing factor MCM7-like	NtMCM7	AT4G02060	-1.46
LOC107799705	DNA replication licensing factor MCM4-like	NtMCM4	AT2G16440	-1.42
LOC107826020	kinesin-1-like protein PSS1	NtPSS1	AT3G63480	-1.42
LOC107830916	DNA-damage-repair/toleration protein DRT102-like	NtDRT102	AT3G04880	-1.41
LOC107804233	RAN GTPase-activating protein 1-like	NtRANGAP1	AT3G63130	-1.40
LOC107807022	mitotic checkpoint protein BUB3.1	NtBUB3.1	AT3G19590	-1.37
LOC107828330	separase-like	NtESP	AT4G22970	-1.37

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107820279	scarecrow-like protein 28	NtRGA	AT2G01570	-1.37
LOC107821048	ATP-dependent DNA helicase Q-like 4A	NtRECQ4A	AT1G10930	-1.36
LOC107772839	uncharacterized LOC107772839	NtMCM10-like	AT2G20980	-1.33
LOC107824739	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1a	AT5G58230	-1.32
LOC107831333	65-kDa microtubule-associated protein 3-like	NtMAP65-3	AT5G51600	-1.31
LOC107799072	poly [ADP-ribose] polymerase 1-like	NtPARP1	AT2G31320	-1.30
LOC107795010	DNA polymerase eta	NtPOLε	AT5G44740	-1.28
LOC107816422	cell division control protein 45 homolog	NtCDC45	AT3G25100	-1.27
LOC107817276	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8b	AT1G02065	-1.27
LOC107814297	ATP-dependent DNA helicase Q-like 1	NtRECQ1	AT3G05740	-1.24
LOC107820519	BRCA1-associated RING domain protein 1-like	NtBARD1	AT1G04020	-1.24
LOC107819758	probable DNA helicase MCM9	NtMCM9	AT2G14050	-1.23
LOC107764231	origin of replication complex subunit 1-like	NtORC1	AT4G14700	-1.22
LOC107831338	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU80	NtKU80	AT1G48050	-1.22
LOC107788817	origin of replication complex subunit 5-like	NtORC5	AT4G29910	-1.21
LOC107828333	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1b	AT5G58230	-1.21
LOC107800100	24-methylenesterol C-methyltransferase 2-like	NtSMT2	AT1G20330	-1.20
LOC107819196	proline-rich receptor-like protein kinase PERK10	NtPERK10	AT2G32840	-1.20
LOC107769279	blue-light photoreceptor PHR2-like	NtPHR2	AT2G47590	-1.20
LOC107774523	uncharacterized LOC107774523	NtuvrB-like	AT5G43210	-1.20
LOC107778561	FACT complex subunit SPT16-like	NtSPT16b	AT4G10710	-1.19
LOC107809530	protein TPX2-like	NtTPX2	AT4G22860	-1.18
LOC107816889	protein NETWORKED 1D-like	NtNET1D	AT1G03080	-1.18
LOC107804510	dof zinc finger protein DOF3.4-like	NtOBP1b	AT3G50410	-1.17
LOC107800310	cyclin-C1-2-like	NtCycC1;2	AT5G48640	-1.17
LOC107787194	rho GTPase-activating protein 7-like	NtPHGAP2	AT5G19390	-1.16
LOC107812534	uncharacterized LOC107812534	NtASY3	AT2G46980	-1.16
LOC107789454	cell division cycle protein 123 homolog	NtCDC123	AT4G05440	-1.16
LOC107795213	myb-related protein 3R-1-like	NtMYB3R-1	AT5G11510	-1.15
LOC107785812	cyclin-L1-1-like	NtCycL1;1	AT2G26430	-1.14

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107760693	structural maintenance of chromosomes protein 5-like	NtSMC5	AT5G15920	-1.14
LOC107824196	protein POLYCHOME-like	NtGIG1	AT3G57860	-1.14
LOC107830439	crossover junction endonuclease MUS81-like	NtMUS81	AT4G30870	-1.14
LOC107825338	DNA mismatch repair protein MSH6-like	NtMSH6	AT4G02070	-1.13
LOC107830438	cell division control protein 48 homolog C-like	NtCDC48C	AT3G01610	-1.13
LOC107827008	protein JASON-like	NtJASON	AT1G06660	-1.12
LOC107794754	DNA topoisomerase 2-binding protein 1	NtMEI1	AT1G77320	-1.11
LOC107766359	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1-like	NtPIN1L	AT2G18040	-1.11
LOC107769278	gamma-tubulin complex component 4-like	NtGCP4	AT3G53760	-1.10
LOC107799578	FHA domain-containing protein PS1-like	NtPS1b	AT1G34355	-1.10
LOC107803524	protein gamma response 1-like	NtGR1	AT3G52115	-1.09
LOC107814562	ATP-dependent DNA helicase Q-like SIM	NtRECQSIM	AT5G27680	-1.07
LOC107791920	protein STICHEL	NtSTI	AT2G02480	-1.07
LOC107803775	dynammin-related protein 1E-like	NtDL1E	AT3G60190	-1.06
LOC107827331	DNA repair protein REV1-like	NtREV1	AT5G44750	-1.06
LOC107805945	protein MCM10 homolog	NtMCM10	AT2G20980	-1.06
LOC107812049	putative serine/threonine-protein kinase haspin homolog	NtHaspin	AT1G09450	-1.05
LOC107778339	cullin-1-like	NtCUL1	AT4G02570	-1.05
LOC107784180	protein MICRORCHIDIA 6-like	NtMORC6	AT1G19100	-1.05
LOC107817395	uncharacterized LOC107817395	NtSMR8	AT1G10690	-1.04
LOC107806587	cell cycle checkpoint control protein RAD9A-like	NtRAD9A	AT3G05480	-1.04
LOC107782883	cell division cycle 20.2, cofactor of APC complex-like	NtCDC20.2	AT4G33270	-1.03
LOC107817044	DNA repair helicase XPB1-like	NtXPB1	AT5G41370	-1.02
LOC107821348	FHA domain-containing protein PS1-like	NtPS1a	AT1G34355	-1.01
LOC107800862	protein SLOW WALKER 1-like	NtSWA1	AT2G47990	-1.01
LOC107764604	DNA-3-methyladenine glycosylase-like	NtMAGb	AT3G12040	1.19
LOC107818277	alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase-like	NtCER4	AT4G33790	2.38
LOC107759159	DNA-3-methyladenine glycosylase-like	NtMAGa	AT3G12040	4.24

Fonte: Autoria própria.

3.1.3.1.1 A maioria dos genes de ciclo celular diferencialmente expressos possui expressão característica durante esse processo em células BY-2

Apesar de *SCI1* ser preferencialmente expresso em estigmas/estiletos, Thomé (2019) detectou a expressão desse gene em culturas de células BY-2 de *N. tabacum*. É importante destacar que essa cultura consiste em células imortalizadas, provenientes de plântulas do cultivar *Bright Yellow 2* de *N. tabacum* (NAGATA; NEMOTO; HASEZAWA, 1992). Sendo assim, as células BY-2 configuram uma ferramenta amplamente utilizada para estudos do ciclo celular em plantas (NAGATA; KUMAGAI, 1999; NAGATA; SAKAMOTO; SHIMIZU, 2004). Recentemente, Trolet et al. (2019) produziram dados de RNA-seq das diferentes fases do ciclo celular em BY-2, os quais estão disponíveis no repositório de acesso público *Sequence Read Archive* (SRA – trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra). Isto posto, é preciso reiterar que: i) *SCI1* é um inibidor do ciclo celular (DEPAOLI et al., 2011), ii) *SCI1* é expresso em células BY-2 (Thomé, 2019), e iii) o silenciamento de *SCI1* afeta genes associados ao ciclo celular nos estigmas/estiletos. Portanto, devido a esses fatos, é interessante utilizar os dados de Trolet et al. (2019) para investigar se *SCI1* possui um padrão de expressão diferencial durante o ciclo celular. Adicionalmente, como esse RNA-seq representa todos os genes expressos em BY-2, é possível determinar se os 84 genes DE, associados ao ciclo celular, efetivamente possuem padrões de expressão distintos durante o ciclo celular dessas células.

Para essa investigação, as bibliotecas de sequenciamento das três réplicas biológicas de cada uma das 4 fases do ciclo celular - G1, S, G2, e M - foram obtidas do repositório SRA. Segundo Trolet et al. (2019), os sequenciamentos foram feitos no modo *paired-end*, de maneira similar ao RNA-seq feito para estigmas/estiletos deste trabalho. Assim, para obter os valores de expressão de genes nas amostras de Trolet et al. (2019), foram utilizados os mesmos métodos descritos no item 3.1.1 (p. 64), sem alterações.

A quantificação da expressão gênica durante o ciclo celular de BY-2 permite dizer que a expressão de *SCI1* é relativamente baixa durante o ciclo celular (Figura 10). Nessas células, *SCI1* atinge um valor máximo de expressão na fase G1 (21 Transcritos Por Milhão – TPM). Por sua vez, na fase G2, *SCI1* apresenta o seu menor

valor de expressão (16 TPM). Esse resultado corrobora aquele encontrado por Thomé (2019), que descreve a expressão de *SCI1*, por RT-qPCR, no ciclo celular em BY-2. Nessa análise, a autora também detectou a variação discreta de *SCI1* no ciclo, que é relativamente elevada na fase M, começa a decrescer em G1, e é menos expresso na fase S. Entretanto, não foram analisadas células BY-2 na fase G2, e os resultados aqui descritos complementam os de Thomé (2019). Apesar disso, em ambos os casos, a expressão de *SCI1* oscila pouco durante o ciclo celular de BY-2.

Como é possível observar na Figura 10, o nível da expressão de *SCI1* detectado por RNA-seq nas fases G1 e M é parecido (considerando o desvio-padrão), e descrevem um comportamento similar ao encontrado por Thomé (2019). Adicionalmente, esse padrão de expressão complementa os resultados descritos por Strini et al. (submetido), o qual analisou a localização da proteína SCI1-GFP durante o ciclo celular em BY-2. Nessa análise, SCI1-GFP é detectada durante todo o ciclo celular, é degradada durante a metáfase, e reaparece na telófase. Como mencionado anteriormente, esse padrão de localização é similar ao encontrado para WEE1, a qual é degradada para que ocorra a progressão do ciclo (COOK et al., 2013). Dessa forma, como a expressão endógena de *SCI1* no ciclo celular em BY-2 varia pouco, e é maior em M e G1, se explica essa elevação discreta para que seja repostas as proteínas SCI1 degradadas na metáfase. Assim, corrobora a proposta de Strini et al. (submetido) que propõe a sua regulação de SCI1 a nível proteico durante o ciclo celular em BY-2.

Figura 10. Expressão de *SC11* durante o ciclo celular em cultura de células BY-2.

Eixo x: Diferentes fases do ciclo celular. G1: *gap 1*; S: síntese; G2: *gap 2*; M: mitose. Eixo y: Nível de expressão dado em Transcritos por Milhão (TPM). Linha azul: expressão de *SC11*. Barras: desvio-padrão. Fonte: Autoria própria.

Adicionalmente, a fim de determinar se os genes DE, relacionados ao ciclo celular, possuem padrões de expressão característicos durante esse processo em BY-2, foi feita uma análise de agrupamento (*clusterization*). Dessa forma, foi empregado o programa *clust* (ABU-JAMOUS; KELLY, 2018), o qual utiliza os dados de expressão gênica de RNA-seq para identificar grupos (*clusters*) de genes que se co-expressam. Nesse método, a expressão dos genes é normalizada, gerando escores Z (*Z-scores*), que permitem analisar alterações na expressão sem levar em conta a abundância dos genes (ABU-JAMOUS; KELLY, 2018). Esse passo é importante para comparar oscilações na expressão de genes muito abundantes com genes pouco abundantes, uma vez que a informação de interesse, nesse caso, é o padrão e não a abundância de transcritos desses genes.

Como resultado da análise de agrupamento, 18 *clusters* de genes foram obtidos (nomeados de C0-C17) e representam diferentes padrões de expressão durante o ciclo celular (APÊNDICE D). De acordo com os grupos formados, *SC11* pertence ao grupo “C5”, caracterizado por maior expressão durante as fases G1 e M, expressão média-alta em S e menor expressão em G2 (Figura 11A). Com relação aos 84 genes de ciclo celular, identificados como DE em estigmas/estiletes de plantas silenciando

SC11, foi observado que 65 deles tem expressão regulada ao longo do ciclo celular durante o ciclo celular em BY-2 (APÊNDICE D).

A partir dessa análise, realizou-se um teste hipergeométrico (RICE, 2006), para verificar se existe enriquecimento de determinados grupos dentre esses 65 genes. Nesse teste, é comparado como se distribuem os *clusters* na lista de interesse com a distribuição dos *clusters* para o total de genes expressos em BY-2 (36.616 genes – aqui denominados como Referência). Foram determinados como enriquecidos grupos com *p*-valores corrigidos pelo método Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) menores que 0.05. Com isso, o resultado do teste permite dizer com confiança que os grupos “C0” e “C1” estão enriquecidos dentre os genes relacionados ao ciclo celular (Figura 11B,C).

Figura 11. Análise de super-representação dos genes DE em grupos de perfis de expressão gênica durante o ciclo celular de células BY-2 e representação dos grupos importantes.

A - O grupo C5 é o qual *SC11* faz parte, segundo agrupamento (programa *clust*) dos genes com expressão oscilatória durante o ciclo celular. **B** - Os grupos C0 e C1 são aqueles super-representados entre os genes DE da categoria “ciclo celular”, em plantas silenciando *SC11*, em comparação com a Referência. **C** – C0-C17: grupos de genes co-expressos durante o ciclo celular; Em laranja: Distribuição dos genes DE do ciclo celular identificados em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC11* nos diferentes grupos; Em cinza: distribuição do total de genes expressos em BY-2 nos diferentes grupos (Referência). *: Indica os grupos super-representados, com *p*-valor < 0.05, segundo correção pelo

método Benjamini-Hochberg. A figura representando os padrões de todos os grupos se encontra no APÊNDICE D. Fonte: Autoria própria.

Como ilustrado na Figura 11C, os genes dos grupos C0 e C1 possuem pico de expressão nas fases S e G2. Esse padrão é o oposto daquele observado para o grupo C5, ao qual pertence *SC11* (Figura 11A). Dentre os genes do grupo C0 estão, por exemplo, os supracitados *NtWEE1*, *NtRecQ4A*, *NtRecQ1*, *NtRecSIM*, *NtESP1*, *NtPSS1*, *NtORC1*, *NtGR1*, *NtMUS81*, *NtRANGAP1* e *NtCDC45*. Já no grupo C1 estão inclusos os supracitados *NtREV1*, *NtMCM9*, *NtMCM10*, *NtXPB1*, *NtFEN1*, *NtPOL ϵ* , *NtBARD1*, *NtORC5* e *NtSMC5*. Interessantemente, a classificação desses genes nos grupos C0 e C1 é compatível com as funções de seus homólogos de *A. thaliana*, uma vez que podem ser conectados à replicação de DNA que ocorre na fase S, e no reparo de DNA, que ocorre entre S e G2.

Como mencionado no item 3.1.3.1 (p. 71), não foram descritos funcionalmente muitos dos genes do ciclo celular identificados como diferencialmente expressos em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC11*. Apesar disso, a análise aqui apresentada mostra que 77,4% desses genes possuem oscilações de expressão durante o ciclo celular em BY-2, o que sugere que têm papéis nesse processo em *N. tabacum*. Entretanto, é preciso considerar que os mecanismos de regulação da expressão gênica em células BY-2 podem ser diferentes daqueles encontrados em tecidos florais, onde *SC11* é mais expresso. Assim, são necessárias investigações mais detalhadas sobre os papéis dos genes aqui mencionados nesses tecidos especificamente.

3.1.3.2 *SC11* pode ser um gene chave na via de sinalização por auxina

Outro termo GO enriquecido na análise do item 3.1.3, que pode ser destacado é “resposta à auxina”. Em trabalhos prévios, foi mostrado que *SC11* participa da sinalização por auxina, regulando e sendo regulado por genes dessa via (DEPAOLI et al., 2011; DEPAOLI; DORNELAS; GOLDMAN, 2014; DEPAOLI; GOLDMAN; GOLDMAN, 2012). Dos 39 genes DE nessa categoria, 29 estão *down*-regulados, com

variação do $\log_2FC$ entre -3,58 e -1, em plantas de silenciamento de *SCI1* (Tabela 5). Já os outros 10 genes estão *up*-regulados, com variação do $\log_2FC$ entre 1,02 e 2,2.

Tabela 5. Descrição dos genes DE na categoria “resposta à auxina”. A tabela está organizada em ordem dos genes menos expressos em plantas silenciando *SCI1* para os mais expressos. **Núm. Acesso:** número de acesso do gene no banco de dados NCBI; **Araport:** número de acesso do putativo homólogo do gene em *A. thaliana*; **$\log_2FC$:** valores de $\log_2(Fold-Change)$.

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	$\log_2FC$
LOC107771987	cytochrome P450 98A2-like	NtTT7	AT5G07990	-3.58
LOC107805674	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8a	AT1G02065	-1.95
LOC107787968	auxin response factor 5-like	NtARF5a	AT1G19850	-1.74
LOC107816434	auxin transporter-like protein 2	NtLAX2	AT2G21050	-1.69
LOC107765238	dof zinc finger protein DOF3.4-like	NtOBP1a	AT3G50410	-1.64
LOC107764055	pleiotropic drug resistance protein 3	NtABCG37	AT3G53480	-1.52
LOC107815131	transcription factor TCP4-like	NtTCP3	AT1G53230	-1.38
LOC107824503	phospholipase D zeta 1-like	NtPLDP2	AT3G05630	-1.31
LOC107817276	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8b	AT1G02065	-1.27
LOC107819824	jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like	NtDFL2	AT4G03400	-1.26
LOC107807457	auxin response factor 5-like	NtARF5b	AT1G19850	-1.25
LOC107806323	protein AUXIN RESPONSE 4-like	NtAXR4	AT1G54990	-1.22
LOC107764068	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase, chloroplastic-like	NtPUR7	AT3G21110	-1.20
LOC107794639	probable ethylene response sensor 1	NtETR1	AT1G66340	-1.18
LOC107804510	dof zinc finger protein DOF3.4-like	NtOBP1b	AT3G50410	-1.17
LOC107792899	nuclear pore complex protein NUP160	NtNUP160	AT1G33410	-1.16
LOC107804026	cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1-like	NtCAND1	AT2G02560	-1.13
LOC107824959	auxin-induced protein 22D-like	NtAUX22D	AT5G43700	-1.13
LOC107818819	auxin response factor 1-like	NtARF1	AT3G61830	-1.10
LOC107804758	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP42-like	NtTWD1	AT3G21640	-1.07
LOC107767241	auxin response factor 2-like	NtARF2	AT4G23980	-1.06
LOC107826719	protein kinase PINOID 2-like	NtPID2	AT2G26700	-1.06
LOC107776741	serine/threonine-protein kinase TOR-like	NtTOR	AT1G50030	-1.05
LOC107798373	cytochrome P450 CYP736A12-like	NtTT7	AT5G07990	-1.05

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107778339	cullin-1-like	NtCUL1	AT4G02570	-1.05
LOC107801569	auxin-responsive protein IAA13-like	NtIAA13	AT2G33310	-1.04
LOC107797072	agamous-like MADS-box protein AGL15	NtAGL15	AT5G13790	-1.03
LOC107808327	rac-like GTP-binding protein 5	NtRAC3	AT4G35020	-1.02
LOC107771982	auxin response factor 11-like	NtARF11	AT4G23980	-1.00
LOC107805560	auxin-induced protein 15A-like	NtSAUR14	AT4G38840	1.02
LOC107815530	auxin-responsive protein IAA14-like	NtIAA14	AT3G23050	1.19
LOC107813613	chalcone synthase A	NtTT4	AT5G13930	1.23
LOC107769257	protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3-like	NtNTR1	AT1G12110	1.26
LOC107759673	homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like	NtHB40b	AT4G36740	1.65
LOC107822530	type IV inositol polyphosphate 5-phosphatase 11-like	Nt5PTASE11	AT1G47510	1.81
LOC107779436	single myb histone 5-like	NtTRB1	AT1G49950	1.99
LOC107808763	uncharacterized transporter YBR287W-like	NtPILS2	AT1G71090	2.01
LOC107799312	cytochrome P450 84A1-like	NtTT7	AT5G07990	2.10
LOC107770469	homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like	NtHB40a	AT4G36740	2.20

Fonte: Autoria própria.

Dentre os genes *down*-regulados se encontram cinco membros da família de fatores de transcrição AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), homólogos a quatro genes de *A. thaliana*, que são: *ARF1* (*NtARF1*, -1,11), *ARF2* (*NtARF2*, -1,16), *ARF5/MONOPTEROS* (*NtARF5a*, -1,74 e *NtARF5b*, -1,25), e *ARF11* (*NtARF11*, -1,01). Por serem genes importantes na via de sinalização mediada por auxina, os ARFs possuem diversos papéis no desenvolvimento das plantas. Em *N. tabacum*, *NtARF2*, por exemplo, se expressa diferencialmente durante o ciclo celular na cultura de células BY-2 (BREYNE et al., 2002). Em *A. thaliana*, o homólogo *ARF2* participa da regulação da proliferação celular durante a formação da flor (SCHRUFF et al., 2006). Ambos os mutantes de *A. thaliana*, *sci1* e *arf2*, apresentam estiletes alongados, como resultado de um maior número de células (DEPAOLI; DORNELAS; GOLDMAN, 2014; SCHRUFF et al., 2006). Schruuff et al (2006) propõe que o aumento da proliferação celular nos mutantes *arf2* pode ser resultado do atraso da transição entre o estado proliferativo para o diferenciado, já que o maior número de células não causa alterações morfológicas drásticas. Esse efeito é exatamente o que se observa quando

SCI1 é silenciado em *N. tabacum* (DEPAOLI et al., 2011), e nos mutantes *sci1* de *A. thaliana* (DEPAOLI; DORNELAS; GOLDMAN, 2014). Apesar disso, os resultados encontrados neste trabalho, com o silenciamento de *SCI1*, sugerem que taxas aceleradas de proliferação celular permitem a transição precoce para o estado diferenciado. Com isso, o crescimento dos órgãos dependeria mais de processos como a alongação celular. Como os próprios autores Schruff et al. (2006) discutem, é necessário investigar os processos de proliferação e diferenciação em maior detalhe para entender como eles se relacionam entre si e com o hormônio auxina.

Ainda sobre os fatores de transcrição ARF, podemos citar ARF5, que em *A. thaliana* regula a expressão dos fatores de transcrição *LFY*, *ANT* e *AIL6*, reguladores chave da proliferação e diferenciação celular no meristema floral (KRIZEK et al., 2020; YAMAGUCHI et al., 2013). Com base nos estudos funcionais de ARF5 em *A. thaliana*, esse gene participa de processos iniciais do desenvolvimento da flor (CHUNG et al., 2019), sendo inesperada a sua expressão em estádios mais avançados. Contudo, a *down*-regulação dos genes *NtARF5a* e *NtARF5b* em plantas silenciando *SCI1* aponta para a sua expressão nos estádios 1 a 6 nos estigmas/estiletes de *N. tabacum*. Dessa forma, é importante estudar a função de *NtARF5* para melhor compreender seu papel na via de sinalização por auxina em pistilos de *N. tabacum*. Além disso, como *SCI1* se expressa no meristema floral de *N. tabacum*, será interessante investigar se a influência na expressão de *NtARF5a* e *NtARF5b* também ocorre em estádios iniciais do desenvolvimento da flor.

Adicionalmente, merecem destaque dois genes *NtSQUAMOSA-PROMOTER BINDING 8*: *NtSPL8a* (-1,95) e *NtSPL8b* (-1,27). Ambos esses homeólogos são altamente expressos em botões florais e no pistilo de *N. tabacum* (HAN et al., 2016). Esse padrão de expressão também é observado no homólogo em *A. thaliana*, *SPL8*, cujo papel proposto é o de regulação do desenvolvimento do gineceu (XING et al., 2013). Essa regulação ocorre em uma via compartilhada com *miR156* e a sinalização por auxina mediada por genes *YUCCA* (XING et al., 2013). Curiosamente, o mutante *spl8* de *A. thaliana* produz estiletes mais curtos, como resultado da alteração da via de sinalização de auxina no gineceu (XING et al., 2013). Nesse mutante, esse efeito é parcialmente explicado por uma menor expressão do gene *YUCCA4* nos estádios iniciais do desenvolvimento floral no estigma/estilete (XING et al., 2013). Coincidentemente, o gene *NtYUC4* (-1,35), homólogo de *YUCCA4*, também aparece

down-regulado em estigmas e estiletes de plantas com *SC1* silenciado. Esse gene não aparece na categoria de “resposta a auxina”, já que ele participa da síntese desse hormônio (ZHAO, 2018). Conforme analisado por DePaoli, Dornelas e Goldman (2014), os genes *YUCCA/NPY* são reguladores de *AtSC1*. Novamente, essas relações suportam fortemente a hipótese da participação de *SC1* na proliferação celular durante o desenvolvimento de órgãos florais de forma dependente de auxina. Esse conjunto de informações coloca *SC1* em um papel central, no qual regula e é regulado por genes *YUCCA*.

Dentre os genes *up*-regulados, com possível participação na resposta à auxina, está incluído o membro *NtIAA14* (1,19), da família AUX/IAA. Em *N. tabacum* esse gene é expresso em botões florais e flores em antese, preferencialmente em carpelos e no estigma (DARGEVICIUTE et al., 1998). *NtIAA14* é homólogo de *IAA7* em *A. thaliana*, um gene envolvido na regulação do florescimento (MAI; WANG; YANG, 2011). Nesse processo, *IAA7* afeta a expressão dos fatores de transcrição *LFY* e *SOC1*, além de ser alvo de degradação da via de sinalização por auxina pelo complexo SCF^{TIR1} (GRAY et al., 2001; MAI; WANG; YANG, 2011).

Adicionalmente, os genes *up*-regulados *NtHOMEOBOX 40a* (*NtHB40a*, 2,20) e *NtHB40b* (1,65), são homeólogos e codificam um homólogo de *HB40* de *A. thaliana*. Nessa espécie, o gene *HB40* se expressa preferencialmente em flores, sendo induzido por *LFY*, porém seus mecanismos de ação não são conhecidos (HENRIKSSON et al., 2005; WAGNER et al., 2004). Interessantemente, em *A. thaliana*, os genes *IAA7*, *HB40* e *ARF5* participam da via de desenvolvimento floral envolvendo o fator de transcrição *LFY*. Somados, esses resultados reforçam o envolvimento de *SC1* no desenvolvimento floral mediado por auxina, como parte da complexa rede molecular que coordena esse processo. Na seção seguinte, mais evidências da participação de *SC1* no desenvolvimento floral serão exploradas.

3.1.3.3 O silenciamento de *SC1* afeta a expressão de genes chaves do desenvolvimento floral

A categoria “desenvolvimento de estrutura reprodutiva” é associada a 99 genes DE. Desses, 83 genes estão *down*-regulados, com variação do log₂FC entre -6,35 e -

1,01, em plantas de silenciamento de *SCI1* (Tabela 6). Complementarmente, 16 genes estão *up*-regulados, com variação do $\log_2FC$ entre 1,02 e 3,53. Dentre esses, encontram-se genes com funções desde o início do desenvolvimento da flor até o amadurecimento do fruto.

Tabela 6. Descrição dos genes DE na categoria “desenvolvimento de estrutura reprodutiva”. A tabela está organizada em ordem dos genes menos expressos em plantas silenciando *SCI1* para os mais expressos. **Núm. Acesso:** número de acesso do gene no banco de dados NCBI; **Araport:** número de acesso do putativo homólogo do gene em *A. thaliana*; **$\log_2FC$:** valores de $\log_2(Fold-Change)$. Em **negrito** estão destacados os genes os quais tiveram sua expressão testada por RT-qPCR (Figura 8).

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	$\log_2FC$
LOC107810483	protein virilizer homolog	NtVIR	AT3G05680	-6.35
LOC107775633	transcription factor HBP-1b(c38)-like	NtHBP-1Ba	AT1G68640	-2.45
LOC107793085	cyclin-D3-1-like	NtCycD3;1	AT3G50070	-2.16
LOC107807872	QWRF motif-containing protein 2-like	NtEDE1	AT2G44190	-2.04
LOC107794617	glutaredoxin-C9-like	NtROXY2	AT5G14070	-2.01
LOC107820144	zinc-finger homeodomain protein 4-like	NtHB31	AT1G14440	-1.95
LOC107805674	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8a	AT1G02065	-1.95
LOC107786347	protein CUP-SHAPED COTYLEDON 3-like	NtCUC3	AT1G76420	-1.90
LOC107796724	agamous-like MADS-box protein AGL11	NtAGL11a	AT4G09960	-1.85
LOC107778560	FACT complex subunit SPT16-like	NtSPT16a	AT4G10710	-1.79
LOC107787968	auxin response factor 5-like	NtARF5a	AT1G19850	-1.74
LOC107816434	auxin transporter-like protein 2	NtLAX2	AT2G21050	-1.69
LOC107778807	transcription factor HBP-1b(c38)-like	NtHBP-1Bb	AT1G68640	-1.64
LOC107809546	agamous-like MADS-box protein AGL11	NtAGL11b	AT4G09960	-1.56
LOC107778480	F-box/LRR-repeat protein 17-like	NtFBL17	AT3G54650	-1.48
LOC107826020	kinesin-1-like protein PSS1	NtPSS1	AT3G63480	-1.42
LOC107811097	probable glutamate carboxypeptidase 2	NtAMP1	AT3G54720	-1.42
LOC107829827	protein argonaute PNH1-like	NtPNH1	AT5G43810	-1.42
LOC107771921	ABC transporter G family member 11-like	NtABCG11	AT1G17840	-1.37
LOC107828330	separase-like	NtESP1	AT4G22970	-1.37
LOC107820279	scarecrow-like protein 28	NtSCR28	AT2G01570	-1.37
LOC107788088	probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA4	NtYUC4	AT5G11320	-1.35

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107831936	alpha-N-acetylglucosaminidase-like	NtCYL1a	AT5G13690	-1.34
LOC107802952	axial regulator YABBY 1-like	NtYAB1	AT2G45190	-1.34
LOC107824739	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1a	AT5G58230	-1.32
LOC107802780	nuclear pore complex protein NUP214-like	NtLNO1	AT1G55540	-1.31
LOC107805228	uncharacterized LOC107805228	NtEIP9	AT5G64360	-1.30
LOC107761631	RNA-binding protein BRN1-like	NtBRN1	AT4G03110	-1.30
LOC107789167	transcription factor bHLH91-like	NtbHLH91	AT2G31210	-1.28
LOC107826559	homeobox protein knotted-1-like LET6	NtLET6	AT1G62360	-1.27
LOC107817276	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8b	AT1G02065	-1.27
LOC107807457	auxin response factor 5-like	NtARF5b	AT1G19850	-1.25
LOC107828133	FRIGIDA-like protein 5	NtFRL5	AT5G48385	-1.25
LOC107777966	basic blue protein-like	NtARPN	AT2G02850	-1.23
LOC107760987	probable histone H2A variant 1	NtHTA8	AT2G38810	-1.22
LOC107769372	sm-like protein LSM4	NtLSM4	AT5G27720	-1.22
LOC107828333	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1b	AT5G58230	-1.21
LOC107794024	pantoate--beta-alanine ligase-like	NtPANC	AT5G48840	-1.20
LOC107778561	FACT complex subunit SPT16-like	NtSPT16b	AT4G10710	-1.19
LOC107781895	protein RBL-like	NtRBL	AT3G21060	-1.18
LOC107817392	leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM3	NtPXL1	AT1G08590	-1.18
LOC107787876	mitogen-activated protein kinase kinase kinase NPK1-like	NtNPK1	AT1G09000	-1.17
LOC107769800	histone-lysine N-methyltransferase EZA1-like	NtEZA1	AT2G23380	-1.17
LOC107824196	protein POLYCHOME-like	NtOSD1	AT3G57860	-1.14
LOC107767613	protein HASTY 1-like	NtHST	AT3G05040	-1.14
LOC107796854	uncharacterized LOC107796854	NtKETCH1c	AT5G19820	-1.14
LOC107794891	zinc-finger homeodomain protein 2-like	NtHB25	AT5G65410	-1.14
LOC107771837	leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM3	NtBAM3	AT4G20270	-1.13
LOC107804026	cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1- like	NtCAND1	AT2G02560	-1.13
LOC107830438	cell division control protein 48 homolog C-like	NtCDC48C	AT3G01610	-1.13

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107800137	protein CUP-SHAPED COTYLEDON 2-like	NtCUC2a	AT5G53950	-1.12
LOC107768851	60S ribosomal protein L3-like	NtRP1	AT1G43170	-1.11
LOC107766359	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1-like	NtPIN1L	AT2G18040	-1.11
LOC107779259	flowering locus K homology domain-like	NtFLKa	AT3G04610	-1.09
LOC107822433	flowering locus K homology domain-like	NtFLKb	AT3G04610	-1.08
LOC107816605	transcriptional activator FHA1-like	NtFHA2	AT3G07220	-1.08
LOC107830010	sucrose synthase 2-like	NtSUS3a	AT4G02280	-1.08
LOC107774568	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit B-like	NtMEE12	AT2G02955	-1.08
LOC107771438	guanine nucleotide-binding protein-like NSN1	NtNSN1	AT3G07050	-1.08
LOC107775584	sucrose synthase 2-like	NtSUS3b	AT4G02280	-1.07
LOC107760597	guanine nucleotide-binding protein subunit beta- 2	NtAGB1	AT4G34460	-1.07
LOC107826703	protein CUP-SHAPED COTYLEDON 2-like	NtCUC2b	AT5G53950	-1.06
LOC107810185	protein pleiotropic regulatory locus 1-like	NtPRL1	AT4G15900	-1.06
LOC107790817	phytochrome A-associated F-box protein-like	NtEID1	AT4G02440	-1.06
LOC107766724	alanine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial-like	NtEMB86	AT5G22800	-1.06
LOC107831862	uncharacterized LOC107831862	NtSED1	AT1G55040	-1.06
LOC107826719	protein kinase PINOID 2-like	NtPID2	AT2G26700	-1.06
LOC107788753	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g39710-like	NtEMB2745a	AT5G39710	-1.06
LOC107816271	mitochondrial Rho GTPase 1-like	NtMIRO1	AT5G27540	-1.05
LOC107812249	probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	NtHAP15	AT1G20200	-1.05
LOC107776741	serine/threonine-protein kinase TOR-like	NtTOR	AT1G50030	-1.05
LOC107778339	cullin-1-like	NtCUL1	AT4G02570	-1.05
LOC107786674	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g46050, mitochondrial-like	NtDOT4	AT4G18750	-1.04
LOC107797072	agamous-like MADS-box protein AGL15	NtAGL15	AT5G13790	-1.03
LOC107797600	regulatory protein NPR5-like	NtBOP2	AT2G41370	-1.03
LOC107783309	oxalate--CoA ligase-like	NtAAE3	AT3G48990	-1.03

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107798605	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g09820-like	NtEMB2745b	AT5G39710	-1.03
LOC107764551	protein HUA2-LIKE 2-like	NtHULK2	AT2G48160	-1.03
LOC107811032	alpha-N-acetylglucosaminidase-like	NtCYL1c	AT5G13690	-1.02
LOC107807876	proline--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial-like	NtOVA6	AT5G52520	-1.02
LOC107827562	alpha-N-acetylglucosaminidase-like	NtCYL1b	AT5G13690	-1.02
LOC107796723	homeobox protein LUMINIDEPENDENS-like	NtLD	AT4G02560	-1.01
LOC107796434	50S ribosomal protein HLP, mitochondrial-like	NtHLL	AT1G17560	-1.01
LOC107785633	transcription factor CYCLOIDEA-like	NtTCP1	AT1G67260	1.02
LOC107768442	flowering-promoting factor 1-like protein 3	NtFPF1	AT5G24860	1.02
LOC107774027	agamous-like MADS-box protein AGL8 homolog	NtAGL8	AT5G60910	1.03
LOC107775986	probable transcription factor KAN4	NtKAN4	AT5G42630	1.03
LOC107816253	protein DETOXIFICATION 33-like	NtDTX33	AT1G47530	1.04
LOC107793457	bidirectional sugar transporter SWEET12-like	NtSWEET11	AT3G48740	1.11
LOC107821565	metal-nicotianamine transporter YSL2-like	NtYSL3	AT5G53550	1.11
LOC107815999	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	NtEFE	AT1G05010	1.17
LOC107798456	uncharacterized LOC107798456	NtVIR	AT3G05680	1.26
LOC107782000	importin-5-like	NtKETCH1b	AT5G19820	1.36
LOC107825011	uncharacterized LOC107825011	NtLEA26	AT2G44060	1.48
LOC107798318	importin-5-like	NtKETCH1a	AT5G19820	1.53
LOC107775833	NAC transcription factor 29-like	NtNAP	AT1G69490	1.93
LOC107777295	uncharacterized LOC107777295	-	AT1G72100	2.45
LOC107797196	embryonic protein DC-8-like	NtDC-8	AT2G18340	2.93
LOC107793215	late embryogenesis abundant protein Dc3-like	NtLEA7	AT1G52690	3.53

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 12, os genes DE envolvidos no desenvolvimento floral, bem como alguns genes de resposta à auxina com papel nesse processo, estão representados de acordo com os estádios nos quais podem atuar. Entre os genes DE, foram encontrados genes *down*-regulados cujos homólogos em *A. thaliana* regulam a

transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva, como é o caso de *NtLUMINIDEPENDENS* (*NtLD*, -1,01) e *NtAGAMOUS-LIKE 15* (*NtAGL15*, -1,03). Em *A. thaliana*, LD promove o florescimento através da regulação positiva da expressão de *LFY*, e a expressão de ambos é detectada em regiões onde há alta proliferação celular (AUKERMAN et al., 1999). Já *AGL15* age em conjunto com *AGL18*, reprimindo a expressão do integrador floral *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), e estimulando a expressão do repressor floral *miRNA156*, e, por consequência, reprime o florescimento (ADAMCZYK; LEHTI-SHIU; FERNANDEZ, 2007; SERIVICHYASWAT et al., 2015). Interessantemente, *AGL15* tem sua expressão ativada por auxina, e reprimida por altos níveis de sua própria proteína (ZHU; PERRY, 2005).

Adicionalmente, três genes com homólogos participantes do Complexo *Polycomb Repressive 2* (PRC2) também estão *down*-regulados em plantas de silenciamento de *SCI1*: *NtMULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1* (*NtMSI1a*, -1,32 e *NtMSI1b*, -1,21) e *NtHISTONE-LYSINE N-METHYLTRANSFERASE EZA1* (*NtEZA1*, -1,17). Em *A. thaliana*, a *down*-regulação de *MSI1* e *CURLY LEAF* (*CLF* – homólogo de *NtEZA1*) resulta em uma menor quantidade de metilações de histonas H3K27me3 nos genes *MIR156* e *FLC*, bem como em modificações na expressão de vários genes retardando a indução do florescimento (DOTTO et al., 2018). *MSI1* também é necessário para a deposição de marcas H3K4me2 e H3K9ac no gene *SOC1*, responsáveis por aumentar sua expressão, necessária para a indução do florescimento (BOUVERET et al., 2006). Em suma, *MSI1* e *CLF* são indutores do florescimento, e sua *down*-regulação indica o atraso desse processo. É importante destacar que a indução do florescimento é um processo que precede a expressão de *SCI1*, a qual tem início no meristema floral (CRUZ, 2018). Dessa forma, a relação de *SCI1* com os genes *NtLD*, *NtAGL15*, *NtMSI1a*, *NtMSI1b* e *NtEZA1* e sua potencial regulação do início do florescimento, é um alvo interessante para estudos futuros, visto que esses resultados foram encontrados em estigmas/estiletes já diferenciados.

Ainda no início do desenvolvimento floral, em *A. thaliana* pode ser destacado o gene *REPRESSOR OF GA1-3 1* (*RGA*). Em *N. tabacum*, foi identificado como *down*-regulado em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SCI1* o gene *NtSCARECROW-like 28* (*NtSCR28*, -1,37), um homólogo de *RGA*. A função de *RGA* em *A. thaliana* consiste na repressão do desenvolvimento floral, e depende de sua ligação a fatores de transcrição da família SPL (YU et al., 2012). Como abordado no item 3.1.3.2 (p. 85), os genes *NtSPL8a* e *NtSPL8b*, pertencentes à família SPL, estão *down*-

regulados. Em *A. thaliana*, RGA afeta a expressão dos fatores de transcrição *FUL* e *SOC1*, os quais codificam proteínas chaves na regulação do desenvolvimento floral (YU et al., 2012). O trabalho de Torti et al. (2012) descreve, em *A. thaliana*, que *FUL* e *SOC1* regulam a expressão do fator de transcrição *HOMEODOMAIN 31 (HB31)*. Curiosamente, dois fatores de transcrição da família *HOMEODOMAIN* estão *down-regulados*, são eles: *NtHB31* (-1,95) e *NtHB25* (-1,14). Em *A. thaliana*, seus homólogos se expressam preferencialmente em flores imaturas e adultas (TAN; IRISH, 2006). Entretanto, apesar de potencialmente relevantes para o desenvolvimento floral, a atuação de *HB31* e *HB25* durante esse processo não foi ainda descrita. Dessa forma, é interessante observar que o silenciamento de *SCI1* promove a desregulação de muitos genes envolvidos na mesma rede regulatória.

Figura 12. Genes DE em plantas silenciando *SC1/1* e suas possíveis relações com o desenvolvimento floral.

Em vermelho: genes *down*-regulados em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC1/1* em comparação com a planta controle. Em azul: genes *up*-regulados. SAM: meristema apical do caule; IM: meristema de inflorescência; FM: meristema floral; Em preto: genes de *A. thaliana*. A distribuição dos genes de acordo com os estádios do desenvolvimento foi feita de acordo com suas putativas funções, com base na literatura de seus homólogos de *A. thaliana*. Fonte: Modificado de Alvarez-Buylla et al. (2010).

Um pouco mais adiante, após a transição para a fase reprodutiva, se inicia de fato o desenvolvimento floral. Nesse estágio do desenvolvimento é possível destacar o gene *down-regulado* *NtHOMEBOX PROTEIN KNOTTED-1-like LET6* (*NtLET6*, -1,27), homólogo de *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) de *A. thaliana*. Nessa espécie, *STM* está envolvido na formação e manutenção do meristema apical do caule (SAM) durante todo o desenvolvimento da planta (AIDA; ISHIDA; TASAKA, 1999; SCOFIELD et al., 2013). Ademais, *STM* regula a diferenciação celular e o estabelecimento do padrão floral durante o desenvolvimento da flor (CHUNG et al., 2019; KANRAR; ONGUKA; SMITH, 2006; SCOFIELD; DEWITTE; MURRAY, 2007; SMITH et al., 2011). No papel de formação do meristema, *STM* age em coordenação com os genes da família *CUP SHAPED COTYLEDON* (*CUC*), e estimula a expressão de genes de identidade floral através de sua interação com os complexos FT-FLOWERING LOCUS D e AGL24-SOC1 (SMITH et al., 2011). Adicionalmente, outro gene de *A. thaliana* que interage com o complexo AGL24-SOC1 é *Pin1At*, promovendo o florescimento mediado por auxina (WANG et al., 2010; XI et al., 2016). Seu homólogo em *N. tabacum*, *NtPEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE PIN1-like* (*NtPIN1L*, -1,11), está *down-regulado* em estigmas/estiletes de plantas com o *SCI1* silenciado.

Em *N. tabacum*, existem 3 genes *DE down-regulados* que são homólogos dos genes *CUC2* e *CUC3* de *A. thaliana*: *NtCUC2a* (-1,06), *NtCUC2b* (-1,12), e *NtCUC3* (-1,90). Em *A. thaliana*, os genes *CUC* são importantes na regulação da fusão do carpelo e têm diversas funções durante o desenvolvimento da flor (LEE et al., 2015). Outra correlação interessante é que, em *A. thaliana*, *CUC2* é positivamente regulado por ARF5 durante a formação dos óvulos (GALBIATI et al., 2013). Adicionalmente, o gene *STM* é reprimido de maneira indireta por ARF5 para promover o início do desenvolvimento floral (CHUNG et al., 2019). Nesse mecanismo, a repressão de *STM* por ARF5 ocorre mediada pelo fator de transcrição YABBY1/ABNORMAL FLOWERS 1 (YAB1/AFO), cuja expressão é induzida por ARF5 (CHUNG et al., 2019). Curiosamente, no presente trabalho foi identificado que, em *N. tabacum*, o gene *NtYABBY1* (*NtYAB1*, -1,34), homólogo de *YAB1/AFO*, está *down-regulado* em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SCI1*. Ademais, em *A. thaliana* o gene *YAB1/AFO* se expressa nas células fundadoras do meristema floral, onde participa da extinção da expressão de *STM*, necessária para o início do desenvolvimento (CHUNG et al., 2019). Essas informações conectam novamente *SCI1* à via de sinalização por auxina, mediada por ARF5, com o início do desenvolvimento floral.

Ainda tratando-se de genes que participam do início do desenvolvimento floral, foi encontrado *down*-regulado o gene *NtBLADE ON PETIOLE 2* (*NtBOP2*, -1,03). Em *A. thaliana*, os genes *BOP1* e *BOP2* participam de diversos eventos de diferenciação celular em inflorescências, agindo paralelamente à *LFY* para aumentar a expressão de *APETALA1* (*AP1*) (MCKIM et al., 2008; XU et al., 2010). Nessa via paralela, o fator de transcrição *PERIANTHIA* (*PAN*) recruta *BOP1* e *BOP2* para o promotor de *AP1* para aumentar sua expressão (XU et al., 2010). Coincidentemente, dois genes que codificam homólogos de *PAN* estão *down*-regulados, são eles: *NtTRANSCRIPTION FACTOR HBP-1B(C38)-like a* (*NtHBP-1Ba*, -2,45) e *NtHBP-1Bb* (-1,64). Em conjunto, a ação de *PAN*, *BOP1*, *BOP2* e *AP1* afeta negativamente a expressão de *AGL24* e outros reguladores do tempo de florescimento, promovendo o início do desenvolvimento floral (XU et al., 2010).

Por fim, após a determinação dos órgãos florais, ocorre a sinalização para a terminação do meristema floral (THOMSON; WELLMER, 2019). Em *A. thaliana*, essa sinalização é coordenada principalmente pelo fator de transcrição *AG*, o qual reprime a expressão de *WUS* e, conseqüentemente, a indeterminação do meristema floral (XU et al., 2019). Nesse estágio, alguns genes que participam do início do desenvolvimento podem assumir outras funções em *A. thaliana*, como *CLF* e *PAN* (DAS et al., 2009; LIU et al., 2011; MAIER et al., 2009). É importante reforçar que, em *N. tabacum*, a expressão de seus homólogos (*NtEZA1*, *NtHBP-1Ba* e *NtHBP-1Bb*) está reduzida em plantas silenciando *SC11*. A proteína *CLF*, por exemplo, é recrutada por *AG* para reprimir a expressão de *WUS* (LIU et al., 2011). Adicionalmente, *PAN* controla a expressão de *AG* no estágio de terminação do meristema floral, havendo uma regulação em *loop* de *feedback* negativo entre esses genes, possivelmente mediada por *WUS* (DAS et al., 2009; MAIER et al., 2009). Contrariamente à *PAN*, que é uma proteína ativadora de *AG*, a proteína Nucleostemin-like 1 (*NSN1*) reprime a expressão de *AG*, tendo papel junto de *APETALA2* na especificação dos órgãos florais (WANG et al., 2012). O homólogo de *NSN1* em *N. tabacum* também está *down*-regulado em plantas em que *SC11* está silenciado (*NtNSN1*, -1,08).

Outro gene interessante, que merece destaque, é *NtAGAMOUS-LIKE 8* (*NtAGL8*, 1,03), que está *up*-regulado em plantas de silenciamento de *SC11*. Esse gene é homólogo do fator de transcrição *FRUITFULL* (*FUL*), de *A. thaliana*. Nessa espécie, *FUL* participa da indução e terminação do florescimento (BALANZÀ et al., 2018; BALANZÀ; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ; FERRÁNDIZ, 2014; GU et al., 1998; HEMPEL

et al., 1997; WANG; CZECH; WEIGEL, 2009), e do estabelecimento do padrão floral (BEMER et al., 2017), e do desenvolvimento do fruto (GU et al., 1998). No início do desenvolvimento floral, *FUL* é alvo dos fatores de transcrição *FD* e *SPL* (JUNG et al., 2016; WANG; CZECH; WEIGEL, 2009), e tem função parcialmente redundante a *AP1* na formação do meristema floral (FERRÁNDIZ et al., 2000). Dessa forma, é interessante investigar como *SCI1* se relaciona com esse gene multifuncional durante o desenvolvimento floral em *N. tabacum*.

É importante destacar que um dos genes o qual teve sua expressão diferencial (*down-regulada*) detectada por RNA-seq e confirmada por RT-qPCR, o *NtWUSCHEL-like HOMEBOX 1* (*NtWOX1*, -1,34) não aparece na lista da Tabela 6 (ver gene LOC107796170, APÊNDICE B). Trata-se de um caso interessante, pois seu homólogo em *A. thaliana*, *WOX1*, está envolvido no desenvolvimento de folhas (VANDENBUSSCHE et al., 2009). Em contraponto, o homólogo de *NtWOX1* em *Petunia x hybrida* (uma solanácea) é o gene *MAEWEST* (*MAW*). Vandenbussche et al. (2009) compararam os genes *WOX1* de *A. thaliana* e *MAW* de *P. hybrida*, e demonstraram que esses compartilham funções em folhas, porém *MAW* é indispensável na regulação do desenvolvimento do pistilo. Adicionalmente, o padrão de expressão de *MAW* nos primórdios de órgãos florais em *P. hybrida* (VANDENBUSSCHE et al., 2009) é similar ao de *SCI1* em *N. tabacum* (CRUZ, 2018). Dessa forma, *NtWOX1* é mais um gene interessante a ser estudado, devido ao fato de potencialmente compartilhar com *SCI1* uma função no desenvolvimento da flor.

Como evidenciado no decorrer dessa seção, é possível afirmar que o silenciamento de *SCI1* nos estigmas/estiletos de *N. tabacum* afeta a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento reprodutivo. Adicionalmente, cabe lembrar que, recentemente, foi detectada a expressão de *SCI1* nos meristemas florais (CRUZ, 2018). Entretanto, o papel de *SCI1* ainda não foi elucidado nesse estágio de desenvolvimento. Dessa forma, o conjunto destes resultados aponta genes alvos de estudos futuros, complementando a descrição do mecanismo de *SCI1* durante o desenvolvimento reprodutivo de *N. tabacum*.

3.1.3.4 O silenciamento de *SCI1* afeta genes que participam do processamento de RNAs, incluindo o *splicing*

Outro resultado interessante da análise de RNA-seq mostra que 47 genes, potencialmente envolvidos em vias de processamento de RNAs, estão diferencialmente expressos. Interessantemente, trabalhos paralelos no laboratório conectam *SCI1* com uma dessas vias, o *splicing* (PINOTI, 2016; STRINI, 2014). Dos 47 genes DE dessa categoria, 44 estão *down*-regulados, com variação do $\log_2FC$ entre -1,52 e -1, em plantas de silenciamento de *SCI1* (Tabela 7). Complementarmente, 3 genes estão *up*-regulados, com variação do $\log_2FC$ entre 1,13 e 3,9.

Tabela 7. Descrição dos genes DE na categoria “processamento de RNAs”. A tabela está organizada em ordem dos genes menos expressos em plantas silenciando *SCI1* para os mais expressos. **Núm. Acesso:** número de acesso do gene no banco de dados NCBI; **Araport:** número de acesso do putativo homólogo do gene em *A. thaliana*; **$\log_2FC$:** valores de $\log_2(Fold-Change)$. Em **negrito** está destacado NtSR30, que teve expressão confirmada por RT-qPCR (Figura 8).

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	$\log_2FC$
LOC107828687	THO complex subunit 1-like	NtTHO1a	AT5G09860	-1.52
LOC107817790	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, chloroplastic-like	NtRIF10	AT3G03710	-1.51
LOC107814109	mRNA-decapping enzyme-like protein	NtDCP1	AT1G08370	-1.45
LOC107830492	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g56310-like	NtCRR2	AT3G46790	-1.35
LOC107804392	uncharacterized LOC107804392	NtTHO1-like	AT5G09860	-1.33
LOC107807893	protein argonaute 4A-like	NtAGO4	AT2G27040	-1.32
LOC107822440	protein CHROMATIN REMODELING 35-like	NtDRD1	AT2G16390	-1.29
LOC107823544	protein RRP6-like 2	NtRRP6L2	AT5G35910	-1.24
LOC107766361	probable ribosome-binding factor A, chloroplastic	NtRBF1	AT4G34730	-1.22
LOC107762847	sm-like protein LSM2	NtLSM2	AT1G03330	-1.22
LOC107769372	sm-like protein LSM4	NtLSM4	AT5G27720	-1.22
LOC107767634	33 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic	NtCP33	AT3G52380	-1.20
LOC107774569	sm-like protein LSM8	NtLSM8	AT1G65700	-1.20
LOC107775892	uncharacterized LOC107775892	NtSHOT1	AT3G60400	-1.18

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107779204	rho-N domain-containing protein 1, chloroplastic	NtRHON1	AT1G06190	-1.18
LOC107804381	THO complex subunit 1-like	NtTHO1b	AT5G09860	-1.16
LOC107775741	protein PALE CRESS, chloroplastic-like	NtPAC	AT2G48120	-1.15
LOC107825164	small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B'-like	NtSmB	AT4G20440	-1.11
LOC107811535	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g14470-like	NtQED1	AT2G29760	-1.11
LOC107763122	pre-mRNA- <i>splicing</i> factor SYF1-like	NtSYF1	AT5G28740	-1.11
LOC107779009	DNA-directed RNA polymerase V subunit 1-like	NtRPD1B	AT2G40030	-1.09
LOC107803524	protein gamma response 1-like	NtGR1	AT3G52115	-1.09
LOC107773161	exosome complex component RRP41 homolog	NtRRP41	AT3G61620	-1.09
LOC107775465	intron-binding protein aquarius	NtAQR	AT2G38770	-1.08
LOC107788750	WW domain-binding protein 4-like	NtWBP4	AT1G49590	-1.07
LOC107800809	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial	NtRPF2	AT1G62670	-1.07
LOC107804027	survival of motor neuron-related- <i>splicing</i> factor 30-like	NtSMNDC1	AT2G02570	-1.06
LOC107766793	DExH-box ATP-dependent RNA helicase DExH9-like	NtDExH9	AT1G59760	-1.06
LOC107810185	protein pleiotropic regulatory locus 1-like	NtPRL1	AT4G15900	-1.06
LOC107766724	alanine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial-like	NtEMB86	AT5G22800	-1.06
LOC107810091	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 8-like	NtRH8	AT4G00660	-1.05
LOC107776741	serine/threonine-protein kinase TOR-like	NtTOR	AT1G50030	-1.05
LOC107784564	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial	NtRPF1	AT1G12700	-1.05
LOC107786674	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g46050, mitochondrial-like	NtDOT4	AT4G18750	-1.04
LOC107760550	pre-mRNA- <i>splicing</i> factor 18-like	NtPrp18a	AT1G03140	-1.04
LOC107774571	serrate RNA effector molecule-like	NtSE	AT2G27100	-1.03
LOC107820968	putative tRNA (cytidine(34)-2'-O)-methyltransferase	NtAGL26	AT5G26880	-1.03
LOC107764551	protein HUA2-LIKE 2-like	NtHULK2	AT2G48160	-1.03
LOC107820528	small nuclear ribonucleoprotein Sm D1-like	NtSmD1b	AT4G02840	-1.02

Núm. Acesso	Descrição	Abreviação	Araport	log ₂ FC
LOC107816187	THO complex subunit 7A-like	NtTHO7	AT5G16790	-1.01
LOC107800862	protein SLOW WALKER 1-like	NtSWA1	AT2G47990	-1.01
LOC107781437	ribosome biogenesis protein BOP1 homolog	NtPEP1	AT2G40360	-1.01
LOC107761600	serine/arginine-rich <i>splicing</i> factor RS41-like	NtRS41	AT4G25500	-1.01
LOC107775406	poly(A)-specific ribonuclease PARN-like	NtPARN	AT3G25430	-1.00
LOC107784944	pre-mRNA cleavage factor Im 25 kDa subunit 1-like	NtCFIM-25	AT4G29820	1.13
LOC107772873	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 21-like	NtSMA1	AT2G33730	1.22
LOC107761364	serine/arginine-rich <i>splicing</i> factor SR30-like	NtSR30	AT1G09140	3.90

Fonte: Autoria própria.

As vias de processamento de RNAs correspondem a todos os processos nos quais essas moléculas são criadas ou modificadas. Alguns exemplos de processamento de RNAs são o *splicing*, a produção de miRNAs, o silenciamento gênico pós-transcricional, a síntese de RNA ribossomal (rRNA), e as vias de degradação e tráfego de RNAs (PRALL; SHARMA; GREGORY, 2019; SÁEZ-VÁSQUEZ; DELSENY, 2019). Na Figura 13, os genes DE pertencentes à essa categoria estão divididos de acordo com as vias nas quais participam.

Na via de regulação de microRNAs, podemos citar o gene *down*-regulado *NtSERRATE* (*NtSE*, -1,03), homólogo de *SERRATE* (*SE*) que, em *A. thaliana*, codifica uma proteína *zinc-finger* C2H2. Essa proteína está envolvida em diversos mecanismos de regulação de RNAs, como o *splicing* alternativo (RACZYNSKA et al., 2014), regulação de microRNAs (LOBBES et al., 2006), transcrição de genes sem íntrons (SPETH et al., 2018), além de funcionar como regulador da atividade do meristema apical do caule (GRIGG et al., 2005). Ademais, foi identificado como *up*-regulado o gene *NtSMA1* (1,22). Seu homólogo em *A. thaliana* codifica *SMALL1* (*SMA1*), uma proteína DEAD-BOX da família de helicases de RNA. Nessa espécie, *SMA1* interage com *SE* e ambas participam da biogênese de miRNAs (LI et al., 2018). Dessa forma, é possível dizer que o silenciamento de *SC11* afeta a expressão dos genes *NtSE* e *NtSMA1*, os quais também podem estar envolvidos nas mesmas vias de regulação em *N. tabacum*.

Figura 13. Genes DE em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC11* que podem estar envolvidos em vias de processamento de RNAs.

Em vermelho: genes *down*-regulados em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC11* em comparação com a planta controle. Em azul: genes *up*-regulados. A distribuição dos genes de acordo com as vias de processamento de RNAs foi feita de acordo com suas putativas funções, com base na literatura de seus homólogos de *A. thaliana*. Fonte: Autoria própria.

Na via de processamento de rRNAs, pode-se destacar o gene *down*-regulado *NtPEP1* (-1,01), homólogo de *PEP1* de *A. thaliana*. A diminuição da expressão de *PEP1* em *A. thaliana* causa severos problemas de desenvolvimento associados à divisão celular, sendo sua deleção letal (CARVALHO et al., 2016). Outros quatro genes envolvidos na biogênese de rRNAs em *A. thaliana* possuem homólogos DE no RNA-seq. O gene *SLOW WALKER 1* (homólogo de *NtSWA1*, -1,01) afeta a divisão celular durante a gametogênese (SHI et al., 2005). Por sua vez, *PALE CRESS* (homólogo de *NtPAC*, -1,15) afeta o desenvolvimento de cloroplastos e folhas (MEURER et al., 2017). Adicionalmente, *MTR4* (homólogo de *NtDExH9*, -1,06), uma helicase de RNA da família DExH-BOX, afeta a viabilidade da planta (LANGE; SEMENT; GAGLIARDI, 2011). Finalmente, o gene *RRP6L2* (homólogo de *NtRRP6L2*, -1,24) participa da biogênese dos ribossomos (SIKORSKI et al., 2015).

Interessantemente, Strini (2014) verificou que a proteína SCI1-GFP se co-localiza com marcadores de nucléolos em *N. tabacum*. O nucléolo é a região na qual ocorre a biogênese e o processamento de rRNAs (BROWN; SHAW, 1998; SÁEZ-VÁSQUEZ; DELSENY, 2019). Em suma, a *down*-regulação desses cinco genes envolvidos em processamento de rRNAs sugere que *SCI1* possa atuar nessa via.

Na via de *splicing*, dentre os genes *down*-regulados, estão três homólogos de membros da família *Sm-like* (LSM), que são: *NtLSM2* (-1,22), *NtLSM4* (-1,22) e *NtLSM8* (-1,2). Em *A. thaliana*, os homólogos desses genes participam do *splicing* e da regulação da degradação de mRNAs importantes para o desenvolvimento dessa espécie (GOLISZ et al., 2013; PEREA-RESA et al., 2013). Adicionalmente, estão *down*-regulados os genes *NtSmD1b* (-1,02) e *NtSmB* (-1,11), homólogos de membros da família *Sm* de *A. thaliana*. Nessa espécie, genes *Sm* estão envolvidos no *splicing*, no controle de qualidade de RNAs e no silenciamento gênico pós-transcricional (ELVIRA-MATELOT et al., 2015). Outro gene *down*-regulado é *NtPrp18a* (-1,04), que tem como homólogo *Prp18a* em *A. thaliana*. A proteína *Prp18a* é componente do spliceossomo e participa do segundo passo do *splicing* constitutivo, afetando o desenvolvimento de raízes e frutos (KANNO et al., 2018). Os genes das famílias *LSM* e *Sm*, bem como *Prp18a*, têm em comum a sua participação no *splicing* em *A. thaliana*. É possível que a *down*-regulação de seus homólogos, efeito do silenciamento de *SCI1* nos estigmas/estiletes, tenha como resultado a perturbação desse processo.

Dentre os genes envolvidos no *splicing* em *A. thaliana*, destaca-se *SERINE/ARGININE RICH PROTEIN 30* (*SR30*). *SR30* é um fator geral de *splicing* da família de proteínas *SR*, e afeta esse processo de forma global, visto que regula outros fatores de *splicing* (LOPATO et al., 1999). Ademais, ele está diretamente envolvido no desenvolvimento da flor, sendo que sua superexpressão resulta no aumento desse órgão (LOPATO et al., 1999). Em estigmas e estiletes de *N. tabacum* silenciando *SCI1*, verificou-se que o homólogo *NtSR30* está quase 15 vezes mais expresso ($\log_2FC = 3,9$), o que foi confirmado por RT-qPCR (Figura 8, item 3.1.2).

Interessantemente, Pinoti (2016) mostrou que, em *N. tabacum*, a proteína *SCI1* interage com o fator de *splicing* *NtSR45*. Curiosamente, a proteína *SR45* de *A. thaliana* é responsável pelo *splicing* constitutivo de *SR30* (ALI et al., 2007; DAY et al., 2012). Além disso, *SR45* também é responsável pelo controle de *splicing* de vários genes em inflorescências de *A. thaliana*, podendo ter efeito de ativação ou repressão na

produção de transcritos alternativos desses genes (ZHANG et al., 2017). Adicionalmente, a homóloga de SR45 em *H. sapiens*, RNPS1 é uma proteína SR central na regulação do *splicing*, onde é parte dos complexos multiméricos que se formam em junções éxon-éxon (LYKKE-ANDERSEN; SHU; STEITZ, 2001). Complementarmente, Pinoti et al. (em preparação) demonstram que, na sequência de aminoácidos de SCI1, existem dipeptídeos RS e EK, característica observada na proteína SR SRrp86 de *H. sapiens* (BARNARD et al., 2002; LI et al., 2003). Nessa espécie, SRrp86 é moduladora da atividade de outras proteínas SR, e afeta o *splicing* por elas mediado (BARNARD et al., 2002; LI et al., 2003). Pode-se supor, então, que SCI1 participa ativamente da regulação do *splicing* de *NtSR30*, através de sua interação com NtSR45. Dessa forma, dada a relevância de *SR30* no *splicing*, optou-se por investigar esse gene em maior detalhamento, o que será abordado na seção a seguir.

3.1.4 Caracterização do fator de *splicing* NtSR30 em *N. tabacum*

3.1.4.1 Os genes *NtSR30* de *N. tabacum* e *SR30* de *A. thaliana* compartilham características estruturais, sugerindo que são homólogos funcionais

Segundo o banco de dados NCBI, o gene *NtSR30* (LOC107761364) possui 13 éxons e 12 íntrons, codificando oito transcritos, aqui denominados *NtSR30-mRNA1* a *mRNA8* (Figura 14A; Tabela 8). Em comparação, o gene *SR30* de *A. thaliana* (AT1G09140) tem estrutura similar a *NtSR30*. Nessa espécie, o gene possui 12 éxons e 11 íntrons, produzindo cinco transcritos diferentes (Figura 14B; Tabela 8; PALUSA; ALI; REDDY, 2007). É importante destacar que os efeitos de *SR30* no *splicing* são relacionados a quais de seus transcritos são expressos.

Lopato et al. (1999) verificaram que, em *A. thaliana*, a superexpressão do transcrito completamente processado (*SR30-mRNA1*), o qual codifica a maior isoforma da proteína SR30, afeta o *splicing* alternativo do gene *SR30* (*feedback* de regulação) e de *SR34*, outro regulador do *splicing*. Dessa forma, a expressão dos transcritos alternativos de *SR30* diminui seu próprio efeito sobre o *splicing* global

(LOPATO et al., 1999). Em vista dessa importância, os transcritos alternativos de *NtSR30* em *N. tabacum* foram caracterizados por análises *in silico*. A próxima seção (item 3.1.4.2) abordará se os diferentes transcritos de *splicing* de *NtSR30* são afetados pelo silenciamento de *SC1*.

Figura 14. Caracterização dos genes *NtSR30* e *AtSR30*.

A – Estrutura do gene *NtSR30* de *N. tabacum* e seus eventos de *splicing* alternativos e tradução proteica preditos. **B** – Estrutura do gene *SR30* de *A. thaliana* e seus respectivos eventos de *splicing* alternativos e tradução proteica preditos. Blocos em preto: representação de éxons; linhas entre blocos: representação de íntrons; blocos hachurados: porções de íntrons retidas como resultado de *splicing* alternativo; PTC: Códon de Terminação Prematuro; *Primers* RT-PCR: posição dos *primers Forward* e *Reverse* desenhados para experimento de RT-PCR (item 3.1.4.2, p. 112); *Primers* RT-qPCR: posição dos *primers Forward* e *Reverse* desenhados para o experimento de RT-qPCR (item 3.1.2, p. 66); RRM1 e RRM2: domínios de ligação a RNA; RS: domínio rico em Arginina e Serina. Fonte: Autoria própria.

Uma análise mais refinada dos transcritos de *NtSR30* em *N. tabacum* permitiu identificar que, dos oito transcritos preditos desse gene, cinco deles apresentam Códon de Terminação Prematura (PTCs – *Premature Termination Codons*; Figura 14A; Tabela 8). Essas análises foram feitas com a função *analyzeORF* do programa *IsoformSwitchAnalyzeR* (VITTING-SEERUP; SANDELIN, 2019), utilizando as sequências preditas de quadro aberto de leitura (*Open Reading Frames* - ORFs). Em *A. thaliana* foi observado que, apesar de cinco transcritos serem preditos, apenas a isoforma maior da proteína SR30 é detectada em plântulas (LOPATO et al., 1999). Apesar de possuírem ORFs, todos os transcritos, exceto *SR30-mRNA1*, possuem PTCs (Tabela 8). É importante destacar que mRNAs com PTCs são possíveis alvos da via de Degradação Mediada por Mutações *Nonsense* (*Nonsense-Mediated Decay* – NMD), a qual reconhece esses PTCs e promove a degradação desses mRNAs (PALUSA; REDDY, 2010; PALUSA; ALI; REDDY, 2007). No entanto, é interessante notar que em folhas de *A. thaliana*, o transcrito alternativo *SR30-mRNA3*, apesar de apresentar características que podem levá-lo à via NMD, possui meia vida muito maior que o *SR30-mRNA1*, o qual não tem as mesmas características (HARTMANN; WIESSNER; WACHTER, 2018). Apesar disso, pouca proteína produzida pelo *SR30-mRNA3* é detectada *in planta* em comparação com a proteína produzida pelo *SR30-mRNA1* (isoforma maior), porém elas são homólogas funcionais *in vitro* (HARTMANN; WIESSNER; WACHTER, 2018). Interessantemente, Palusa e Reddy (2010) observaram que a via NMD não degrada todos os transcritos de genes SR que possuem PTCs, e sugerem que os mesmos possam ter funções regulatórias quando em quantidades baixas.

Em *A. thaliana*, muitos dos transcritos alternativos de SRs estão sujeitos à NMD, existindo uma correlação direta entre o *splicing* alternativo que ocorre nesses transcritos e essa via de degradação (PALUSA; REDDY, 2010). Adicionalmente, verificou-se que a superexpressão de proteínas SR é capaz de aumentar a degradação global de mRNAs pela via NMD (ZHANG; KRAINER, 2004). Outra característica importante é que proteínas SR regulam o *splicing* de genes de sua própria família, formando um mecanismo complexo para o controle do *splicing* (ZHOU; FU, 2013).

Tabela 8. Transcritos produzidos pelos genes *NtSR30* e *AtSR30* e seus tamanhos preditos, presença de PTCs e tamanhos de proteínas preditas. **nt:** nucleotídeos; **aa:** aminoácidos; **PTC:** Códon de Terminação Prematuro, predito com o programa *IsoformSwitchAnalyzeR* (VITTING-SEERUP; SANDELIN, 2019).

Organismo	Transcrito	Núm. acesso NCBI	mRNA predito (nt)	PTC	Proteína predita (aa)
<i>N. tabacum</i>	<i>NtSR30-mRNA1</i>	XM_016579590.1	1167	-	293
	<i>NtSR30-mRNA2</i>	XM_016579591.1	1155	-	289
	<i>NtSR30-mRNA3</i>	XM_016579592.1	1152	-	288
	<i>NtSR30-mRNA4</i>	XR_001642577.1	1415	Sim	267
	<i>NtSR30-mRNA5</i>	XR_001642578.1	1326	Sim	267
	<i>NtSR30-mRNA6</i>	XR_001642579.1	1157	Sim	267
	<i>NtSR30-mRNA7</i>	XR_001642580.1	1068	Sim	267
	<i>NtSR30-mRNA8</i>	XR_001642581.1	1403	Sim	263
<i>A. thaliana</i>	<i>SR30-mRNA1</i>	Palusa et al., 2007	773	-	268
	<i>SR30-mRNA2</i>		1018	Sim	92
	<i>SR30-mRNA3</i>		852	Sim	256
	<i>SR30-mRNA4</i>		1111	Sim	256
	<i>SR30-mRNA5</i>		1190	Sim	92

Fonte: Autoria própria.

Apesar do grande número de transcritos, são preditas apenas cinco isoformas de proteínas NtSR30 em *N. tabacum* (Figura 14A, Tabela 8). Em *A. thaliana*, os cinco transcritos produzidos possuem ORFs que podem codificar três isoformas de proteínas AtSR30 (Figura 14B, Tabela 8). Análises das sequências de aminoácidos preditas das isoformas maiores de NtSR30 e AtSR30, com os programas *InterProScan* (JONES et al., 2014) e *CD-Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004), detectam dois domínios de reconhecimento e ligação a RNAs na porção amino-terminal (Figura 14). Esses domínios são denominados de RRM1 e RRM2, os quais são conservados em eucariotos (MACKERETH; SATTLER, 2012). Eles estão presentes em proteínas SR e em ribonucleoproteínas (RNPs) envolvidas em *splicing* (LAZAR et al., 1995; MACKERETH; SATTLER, 2012). Em *N. tabacum*, as cinco isoformas preditas de NtSR30 possuem os domínios RRM1 e RRM2 idênticos (Figura 14A). Em *A. thaliana* duas isoformas de proteínas SR30 (produzidas pelos *SR30-mRNAs 1, 3 e 4*) possuem os domínios RRM1 e RRM2 idênticos, e outra isoforma

(produzida pelos *SR30-mRNAs* 2 e 5) possui o domínio RRM1 intacto e o RRM2 truncado (Figura 14B).

Adicionalmente, é encontrado na porção carboxi-terminal das isoformas maiores de proteínas SR30 um domínio denominado RS (Figura 14). Esse domínio não tem estrutura específica, mas pode ser definido como uma região de pelo menos 50 aminoácidos, em que mais de 40% desses sejam Arginina (R) e Serina (S), organizados em dipeptídeos RS ou SR (MANLEY; KRAINER, 2010). Na isoforma maior de *N. tabacum*, o domínio RS possui 101 aminoácidos, dos quais 60,39% são resíduos R (24) e S (37). Na isoforma maior de *A. thaliana*, o domínio RS possui 81 aminoácidos, dos quais 62,96% são resíduos R (17) e S (34). Ao comparar as maiores isoformas de NtSR30 e AtSR30, elas possuem 73% dos seus aminoácidos idênticos, e 82% de similaridade, com diferenças mais evidentes na região do domínio RS (Figura 15).

Figura 15. Comparação entre as sequências de aminoácidos das isoformas completas das proteínas NtSR30 e AtSR30.

RRM1 e RRM2: domínios de reconhecimento e ligação a RNAs; **RS:** domínio RS, rico em Argininas e Serinas. O alinhamento foi gerado com o software MAFFT (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2017) e o consenso e representação gráfica com o pacote *msa* no programa R (BODENHOFER et al., 2015). Fonte: Autoria própria.

É importante mencionar que, tanto em *N. tabacum* quanto em *A. thaliana*, as diferenças entre isoformas preditas de proteínas SR30 ocorrem na região carboxi-terminal, onde se encontra o domínio RS (Figura 14). Interessantemente, foi sugerido que as diferenças no tamanho e composição do domínio RS podem afetar as interações proteína-proteína (BARTA; KALYNA; REDDY, 2010). Dessa forma, podemos elencar passos importantes para o estudo de proteínas SR30: i) identificar quais transcritos são expressos no tecido de estudo, ii) identificar quais proteínas são produzidas por esses transcritos, e iii) considerar que, quando são expressas mais de uma isoforma, as parceiras de interação podem ser diferentes entre as isoformas. Ademais, essas análises permitem concluir que *NtSR30* e *AtSR30* são genes homólogos, com potencial equivalência funcional, devido às características que compartilham.

3.1.4.2 O silenciamento de *SCI1* afeta a expressão de transcritos alternativos de *NtSR30*

No presente trabalho, foi mostrado que o gene *NtSR30* é mais expresso em estigmas e estiletos de plantas com silenciamento de *SCI1*, em comparação com a planta controle (item 3.1.3.4, p. 100). É importante reiterar que: i) em *N. tabacum* a proteína *SCI1* interage com proteínas possivelmente envolvidas no *splicing* (PINOTI, 2016); ii) em *A. thaliana*, a expressão de transcritos alternativos do gene *SR30* afeta o *splicing* global (LOPATO et al., 1999). Portanto, é interessante determinar se o silenciamento de *SCI1* afeta a produção de transcritos alternativos de *NtSR30*.

O primeiro método utilizado para essa finalidade consiste no alinhamento das *reads* de cada amostra de RNA-seq à sequência genômica de *NtSR30*, a fim de quantificar as junções éxon-éxon (programa *HISAT2* - PERTEA et al., 2016). Esse método difere do método anterior (item 3.1.1, p. 64), que utilizou o programa *Salmon* para as análises de expressão diferencial de genes. Essa diferença reside no aspecto de que o programa *HISAT2* realiza alinhamentos de *reads* à sequência genômica, enquanto *Salmon* realiza mapeamentos ao transcriptoma. O segundo passo desse método consiste em utilizar as quantificações geradas para verificar: i) a diferença na expressão do gene *NtSR30*; ii) a diferença na expressão dos transcritos alternativos

desse gene. Para esse fim, foi utilizado o programa *IsoformSwitchAnalyzeR* (VITTING-SEERUP; SANDELIN, 2019).

O resultado dessa análise confirmou que o gene *NtSR30* está *up-regulado* em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SCI1*, sendo que na planta controle quase não há expressão desse gene (Figura 16B). Adicionalmente, é possível afirmar que em plantas controle de *N. tabacum* apenas o *NtSR30-mRNA4* tem expressão detectada, enquanto em plantas de silenciamento de *SCI1* é detectada a expressão dos *NtSR30-mRNAs* 1, 3, 4, 5 e 7 (Figura 16A e C). Conforme ilustrado na Figura 16A, as diferenças entre os transcritos alternativos de *NtSR30* se concentram em seus éxons finais (entre o 10º e o 11º). Dessa forma, o método de sequenciamento por RNA-seq tem limitações, principalmente por consistir em sequências pequenas (pares de sequências com 90 bases no caso deste trabalho). Segundo Ding, Rath e Bai (2017), sequências mais longas, em conjunto com um desenho experimental específico, são importantes considerações caso o objetivo do RNA-seq seja detectar *splicing* alternativo.

Figura 16. Análise de expressão diferencial de transcritos de *NtSR30* por RNA-seq.

A: Estrutura dos transcritos alternativos de *NtSR30* com expressão detectada por RNA-seq. Quadrado em azul: região amplificada pelos *primers* (setas brancas) utilizados no experimento de RT-PCR, descrito abaixo. **B:** Expressão do gene *NtSR30* segundo análise com o programa *IsoformSwitchAnalyzeR*. **C:** Expressão dos transcritos de *NtSR30* segundo análise com o programa *IsoformSwitchAnalyzeR*. Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, devido às limitações inerentes ao método de RNA-seq, realizou-se um experimento de RT-PCR, com o objetivo de verificar as diferenças encontradas no RNA-seq. Para isso, foram desenhados *primers* nos éxons 10 e 11 do gene *NtSR30*, flanqueando o íntron 10, no qual ocorrem a maioria dos eventos de *splicing* alternativo (Figura 14A, Figura 16A). Com esses *primers*, os amplicons preditos foram de 138 pb (*NtSR30-mRNA2*), 150 pb (*NtSR30-mRNAs 1 e 3*), 345 pb (*NtSR30-mRNA7*), 424 pb (*NtSR30-mRNA6*), 612 pb (*NtSR30-mRNA5*), 682 pb (*NtSR30-mRNAs 4 e 8*), ilustrados na Figura 17.

As três bandas de maior intensidade em ambas as amostras correspondem aos tamanhos esperados de amplicons preditos para *NtSR30-mRNA1/NtSR30-mRNA3* (150 pb), *NtSR30-mRNA5* (612 pb), *NtSR30-mRNA4/NtSR30-mRNA8* (682 pb). Com esse resultado, algumas observações podem ser feitas. Em primeiro lugar, cabe salientar que na análise com os dados de RNA-seq, verificou-se apenas a expressão do *NtSR30-mRNA4* em plantas controle. Entretanto, neste experimento de RT-PCR, foram amplificadas sequências equivalentes aos transcritos alternativos que não aparecem no RNA-seq. Essa contradição pode ser reflexo da limitação do RNA-seq em quantificar genes pouco expressos (SIMS et al., 2014). Em segundo lugar, as bandas mais intensas correspondem às isoformas de mRNA mais expressas no RNA-seq (*NtSR30-mRNAs 1, 3, 4 e 5* – Figura 16C). Em terceiro lugar, além das bandas de tamanho predito, outras bandas são visíveis no gel de agarose (Figura 17). Essas bandas adicionais, de menor intensidade, podem indicar transcritos novos de *NtSR30* ou mesmo transcritos não processados completamente.

Figura 17. Análise da presença de transcritos alternativos de *NtSR30* em estigmas e estiletes de plantas controle comparadas com plantas de silenciamento de *SCI1*.

Gel de agarose 2% da eletroforese realizada com reações de PCR utilizando *primers* flanqueando os éxons 10 e 11 de *NtSR30*. nt: nucleotídeos; M: marcador de peso molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific); SR1: planta controle; Blocos em preto: representação de éxons; linhas entre blocos: representação de íntrons; blocos hachurados: porções de íntrons retidas como resultado de *splicing* alternativo; Tamanhos preditos dos amplicons estão indicados ao lado direito de sua representação. Fonte: Autoria própria.

É interessante reforçar que os componentes da via de *splicing* se organizam espaço-temporalmente no desenvolvimento durante o ciclo celular e dependendo do estado fisiológico da célula (ALI; REDDY, 2008). Em *A. thaliana*, por exemplo, é sabido que, durante o desenvolvimento floral, estão presentes formas constitutivas e estágio-específicas de diversos transcritos via *splicing* alternativo (WANG et al., 2014). Dessa forma, apesar da putativa ligação de *SCI1* com o *splicing* alternativo, em especial de *NtSR30*, abrir um novo universo de regulação, ela também integra mecanismos que já estão sendo estudados. Consequentemente, o estudo mais detalhado da dinâmica de *NtSR30* em plantas transgênicas com silenciamento e superexpressão de *SCI1* é um excelente ponto de partida para verificar se o papel de *SCI1* no desenvolvimento da flor envolve *splicing* direta ou indiretamente.

4 Capítulo II - Avanços na caracterização de NtCDKG;2.

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 O nível de expressão de NtCDKG;2 afeta o tamanho de sementes de *N. tabacum*

O primeiro trabalho de caracterização de NtCDKG;2 mostrou que plantas transgênicas, silenciando ou superexpressando essa CDK, não possuem fenótipos diferentes de plantas controle (LUBINI, 2012). Entretanto, foi possível verificar que as sementes das plantas de silenciamento possuem problemas de germinação, bem como um tamanho aparentemente reduzido. Interessantemente, segundo dados de expressão por RNA-seq no banco de dados NCBI, o gene *NtCDKG;2* é mais expresso em sementes, em comparação com os demais órgãos de *N. tabacum* (Figura 18; ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&list_uids=107826481). Curiosamente, em *A. thaliana* esse padrão também é observado para a expressão de *CDKG;2*, a qual é mais elevada nas sementes em comparação com outros órgãos (bar.utoronto.ca/efp). Dessa forma, é interessante investigar se as alterações na expressão de *NtCDKG;2* afetam as sementes de plantas transgênicas de *N. tabacum* silenciando e superexpressando esse gene. É importante notar que, no que diz respeito aos possíveis problemas de viabilidade e germinação das sementes, eles serão analisados quando as linhagens transgênicas forem homozigotas, e não estiverem mais segregando o transgene. Apesar disso, é possível analisar se o tamanho das sementes das plantas transgênicas, não homozigotas, apresentam diferenças em comparação com as de plantas selvagens.

Figura 18. Expressão de *NtCDKG;2* em diferentes tecidos de *N. tabacum*, por RNA-seq.

Eixo x: diferentes órgãos de *N. tabacum*; Eixo y: quantificação da expressão em Transcritos Por Milhão; Barras: desvio-padrão. Os dados de expressão foram obtidos do banco de dados NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&list_uids=107826481). Fonte: Autoria própria, com dados do NCBI (acesso em 12 de dezembro de 2020).

Portanto, neste trabalho, buscou-se avaliar o tamanho das sementes oriundas de plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão de *NtCDKG;2*. Para isso, foram utilizadas sementes de cada um dos seguintes genótipos de plantas: i) silenciamento de *NtCDKG;2* (linhagens Ri54A, Ri119A, e Ri123A – LUBINI, 2012); ii) superexpressão de *NtCDKG;2* (linhagens OE9.2, OE11.1, e OE32.2 – LUBINI, 2012); iii) superexpressão de GFP (linhagem 4.2 – STRINI, 2014); e iv) planta selvagem (cultivar SR1). Os genótipos pertencentes aos grupos iii e iv compõem os controles utilizados nas comparações com as plantas transgênicas de *NtCDKG;2* (grupos i e ii). É importante destacar que a planta transgênica de superexpressão de GFP foi utilizada para evitar que as possíveis conclusões acerca das diferenças encontradas fossem oriundas do processo de geração de plantas transgênicas. As análises seguiram o método descrito por Herridge et al. (2011), o qual consiste na obtenção de imagens das sementes em estereomicroscópio, seguida da análise de suas áreas com o programa *ImageJ*. Depois disso, foi feita uma análise ANOVA de um fator, a qual confirmou a existência de diferença nas áreas das sementes entre as plantas analisadas, com $p\text{-valor} = 2 \times 10^{-16}$. A seguir, o teste de Tukey foi aplicado a fim de

verificar, com intervalo de confiança de 95%, as diferenças entre pares de linhagens. Como resultado, todas as comparações apresentam diferenças dentro desse intervalo de confiança, com exceção das comparações SR1-OE11.1 e OE9.2-OE11.1 (Figura 19A, “ns” - não significativo).

Dessa forma, a análise permitiu constatar que as três linhagens transgênicas de silenciamento de *NtCDKG;2* possuem sementes que são, em média, menores que a planta selvagem, SR1 (Figura 19A). Em comparação com a planta GFP4.2, apenas as linhagens Ri54A e Ri119A são menores. Em relação às plantas de superexpressão de *NtCDKG;2*, com exceção da linhagem OE11.1, as sementes são, em média, maiores em comparação com as da planta SR1 (Figura 19A). Já em comparação com a planta GFP4.2, as três linhagens de superexpressão possuem sementes maiores. Ademais, é interessante notar que as maiores variações nas áreas de sementes medidas são observadas nas três linhagens de silenciamento em comparação com as outras linhagens (Figura 19A).

Figura 19. Diferenças nos tamanhos de sementes em plantas com expressão alterada de *NtCDKG;2*.

A - Representação em *boxplot* das medições de área (mm²) das sementes analisadas. A linha preta horizontal dentro das caixas coloridas representa a média da área. Os limites inferior e superior das caixas representam os quartis de 25% e 75%, respectivamente. As linhas pretas verticais e pontos representam as áreas de sementes que variam além dos valores representados nas caixas. O número de sementes medidas para cada linhagem está indicado por “n =”, na legenda. Ri54A, Ri119A e Ri123A:

sementes de plantas transgênicas independentes de silenciamento de *NtCDKG;2*; OE9.2, OE11.1 e OE32.2: sementes de plantas transgênicas independentes de superexpressão de *NtCDKG;2*; GFP4.2: sementes de uma planta transgênica superexpressando GFP; SR1: sementes da planta selvagem (controle). ns = não houve significância estatística entre o par indicado pelas extremidades do colchete (SR1-OE11.1 e OE9.2-OE11.1). Todas as outras comparações tem p -valor < 0.05 . **B** - Expressão relativa do gene *NtCDKG;2* em folhas da planta controle (SR1) e das plantas de silenciamento (linhagens Ri) e superexpressão (linhagens OE) de *NtCDKG;2*. Fonte: Autoria própria, valores de expressão de *NtCDKG;2* obtidos de Lubini (2012).

Interessantemente, Cruz (2018) mostrou que *SCI1* se expressa nos óvulos da flor em desenvolvimento. Com isso, pode-se especular que a interação entre *NtCDKG;2* e *SCI1* possa também ocorrer nos óvulos e de alguma forma afetar seu desenvolvimento e, posteriormente, das sementes. Dessa forma, será interessante analisar, no futuro, como se dá o papel dessa CDK multifuncional nesses processos, e se o mesmo está atrelado à função de *SCI1* nos óvulos.

4.1.2 A proteína *NtCDKG;2* possui diferentes isoformas nos órgãos de *N. tabacum*

É importante ressaltar que desde a descoberta da interação entre *SCI1* e *NtCDKG;2*, esforços foram empregados para a caracterização dessa CDK em *N. tabacum* (FERREIRA, 2013, 2016; LUBINI, 2012, 2016; THOMÉ, 2016, 2018). Com esse intuito, fez-se necessária a obtenção da proteína *NtCDKG;2* para realizar diferentes experimentos de interação proteína-proteína e estudos funcionais. Entretanto, muitas dificuldades em obter *NtCDKG;2* foram encontradas ao longo desse objetivo, que podemos enumerar em: i) A expressão heteróloga dessa CDK em bactérias *Escherichia coli* é difícil, e necessita um protocolo extenso, que envolve redobramento, o qual resulta na produção de pouca proteína (LUBINI, 2016); ii) tanto a proteína *NtCDKG;2* endógena de folhas, quanto a incubação da proteína heteróloga com extrato de folhas, não permite a detecção de sua forma completa (LUBINI, 2016). Curiosamente, Santos (2015) observou dificuldades similares na expressão heteróloga de CDK11, a proteína homóloga de *NtCDKG;2* em *H. sapiens* (FERREIRA, 2016; LUBINI, 2016). Segundo o autor, só foi possível expressar CDK11 em *E. coli* sem a sua porção N-terminal, a qual parece desestabilizar a expressão da versão completa (SANTOS, 2015).

Em experimentos prévios com o objetivo de caracterizar a proteína NtCDKG;2, Lubini (2016) observou que em folhas de *N. tabacum*, apenas peptídeos de menores pesos moleculares que o predito para a proteína completa (aproximadamente 76 kDa) são detectados com um anticorpo policlonal contra a mesma. Segundo a autora, nesse tecido existem apenas as duas isoformas menores de NtCDKG;2: uma de aproximadamente 33 kDa e a outra com cerca de 45 kDa. Visto que SCI1 interage com a isoforma completa de NtCDKG;2 nos estigmas/estiletes (STRINI, 2014), e que NtCDKG;2 pode participar do desenvolvimento das sementes, é interessante investigar o comportamento dessa CDK em outros tecidos.

Com esse objetivo, no presente trabalho, foram extraídas as proteínas totais de raízes, folhas, sépalas, pétalas, anteras, ovários, estigmas/estiletes, ovários e sementes pelo método de Ácido Tricloroacético-Acetona (MECHIN; DAMERVAL; ZIVY, 2007). Esse método foi utilizado pois o ácido tricloroacético é desnaturante, e desativa proteínas rapidamente, evitando a sua degradação (GUO et al., 2015). É importante destacar que esse método difere daquele utilizado por Lubini (2016), o qual consistiu na utilização de um tampão de extração para manter ativas as proteínas extraídas. Após a extração, as proteínas totais foram separados por eletroforese e depois submetidas a um *western blot* utilizando o anticorpo policlonal contra NtCDKG;2 (descrito em LUBINI, 2016).

Como ilustrado na Figura 20, o anticorpo contra NtCDKG;2 foi capaz de reconhecer peptídeos de diferentes tamanhos em diferentes tecidos de *N. tabacum*. De acordo com esse experimento, a proteína completa predita (aproximadamente 76 kDa) foi detectada em todos os tecidos, com exceção das raízes e sementes (Figura 20). No caso de raízes, Lubini (2012) identificou a presença de transcritos do gene *NtCDGK;2* nesse órgão. Assim, a ausência da proteína NtCDKG;2 pode ser explicada por seu baixo nível e/ou por interferências causadas pela presença de pigmentos, lipídeos e compostos fenólicos na extração de proteínas totais desse tecido (GUO et al., 2015). No que diz respeito às sementes, esse resultado foi surpreendente. Como sementes são ricas em proteínas de estocagem (PANITZ; MANTEUFFEL; WOBUS, 1999), sua abundância pode ter dificultado a detecção da forma completa de NtCDKG;2. Apesar disso, bandas de menor peso molecular (abaixo de 30 kDa) são detectadas pelo anticorpo nesse tecido. Desse modo, em conjunto com o fenótipo

notado no item anterior, esses resultados permitem propor que isoformas específicas de NtCDKG;2 participem do desenvolvimento da semente.

Figura 20. Western blot de amostras de diferentes tecidos de *N. tabacum* com o anticorpo policlonal anti-NtCDKG;2.

Cada canaleta contém 25 µg de proteínas totais, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS/PAGE). O tamanho predito da isoforma completa de NtCDKG;2 é de 76,5 kDa. Isoformas menores de NtCDKG;2, de aproximadamente 45 kDa e 33 kDa foram descritas por Lubini (2016). L (kDa): marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color (BioRad). Fonte: Autoria própria.

Adicionalmente, peptídeos de menor peso molecular também foram reconhecidos pelo anticorpo em folhas, anteras, ovários e estigmas/estiletes em padrões diferentes. Uma banda que corresponde ao tamanho de aproximadamente 45 kDa pode ser encontrada em folhas, anteras e ovários e, em menor intensidade, em pétalas (Figura 20). Complementarmente, foi detectada uma banda pouco intensa, de aproximadamente 33 kDa, em folhas e anteras. Ambas as bandas próximas de 45 kDa e 33 kDa são equivalentes às putativas isoformas de NtCDKG;2 descritas por Lubini (2016). Adicionalmente, em estigmas/estiletes e sementes, bandas ainda menores são detectadas pelo anticorpo. Para esses peptídeos, aparentemente

menores que 30 kDa, pode ser possível que correspondam a isoformas novas de NtCDKG;2, que são tecido-específicas.

Em suma, com os resultados apresentados e estudos prévios sobre NtCDKG;2, algumas observações podem ser feitas. Em primeiro lugar, com a utilização de um tampão desnaturante, que inibe a atividade de proteínas, é possível detectar a isoforma completa de NtCDKG;2 em folhas e na maioria dos órgãos de *N. tabacum*. Esse resultado contrasta com o encontrado por Lubini (2016), a qual utilizou um tampão o qual não possuía inibidores de proteassomos, apenas de proteases. Com isso, é possível propor que a ausência da forma completa de NtCDKG;2 nas amostras de Lubini (2016) sejam fruto da degradação dessa CDK pelo proteassomo. Em segundo lugar, foi possível determinar que as putativas isoformas de NtCDKG;2, descritas por Lubini (2016), possuem dinâmica tecido-específica. Em terceiro lugar, putativas isoformas novas são detectadas em estigmas/estiletos e sementes. Cabe lembrar que Lubini (2012) mostrou que o gene *NtCDKG;2* é expresso de forma ubíqua nos diferentes órgãos de *N. tabacum*, o que é reforçado por dados de expressão do NCBI (Figura 18). Dessa forma, com os resultados apresentados aqui, é reforçada a hipótese de que a proteína NtCDKG;2 sofra regulação pós-traducional de forma tecido-específica. Essa hipótese é importante para considerar experimentos envolvendo NtCDKG;2.

4.1.3 NtCDKG;2 possui um peptídeo sinal PEST de degradação pelo proteassomo

Apesar de terem sido encontradas as isoformas completas de NtCDKG;2 em todos os órgãos de *N. tabacum*, com exceção de raízes e sementes, é importante destacar que: i) em extratos foliares com um tampão que não inibe proteassomos são encontradas apenas isoformas menores de NtCDKG;2 (LUBINI, 2016); ii) SCI1 interage com a isoforma maior (STRINI, 2014); iii) estudos *in planta* dessa interação são feitos em folhas. Assim, é importante investigar se a ausência da isoforma completa de NtCDKG;2, nas condições citadas, tem relação com a degradação pela via do proteassomo. Segundo Adachi, Uchimiya e Umeda (2006), em ambas *A. thaliana* e *N. tabacum*, a expressão de outras CDKs, a CDKB2;1 e a CDKB2;2, é

controlada por rápida degradação pelo proteassomo devido à presença de um peptídeo PEST. Esse peptídeo consiste em uma sequência rica nos aminoácidos Prolina, Ácido Glutâmico ou Aspártico, Serina e Treonina (P, E/D, S e T), e funciona como um sinal para encaminhar a proteína ao proteassomo (ADACHI; UCHIMIYA; UMEDA, 2006; ROGERS; WELLS; RECHSTEINER, 1986). Dessa forma, decidimos investigar se NtCDKG;2 possui peptídeos PEST, o que poderia explicar a ausência de sua isoforma maior em folhas quando não há inibição do proteassomo.

Através do programa *pepfind* (bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepfind), foram identificados cinco peptídeos PEST na sequência de aminoácidos de NtCDKG;2 (Figura 21A). Desses, um único peptídeo possui um escore PEST de 11,71, valor acima do *threshold*, o que significa que há potencial relevância biológica (ROGERS; WELLS; RECHSTEINER, 1986). Esse peptídeo está localizado na região N-terminal de NtCDKG;2 (posições 66 a 97) e possui 30 aminoácidos (Figura 21B). Segundo Rogers, Wells e Rechsteiner (1986), proteínas com motivos PEST de escore alto (acima de 10) raramente excedem 30 min de meia-vida na célula.

Figura 21. Identificação de peptídeos PEST na sequência de aminoácidos de NtCDKG;2.

A - Foram encontrados 5 peptídeos ricos em sequências PEST (linhas verde-claro e vermelhas). O peptídeo mais próximo à região amino-terminal possui o maior *score*, de 11,71 (verde-claro), e pode ser considerado biologicamente relevante, pois está acima do *threshold* (+5,00, linha azul-clara). **B** - Posição e sequência do peptídeo PEST na sequência de NtCDKG;2; N- e -C indicam as extremidades amino- e carboxi-terminais, respectivamente. Em cinza: domínio quinase. Fonte: Autoria própria.

Como exemplo, as proteínas CDKB2;1 e CDKB2;2 de *A. thaliana* estudadas por Adachi, Uchimiya e Umeda (2006), possuem peptídeos PEST com escores de 9,72 e 10,24, respectivamente, e são degradadas em poucas horas. Ainda mais interessante, é a proteína CYCD3;1 de *A. thaliana*, (escore PEST de 10,82), que tem meia-vida de apenas 7 minutos na célula (PLANCHAIS; SAMLAND; MURRAY, 2004). Em plantas, ciclinas predominantes na fase G1 do ciclo celular, como é o caso de CYCD3;1, são, em particular, ricas em domínios PEST, o que explica sua curta vida na célula (FRANCIS, 2007; MENGES et al., 2006). Dessa forma, podemos supor que a meia-vida de NtCDKG;2 também seja rápida e que a presença de PEST, na sequência dessa CDK, pode indicar um dos mecanismos de sua degradação. No experimento descrito acima (item 4.1.2, p. 119), é possível supor que a proteína NtCDKG;2 completa foi detectada porque o método de extração inibiu rapidamente enzimas que a degradariam (GUO et al., 2015). Curiosamente, a proteína CDK11, homóloga de NtCDKG;2 em *H. sapiens*, possui três motivos PEST em sua região N-terminal (BUNNELL et al., 1990). Dessa forma, CDK11 é degradada pelo proteassomo, a menos que esteja associada com a chaperona *Heat-shock Protein 90* (Hsp90) (MIKOLAJCZYK; NELSON, 2004). É importante destacar que a degradação pelo proteassomo não é responsável pela produção de isoformas de menor tamanho. Esse mecanismo de degradação é apenas uma possível explicação para a não detecção da isoforma maior de NtCDKG;2 quando são feitos extratos com tampões sem inibidores de proteassomos.

4.1.4 Comparações das sequências de aminoácidos de NtCDKG;2, AtCDKG;2 e CDK11 de *H. sapiens*

Visto que nos itens acima (4.1.1 e 4.1.3) as evidências da homologia entre NtCDKG;2 e CDK11 foram reforçadas, é importante descrever as semelhanças que permitem sustentar essa hipótese. Ademais, Menges et al. (2005) também propuseram a homologia de CDKG;2 de *A. thaliana* com a CDK11 de *H. sapiens*, porém sem mostrar dados que sustentem essa comparação. Dessa forma, nesta seção, serão apresentadas novas evidências, discutidas com aquelas já disponíveis, da homologia entre NtCDKG;2, CDK11 e CDKG;2 de *A. thaliana* (AtCDKG;2).

Neste trabalho, determinou-se que as sequências de aminoácidos de NtCDKG;2, AtCDKG;2 e CDK11 possuem estruturas similares, que consistem em uma porção N-terminal extensa e um domínio quinase na porção C-terminal (Figura 22). Como ilustrado na Figura 22, no domínio N-terminal, destaca-se a presença, nas três proteínas, de sinais de localização nuclear (NLS – *Nuclear Localization Signal*). Em comparação, *N. tabacum* e *A. thaliana* possuem um NLS adicional em sua extremidade C-terminal (Figura 22). Segundo Tinland et al. (1992), a presença de NLS em ambos o N- e C-terminal é redundante, mas pode aumentar a eficiência do transporte nucleocitoplasmático de proteínas com essa característica.

Outro aspecto importante observado nas regiões N-terminal das sequências analisadas é a presença de dipeptídeos RS (Figura 22). Esses dipeptídeos são característicos de proteínas envolvidas no *splicing*, visto que medeiam a interação com proteínas SR, que são fatores gerais desse processo (JEONG, 2017; WU; MANIATIS, 1993). Como encontrado em um trabalho prévio, NtCDKG;2 possui cinco dipeptídeos RS e AtCDKG;2 possui seis desses dipeptídeos (Figura 22; FERREIRA, 2016). Complementarmente, a sequência de CDK11 possui dois dipeptídeos RS (Figura 22).

Em NtCDKG;2, como mencionado no item acima (4.1.3, p. 122), um peptídeo PEST de escore 11,71 é encontrado entre os resíduos 66-97 (Figuras 18 e 19). Adicionalmente, a re-análise da presença de peptídeos PEST na sequência CDK11 de *H. sapiens* permitiu confirmar a presença de um peptídeo com escore de 11,77 entre os aminoácidos 367-407 (Figura 22). Como ilustrado na Figura 22, em *A. thaliana* são encontrados dois peptídeos PEST em AtCDKG;2: um entre os aminoácidos 107-129 (escore 11,94) e outro entre as posições 381-392 (escore 10,10). Conjuntamente, esses resultados permitem inferir que todas essas CDKs têm vida curta na célula e, como descrito para CDK11 (MIKOLAJCZYK; NELSON, 2004), podem depender de interações estabilizadoras para sua função adequada.

Figura 22. Comparação dos elementos nas sequências de aminoácidos de NtCDKG;2, CDK11 e AtCDKG;2.

Em azul: dipeptídeos RS; Em verde: peptídeos PEST preditos com o programa *epesftind*; Em vermelho: sinais de localização nuclear preditos com o programa LOCALIZER para as sequências de plantas, retirados de Zhou et al. (2016) para CDK11; Domínio quinase: domínio *STKC_CDC2L* comum às três CDKs; Seta curvada vazia: sítio predito da tradução alternativa de NtCDKG;2 via IRES (LUBINI, 2016); Seta curvada preta: Sítio IRES onde a isoforma CDK11p58 é traduzida em *H. sapiens* (ZHOU et al., 2016); Triângulo vazio: provável sítio de clivagem que permite a produção do fragmento N-terminal de 33 kDa de NtCDKG;2 (LUBINI, 2016); Triângulo preto: sítio de clivagem por caspases 1 e 3 de CDK11 em *H. sapiens* (ZHOU et al., 2016). Fonte: Autoria própria, representação de CDK11 baseada em Zhou et al. (2016).

É interessante reforçar, nesse ponto, que CDK11 possui 4 isoformas principais (LOYER; TREMBLEY, 2020), as quais serão descritas a seguir. Como Lubini (2016) e o experimento de *western blot* (item 4.1.2, p. 119) sugerem, NtCDKG;2 também possui pelo menos três isoformas em *N. tabacum*. Em contraponto, em *A. thaliana* apenas a isoforma completa de AtCDKG;2 foi descrita (MA et al., 2015).

A isoforma CDK11^{p110} de *H. sapiens* (Figura 22) foi identificada por sua associação a complexos de transcrição da RNAPII, nos quais pode interagir com a subunidade Rpb1 dessa polimerase e fatores de alongamento da transcrição (LOYER; TREMBLEY, 2020; TREMBLEY et al., 2002). Nesses complexos, sua função é de regular, por fosforilações, a associação de CDK8/ciclina C ao complexo *Mediator*, o qual regula a transcrição (DROGAT et al., 2012). Interessantemente, NtCDKG;2 interage com as subunidades NtRBP4, NtRBP7 e o domínio CTD da subunidade

NtRPB1 da RNAPII em *N. tabacum*, o que a coloca no contexto da transcrição (FERREIRA, 2016).

Adicionalmente, a isoforma CDK11^{p110} participa do *splicing* através de sua associação aos fatores gerais RNPS1 e 9G8, os quais são proteínas SR (HU et al., 2003; LOYER et al., 1998). Além disso, 9G8 é alvo direto de fosforilação de CDK11^{p110} (HU et al., 2003). Em *A. thaliana*, o homólogo do fator 9G8 é RSZ21 (GOLOVKIN; REDDY, 1998), o qual interage com CDKG;2 (VAN LEENE et al., 2010). Complementarmente, a interação de NtCDKG;2 com NtRSZ21 também foi identificada em *N. tabacum* (THOMÉ, 2016). Ademais, a função de CDK11^{p110} no *splicing* é dependente de sua interação com ciclinas L (CyclL) *in vitro* e *in vivo* (LOYER et al., 2008). Em *N. tabacum*, foi identificada a interação entre as proteínas NtCDKG;2 e NtCyclL (FERREIRA, 2016). Além disso, a interação de AtCDKG;2 e AtCyclL1 também ocorre em *A. thaliana*, e sua participação no *splicing* já foi demonstrada nessa espécie (CAVALLARI et al., 2018; MA et al., 2015; NIBAU et al., 2020b). Dessa forma, é possível estabelecer mais uma conexão entre a CDKG;2 de plantas e CDK11^{p110}. Essas similaridades, junto da presença dos dipeptídeos RS (Figura 22), reforçam o envolvimento dessas CDKs no *splicing*.

Outra isoforma de CDK11 em *H. sapiens* é a CDK11^{p58}, produzida por tradução alternativa através de um sítio interno de entrada para o ribossomo (IRES) no mRNA de *CDK11* (Figura 22; LOYER; TREMBLEY, 2020). Como resultado dessa tradução alternativa, a isoforma CDK11^{p58} possui apenas a porção C-terminal contendo o domínio quinase (CORNELIS et al., 2000). Como mencionado anteriormente, Lubini (2016) detectou um sítio IRES na sequência codificadora de NtCDKG;2 (Figura 22), que seria capaz de produzir uma proteína de cerca de 45 kDa, também contendo apenas o domínio C-terminal. Em *A. thaliana* não foram detectados sítios IRES no mRNA de *CDKG;2* (dados não apresentados).

É interessante ressaltar que a síntese da isoforma CDK11^{p58} ocorre apenas nas fases G2/M do ciclo celular (CORNELIS et al., 2000). Esse foi o primeiro exemplo de controle traducional de proteínas reguladoras do ciclo celular, diferente dos mecanismos clássicos de regulação no nível transcricional ou pós-traducional. A isoforma CDK11^{p58} possui diferentes funções durante o ciclo celular, participando da maturação dos centrossomos e formação do fuso mitótico, assim como da regulação da coesão de cromátides-irmãs, evitando a sua separação prematura (HU et al., 2007;

PETRETTI et al., 2006). Durante a mitose, essa isoforma está presente nos polos do fuso mitótico, através de sua associação aos microtúbulos, e tem papel importante regulando a nucleação de microtúbulos durante a formação do fuso (YOKOYAMA et al., 2008).

Interessantemente, Thomé (2019) mostrou que, em *N. tabacum*, NtCDKG;2 se co-localiza com α -tubulinas em um padrão que lembra o fuso mitótico. Ademais, essa autora também demonstrou que NtCDKG;2 interage com Nt β -tubulina6, sugerindo a participação dessa CDK na mitose. Uma análise da dinâmica da proteína GFP-NtCDKG;2, nas diferentes fases do ciclo celular de células BY-2, mostrou que essa CDK apresenta padrões de localização intrinsecamente dependentes da fase do ciclo em que as células se encontram (LUBINI, 2016). Nessas células, durante a metáfase e anáfase, GFP-NtCDKG;2 pode ser visualizada em associação ao fuso mitótico, de maneira difusa (LUBINI, 2016). Esse mesmo padrão foi observado em anáfases de células epidérmicas foliares (FERREIRA, 2016). É importante ressaltar que, em *A. thaliana*, essa relação entre CDKG;2 e o fuso mitótico ainda não foi identificada.

Adicionalmente, em *H. sapiens* foi constatado que a auto-fosforilação da isoforma CDK11^{p58} é essencial para a sua ativação e resulta em sua dimerização (CHI et al., 2011). Curiosamente, foi identificada, por duplo-híbrido em leveduras, a homodimerização de isoformas maiores NtCDKG;2, indicando a possibilidade de sua auto-fosforilação (FERREIRA, 2016). Dessa forma, é interessante investigar se esse fenômeno se repete com a isoforma de cerca de 45 kDa de NtCDKG;2, possivelmente gerada por tradução alternativa. Outro passo importante na caracterização de NtCDKG;2 durante o ciclo celular será determinar se apenas uma isoforma participa desse processo, ou se ambas as formas, completa (76 kDa) e a de 45 kDa, têm funções similares.

Ainda em *H. sapiens*, as isoformas CDK11^{p46} e CDK11^{p60} correspondem às porções C-terminal e N-terminal, respectivamente, resultantes da clivagem proteolítica da isoforma CDK11^{p110} por caspases (Figura 22 - (FENG et al., 2005; MIKOLAJCZYK; NELSON, 2004; TANG; GURURAJAN; KIDD, 1998). A isoforma CDK11^{p46} é capaz de induzir apoptose quando expressa de forma ectópica em cultura de células humanas (MIKOLAJCZYK; NELSON, 2004). Por sua vez, a isoforma CDK11^{p60} é transportada para as mitocôndrias, em um processo que libera citocromos c e leva à ativação da caspase-3, principal caspase que cliva as isoformas maiores de CDK11, formando um

ciclo de *feedback* pró-apoptótico (FENG et al., 2005). Em contraste, a putativa isoforma de NtCDKG;2 de cerca de 33kDa, produzida por sua clivagem, em folhas, corresponderia à porção N-terminal da proteína (Figura 22), e não foi detectada sua possível isoforma complementar, como ocorre para CDK11^{p46} e CDK11^{p60}. É importante ressaltar que, em *H. sapiens*, a produção da isoforma CDK11^{p46} não elimina a presença da isoforma maior, CDK11^{p110} (MIKOLAJCZYK; NELSON, 2004). Dessa forma, a ausência de NtCDKG;2 completa em extrato de folhas não é explicada somente pela clivagem que produziria a isoforma de 33 kDa. É possível que, em folhas, além da clivagem ocorra degradação pelo proteassomo mediada por PEST, como sugerido no item 4.1.3 (p. 122). Com base nestes resultados, é possível propor que pelo menos alguns dos mecanismos de regulação pós-traducional da CDK11 de *H. sapiens* são conservados em NtCDKG;2, sua homóloga em *N. tabacum*.

Em uma análise mais refinada do domínio quinase dessas proteínas, o programa CD-Search (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004) foi capaz de identificar nas três sequências o domínio STKc_CDC2L1 (ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cd07843). Comparando as sequências desse domínio entre as três espécies, todas compartilham 195 aminoácidos idênticos nessa região (Figura 23). Como pode ser visto, a maioria dos resíduos que compõe as diferentes características desse domínio é bastante conservada. Na curva de ativação (*T-loop*), por exemplo, dos 23 aminoácidos importantes para essa função em CDK11, 17 são conservados entre as três CDKs (Figura 23). Ainda mais importante, é que a Treonina na posição 583 (T583) de CDK11 presente na curva de ativação, e fosforilada para ativar essa CDK em *H. sapiens* (LAROCHELLE et al., 2006), é conservada em AtCDKG;2 e NtCDKG;2 (Figura 23, seta vermelha). Esse resultado é importante pois significa que, quando em sua estrutura tridimensional, essas proteínas podem ser dobradas de forma similar, o que reforça sua homologia ao menos no que diz respeito à função de quinase.

Figura 23. Conservação do domínio quinase de NtCDKG;2, CDK11 e AtCDKG;2.

O domínio quinase STKc_CDC2L1 é conservado entre as três sequências representadas. Em preto: aminoácidos idênticos nas três sequências; Em cinza: aminoácidos conservados em pares de sequências; Linhas coloridas: indicam as posições das características importantes do domínio; Círculos: representam resíduos que contribuem para a função das características. Seta vermelha: indica a Treonina conservada no *T-loop* (curva de ativação). Fonte: Autoria própria.

Em suma, os resultados das análises *in silico* de NtCDKG;2, CDK11 e AtCDKG;2 permitem fazer as seguintes afirmações: i) essas CDKs são conservadas ao longo da evolução; ii) a presença de elementos regulatórios em comum fortalece sua homologia funcional; iii) a presença de interações conservadas entre as proteínas homólogas, encontradas nas três espécies, contribui para essa hipótese. Dessa forma, espera-se que resultados encontrados para uma CDK sejam norteadores para as outras, dadas as diferenças entre os organismos.

4.1.5 A NtCDKF;1 interage com o domínio quinase de NtCDKG;2, sugerindo que seja sua ativadora

Como mencionado no item anterior (4.1.3), no domínio quinase das CDKs existe uma curva de ativação, ou *T-loop*, na qual a fosforilação de um resíduo de Treonina (T) é indispensável para a ativação da quinase (CHI et al., 2011). Das três isoformas putativas de NtCDKG;2, as duas maiores (76 e 45 kDa) possuem o domínio

quinase. Como foi sugerido no item acima, é possível que de forma análoga à CDK11^{p58}, NtCDKG;2 possa se auto-fosforilar para que ocorra a sua ativação. Entretanto, assim como ocorre para CDK11^{p110} em *H. sapiens*, é possível que essa ativação dependa de uma Quinase Ativadora de CDKs (CAK – *CDK-Activating Kinase*). Em *H. sapiens* a CDK11 pode ser ativada, via fosforilação do *T-loop*, pela CAK CDK7 (LAROCHELLE et al., 2006). Interessantemente, Csaba Koncz afirmou que, em *A. thaliana*, a CAK CDKF;1 pode ativar AtCDKG;2 via fosforilação de seu *T-loop* (comunicação pessoal)¹.

Em trabalhos prévios, foi identificada, em *N. tabacum*, a interação entre NtCDKG;2 e NtCDKF;1, através de um *screening* de duplo-híbrido em leveduras (Y2H) em busca de proteínas parceiras de interação de NtCDKG;2 (LUBINI, 2016). A NtCDKF;1 é homóloga de CDKF;1 de *A. thaliana*, descrita como uma quinase importante para a progressão do ciclo celular (UMEDA; SHIMOTOHNO; YAMAGUCHI, 2005), bem como para a regulação da transcrição (HAJHEIDARI et al., 2012). Complementarmente, a interação entre essas CDKs de *N. tabacum* foi confirmada por ensaios de Y2H quantitativo (THOMÉ, 2016) e por BiFC (FERREIRA, 2016).

Dessa forma, para melhor caracterizar a interação de NtCDKG;2 e NtCDKF;1 de *N. tabacum*, foram produzidas duas proteínas recombinantes de NtCDKG;2: uma sem o domínio de quinase e outra sem o domínio RS, chamadas aqui de Δ QUINASE e Δ RS, respectivamente. Essas proteínas recombinantes foram, então, utilizadas para realizar testes de interação, por Y2H, com NtCDKF;1. Os resultados desse experimento mostram que a interação de NtCDKF;1 ocorre exclusivamente com o domínio quinase de NtCDKG;2 (Figura 24).

¹ KONCZ, C. **About Hu Zhoubo's Thesis**. Destinatário: Pedro Boscariol Ferreira. [Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil]. 11 de abril, 2019. 4 mensagens eletrônicas.

Figura 24. Ensaio de duplo-híbrido em leveduras, mostrando que NtCDKF;1 interage com o domínio quinase NtCDKG;2.

Crescimento de colônias de leveduras em meio seletivo SD -LWH, para avaliar as interações. NtCDKG;2: versão completa da proteína; ΔQUINASE: proteína NtCDKG;2 sem o domínio quinase; ΔRS: proteína NtCDKG;2 sem sua porção N-terminal. DBD: Indica a proteína fusionada ao Domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4; AD: Indica a proteína ligada ao domínio de ativação do fator de transcrição GAL4; vetor vazio = o vetor expressando apenas o AD foi usado como controle negativo. Na legenda, Dipeptídeos RS: indica a posição dos dipeptídeos RS, os quais podem permitir a interação com proteínas SR; N-terminal = o domínio amino-terminal da proteína; C-terminal: porção carboxi-terminal da proteína. Fonte: Autoria própria.

Com base nesse resultado, é possível propor que, assim como ocorre em *A. thaliana*, NtCDKF;1 pode ser uma quinase ativadora de NtCDKG;2 em *N. tabacum*. Essa proposta se baseia no fato que o domínio quinase, presente na proteína NtCDKG;2ΔRS, contém o *T-loop*, com a Treonina conservada tanto na CDKG;2 de *A. thaliana* quanto na CDK11 de *H. sapiens*. Dessa forma, é importante considerar que, em experimentos para estudar a função de NtCDKG;2, sua co-expressão com essa quinase ativadora pode ser necessária. Além disso, a clonagem das duas metades de NtCDKG;2 é mais uma ferramenta para determinar a natureza das interações com essa CDK, descritas previamente (FERREIRA, 2016; LUBINI, 2016; THOMÉ, 2016). Visto que a interação das parceiras com apenas uma das metades de NtCDKG;2 pode indicar a função de cada complexo.

4.1.6 A evolução dos genes de CDKGs em plantas

Como mencionado anteriormente, existem quatro genes que codificam CDKGs em *N. tabacum*, e dois em *A. thaliana* (FERREIRA, 2016). Em *N. tabacum*, esse número se explica por sua alotetraploidia, evento recorrente no gênero *Nicotiana* (LEITCH et al., 2008). Já, em *A. thaliana*, a presença de duas CDKGs pode ser explicada pelo fato de que *AtCDKG;1* ser um retrogene, possivelmente duplicado de *AtCDKG;2* (NIBAU et al., 2020a). Considerando esses fatos, é interessante analisar a história evolutiva das CDKGs na filogenia de plantas. Os resultados desse tipo de análise são importantes, pois permitem inferir a conservação funcional dos genes, uma vez que genes amplamente e altamente expressos são conservados, enquanto genes mais espécie-específicos e menos expressos sofrem taxas mais rápidas de mutações (DAVIDSON et al 2012).

Com a publicação e atualização de genomas de diversas espécies de plantas, é possível avaliar melhor a evolução de genes. Dessa forma, é interessante utilizar esse recurso e, com uma análise filogenética, atualizar a compreensão das relações evolutivas entre as CDKGs de plantas. Para isso, sequências de CDKGs foram recuperadas de espécies com ampla distribuição na filogenia das plantas. A seguir, as espécies escolhidas serão brevemente descritas, e sua utilização justificada.

4.1.6.1 Justificativas das escolhas de espécies

A espécie *Chlamydomonas reinhardtii* é uma alga unicelular da divisão Chlorophyta, que divergiu do grupo Streptophyta (carófitas + plantas terrestres) há mais de um bilhão de anos (LELIAERT; VERBRUGGEN; ZECHMAN, 2011; MOCZYDŁOWSKA et al., 2011). Muitos genes encontrados no gênero *Chlamydomonas* podem ser associados a ancestrais comuns às plantas e aos animais (MERCHANT et al., 2007). Como exemplo, *Chlamydomonas* e Angiospermas compartilham genes da via de fotossíntese (MERCHANT et al., 2007). Em contraponto, espécies do gênero *Chlamydomonas* possuem genes em comum com animais, como os genes codificadores de proteínas do flagelo, ausentes em

Angiospermas (MERCHANT et al., 2007). Dessa forma, essa espécie pode ser utilizada para verificar o quão profunda é a origem de determinados genes de plantas. Já a espécie *Klebsormidium nitens* é uma alga multicelular da divisão Charophyta, que provavelmente é próximo do ancestral comum das plantas terrestres (OHTAKA et al., 2017). Uma evidência dessa proximidade é que algas carófitas apresentam respostas primitivas ao fitormônio auxina (OHTAKA et al., 2017).

Foram também escolhidas duas espécies de briófitas: a hepática *Marchantia polymorpha* e o musgo *Physcomitrella patens* (SCHAEFER; ZRÝD, 2001; SHIMAMURA, 2016). Dentre as plantas terrestres, as briófitas são consideradas a linhagem evolutivamente mais antiga (LINDE et al., 2020; SHIMAMURA, 2016), o que as torna interessantes para explorar a diversidade e universalidade de fenômenos biológicos do ponto de vista evolutivo. Curiosamente, em ambas as espécies, mecanismos primitivos de sinalização mediada por auxina também são encontrados (KATO et al., 2015). Esses mecanismos são mais complexos que os presentes em carófitas e possuem elementos conservados em Angiospermas (KATO et al., 2015; OHTAKA et al., 2017).

A espécie *Selaginella moellendorffii* é uma traqueófito da divisão Lycopphyta e representa o grupo mais antigo das plantas terrestres com sistemas vasculares (BANKS et al., 2011). O grupo das licófitas apresenta características compartilhadas com as briófitas (geração gametofítica independente, esporos haplóides gerados no esporófito) e com as Angiospermas (geração esporofítica dominante, células lignificadas) (BANKS et al., 2011; FERRARI et al., 2020). Além disso, licófitas são o grupo de plantas mais antigo que apresentam, além de vasculatura, órgãos especializados, como as folhas, o caule, e raízes (FERRARI et al., 2020). Portanto, essa espécie possui uma posição filogenética interessante para avaliar a conservação de sistemas genéticos.

Outra espécie escolhida foi *Amborella trichopoda*, que é considerada parte do grupo-irmão de todas as Angiospermas (ALBERT et al., 2013; SOLTIS et al., 2008). Essa espécie vem sendo estudada principalmente para responder duas principais perguntas: i) como surgiu a flor em Angiospermas? (FLORES-TORNERO et al., 2019, 2020; FOGLIANI et al., 2017); e ii) como se explicam os eventos de poliploidização que influenciam a diversidade das Angiospermas? (ALBERT et al., 2013; SCARPINO; LEVIN; MEYERS, 2014). Dessa forma, é interessante utilizar essa espécie, pois ela

permite identificar possíveis genes que possibilitaram o desenvolvimento das flores nas Angiospermas.

Dentro do grupo das Angiospermas, foram escolhidas seis espécies, sendo que três são monocotiledôneas e três, incluindo *N. tabacum*, são dicotiledôneas. Das monocotiledôneas, foi escolhida a espécie *Zostera marina*, da família Zosteraceae, e as espécies *Oryza sativa* e *Sorghum bicolor* da família Poaceae. A espécie *Z. marina* é particularmente interessante, pois se trata de uma Angiosperma marinha, a qual é estudada para compreender a plasticidade e adaptações genômicas que a permitem se desenvolver nesse *habitat* (OLSEN et al., 2016). Já *O. sativa* e *S. bicolor*, arroz e sorgo, respectivamente, são gramíneas-modelo em estudos genéticos de monocotiledôneas e, apesar de serem da mesma família, possuem divergência evolutiva estimada em 50-70 milhões de anos (PATERSON; BOWERS; CHAPMAN, 2004). Segundo Paterson, Bowers e Chapman (2004), ambas espécies surgiram de um mesmo evento de poliploidização ancestral e são interessantes para estudar o processo de diploidização, visto que é observada perda diferencial de genes homeólogos entre essas espécies.

Já as eudicotiledôneas escolhidas foram *N. tabacum* (família Solanaceae), *A. thaliana* (família Brassicaceae) e *Populus trichocarpa* (família Salicaceae). A divergência entre Solanaceae (*N. tabacum*) e Brassicaceae (*A. thaliana*) ocorreu há cerca de 112-156 milhões de anos atrás (WANG et al., 2008; YANG et al., 1999). Já a divergência entre Brassicaceae (*A. thaliana*) e Salicaceae (*P. trichocarpa*) ocorreu há cerca de 100-120 milhões de anos atrás (KROM; RAMAKRISHNA, 2008). Esses dados indicam que a separação entre os grupos que originaram as três espécies ocorreu próximo à diversificação das Angiospermas (VINCENTZ et al., 2004). Resumidamente, *A. thaliana* é uma espécie de aproximadamente 38 milhões de anos, cujo ancestral era teraplóide (ERMOLAEVA et al., 2003). Desde então, essa planta sofreu eventos de diploidização, evidentes no seu genoma hoje, o qual possui poucos genes duplicados se comparada a tetraplóides recentes (PANCHY; LEHTI-SHIU; SHIU, 2016; SIERRO et al., 2014). Por outro lado, *N. tabacum* é uma planta alotetraplóide recente, de aproximadamente 200 mil anos, que apresenta um alto número de genes duplicados (SIERRO et al., 2014). Já no caso de *P. trichocarpa*, apesar de ser uma espécie antiga (8 a 13 milhões de anos; STERCK et al., 2005), resultante de um evento de duplicação genômica, essa espécie reteve muitos de seus

genes duplicados (RODGERS-MELNICK et al., 2012), em comparação com *A. thaliana*. Segundo Tuskan et al. (2006), esses grupos de genes duplicados em *P. trichocarpa* foram mantidos devido à sua importância específica no desenvolvimento dessa espécie arbórea, como é o caso de genes associados à biossíntese da parede lignocelulósica, por exemplo.

4.1.6.2 As CDKGs são um grupo conservado em plantas

Para construir a árvore filogenética de CDKGs, foram utilizadas como “iscas” as sequências de AtCDKG;1, AtCDKG;2 e NtCDKG;2 em buscas de similaridade com o programa *BLASTP* (CAMACHO et al., 2009). Essa busca foi realizada em um banco de dados construído com as sequências de aminoácidos de todas as espécies escolhidas (descrito no item 2.12, p. 61). A seguir, com base no resultado dessa busca, foram removidas sequências duplicadas (com 100% de identidade) com o programa *skipredundant* (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000). Adicionalmente, foram removidas sequências pequenas, com tamanho menor que 75% (459 aminoácidos) do tamanho de AtCDKG;1, a menor CDK analisada. Esse passo é importante para remover sequências parciais, as quais não representam isoformas completas de CDKGs. Com o conjunto de sequências resultante, foi realizado um alinhamento múltiplo no programa MAFFT (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2017). A seguir, a partir desse alinhamento, foi realizada uma análise manual para remover sequências parciais ou isoformas de uma mesma proteína, dando preferência para sequências representando a proteína completa. Após esse refinamento das sequências, o alinhamento foi repetido com o grupo final, o qual totaliza 22 sequências de CDKGs de plantas. Com esses dados, foi possível construir uma árvore de máxima verossimilhança das CDKGs, com o programa *PhyML3.0* (GUINDON et al., 2010). É importante mencionar que os nomes dados às sequências na árvore não são anotações dos bancos de dados consultados. Os nomes foram dados de acordo com as posições das sequências na árvore filogenética. O sufixo “like” foi adicionado aos nomes para evitar afirmações equivocadas. Para sequências de *A. thaliana*, foram utilizados os nomes segundo descrição no banco de dados ThaleMine. O nome

NtCDKG;2 foi utilizado para a proteína em estudo no laboratório em que o presente trabalho foi desenvolvido (marcado com quadrado preto na Figura 25A).

Como é possível observar na árvore obtida (Figura 25A), a organização das CDKGs acompanha, geralmente, a filogenia do reino das plantas (Figura 25B, com base na filogenia de Chen et al., 2018). A principal informação desse resultado é que a presença de CDKGs em carófitas e clorófitas indica uma origem ancestral no reino das plantas (Figura 25). O grupo “CDKG-SBL” (Figura 25A, em verde), faz referência às CDKGs de espécies das divisões Streptophyta, Bryophyta e Lycophyta. Esse grupo contém proteínas de relação próxima às CDKGs já descritas (AtCDKG;1, AtCDKG;2 e NtCDKG;2), e se agrupam em uma posição “ancestral” em relação a elas. Membros desse grupo incluem: uma sequência de *M. polymorpha* (Mp), duas sequências de *P. patens* (Pp), duas sequências de *S. moelendorffii* (Sm) e uma sequência de *K. nitens* (Kn). É interessante notar que a presença de duas sequências em *P. patens* e *S. moelendorffii* é explicada por suas histórias evolutivas. Em *P. patens*, um evento de duplicação genômica explica a presença de genes duplicados (LANG et al., 2018). Já *S. moelendorffii* não apresenta indícios de duplicação genômica (BANKS et al., 2011), porém alguns grupos de genes duplicados são observados (FERRARI et al., 2020; GRAMZOW et al., 2012).

Figura 25. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de CDKGs em diferentes espécies de plantas.

A - Espécies utilizadas: *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Populus trichocarpa* (Pt), *Oryza sativa* subsp. *japonica* (Os), *Sorghum bicolor* (Sb), *Zostera marina* (Zm), *Amborella trichopoda* (Am), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Physcomitrella patens* (Pp), *Marcantia polymorpha* (Mp), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), e *Klebsormidium nitens* (Kn). Os números de acesso das sequências estão na Tabela 9. Verde claro: espécies basais na filogenia de plantas. Roxo: sequência de *A. trichopoda*, grupo-irmão das CDKGs de Angiospermas. Vermelho: CDKGs de monocotiledôneas. Rosa: CDKGs encontradas em dicotiledôneas. Círculos vermelhos: nós da árvore com baixa sustentação (menor que 0,7); Escala: número de substituições de aminoácidos (0,5 = 5 substituições). Quadrado preto: indica a NtCDKG;2 estudada no laboratório. Árvore construída com o programa *PhyML3.0* com base em alinhamento no programa *MAFFT*. **B** - representação simplificada da filogenia do reino Plantae de Chen et al. (2018); Monocot.: monocotiledôneas; Eudicot.: eudicotiledôneas. Fonte: Autoria própria.

O posicionamento da sequência AmCDKG-like, de *A. trichopoda* como grupo-irmão das CDKGs de Angiospermas é idêntico ao posicionamento dessa espécie na filogenia das plantas (Figura 25, em roxo; CHEN, F. et al., 2018). Assim como os posicionamentos das espécies do grupo “CDKG-SBL”, esse resultado mostra que a evolução de CDKGs acompanha quase perfeitamente à evolução das plantas verdes. Entre as Angiospermas, podemos novamente afirmar que as sequências de CDKGs se dividem de acordo com a história evolutiva das espécies (CHEN, F. et al., 2018). No grupo ‘CDKG-mono’ estão: uma sequência de *Z. marina* (Zm), duas sequências de *O. sativa* (Os) e duas sequências de *S. bicolor* (Sb), todas monocotiledôneas (Figura 25A, em vermelho). Como mencionado anteriormente, *O. sativa* e *S. bicolor* possuem um ancestral comum, porém evoluíram de forma independente há mais de 50 milhões de anos (PATERSON; BOWERS; CHAPMAN, 2004). De acordo com a árvore aqui apresentada, é possível afirmar que ambas as espécies mantiveram o par de homeólogos de CDKGs que possuem, o que pode indicar a importância desses genes nessas espécies.

No grupo formado por CDKGs de eudicotiledôneas, existem: quatro sequências de *N. tabacum* (Nt), uma sequência de *P. trichocarpa* (Pt) e duas sequências de *A. thaliana* (At). Nesse grupo, aqui denominado ‘CDKG-dico’, representado em rosa na Figura 25A, algumas informações importantes são observadas. Como mencionado anteriormente, a presença de quatro sequências similares de CDKGs em *N. tabacum* é explicada por sua alotetraploidia recente (SIERRO et al., 2014), e seus genomas parentais *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis* (SIERRO et al., 2013) possuem, cada um, dois genes que codificam CDKGs (FERREIRA, 2016). Novamente, esses números são explicados pelos eventos de duplicação genômica na história evolutiva do gênero *Nicotiana* (CLARKSON et al., 2005; LEITCH et al., 2008). Já em *P. trichocarpa*, chama a atenção o fato de que apenas uma sequência se agrupa com as CDKG;2 de *N. tabacum* e *A. thaliana*, enquanto outras duas ficam em uma posição externa à árvore (Figura 25A). Essa separação pode ser explicada pelo fato de que a análise não foi capaz de posicionar com sucesso essas sequências na árvore, porém elas correspondem a proteínas do tipo CDKG. Sua aparente exclusão também pode ser devido ao fato de, assim como AtCDKG;1, essas sequências apresentam diferenças em relação às outras CDKGs, o que dificulta seu posicionamento na árvore, mas justifica sua proximidade com AtCDKG;1. Essa diferença é identificada por uma

inserção de seis aminoácidos no domínio quinase das sequências de *P. trichocarpa*, ausentes nas outras sequências. Além disso, essa inserção se alinha com uma inserção de quatro aminoácidos na mesma região da sequência de AtCDKG;1 (Figura E. 1 no APÊNDICE E). Interessantemente, *P. trichocarpa* é originária de um evento de poliploidização que ocorreu há mais de 8 milhões de anos (STERCK et al., 2005; TUSKAN et al., 2006), e Rodgers-Melnick et al. (2012) propõem que a preservação de genes duplicados nessa espécie ocorra por uma combinação dos processos de subfuncionalização e de seleção purificadora de genes codificando proteínas com muitas parceiras de interação, o que pode explicar as diferenças encontradas em suas sequências (influência da subfuncionalização).

Finalmente, na análise filogenética de CDKGs, a sequência pertencente à espécie *C. reinhardtii*, CrCDKG-like, se agrupou com AtCDKG;1, e não se agrupou na posição equivalente na filogenia de plantas, o que era esperado (Figura 25). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que tanto AtCDKG;1 quanto CrCDKG-like estão entre as sequências mais divergentes entre as utilizadas nessa análise, como acontece com as supracitadas sequências de *P. trichocarpa* (Figura E. 1 no APÊNDICE E). Dessa forma, a “ancestralidade” registrada na sequência CrCDKG-like foi interpretada na análise da mesma forma que as particularidades das sequências AtCDKG;1, e de PtCDKG;1-like1 e PtCDKG;1-like2 (Figura E. 1 no APÊNDICE E).

Nesse ponto, é importante reiterar que a presença de duas CDKGs, em *A. thaliana*, ocorre devido ao fato de *AtCDKG;1* ser um retrogene (NIBAU et al., 2020a). Portanto, nessa espécie, *AtCDKG;1* é codificada por apenas um éxon (HUANG et al., 2013), enquanto *AtCDKG;2* é codificada por 6 éxons (MA et al., 2015). Dessa forma, é interessante investigar quantos éxons compõe a sequência codificadora das CDKGs analisadas, para identificar se a retroduplicação é recorrente nessa família de CDKs. Com essa finalidade, foram feitas consultas aos bancos de dados NCBI e Phytozome.

Com essa análise, foi possível determinar que todos os genes codificando CDKGs em *N. tabacum* possuem seis éxons, e o mesmo se observa em *P. trichocarpa* (Tabela 9, Figura E. 2 no APÊNDICE E). Em monocotiledôneas (*O. sativa* e *S. bicolor*), proteínas CDKG são codificadas por sete éxons, enquanto *Z. marina* possui oito éxons (Tabela 9). Na licófito *S. moelendorffii*, as sequências também possuem seis éxons (Tabela 9). A única CDKG presente em *A. trichopoda* possui nove éxons, característica que compartilha com *K. nitens* e *C. reinhardtii* (Tabela 9). Curiosamente,

ambos os genes de CDKGs de *P. patens* possuem apenas um éxon (Tabela 9), o que pode ser reflexo de duplicação de retrogenes, com perda do gene parental. Esse mecanismo ocorre, por exemplo, nas espécies dos metazoários *Ciona intestinalis* e *Ciona savignyi* (KIM et al.,2014). Dessa forma, é uma evidência da recorrência de retroduplicação de genes *CDKG*, que ocorre de maneira independente em *A. thaliana* e *P. patens*.

Tabela 9. Descrição das sequências de CDKGs apresentadas na árvore da Figura 25. **Id. Na Árvore:** nome da sequência apresentado na árvore filogenética. **Núm. Acesso:** número de acesso da sequência no banco de dados NCBI ou Phytozome (phytozome-next.jgi.doe.gov). **Núm. aa:** comprimento da sequência, em aminoácidos. **Motivos RS:** número de dipeptídeos RS na porção N-terminal da sequência de aminoácidos. **PEST N-terminal:** resultado da análise em busca de peptídeos PEST na região N-terminal da sequência, só estão reportados peptídeos com escore acima de 5,0. **Éxons na CDS:** número de éxons que contribuem para a sequência codificadora (CDS) da proteína, segundo os bancos de dados NCBI e Phytozome.

ID na Árvore	Núm. Acesso	Espécie	Grupo na Árvore	Núm. aa	Motivos RS	PEST N-terminal	Éxons na CDS
KnCDKG-like	GAQ90625.1	<i>Klebsormidium nitens</i>	CDKG-SBL	858	5	4	9
MpCDKG-like	PTQ26968.1	<i>Marchantia polymorpha</i>		984	10	3	3
PpCDKG-like1	XP_024363927.1	<i>Physcomitrella patens</i>		950	10	3	1
PpCDKG-like2	XP_024388340.1			909	8	2	1
SmCDKG-like1	XP_024521556.1	<i>Selaginella moelendorffii</i>		510	4	1	6
SmCDKG-like2	XP_024524866.1			510	4	1	6
AmCDKG-like	XP_020523001.1	<i>Amborella trichopoda</i>		751	2	2	9
ZmCDKG-like	Zosma7g00120	<i>Zostera marina</i>	CDKG-mono	713	5	1	8
OsCDKG;2-like1	XP_015635720.1	<i>Oryza sativa</i>		710	7	3	7
OsCDKG;2-like2	XP_015625437.1			693	8	1	7
SbCDKG;2-like1	XP_021317919.1	<i>Sorghum bicolor</i>		692	6	3	7
SbCDKG;2-like2	XP_002452405.1			675	9	2	7
AtCDKG;1	AT5G63370.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>		CDKG-dico	612	4	0
AtCDKG;2	AT1G67580.1		752		6	2	6
NtCDKG;2	XP_016508954.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	669		5	1	6
NtCDKG;2-2	XP_016498534.1		669		4	1	6

ID na Árvore	Núm. Acesso	Espécie	Grupo na Árvore	Núm. aa	Motivos RS	PEST N-terminal	Éxons na CDS
NtCDKG;2-like1	XP_016482370.1			746	9	3	6
NtCDKG;2-like2	XP_016501762.1			747	7	3	6
PtCDKG;2	XP_024463263.1	<i>Populus trichocarpa</i>		750	4	3	6
PtCDKG-like2	XP_024442417.1	<i>Populus trichocarpa</i>		720	5	1	6
PtCDKG-like1	XP_024438267.1			686	2	1	6
CrCDKG-like	PNW81423.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		670	3	2	9

Fonte: Autoria própria.

Outra característica interessante que deve ser apontada é a presença dos dipeptídeos RS na porção N-terminal (precedendo o domínio quinase) das sequências de CDKGs (Tabela 9, Figura E. 3 no APÊNDICE E). Todas as sequências analisadas possuem esses dipeptídeos em seu N-terminal, em quantidades variáveis (Tabela 9). Esse resultado é importante pois, em *A. thaliana*, por exemplo, as CDKGs são as únicas CDKs com essa característica. Como mencionado anteriormente, a presença de dipeptídeos RS é possivelmente o que permite a participação das CDKGs no *splicing*. Dessa forma, será interessante investigar, no futuro, se essa CDK conservada mantém seu papel no *splicing* nas outras espécies.

Finalmente, todas as 22 sequências foram submetidas ao programa *espeftind*, para verificar se a presença de peptídeos PEST também é uma característica de CDKGs. Todas as sequências analisadas, com exceção de AtCDKG;1 de *A. thaliana*, possuem peptídeos PEST com potencial relevância biológica (Tabela 9). Em todos os casos, esses peptídeos se localizam anteriores ao domínio quinase, na porção N-terminal. Consequentemente, é interessante propor que os mecanismos de regulação de CDKGs também podem ser conservados desde sua possível origem na história das plantas.

Em suma, esses dados permitem dizer que: i) A família CDKG em plantas tem origem no início da história evolutiva desse grupo; ii) O evento de retroduplicação que ocorreu em *A. thaliana* e gerou AtCDKG;1 parece ocorrer de forma isolada, e o mesmo

evento pode ter ocorrido independentemente em *P. patens*; iii) todas as proteínas CDKG possuem região N-terminal de tamanho variável, a qual possui dipeptídeos RS; iv) a presença de peptídeos PEST na porção N-terminal pode ser uma característica comum às CDKGs. Isto posto, a família de CDKGs é conservada durante a evolução de plantas, com potenciais funções no ciclo celular e *splicing*, e será interessante entender como suas funções se conservam, ou não, em espécies tão diversas.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho respondeu aos objetivos propostos e, portanto, contribui para a caracterização dos genes *SCI1* e *NtCDKG;2* de *N. tabacum*. Dessa forma, com os resultados obtidos, é possível concluir que:

1) O silenciamento de *SCI1* afeta a expressão gênica em estigmas/estiletes de *N. tabacum*;

2) Os genes afetados pelo silenciamento de *SCI1* indicam que:

- *SCI1* tem função específica no ciclo celular;
- Os genes do ciclo celular afetados pelo silenciamento são importantes nas fases S e G2 desse processo biológico;
- *SCI1* tem papel central na via de sinalização por auxinas;
- Os genes de desenvolvimento floral, diferencialmente expressos, fazem parte de processos nos quais *SCI1* pode participar, o que é corroborado pela expressão desse gene no meristema floral;
- *SCI1* pode estar envolvido em processamento de RNAs, incluindo o *splicing*;

3) O envolvimento de *SCI1* no *splicing* pode envolver a proteína SR NtSR30, e o silenciamento de *SCI1* indica controle direto do *splicing* alternativo do gene *NtSR30*;

4) O nível de expressão de *NtCDKG;2* afeta o tamanho das sementes.

5) *NtCDKG;2* tem isoformas expressas em padrões diferentes nos órgãos de *N. tabacum*.

5) As dificuldades em obter a proteína *NtCDKG;2* provavelmente são resultado de sua degradação no proteassomo, mediada por peptídeos PEST.

6) *NtCDKG;2* é homóloga de *AtCDKG;2* e *CDK11* de *H. sapiens*, e os resultados obtidos apontam para uma conservação funcional dessas CDKs.

7) As proteínas CDKGs estão presentes durante toda história evolutiva das plantas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 Sugestões referentes ao Capítulo I

Como evidenciado neste trabalho, o silenciamento de *SCI1* causa alterações na expressão gênica em *N. tabacum*. Os genes alterados nessas plantas reforçam as hipóteses de que *SCI1* atua no controle da proliferação celular durante o desenvolvimento da flor. Adicionalmente, foram encontrados mais indícios da participação de *SCI1* no metabolismo de RNAs. A seguir, possíveis perguntas biológicas e sugestões de como respondê-las são exploradas.

A) Em quais momentos do desenvolvimento floral o silenciamento de *SCI1* tem maior impacto na expressão gênica?

Com as respostas para essa pergunta, será possível determinar os mecanismos mais específicos do papel de *SCI1* durante esse processo. Para isso, é sugerido que sejam feitas análises da expressão de alguns dos genes diferencialmente expressos, aqui identificados, nos meristemas florais, bem como nos primórdios dos órgãos florais, de plantas silenciando *SCI1*, de plantas controle, e possivelmente de plantas de superexpressão de *SCI1*. Como o meristema floral é um tecido microscópico, pode ser conveniente a utilização da técnica de Microdissecção por Captura de Laser (LCM - Laser Capture Microdissection) (KERK et al., 2003). Convenientemente, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, à qual o Programa de Pós-Graduação em Genética pertence, existe o Laboratório Multiusuário de Microscopia de Microdissecção a Laser.

Com essa técnica, é possível recuperar secções específicas de tecidos, devidamente fixados para preservar os RNAs, os quais podem ser utilizados para experimentos de RT-qPCR. Essa técnica foi utilizada com sucesso para estudar meristemas florais em *A. thaliana* (LIU et al., 2011) e arroz (HARROP et al., 2016), por exemplo. Adicionalmente, também é possível realizar LCM-seq, que é a junção da técnica de microdissecção ao sequenciamento em larga escala por RNA-seq, que foi capaz de responder questões importantes relacionadas a meristemas em outras plantas, como a alface (CHEN, Z. et al., 2018).

B) Como *SCI1* se relaciona com o *splicing*?

Para responder a essa pergunta, é possível analisar se o silenciamento de *SCI1* tem efeitos no *splicing* de um gene repórter. Um experimento desse tipo, descrito em plantas, pode ser feito utilizando um repórter visual, que faz uso de GFP (Figura 26 - KANNO et al., 2020). Nesse método, uma construção gênica contendo um promotor mínimo do tipo TATA, precedido de um *enhancer* viral (EPRV), antes da sequência codificadora de GFP é utilizada para transformar plantas. Essa construção pode gerar 3 diferentes transcritos. Um deles não sofre *splicing*, e a presença de códons de terminação no “íntron” retido não permite a expressão de GFP (Figura 26A, “unspliced”). No outro, pode haver *splicing* de um “íntron” com sítios não-canônicos de *splicing* GU-AG, o que também impede a produção da GFP (Figura 26A, “GU-AG”). O último transcrito possível é produzido pelo *splicing* em sítios canônicos AU-AC, e permite a expressão da GFP (Figura 26A, “AU-AC”). Segundo Kanno et al. (2020), plantas controle transformadas com essa construção demonstram sinal baixo de GFP (Figura 26B, “T line”). Quando essa construção é utilizada para transformar plantas, nas quais genes que participam do *splicing* estão afetados, três principais fenótipos são possíveis: se o fenótipo for parecido com a planta controle (Figura 26B, “T-line”), não há provável alteração no *splicing*; se forem encontrados os fenótipos de baixa expressão de GFP (Figura 26B, “Weak”), ou de alta expressão de GFP (Figura 26B, “Hyper”), há indicação que o gene de interesse afeta o *splicing*. Como confirmação, além da observação da fluorescência, é feita a quantificação dos diferentes transcritos produzidos. Dessa forma, é possível avaliar se o gene em estudo afeta o *splicing* canônico, o não-canônico, ou o *splicing* em geral. É interessante apontar que o LBMP tem experiência com todos os procedimentos técnicos envolvidos no método proposto. Dessa forma, esse experimento pode auxiliar em avaliar se *SCI1* afeta o *splicing* em *N. tabacum*. O mesmo é sugerido para avaliar se *NtCDKG;2* participa do *splicing*.

Figura 26. Gene repórter para avaliar o *splicing* em plantas.

A – T-DNA construct: construção do gene repórter de GFP para analisar *splicing* em plantas; Transcripts detected: possíveis transcritos produzidos pelo gene repórter; “unspliced”: versão não-processada do transcrito; “GU-AG”: transcrito processado por *splicing* dos sítios não-canônicos; “AU-AC”: transcrito processado por *splicing* dos sítios canônicos. **B** – Fenótipos possíveis no experimento; “T line”: fenótipo encontrado na planta controle; “Weak”: fenótipo encontrado em plantas com problemas no *splicing* canônico; “Hyper”: fenótipo encontrado em plantas com *splicing* canônico aumentado. Fonte: Kanno et al. (2020).

C) Como o silenciamento de *SCI1* afeta o *splicing* alternativo de *NtSR30*?

Para responder a essa pergunta, é possível sugerir um experimento de PCR em alta resolução (SIMPSON et al., 2007). Nesse experimento, reações de RT-PCR são feitas para amplificar os fragmentos gerados por diferentes eventos de *splicing* alternativos de um gene. Para isso, *primers* flanqueando a região de interesse (onde ocorrem os eventos) são utilizados para amplificar fragmentos de 60-700 pb. Com isso, o primeiro passo é determinar o número de ciclos de PCR necessários para detectar diferenças na quantidade de cada fragmento (amplificação linear). Esse passo é importante pois, com mais ciclos de PCR, as quantidades de fragmentos amplificados começam a se equalizar (amplificação exponencial). Determinado o número de ciclos ideal para detectar os transcritos em amplificação linear, a reação de RT-PCR é refeita com o mesmo par de *primers*, porém um deles deve ser marcado com 6-carboxifluoresceína (6-FAM). Depois, uma fração dos produtos da reação de

PCR são submetidos a um sequenciamento de Sanger, que permite separar os fragmentos por tamanho, ao mesmo tempo que identificar suas sequências. Esses sequenciamentos são, então, analisados em um programa para análise de fragmentos/genótipos. Nessa análise, os picos de fluorescência correspondentes aos tamanhos de cada fragmento são observados, bem como a intensidade de fluorescência que cada fragmento gerou (quantidade). Com esse resultado, é possível calcular as razões entre cada fragmento na reação de RT-PCR e, portanto, a porcentagem de *splicing* que ocorre para o gene de estudo.

Com essa técnica, é possível comparar as razões de *splicing* para um determinado gene, em diferentes condições ou tratamentos, desde que sejam feitas réplicas técnicas e biológicas adequadas. Essa técnica já foi utilizada para avaliar e descobrir eventos de *splicing* alternativo em cevada (SIMPSON et al., 2019) e cana-de-açúcar (DANTAS et al., 2019). Além disso, o LBMP conta com uma técnica especializada em sequenciamento de Sanger, a Dra. Andréa Carla Quiapim, que poderá contribuir, com sua experiência, para a realização desse experimento. Encontrar os detalhes da regulação do *splicing* de *NtSR30* por SCI1 é um passo essencial para caracterizar as possíveis vias pelas quais SCI1 atua no *splicing*. Além disso, a caracterização das funções do gene *NtSR30* permitirá entender se seu *splicing* alternativo se conecta com o desenvolvimento floral em *N. tabacum*.

6.2 Sugestões referentes ao Capítulo II

Neste trabalho, foram caracterizados alguns aspectos de NtCDKG;2. Não obstante, ainda é necessário responder outras perguntas sobre essa CDK. A seguir, serão apresentadas algumas dessas perguntas, bem como sugestões de como respondê-las.

A) A presença de um peptídeo PEST é responsável pela degradação de NtCDKG;2?

Para responder essa pergunta, pode ser utilizado um dos métodos que Adachi, Uchimiya e Umeda (2006) empregaram para determinar a dependência de PEST para a degradação de CDKBs de *A. thaliana*. Esse método consistiria na fusão do peptídeo

PEST de NtCDKG;2 com uma proteína repórter, como a Beta-glucoronidase (GUS), resultando na construção PEST-GUS. Com isso, é possível comparar como se comporta essa proteína em relação a uma versão do repórter sem o peptídeo PEST, ou seja, apenas a expressão de GUS. Ambas as construções seriam utilizadas, então, para a transformação transiente de folhas. Feito isso, extratos de proteínas das folhas devem ser realizados em dois modos: i) extrato contendo o inibidor de proteassomos MG132; ii) extrato contendo DMSO como controle. Nesses extratos, pode ser quantificada e comparada a atividade de GUS e PEST-GUS nas duas condições, com um ensaio enzimático utilizando o substrato *4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide* (4-MUG). Além disso, é possível verificar a quantidade de proteínas nesses extratos através de *western blot* com um anticorpo comercial contra GUS. Caso encontradas diferenças entre PEST-GUS e GUS em sua resposta à presença do inibidor MG132, essa comparação pode validar a hipótese de que o peptídeo PEST é o responsável pela degradação de NtCDKG;2 em folhas. Essas respostas são importantes para estudar a função de NtCDKG;2, visto que sua expressão heteróloga em folhas é uma das ferramentas mais utilizadas para esse fim.

B) A NtCDKG;2 é uma quinase?

Durante o período de desenvolvimento desse trabalho, foram feitas tentativas para avaliar se NtCDKG;2 é uma quinase funcional (dados não apresentados). A maior dificuldade em realizar esse experimento consistiu na obtenção da proteína NtCDKG;2 em quantidades suficientes para tal. Como mencionado anteriormente, a expressão de NtCDKG;2 em *E. coli* demanda um protocolo que envolve desnaturação e redobramento da proteína. O resultado desse método produz pouca proteína, e o redobramento pode não ser efetivo. Além disso, tentativas de extrair e imunoprecipitar NtCDKG;2 de estigmas/estiletos não foram bem sucedidas (dados não apresentados). Ainda, a atividade de CDKs é geralmente dependente da presença de sua ciclina parceira de interação e de uma quinase ativadora. No caso de NtCDKG;2, essas proteínas podem ser NtCycL1;1 e NtCDKF;1, respectivamente. Felizmente, foi possível obter NtCycL1;1 e NtCDKF;1 por expressão heteróloga em *E. coli* (dados não mostrados) e essa é uma ferramenta útil para o futuro. Dessa forma, é preciso melhorar os parâmetros para que se obtenha NtCDKG;2 funcional, para que um ensaio de quinase seja realizado.

Como sugestão para esse problema, duas sugestões são dadas. A primeira consiste em utilizar um sistema de expressão heteróloga que permita a produção de NtCDKG;2 funcional, sem a necessidade de um protocolo que envolva redobramento. Esse objetivo pode ser atingido com a expressão em culturas de células de insetos, por exemplo. A segunda sugestão é verificar se, com as mutações no peptídeo PEST, sugeridas acima, é possível obter NtCDKG;2, em sua isoforma completa e funcional, a partir de tecidos vegetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-JAMOUS, Basel; KELLY, Steven. Clust: automatic extraction of optimal co-expressed gene clusters from gene expression data. **Genome Biology**, v. 19, n. 1, p. 172, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-018-1536-8>
- ADACHI, Sumiko; UCHIMIYA, Hirofumi; UMEDA, Masaaki. Expression of B2-type cyclin-dependent kinase is controlled by protein degradation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcl034>
- ADAMCZYK, Benjamin J.; LEHTI-SHIU, Melissa D.; FERNANDEZ, Donna E. The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 50, n. 6, p. 1007–1019, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03105.x>
- AGRAWAL, Rekha; JIŘÍ, Fajkus; THAKUR, Jitendra K. The kinase module of the Mediator complex: an important signalling processor for the development and survival of plants. **Journal of Experimental Botany**, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eraa439>
- AIDA, M.; ISHIDA, T.; TASAKA, M. Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. **Development**, v. 126, n. 8, p. 1563 LP – 1570, 1999
- ALBERT, V. A. et al. The Amborella Genome and the Evolution of Flowering Plants. **Science**, v. 342, n. 6165, p. 1241089–1241089, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1241089>
- ALI, G. S.; REDDY, A. S. N. Spatiotemporal organization of pre-mRNA *splicing* proteins in plants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-76776-3_6
- ALI, Gul Shad; PALUSA, Saiprasad G.; GOLOVKIN, Maxim; PRASAD, Jayendra; MANLEY, James L.; REDDY, Anireddy S. N. Regulation of plant developmental processes by a novel *splicing* factor. **PloS one**, v. 2, n. 5, p. e471, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000471>
- ALONI, Roni; ALONI, Erez; LANGHANS, Markus; ULLRICH, Cornelia I. Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. **Planta**, v. 223, n. 2, p. 315–328, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-005-0088-9>
- ALVAREZ-BUYLLA, Elena R. et al. **Flower Development**. The *Arabidopsis* Book, v. 8, n. 1, p. e0127, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0127>
- BIOSYSTEMS, Applied. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Gene Expression, [S. l.], v. 2009, p. 1–60, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-31107-9>
- ASHBURNER, Michael et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. **Nature Genetics**. NIH Public Access, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/75556>
- AUKERMAN, Milo J.; LEE, Ilha; WEIGEL, Detlef; AMASINO, Richard M. The *Arabidopsis* flowering-time gene LUMINIDEPENDENS is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates LEAFY

expression. **Plant Journal**, v. 18, n. 2, p. 195–203, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00442.x>

BALANZÀ, Vicente; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, Irene; FERRÁNDIZ, Cristina. Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 4, p. 1193–1203, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert482>

BALANZÀ, Vicente; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, Irene; SATO, Shusei; YANOFSKY, Martin F.; KAUFMANN, Kerstin; ANGENENT, Gerco C.; BEMER, Marian; FERRÁNDIZ, Cristina. Genetic control of meristem arrest and life span in Arabidopsis by a FRUITFULL-APETALA2 pathway. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03067-5>

BANKS, Jo Ann et al. The selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. **Science**, v. 332, n. 6032, p. 960–963, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203810>

BARNARD, Daron C.; LI, Jun; PENG, Rui; PATTON, James G. Regulation of alternative *splicing* by SRp86 through coactivation and repression of specific SR proteins. **RNA**, v. 8, n. 4, p. 526–533, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S1355838202029928>

BARTA, A.; KALYNA, M.; LORKOVIĆ, Z. J. Plant SR proteins and their functions. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 326, p. 83–102, 2008.

BARTA, Andrea; KALYNA, Maria; REDDY, Anireddy S. N. N. Implementing a Rational and Consistent Nomenclature for Serine/Arginine-Rich Protein *Splicing* Factors (SR Proteins) in Plants. **The Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 2926–2929, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.078352>

BECKER, Annette; ALIX, Karine; DAMERVAL, Catherine. The evolution of flower development: Current understanding and future challenges. **Annals of Botany**, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr122>

BEEMSTER, Gerrit T. S. et al. Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of Arabidopsis. **Plant Physiology**, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.053884>

BEMER, Marian; VAN MOURIK, Hilda; MUIÑO, Jose M.; FERRÁNDIZ, Cristina; KAUFMANN, Kerstin; ANGENENT, Gerco C. FRUITFULL controls SAUR10 expression and regulates Arabidopsis growth and architecture. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 13, p. 3391–3403, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erx184>

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

BENT, Andrew. Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. **Methods in molecular biology**, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59745-130-4:87>

BEYAERT, Rudi; KIDD, Vincent J.; CORNELIS, Sigrid; VAN DE CRAEN, Marc; DENECKER, Geertrui; LAHTI, Jill M.; GURURAJAN, Rajagopal; VANDENABEELE, Peter; FIERS, Walter. Cleavage of PITSLRE kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumor necrosis factor. **Journal of**

Biological Chemistry, v. 272, n. 18, p. 11694–11697, 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.18.11694>

BLAINEY, Paul; KRZYWINSKI, Martin; ALTMAN, Naomi. Points of significance: Replication. **Nature Methods**. Nature Publishing Group, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3091>

BODENHOFER, Ulrich; BONATESTA, Enrico; HOREJŠ-KAINRATH, Christoph; HOCHREITER, Sepp. msa: an R package for multiple sequence alignment. **Bioinformatics**, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv494>

BOMBARELY, Aureliano; EDWARDS, Kieron D.; SANCHEZ-TAMBURRINO, Juan; MUELLER, Lukas A. Deciphering the complex leaf transcriptome of the allotetraploid species *Nicotiana tabacum*: A phylogenomic perspective. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-406>

BORUC, Joanna; VAN DEN DAELE, Hilde; HOLLUNDER, Jens; ROMBAUTS, Stephane; MYLLE, Evelien; HILSON, Pierre; INZÉ, Dirk; DE VEYLDER, Lieven; RUSSINOVA, Eugenia. Functional Modules in the *Arabidopsis* Core Cell Cycle Binary Protein–Protein Interaction Network. **The Plant Cell**, v. 22, n. 4, p. 1264–1280, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.073635>

BOUVERET, Romaric; SCHÖNROCK, Nicole; GRUISSEM, Wilhelm; HENNIG, Lars. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* MSI1. **Development**, v. 133, n. 9, p. 1693–1702, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02340>

BULLARD, James H.; PURDOM, Elizabeth; HANSEN, Kasper D.; DUDOIT, Sandrine. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 11, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-94>

BRASIL, Juliana Nogueira; MONTEIRO COSTA, Carinne N.; CABRAL, Luiz Mors; FERREIRA, Paulo C. G.; HEMERLY, Adriana S. The plant cell cycle: Pre-replication complex formation and controls. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 276–291, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0118>

BREYNE, Peter et al. Transcriptome analysis during cell division in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 23, p. 14825–14830, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.222561199>

BROWN, John W. S.; SHAW, Peter J. Small nucleolar RNAs and pre-rRNA processing in plants. **Plant Cell**, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.10.5.649>

BUNNELL, B. A.; HEATH, L. S.; ADAMS, D. E.; LAHTI, J. M.; KIDD, V. J. Increased expression of a 58-kDa protein kinase leads to changes in the CHO cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 19, p. 7467–7471, 1990. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.19.7467>

BÖGRE, László; MAGYAR, Zoltán; LÓPEZ-JUEZ, Enrique. New clues to organ size control in plants. **Genome Biology**. BioMed Central, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2008-9-7-226>

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

CAILLAUD, Marie-Cécile Cécile et al. Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6757, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006757>

CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; MA, Ning; PAPADOPOULOS, Jason; BEALER, Kevin; MADDEN, Thomas L. BLAST+: Architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

CANDIANO, Giovanni; BRUSCHI, Maurizio; MUSANTE, Luca; SANTUCCI, Laura; GHIGGERI, Gian Marco; CARNEMOLLA, Barbara; ORECCHIA, Paola; ZARDI, Luciano; RIGHETTI, Pier Giorgio. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, [S. l.], v. 25, n. 9, p. 1327–1333, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200305844>

CARBON, S. et al. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D330–D338, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1055>

CARVALHO, Sofia D.; CHATTERJEE, Mithu; COLEMAN, Lauren; CLANCY, Maureen A.; FOLTA, Kevin M. Analysis of Block of cell proliferation 1 (BOP1) activity in strawberry and Arabidopsis. **Plant Science**, v. 245, p. 84–93, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.01.002>

CAVALLARI, Nicola; NIBAU, Candida; FUCHS, Armin; DADAROU, Despoina; BARTA, Andrea; DOONAN, John H. The cyclin-dependent kinase G group defines a thermo-sensitive alternative *splicing* circuit modulating the expression of Arabidopsis ATU2AF65A. **Plant Journal**, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13914>

CHANG, Wenwen; GUO, Yinghui; ZHANG, Hao; LIU, Xigang; GUO, Lin. Same Actor in Different Stages: Genes in Shoot Apical Meristem Maintenance and Floral Meristem Determinacy in Arabidopsis. **Frontiers in Ecology and Evolution** Frontiers Media S.A., 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2020.00089>

CHEN, Fei; DONG, Wei; ZHANG, Jiawei; GUO, Xinyue; CHEN, Junhao; WANG, Zhengjia; LIN, Zhenguo; TANG, Haibao; ZHANG, Liangsheng. The Sequenced Angiosperm Genomes and Genome Databases. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 418, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.00418>

CHEN, Zijing et al. LCM-seq reveals the crucial role of LsSOC1 in heat-promoted bolting of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **The Plant Journal**, v. 95, n. 3, p. 516–528, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13968>

CHENG, Chia Yi; KRISHNAKUMAR, Vivek; CHAN, Agnes P.; THIBAUD-NISSEN, Françoise; SCHOBEL, Seth; TOWN, Christopher D. Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. **Plant Journal**, v. 89, n. 4, p. 789–804, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13415>

CHENG, Yan et al. Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes upregulates the E2F pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 75, n. 4, p. 642–655, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12228>

CHENG, Youfa; ZHAO, Yunde. A Role for Auxin in Flower Development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 1, p. 99–104, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00412.x>

CHI, Yayun et al. Thr-370 is responsible for CDK11p58 autophosphorylation, dimerization, and kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 1748–1757, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.107367>

CHUNG, Yuhee et al. Auxin Response Factors promote organogenesis by chromatin-mediated repression of the pluripotency gene SHOOTMERISTEMLESS. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08861-3>

CIOMBOROWSKA, J.; ROSIKIEWICZ, W.; SZKLARCZYK, D.; MAKALOWSKI, W.; MAKALOWSKA, I. “Orphan” Retrogenes in the Human Genome. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 2, p. 384–396, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss235>

CLARKSON, James J.; LIM, K. Yoong; KOVARIK, Ales; CHASE, Mark W.; KNAPP, Sandra; LEITCH, Andrew R. Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). **New Phytologist**, v. 168, n. 1, p. 241–252, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01480.x>

COOK, Gemma S. et al. Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 7, p. 2093–2106, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert066>

CORDIN, Olivier; BEGGS, Jean D. RNA helicases in *splicing*. **RNA Biology**, v. 10, n. 1, p. 83–95, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/rna.22547>

CORNELIS, Sigrid; BRUYNOOGHE, Yanik; DENECKER, Geertrui; VAN HUFFEL, Sofie; TINTON, Sandrine; BEYAERT, Rudi. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. **Molecular Cell**, v. 5, n. 4, p. 597–605, 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80239-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80239-7)

CROSS, Frederick R.; BUCHLER, Nicolas E.; SKOTHEIM, Jan M. Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. Royal Society, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0078>

CRUZ, Joelma de Oliveira. **A expressão de *SCI1* e sua regulação transcricional no meristema floral de *Nicotiana tabacum***. 2018. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/D.17.2019.tde-29102018-153741>

DANTAS, Luíza L. B.; CALIXTO, Cristiane P. G.; DOURADO, Maira M.; CARNEIRO, Monalisa S.; BROWN, John W. S.; HOTTA, Carlos T. Alternative *Splicing* of Circadian Clock Genes Correlates With Temperature in Field-Grown Sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01614>

DARGEVICIUTE, Ausra; ROUX, Camille; DECREUX, Annabelle; SITBON, Folke; PERROT-RECHENMANN, Catherine. Molecular cloning and expression of the early auxin-responsive Aux/IAA gene family in *Nicotiana tabacum*. **Plant and Cell Physiology**, v. 39, n. 10, p. 993–1002, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029311>

DAS, Pradeep; ITO, Toshiro; WELLMER, Frank; VERNOUX, Teva; DEDIEU, Annick; TRAAS, Jan; MEYEROWITZ, Elliot M. Floral stem cell termination involves the direct regulation of AGAMOUS by PERIANTHIA. **Development**, v. 136, n. 10, p. 1605–1611, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.035436>

DAVIDSON, Rebecca M.; GOWDA, Malali; MOGHE, Gaurav; LIN, Haining; VAILLANCOURT, Brieanne; SHIU, Shin-Han; JIANG, Ning; ROBIN BUELL, C. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. **The Plant Journal**, v. 71, n. 3, p. no-no, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05005.x>

DAY, Irene S.; GOLOVKIN, Maxim; PALUSA, Saiprasad G.; LINK, Alicia; ALI, Gul S.; THOMAS, Julie; RICHARDSON, Dale N.; REDDY, Anireddy S. N. Interactions of SR45, an SR-like protein, with spliceosomal proteins and an intronic sequence: insights into regulated *splicing*. **The Plant Journal**, v. 71, n. 6, p. 936–947, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05042.x>

DE FOLTER, Stefan; IMMINK, Richard G. H. Yeast Protein–Protein Interaction Assays and Screens. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). [s.l.] : Methods Mol Biol, 2011. v. 754p. 145–165. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-154-3_8

DE SCHUTTER, K. et al. Arabidopsis WEE1 Kinase Controls Cell Cycle Arrest in Response to Activation of the DNA Integrity Checkpoint. **Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 211–225, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.045047>

DE VEYLDER, Lieven; BEECKMAN, Tom; INZÉ, Dirk. The ins and outs of the plant cell cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 8, p. 655–665, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2227>

DENAY, Grégoire; CHAHTANE, Hicham; TICHTINSKY, Gabrielle; PARCY, François. A flower is born: an update on Arabidopsis floral meristem formation. **Current Opinion in Plant Biology** Elsevier Ltd, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2016.09.003>

DEPAOLI, Henrique C.; BRITO, Michael S.; QUIAPIM, Andréa C.; TEIXEIRA, Simone P.; GOLDMAN, Gustavo H.; DORNELAS, Marcelo C.; GOLDMAN, Maria Helena S. Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development. **New Phytologist**, v. 190, n. 4, p. 882–895, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03660.x>

DEPAOLI, Henrique Cestari; DORNELAS, Marcelo Carnier; GOLDMAN, Maria Helena S. SCI1 is a component of the auxin-dependent control of cell proliferation in Arabidopsis upper pistil. **Plant Science**, v. 229, p. 122–130, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.003>

DEPAOLI, Henrique; GOLDMAN, Gustavo; GOLDMAN, Maria-Helena. SCI1, the first member of the tissue-specific inhibitors of CDK (TIC) class, is probably connected to the auxin signaling pathway. **Plant Signaling & Behavior**, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/psb.7.1.18525>

DEWITTE, Walter; RIOU-KHAMLICHI, Catherine; SCOFIELD, Simon; HEALY, J. M. Sandr.; JACQMARD, Annie; KILBY, Nigel J.; MURRAY, James A. H. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. **Plant Cell**, v. 15, n. 1, p. 79–92, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.004838>

DING, Lizhong; RATH, Ethan; BAI, Yongsheng. Comparison of Alternative *Splicing* Junction Detection Tools Using RNASeq Data. **Current Genomics**, v. 18, n. 3, p. 268–277, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1389202918666170215125048>

DOTTO, Marcela; GÓMEZ, María Sol; SOTO, María Soledad; CASATI, Paula. UV-B radiation delays flowering time through changes in the PRC2 complex activity and

miR156 levels in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, cell & environment**, v. 41, n. 6, p. 1394–1406, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/pce.13166>

DROGAT, Julie; MIGEOT, Valérie; MOMMAERTS, Elise; MULLIER, Caroline; DIEU, Marc; VAN BAKEL, Harm; HERMAND, Damien. Cdk11-CyclinL Controls the Assembly of the RNA Polymerase II Mediator Complex. **Cell Reports**, v. 2, n. 5, p. 1068–1076, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.027>

DUQUE, Paula. A role for SR proteins in plant stress responses. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 1, p. 49–54, 2011.

DURBAK, Amanda R.; TAX, Frans E. CLAVATA signaling pathway receptors of *Arabidopsis* regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems. **Genetics**, v. 189, n. 1, p. 177–194, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.130930>

EDWARDS, K. D. et al. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 448, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3791-6>

ELLIS, Christine M.; NAGPAL, Punita; YOUNG, Jeffery C.; HAGEN, Gretchen; GUILFOYLE, Thomas J.; REED, Jason W. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 132, n. 20, p. 4563–4574, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02012>

ELVIRA-MATELOT, Emilie; BARDOU, Florian; ARIEL, Federico; JAUVION, Vincent; BOUTEILLER, Nathalie; LE MASSON, Ivan; CAO, Jun; CRESPI, Martin D.; VAUCHERETA, Hervé. The nuclear ribonucleoprotein SmD1 interplays with *splicing*, RNA quality control, and posttranscriptional gene silencing in *Arabidopsis* open. **Plant Cell**, v. 28, n. 2, p. 426–438, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.15.01045>

ERMOLAEVA, Maria D.; WU, Martin; EISEN, Jonathan A.; SALZBERG, Steven L. The age of the *Arabidopsis thaliana* genome duplication. **Plant Molecular Biology**, v. 51, n. 6, p. 859–866, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1023001130337>

EVERAERT, Celine; LUYPAERT, Manuel; MAAG, Jesper L. V.; CHENG, Quek Xiu; DINGER, Marcel E.; HELLEMANS, Jan; MESTDAGH, Pieter. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01617-3>

FENG, Guanyao; SANDERSON, Brian J.; KEEFOVER-RING, Ken; LIU, Jianquan; MA, Tao; YIN, Tongming; SMART, Lawrence B.; DIFAZIO, Stephen P.; OLSON, Matthew S. Pathways to sex determination in plants: how many roads lead to Rome? **Current Opinion in Plant Biology**, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2020.01.004>

FENG, Yongmei; ARIZA, Maria E.; GOULET, Anne Christine; SHI, Jiaqi; NELSON, Mark A. Death-signal-induced relocalization of cyclin-dependent kinase 11 to mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 392, n. 1, p. 65–73, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20050195>

FERRARI, Camilla et al. Expression atlas of *selaginella moellendorffii* provides insights into the evolution of vasculature, secondary metabolism, and roots. **Plant Cell**, v. 32, n. 4, p. 853–870, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/TPC.19.00780>

FERREIRA, Pedro Boscardiol. **A identificação de parceiros de interação de NtCDKG;2 revela suas possíveis funções biológicas em *Nicotiana tabacum***. 2016. Universidade de São Paulo, 2016. <https://repositorio.usp.br/item/002891869>

FERREIRA, Pedro Boscardiol. **Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína quinase, NtCDKG;2, de *Nicotiana tabacum***. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.

FERRÁNDIZ, Cristina; GU, Qing; MARTIENSSEN, Robert; YANOFSKY, Martin F. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. **Development**, v. 127, n. 4, p. 725–734, 2000.

FLORES-TORNERO, María; PROOST, Sebastian; MUTWIL, Marek; SCUTT, Charles P.; DRESSELHAUS, Thomas; SPRUNCK, Stefanie. Transcriptomics of manually isolated *Amborella trichopoda* egg apparatus cells. **Plant Reproduction**, v. 32, n. 1, p. 15–27, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00497-019-00361-0>

FLORES-TORNERO, María; VOGLER, Frank; MUTWIL, Marek; POTĚŠIL, David; IHNATOVÁ, Ivana; ZDRÁHAL, Zbyněk; SPRUNCK, Stefanie; DRESSELHAUS, Thomas. Transcriptomic and Proteomic Insights into *Amborella trichopoda* Male Gametophyte Functions. **Plant Physiology**, v. 184, n. 4, p. pp.00837.2020, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.20.00837>

FOGLIANI, Bruno; GÂTEBLÉ, Gildas; VILLEGENTE, Matthieu; FABRE, Isabelle; KLEIN, Nicolas; ANGER, Nicolas; BASKIN, Carol C.; SCUTT, Charlie P. The morphophysiological dormancy in *Amborella trichopoda* seeds is a plesiomorphic trait in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 119, n. 4, p. mcw244, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcw244>

FRANCIS, Dennis. The plant cell cycle - 15 Years on. **New Phytologist**, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02038.x>

FÜLÖP, Katalin et al. Arabidopsis anaphase-promoting complexes: Multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. **Cell Cycle**, v. 4, n. 8, p. 4084–4092, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/cc.4.8.1856>

GALBIATI, Francesca et al. An integrative model of the control of ovule primordia formation. **Plant Journal**, v. 76, n. 3, p. 446–455, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12309>

GARCÍA-ORTEGA, Luis Fernando; MARTÍNEZ, Octavio. How many genes are expressed in a transcriptome? Estimation and results for RNA-Seq. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130262, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130262>

GASSER, C. S. Molecular studies on the differentiation of floral organs. **Plant Mol Biol**, v. 42, p. 621–649, 1991.

GEBHARDT, Christiane. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 12, p. 2281–2294, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>

GENSCHIK, Pascal; CRIQUI, Marie Claire; PARMENTIER, Yves; DEREVIER, Aude; FLECK, Jacqueline. Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the

destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. **Plant Cell**, v. 10, n. 12, p. 2063–2075, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.10.12.2063>

GLOVER, Natasha M.; REDESTIG, Henning; DESSIMOZ, Christophe. Homoeologs: What Are They and How Do We Infer Them? **Trends in Plant Science** Elsevier Ltd, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.02.005>

GOETZ, Marc; VIVIAN-SMITH, Adam; JOHNSON, Susan D.; KOLTUNOW, Anna M. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 18, n. 8, p. 1873–1886, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.037192>

GOLISZ, Anna; SIKORSKI, Pawel J.; KRUSZKA, Katarzyna; KUFEL, Joanna. Arabidopsis thaliana LSM proteins function in mRNA *splicing* and degradation. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 12, p. 6232–6249, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt296>

GOLOVKIN, Maxim; REDDY, Anireddy S. N. N. The plant U1 small nuclear ribonucleoprotein particle 70K protein interacts with two novel serine/arginine-rich proteins. **The Plant cell**, v. 10, n. 10, p. 1637–1648, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.10.10.1637>

GRAMZOW, Lydia; BARKER, Elizabeth; SCHULZ, Christian; AMBROSE, Barbara; ASHTON, Neil; THEISSEN, Günter; LITT, Amy. Selaginella Genome Analysis – Entering the “Homoplasy Heaven” of the MADS World. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. SEP, p. 214, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00214>

GRAY, William M.; KEPINSKI, Stefan; ROUSE, Dean; LEYSER, Ottoline; ESTELLE, Mark. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 271–276, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/35104500>

GRIGG, Stephen P.; CANALES, Claudia; HAY, Angela; TSIANTIS, Miltos. SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in Arabidopsis. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1022–1026, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04052>

GU, Q.; FERRANDIZ, C.; YANOFSKY, M. F.; MARTIENSSEN, R. The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. **Development**, v. 125, n. 8, p. 1509–1517, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.1.1.37>

GUINDON, Stéphane; DUFAYARD, Jean Franois; LEFORT, Vincent; ANISIMOVA, Maria; HORDIJK, Wim; GASCUEL, Olivier. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

GUO, Hongxiang; LI, Fuxin; WANG, Shaoxin; LI, Sumin; XIAO, Wanfu; LIU, Weiqun. Enhanced Protein Extraction from Tobacco Roots for Proteomic Analysis. **Analytical Letters**, v. 48, n. 1, p. 16–24, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2014.930871>

GUO, Wenbin; TZIOUTZIOU, Nikoleta; STEPHEN, Gordon; MILNE, Iain; CALIXTO, Cristiane; WAUGH, Robbie; BROWN, John; ZHANG, Runxuan. 3D RNA-seq - a powerful and flexible tool for rapid and accurate differential expression and alternative

splicing analysis of RNA-seq data for biologists. **bioRxiv**, p. 656686, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/656686>

GUTIERREZ, Crisanto. 25 Years of Cell Cycle Research: What's Ahead? **Trends in Plant Science** Elsevier Ltd, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.007>

HAJHEIDARI, Mohsen; FARRONA, Sara; HUETTEL, Bruno; KONCZ, Zsuzsa; KONCZ, Csaba. CDKF;1 and CDKD Protein Kinases Regulate Phosphorylation of Serine Residues in the C-Terminal Domain of Arabidopsis RNA Polymerase II. **The Plant Cell**, v. 24, n. 4, p. 1626–1642, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.096834>

HAN, Yao Yao; MA, Yan Qin; LI, Dian Zhen; YAO, Jing Wen; XU, Zi Qin. Characterization and phylogenetic analysis of fifteen NtabSPL genes in *Nicotiana tabacum* L. cv. Qinyan95. **Development Genes and Evolution**, v. 226, n. 1, p. 1–14, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-015-0522-3>

HAN, Yingying; ZHANG, Cui; YANG, Haibian; JIAO, Yuling. Cytokinin pathway mediates APETALA1 function in the establishment of determinate floral meristems in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 18, p. 6840–6845, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1318532111>

HARASHIMA, Hirofumi; DISSMEYER, Nico; SCHNITTGER, Arp. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**. Elsevier, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>

HARASHIMA, Hirofumi; KATO, Ko; SHINMYO, Atsuhiko; SEKINE, Masami. Auxin is required for the assembly of A-type cyclin-dependent kinase complexes in tobacco cell suspension culture. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 9, p. 1103–1112, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.005>

HARROP, Thomas W. R.; UD DIN, Israr; GREGIS, Veronica; OSNATO, Michela; JOUANNIC, Stefan; ADAM, Hélène; KATER, Martin M. Gene expression profiling of reproductive meristem types in early rice inflorescences by laser microdissection. **The Plant Journal**, v. 86, n. 1, p. 75–88, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13147>

HARTMANN, Lisa; WIESSNER, Theresa; WACHTER, Andreas. Subcellular compartmentation of alternatively spliced transcripts defines SERINE/ARGININE-RICH PROTEIN30 expression. **Plant Physiology**, v. 176, n. 4, p. 2886–2903, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.17.01260>

HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZE, D. cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. **Plant Cell**, v. 5, n. 12, p. 1711–1723, 1993. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.5.12.1711>

HEMPEL, F. D.; WEIGEL, D.; MANDEL, M. A.; DITTA, G.; ZAMBRYSKI, P. C.; FELDMAN, L. J.; YANOFSKY, M. F. Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. **Development**, v. 124, n. 19, p. 3845 LP – 3853, 1997.

HENRIKSSON, Eva; OLSSON, Anna S. B.; JOHANNESSON, Henrik; JOHANSSON, Henrik; HANSON, Johannes; ENGSTRÖM, Peter; SÖDERMAN, Eva. Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships *Plant Physiology*. **Plant Physiol**, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.063461>

HERRIDGE, Rowan P.; DAY, Robert C.; BALDWIN, Samantha; MACKNIGHT, Richard C. Rapid analysis of seed size in *Arabidopsis* for mutant and QTL discovery. **Plant Methods**, v. 7, n. 1, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-7-3>

HOFFMANN, Matthias H. Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh.(Brassicaceae). **Journal of Biogeography**, v. 29, n. 1, p. 125–134, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00647.x>

HU, Dongli; MAYEDA, Akila; TREMBLEY, Janeen H.; LAHTI, Jill M.; KIDD, Vincent J. CDK11 complexes promote pre-mRNA *splicing*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8623–8629, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210057200>

HU, Dongli; VALENTINE, Marcus; KIDD, Vincent J.; LAHTI, Jill M. CDK11p58 is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 14, p. 2424–2434, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.007963>

HU, Guanjing; GROVER, Corrinne E.; ARICK, Mark A.; LIU, Meiling; PETERSON, Daniel G.; WENDEL, Jonathan F. Homoeologous gene expression and co-expression network analyses and evolutionary inference in allopolyploids. **Briefings in Bioinformatics**, v. 2020, n. 00, p. 1–17, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbaa035>

HUANG, X. Y.; NIU, J.; SUN, M. X.; ZHU, J.; GAO, J. F.; YANG, J.; ZHOU, Q.; YANG, Z. N. CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1 Is Associated with the Spliceosome to Regulate CALLOSE SYNTHASE5 *Splicing* and Pollen Wall Formation in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 25, n. 2, p. 637–648, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.107896>

HUANG, Yingqun; STEITZ, Joan A. SRprises along a Messenger's Journey. **Molecular Cell**, v. 17, n. 5, p. 613–615, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.020>

INZÉ, Dirk; DE VEYLDER, Lieven. Cell Cycle Regulation in Plant Development. **Annual Review of Genetics**, v. 40, n. 1, p. 77–105, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>

JENIK, P. D.; IRISH, V. F. Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during *Arabidopsis* floral development. **Development**, v. 127, n. 6, p. 1267 LP – 1276, 2000.

JEONG, Sunjoo. SR proteins: Binders, regulators, and connectors of RNA. **Molecules and Cells**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2017.2319>

JEYAKUMAR, John Martin Jerome; ALI, Asif; WANG, Wen Ming; THIRUVENGADAM, Muthu. Characterizing the role of the miR156-SPL network in plant development and stress response. **Plants**, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants9091206>

JONES, Philip et al. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>

JUNG, Jae Hoon; LEE, Hyo Jun; RYU, Jae Yong; PARK, Chung Mo. SPL3/4/5 Integrate Developmental Aging and Photoperiodic Signals into the FT-FD Module in *Arabidopsis* Flowering. **Molecular Plant**, v. 9, n. 12, p. 1647–1659, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.10.014>

KALYNA, M.; BARTA, A. A plethora of plant serine/arginine-rich proteins: redundancy or evolution of novel gene functions? **Biochemical Society Transactions**, v. 32, n. 4, p. 561–564, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BST0320561>

KANNO, Tatsuo; LIN, Wen Dar; CHANG, Chia Liang; MATZKE, Marjori; MATZKE, Antonius J. M. A genetic screen identifies PRP18a, a putative second step *splicing* factor important for alternative *splicing* and a normal phenotype in *Arabidopsis thaliana*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 4, p. 1367–1377, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1534/g3.118.200022>

KANNO, Tatsuo; VENHUIZEN, Peter; WU, Ming Tsung; CHIOU, Phebe; CHANG, Chia Liang; KALYNA, Maria; MATZKE, Antonius J. M.; MATZKE, Marjori. A collection of pre-mRNA *splicing* mutants in *Arabidopsis thaliana*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 6, p. 1983–1996, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1534/g3.119.400998>

KANRAR, Siddhartha; ONGUKA, Ouma; SMITH, Harley M. S. *Arabidopsis* inflorescence architecture requires the activities of KNOX-BELL homeodomain heterodimers. **Planta**, v. 224, n. 5, p. 1163–1173, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-006-0298-9>

KAPUSTIN, Yuri; SOUVOROV, Alexander; TATUSOVA, Tatiana; LIPMAN, David. Splign: Algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. *Biology Direct*, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 20, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6150-3-20>

KATO, Hirotaka; ISHIZAKI, Kimitsune; KOUNO, Masaru; SHIRAKAWA, Makoto; BOWMAN, John L.; NISHIHAMA, Ryuichi; KOHCHI, Takayuki. Auxin-Mediated Transcriptional System with a Minimal Set of Components Is Critical for Morphogenesis through the Life Cycle in *Marchantia polymorpha*. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 5, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005084>

KATOH, Kazutaka; ROZEWICKI, John; YAMADA, Kazunori D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbx108>

KAWAMURA, Kazue; MURRAY, James A. H.; SHINMYO, Atsuhiko; SEKINE, Masami. Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. **Plant Molecular Biology**, v. 61, n. 1–2, p. 311–327, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-006-0014-y>

KERK, Nancy M.; CESERANI, Teresa; LORRAINE TAUSTA, S.; SUSSEX, Ian M.; NELSON, Timothy M. Laser capture microdissection of cells from plant tissues. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 27–35, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.018127>

KEVEI, Zoltán; BALOBAN, Mikhail; DA INES, Olivier; TIRICZ, Hilda; KROLL, Alexandra; REGULSKI, Krzysztof; MERGAERT, Peter; KONDOROSI, Eva. Conserved CDC20 cell cycle functions are carried out by two of the five isoforms in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020618>

KOLTUNOW, A. M.; TRUETTNER, J.; COX, K. H.; WALLROTH, M.; GOLDBERG, R. B. Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. **The Plant Cell**, v. 2, n. 12, p. 1201–1224, 1990. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.2.12.1201>

KOMAKI, Shinichiro; SCHNITTGER, Arp. The Spindle Assembly Checkpoint in Arabidopsis Is Rapidly Shut Off during Severe Stress. **Developmental Cell**, v. 43, n. 2, p. 172–185.e5, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.017>

KOROLEVA, O. A.; CALDER, G.; PENDLE, A. F.; KIM, S. H.; LEWANDOWSKA, D.; SIMPSON, C. G.; JONES, I. M.; BROWN, J. W. S.; SHAWA, P. J. Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: Fast relocation to nucleolus and *splicing* speckles under hypoxia. **Plant Cell**, v. 21, n. 5, p. 1592–1606, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.060434>

KRIZEK, Beth A. AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6 act redundantly to regulate arabidopsis floral growth and patterning. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 1916–1929, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.141119>

KRIZEK, Beth A.; BLAKLEY, Ivory C.; HO, Yen-Yi; FREESE, Nowlan; LORAINE, Ann E. The Arabidopsis transcription factor AINTEGUMENTA orchestrates patterning genes and auxin signaling in the establishment of floral growth and form. **The Plant Journal**, v. 103, n. 2, p. 752–768, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.14769>

KRIZEK, Beth A.; EADDY, Marcie. AINTEGUMENTA-LIKE6 regulates cellular differentiation in flowers. **Plant Molecular Biology**, v. 78, n. 3, p. 199–209, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-011-9844-3>

KROM, Nicholas; RAMAKRISHNA, Wusirika. Comparative analysis of divergent and convergent gene pairs and their expression patterns in rice, arabidopsis, and populus. **Plant Physiology**, v. 147, n. 4, p. 1763–1773, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.122416>

LANG, Daniel et al. The Physcomitrella patens chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. **Plant Journal**, v. 93, n. 3, p. 515–533, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13801>

LANGE, Heike et al. The RNA Helicases AtMTR4 and HEN2 Target Specific Subsets of Nuclear Transcripts for Degradation by the Nuclear Exosome in Arabidopsis thaliana. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 8, p. e1004564, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004564>

LANGE, Heike; SEMENT, François M.; GAGLIARDI, Dominique. MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 68, n. 1, p. 51–63, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04675.x>

LAROCHELLE, Stéphane; BATLINER, Jasmin; GAMBLE, Matthew J.; BARBOZA, Nora M.; KRAYBILL, Brian C.; BLETHROW, Justin D.; SHOKAT, Kevan M.; FISHER, Robert P. Dichotomous but stringent substrate selection by the dual-function Cdk7 complex revealed by chemical genetics. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 55–62, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1028>

LAZAR, Gabor; SCHAAL, Thomas; MANIATIS, Tom; GOODMAN, Howard M. Identification of a plant serine-arginine-rich protein similar to the mammalian *splicing* factor SF2/ASF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7672–7676, 1995. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.17.7672>

LEE, Byung Ha; JEON, Jae Og; LEE, Myeong Min; KIM, Jeong Hoe. Genetic interaction between GROWTHREGULATING FACTOR and CUP-SHAPED

COTYLEDON in organ separation. **Plant Signaling and Behavior**, v. 10, n. 2, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/15592324.2014.988071>

LEE, Jae Wook. RNA sequencing of the nephron transcriptome: a technical note. **Kidney research and clinical practice**, v. 34, n. 4, p. 219–27, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.krcp.2015.08.008>

LEITCH, I. J.; HANSON, L.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; CHASE, M. W.; CLARKSON, J. J.; LEITCH, A. R. **The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of Nicotiana (Solanaceae)**. In: ANNALS OF BOTANY 2008, Oxford Academic, 2008. p. 805–814. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm326>

LELIAERT, Frederik; VERBRUGGEN, Heroen; ZECHMAN, Frederick W. Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny. **BioEssays**, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201100035>

LENHARD, Michael; BOHNERT, Andrea; JÜRGENS, Gerd; LAUX, Thomas. Termination of Stem Cell Maintenance in Arabidopsis Floral Meristems by Interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. **Cell**, v. 105, n. 6, p. 805–814, 2001. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00390-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00390-7)

LI, Jun; HAWKINS, Ian C.; HARVEY, Christopher D.; JENNINGS, Jennifer L.; LINK, Andrew J.; PATTON, James G. Regulation of Alternative *Splicing* by SRp86 and Its Interacting Proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 21, p. 7437–7447, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.23.21.7437-7447.2003>

LI, Shengjun et al. SMA1, a homolog of the *splicing* factor Prp28, has a multifaceted role in miRNA biogenesis in Arabidopsis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 17, p. 9148–9159, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky591>

LI, Wuxing; ZHOU, Yun; LIU, Xing; YU, Peng; COHEN, Jerry D.; MEYEROWITZ, Elliot M. LEAFY controls auxin response pathways in floral primordium formation. **Science Signaling**, v. 6, n. 270, p. ra23, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2003937>

LI, Xiaoyu et al. Ectopic expression of the transcription factor CUC2 restricts growth by cell cycle inhibition in Arabidopsis leaves. **Plant Signaling and Behavior**, v. 15, n. 1, p. 1706024, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15592324.2019.1706024>

LINDE, Anna-Malin; SAWANGPROH, Weerachon; CRONBERG, Nils; SZÖVÉNYI, Péter; LAGERCRANTZ, Ulf. Evolutionary History of the Marchantia polymorpha Complex. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 829, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00829>

LIU, Chang; THONG, Zhonghui; YU, Hao. Coming into bloom: The specification of floral meristems. **Development**, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.033076>

LIU, Ruijie et al. Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 15, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv412>

LIU, Xigang et al. *AUXIN RESPONSE FACTOR 3* integrates the functions of *AGAMOUS* and *APETALA2* in floral meristem determinacy. **The Plant Journal**, v. 80, n. 4, p. 629–641, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12658>

LIU, Xigang; KIM, Yun Ju; MÜLLER, Ralf; YUMUL, Rae Eden; LIU, Chunyan; PAN, Yanyun; CAO, Xiaofeng; GOODRICH, Justin; CHEN, Xuemei. AGAMOUS Terminates Floral Stem Cell Maintenance in Arabidopsis by Directly Repressing WUSCHEL

through Recruitment of Polycomb Group Proteins. **The Plant Cell**, v. 23, n. 10, p. 3654–3670, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.091538>

LIU, Yen Chi; CHENG, Soo Chen. Functional roles of DExD/H-box RNA helicases in Pre-mRNA *splicing*. **Journal of Biomedical Science** BioMed Central Ltd., 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-015-0161-z>

LIU, Zhenning; MIAO, Liming; HUO, Ruxue; SONG, Xiaoya; JOHNSON, Cameron; KONG, Lijun; SUNDARESAN, Venkatesan; YU, Xiaolin. ARF2-ARF4 and ARF5 are Essential for Female and Male Gametophyte Development in Arabidopsis. **Plant & cell physiology**, v. 59, n. 1, p. 179–189, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcx174>

LOBBES, Dajana; RALLAPALLI, Ghanasyam; SCHMIDT, Dominik D.; MARTIN, Cathie; CLARKE, Jonathan. SERRATE: A new player on the plant microRNA scene. **EMBO Reports**, v. 7, n. 10, p. 1052–1058, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400806>

LONG, Jennifer C.; CACERES, Javier F. The SR protein family of *splicing* factors: master regulators of gene expression. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 15–27, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20081501>

LOPATO, Sergiy; KALYNA, Maria; DORNER, Silke; KOBAYASHI, Ryuji; KRAINER, Adrian R.; BARTA, Andrea. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from Arabidopsis thaliana, regulates *splicing* of specific plant genes. **Genes and Development**, v. 13, n. 8, p. 987–1001, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.8.987>

LORKOVIĆ, Zdravko J.; HILSCHER, Julia; BARTA, Andrea. Use of fluorescent protein tags to study nuclear organization of the spliceosomal machinery in transiently transformed living plant cell. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 7, p. 3233–3243, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-01-0055>

LOYER, P.; TREMBLEY, J. H.; LAHTI, J. M.; KIDD, V. J. The RNP protein, RNPS1, associates with specific isoforms of the p34cdc2-related PITSLRE protein kinase in vivo. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 11, p. 1495 LP – 1506, 1998.

LOYER, Pascal; TREMBLEY, Janeen H. Roles of CDK/Cyclin complexes in transcription and pre-mRNA *splicing*: Cyclins L and CDK11 at the cross-roads of cell cycle and regulation of gene expression. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, Elsevier Ltd, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2020.04.016>

LOYER, Pascal; TREMBLEY, Janeen H.; GRENET, Jose A.; BUSSON, Adeline; CORLU, Anne; ZHAO, Wei; KOCAK, Mehmet; KIDD, Vincent J.; LAHTI, Jill M. Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and *splicing* factors: Influence of cyclin I isoforms on splice site selection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 7721–7732, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M708188200>

LUBINI, Greice. **Caracterização do gene NtCDKG ; 2 expresso no pistilo de Nicotiana tabacum L.** 2012. Universidade de São Paulo, 2012. <https://repositorio.usp.br/item/002334115>

LUBINI, Greice. **NtCDKG;2, uma proteína multifuncional, relacionada aos processos de transcrição, processamento de RNA e organização do fuso acromático no ciclo celular de Nicotiana tabacum.** 2016. Universidade de São Paulo, 2016. <https://repositorio.usp.br/item/002927092>

LYKKE-ANDERSEN, J.; SHU, M. D.; STEITZ, J. A. Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. **Science**, v. 293, n. 5536, p. 1836–1839, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1062786>

LYU, Tianqi; CAO, Jiashu. Cys2/His2 zinc-finger proteins in transcriptional regulation of flower development. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19092589>

MA, Xiaoyan; QIAO, Zhu; CHEN, Donghua; YANG, Weiguo; ZHOU, Ruijia; ZHANG, Wei; WANG, Mei. CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2 regulates salinity stress response and salt mediated flowering in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 88, n. 3, p. 287–299, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-015-0324-z>

MACKERETH, Cameron D.; SATTler, Michael. Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. **Current Opinion in Structural Biology** Elsevier Current Trends, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2012.03.013>

MAGYAR, Zoltán; DE VEYlder, Lieven; ATANASSOVA, Ana; BAKÓ, László; INZÉ, Dirk; BÖGRE, László. The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. **Plant Cell**, v. 17, n. 9, p. 2527–2541, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.033761>

MAI, Yan-Xia; WANG, Long; YANG, Hong-Quan. A Gain-of-Function Mutation in IAA7/AXR2 Confers Late Flowering under Short-day Light in *Arabidopsis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 6, p. 480–492, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01050.x>

MAIER, Annette T.; STEHLING-SUN, Sandra; WOLLMANN, Heike; DEMAR, Monika; HONG, Ray L.; HAUBEISS, Silke; WEIGEL, Detlef; LOHMANN, Jan U. Dual roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression. **Development**, v. 136, n. 10, p. 1613 LP – 1620, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.033647>

MANLEY, James L.; KRAINER, Adrian R. A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein *splicing* factors (SR proteins). **Genes and Development**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1934910>

MARCHLER-BAUER, Aron; BRYANT, Stephen H. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. WEB SERVER ISS., 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh454>

MARSCH-MARTÍNEZ, Nayelli; DE FOLTER, Stefan. Hormonal control of the development of the gynoecium. **Current Opinion in Plant Biology**, Elsevier Ltd, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.12.006>

MCKIM, Sarah M.; STENVIK, Grethe Elisabeth; BUTENKO, Melinka A.; KRISTIANSEN, Wenche; CHO, Sung Ki; HEPWORTH, Shelley R.; AALen, Reidunn B.; HAUGHN, George W. The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. **Development**, v. 135, n. 8, p. 1537–1546, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.012807>

MECHIN, V.; DAMERVAL, C.; ZIVY, M. Total protein extraction with TCA-acetone. **Methods Mol Biol**, v. 355, p. 1–8, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59745-227-0:1>

MEINKE, D. W. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. **Science**, v. 282, n. 5389, p. 662–682, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5389.662>

MENGES, Margit; DE JAGER, Sarah M.; GRUISSEM, Wilhelm; MURRAY, James A. H. Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. **The Plant Journal**, v. 41, n. 4, p. 546–566, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x>

MENGES, Margit; SAMLAND, Anne K.; PLANCHAIS, Séverine; MURRAY, James A. H. The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 893–906, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.039636>

MERCHANT, Sabeeha S. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 245–251, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1143609>

MEURER, Jörg; SCHMID, Lisa Marie; STOPPEL, Rhea; LEISTER, Dario; BRACHMANN, Andreas; MANAVSKI, Nikolay. PALE CRESS binds to plastid RNAs and facilitates the biogenesis of the 50S ribosomal subunit. **Plant Journal**, v. 92, n. 3, p. 400–413, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13662>

MIKOLAJCZYK, Monika; NELSON, Mark A. Regulation of stability of cyclin-dependent kinase CDK11p110 and a caspase-processed form, CDK11p46, by Hsp90. **Biochemical Journal**, v. 384, n. 3, p. 461–467, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040848>

MOCZYDŁOWSKA, MAŁGORZATA; LANDING, ED; ZANG, WENLONG; PALACIOS, TEODORO. Proterozoic phytoplankton and timing of Chlorophyte algae origins. **Palaeontology**, v. 54, n. 4, p. 721–733, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1475-4983.2011.01054.x>

MORGAN, David Owen. **The cell cycle : principles of control**. [s.l.] : New Science Press, 2007.

MOUBAYIDIN, Laila; ØSTERGAARD, Lars. Gynoecium formation: an intimate and complicated relationship. **Current Opinion in Genetics and Development**, Elsevier Ltd, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2017.02.005>

NAGATA, Toshiyuki; KUMAGAI, Fumi. Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. **Methods in Cell Science**, v. 21, n. 2–3, p. 123–127, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1009832822096>

NAGATA, Toshiyuki; NEMOTO, Yasuyuki; HASEZAWA, Seiichiro. Tobacco BY-2 Cell Line as the “HeLa” Cell in the Cell Biology of Higher Plants. **International Review of Cytology**, v. 132, n. C, p. 1–30, 1992. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62452-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62452-3)

NAGATA, Toshiyuki; SAKAMOTO, Kenichi; SHIMIZU, Takashi. Tobacco BY-2 cells: The present and beyond. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1079/IVP2003526>

NAGPAL, Punita et al. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. **Development**, v. 132, n. 18, p. 4107–4118, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01955>

NAKAZATO, Takeru; OHTA, Tazro; BONO, Hidemasa. Experimental Design-Based Functional Mining and Characterization of High-Throughput Sequencing Data in the Sequence Read Archive. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77910, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077910>.

NEMHAUSER, J. L.; FELDMAN, L. J.; ZAMBRYSKI, P. C. Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. **Development**, v. 127, n. 18, p. 3877 LP – 3888, 2000.

NIBAU, Candida; DADAROU, Despoina; KARGIOS, Nestoras; MALLIOURA, Areti; FERNANDEZ-FUENTES, Narcis; CAVALLARI, Nicola; DOONAN, John H. A Functional Kinase Is Necessary for Cyclin-Dependent Kinase G1 (CDKG1) to Maintain Fertility at High Ambient Temperature in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 586870, 2020a. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.586870>

NIBAU, Candida; GALLEMÍ, Marçal; DADAROU, Despoina; DOONAN, John H.; CAVALLARI, Nicola. Thermo-Sensitive Alternative *Splicing* of FLOWERING LOCUS M Is Modulated by Cyclin-Dependent Kinase G2. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2020b. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01680>

NISA, Maher Un; HUANG, Ying; BENHAMED, Moussa; RAYNAUD, Cécile. The plant DNA damage response: Signaling pathways leading to growth inhibition and putative role in response to stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00653>

OHTAKA, Kinuka; HORI, Koichi; KANNO, Yuri; SEO, Mitsunori; OHTA, Hiroyuki. Primitive auxin response without TIR1 and Aux/IAA in the charophyte alga Klebsormidium nitens. **Plant Physiology**, v. 174, n. 3, p. 1621–1632, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.17.00274>

OKADA, K.; UEDA, J.; KOMAKI, M. K.; BELL, C. J.; SHIMURA, Y. Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. **The Plant Cell**, v. 3, n. 7, p. 677–684, 1991. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.3.7.677>

OLSEN, Jeanine L. et al. The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. **Nature**, v. 530, n. 7590, p. 331–335, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature16548>

Ó'MAOILÉIDIGH, Diarmuid S. A conserved mechanism to terminate floral meristems. **Plant Cell** American Society of Plant Biologists, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.18.00054>

PALUSA, Saiprasad G.; REDDY, Anireddy S. N. Extensive coupling of alternative *splicing* of pre-mRNAs of serine/arginine (SR) genes with nonsense-mediated decay. **New Phytologist**, v. 185, n. 1, p. 83–89, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03065.x>

PANCHY, Nicholas; LEHTI-SHIU, Melissa; SHIU, Shin Han. Evolution of gene duplication in plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 4, p. 2294–2316, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.16.00523>

PANITZ, R.; MANTEUFFEL, R.; WOBUS, U. Tobacco embryogenesis: Storage-protein-accumulating cells of embryo, suspensor, and endosperm are able to undergo cytokinesis. **Protoplasma**, v. 207, n. 1–2, p. 31–42, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01294711>

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; CHAPMAN, B. A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9903–9908, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307901101>

PATRO, Rob; DUGGAL, Geet; LOVE, Michael I.; IRIZARRY, Rafael A.; KINGSFORD, Carl. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nature Methods**, v. 14, n. 4, p. 417–419, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.4197>

PEKKER, Irena; ALVAREZ, John Paul; ESHED, Yuval. Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. **Plant Cell**, v. 17, n. 11, p. 2899–2910, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.034876>

PEREA-RESA, Carlos; HERNÁNDEZ-VERDEJA, Tamara; LÓPEZ-COBOLLO, Rosa; CASTELLANO, María del Mar; SALINAS, Julio. LSM proteins provide accurate *splicing* and decay of selected transcripts to ensure normal Arabidopsis development. **Plant Cell**, v. 24, n. 12, p. 4930–4947, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.103697>

PERROT-RECHENMANN, Catherine. Cellular responses to auxin: division versus expansion. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001446>

PERTEA, Mihaela; KIM, Daehwan; PERTEA, Geo M.; LEEK, Jeffrey T.; SALZBERG, Steven L. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. **Nature Protocols**, v. 11, n. 9, p. 1650–1667, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.095>

PETRETTI, Clotilde; SAVOIAN, Matthew; MONTEMBault, Emilie; GLOVER, David M.; PRIGENT, Claude; GIET, Régis. The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. **EMBO Reports**, v. 7, n. 4, p. 418–424, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400639>

PINOTI, Vitor Favaretto. **SCI1 (Stigma / style Cell cycle Inhibitor 1) interage com a maquinaria de *splicing* e seu silenciamento afeta o transcriptoma do pistilo de *Nicotiana tabacum***. 2016. Universidade de São Paulo, 2016. <https://repositorio.usp.br/item/002889041>

PLANCHAIS, Séverine; SAMLAND, Anne K.; MURRAY, James A. H. Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. **Plant Journal**, v. 38, n. 4, p. 616–625, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0960-7412.2004.02071.x>

PRALL, Wil; SHARMA, Bishwas; GREGORY, Brian D. Transcription Is Just the Beginning of Gene Expression Regulation: The Functional Significance of RNA-Binding Proteins to Post-transcriptional Processes in Plants. **Plant and Cell Physiology** Oxford University Press, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcz067>

PRUNET, Nathanaël; MOREL, Patrice; NEGRUTIU, Ioan; TREHIN, Christophe. Time to stop: Flower meristem termination. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 1764–1772, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.141812>

RACZYNSKA, Katarzyna Dorota et al. The SERRATE protein is involved in alternative *splicing* in Arabidopsis thaliana. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 2, p. 1224–1244, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt894>

REDDY, A. S. N.; MARQUEZ, Y.; KALYNA, M.; BARTA, A. Complexity of the Alternative *Splicing* Landscape in Plants. **The Plant Cell**, v. 25, n. 10, p. 3657–3683, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.117523>

RICE, J. A. **Mathematical Statistics and Data Analysis**. [s.l.] : Cengage Learning, 2006.

RICE, Peter; LONGDEN, Lan; BLEASBY, Alan. EMOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics** Elsevier Ltd, 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2)

RICHARDSON, Dale N.; ROGERS, Mark F.; LABADORF, Adam; BEN-HUR, Asa; GUO, Hui; PATERSON, Andrew H.; REDDY, Anireddy S. N. Comparative Analysis of Serine/Arginine-Rich Proteins across 27 Eukaryotes: Insights into Sub-Family Classification and Extent of Alternative *Splicing*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24542, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024542>

RITCHIE, Matthew E.; PHIPSON, Belinda; WU, Di; HU, Yifang; LAW, Charity W.; SHI, Wei; SMYTH, Gordon K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv007>

ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

ROBINSON, Mark D.; OSHLACK, Alicia. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>

RODGERS-MELNICK, Eli; MANE, Shrinivasrao P.; DHARMAWARDHANA, Palitha; SLAVOV, Gancho T.; CRASTA, Oswald R.; STRAUSS, Steven H.; BRUNNER, Amy M.; DIFAZIO, Stephen P. Contrasting patterns of evolution following whole genome versus tandem duplication events in *Populus*. **Genome Research**, v. 22, n. 1, p. 95–105, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.125146.111>

ROGERS, Scott; WELLS, Rodney; RECHSTEINER, Martin. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. **Science**, 1986. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.2876518>

ROTH, Ohad; ALVAREZ, John P.; LEVY, Matan; BOWMAN, John L.; ORI, Naomi; SHANI, Eilon. The KNOX1 transcription factor SHOOT meristemless regulates floral fate in *Arabidopsis*[OPEN]. **Plant Cell**, v. 30, n. 6, p. 1309–1321, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.18.00222>

SABLOWSKI, Robert. Control of patterning, growth, and differentiation by floral organ identity genes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford University Press, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru514>

SABLOWSKI, Robert. Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erm002>

SANTERRE, Anne; BRITT, Anne B. Cloning of a 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana*. **PNAS**, v. 91, n. 6, p. 2240–2244, 1994. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.6.2240>

SANTOS, Nikolas Paparidis Ferreira Dos. **Obtenção das quinases dependentes de ciclinas CDK9 e CDK11 humanas utilizando um sistema bacteriano de expressão (E. coli)**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015. <https://repositorio.usp.br/item/002689229>

SCARPINO, Samuel V.; LEVIN, Donald A.; MEYERS, Lauren Ancel. Polyploid formation shapes flowering plant diversity. **American Naturalist**, v. 184, n. 4, p. 456–465, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/677752>

SCHAEFER, Didier G.; ZRYD, Jean Pierre. The moss *Physcomitrella patens*, now and then. **Plant Physiology**, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010786>

SCHINDELIN, Johannes et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019>

SCHNITTGER, Arp; SCHÖBINGER, Ulrike; STIERHOF, York Dieter; HÜLSKAMP, Martin. Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes. **Current biology : CB**, v. 12, n. 5, p. 415–20, 2002.

SCHRUFF, Marie C.; SPIELMAN, Melissa; TIWARI, Sushma; ADAMS, Sally; FENBY, Nick; SCOTT, Rod J. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. **Development**, v. 133, n. 2, p. 251–261, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02194>

SCOFIELD, Simon; DEWITTE, Walter; MURRAY, James A. H. The KNOX gene SHOOT MERISTEMLESS is required for the development of reproductive meristematic tissues in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 50, n. 5, p. 767–781, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03095.x>

SCOFIELD, Simon; DEWITTE, Walter; NIEUWLAND, Jeroen; MURRAY, James A. H. The *Arabidopsis* homeobox gene SHOOT MERISTEMLESS has cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. **Plant Journal**, v. 75, n. 1, p. 53–66, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12198>

SERIVICHYASWAT, Phanu; RYU, Hak-Seung; KIM, Wanhui; KIM, Soonkap; CHUNG, Kyung Sook; KIM, Jae Joon; AHN, Ji Hoon. Expression of the Floral Repressor miRNA156 is Positively Regulated by the AGAMOUS-like Proteins AGL15 and AGL18. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 3, p. 259–266, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2015.2311>

SHA, Ying; PHAN, John H.; WANG, May D. **Effect of low-expression gene filtering on detection of differentially expressed genes in RNA-seq data**. In: PROCEEDINGS OF THE ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, EMBS 2015, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2015. p. 6461–6464. DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/EMBC.2015.7319872>

SHI, Dong Qiao; LIU, Jie; XIANG, Yan Hui; YE, De; SUNDARESAN, Venkatesan; YANG, Wei Cai. Slow walker1, essential for gametogenesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis. **Plant Cell**, v. 17, n. 8, p. 2340–2354, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.033563>

SHIMAMURA, Masaki. *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, phylogeny and morphology of a model system. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 2, p. 230–256, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcv192>

SHULTZ, Randall W.; TATINENI, Vinaya M.; HANLEY-BOWDOIN, Linda; THOMPSON, William F. Genome-Wide Analysis of the Core DNA Replication Machinery in the Higher Plants *Arabidopsis* and Rice. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, p. 1697–1714, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.107.101105>

SIERRO, Nicolas; BATTEY, James N. D.; OUADI, Sonia; BAKAHER, Nicolas; BOVET, Lucien; WILLIG, Adrian; GOEPFERT, Simon; PEITSCH, Manuel C.; IVANOV, Nikolai V. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4833>

SIERRO, Nicolas; BATTEY, James N. D.; OUADI, Sonia; BOVET, Lucien; GOEPFERT, Simon; BAKAHER, Nicolas; PEITSCH, Manuel C.; IVANOV, Nikolai V. Reference genomes and transcriptomes of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r60>

SIKORSKI, Pawel J.; ZUBER, Hélène; PHILIPPE, Lucas; SEMENT, François M.; CANADAY, Jean; KUFEL, Joanna; GAGLIARDI, Dominique; LANGE, Heike. Distinct 18S rRNA precursors are targets of the exosome complex, the exoribonuclease RRP6L2 and the terminal nucleotidyltransferase TRL in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 83, n. 6, p. 991–1004, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12943>

SIMON, Gary; MOORE, David. **The Basic Practice of Statistics**. [s.l.] : W.H. Freeman, 1996. v. 50 DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/2684675>

SIMONINI, Sara; ØSTERGAARD, Lars. Female reproductive organ formation: A multitasking endeavor. In: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l.] : Academic Press Inc., 2019. v. 131p. 337–371. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.10.004>

SIMPSON, Craig G. et al. High-resolution RT-PCR analysis of alternative barley transcripts. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] : Humana Press Inc., 2019. v. 1900p. 269–281. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7_17

SIMPSON, Craig G.; FULLER, John; MARONNOVA, Monika; KALYNA, Maria; DAVIDSON, Diane; MCNICOL, Jim; BARTA, Andrea; BROWN, John W. S. Monitoring changes in alternative precursor messenger RNA *splicing* in multiple gene transcripts. **The Plant Journal**, v. 53, n. 6, p. 1035–1048, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03392.x>

SIMS, David; SUDBERY, Ian; ILOTT, Nicholas E.; HEGER, Andreas; PONTING, Chris P. Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3642>.

SMITH, Harley M. S.; UNG, Nolan; LAL, Shruti; COURTIER, Jennifer. Specification of reproductive meristems requires the combined function of SHOOT MERISTEMLESS and floral integrators FLOWERING LOCUS T and FD during *Arabidopsis* inflorescence development. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 2, p. 583–593, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq296>

SOLTIS, Douglas E. et al. The Amborella genome: An evolutionary reference for plant biology. **Genome Biology**, v. 9, n. 3, p. 402, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2008-9-3-402>

SONESON, Charlotte; LOVE, Michael I.; ROBINSON, Mark D. Differential analyses for RNA-seq: Transcript-level estimates improve gene-level inferences [version 2; referees: 2 approved]. *F1000Research*, [S. l.], v. 4, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7563.2>

SPETH, Corinna et al. Arabidopsis RNA processing factor SERRATE regulates the transcription of intronless genes. *eLife*, v. 7, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.37078>

SPORNE, K. R. **The morphology of angiosperms: the structure and evolution of flowering plants**. [s.l.] : Hutchinson, 1974.

SRIVASTAVA, Avi; MALIK, Laraib; SARKAR, Hirak; ZAKERI, Mohsen; ALMODARESI, Fatemeh; SONESON, Charlotte; LOVE, Michael I.; KINGSFORD, Carl; PATRO, Rob. Alignment and mapping methodology influence transcript abundance estimation. *Genome Biology*, v. 21, n. 1, p. 239, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-020-02151-8>

STERCK, Lieven; ROMBAUTS, Stephane; JANSSON, Stefan; STERKY, Fredrik; ROUZÉ, Pierre; VAN DE PEER, Yves. EST data suggest that poplar is an ancient polyploid. *New Phytologist*, v. 167, n. 1, p. 165–170, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01378.x>

STRINI, Edward José. **A análise do interactoma de SC11 (Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1) revela possíveis mecanismos de controle da proliferação celular**. 2014. University of Sao Paulo, 2014. <https://repositorio.usp.br/item/002649994>

SUN, Bo; XU, Yifeng; NG, Kian Hong; ITO, Toshiro. A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *Genes and Development*, v. 23, n. 15, p. 1791–1804, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1800409>

SVENSSON, Örjan; ARVESTAD, Lars; LAGERGREN, Jens. Genome-wide survey for biologically functional pseudogenes. *PLoS Computational Biology*, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020046>

SÁEZ-VÁSQUEZ, Julio; DELSENY, Michel. Ribosome biogenesis in plants: From functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell*, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/TPC.18.00874>

TAN, Queenie K. G. K. G. K. G.; IRISH, Vivian F. The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. *Plant Physiology*, v. 140, n. 3, p. 1095–1108, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.070565>

TANG, D.; GURURAJAN, R.; KIDD, V. J. Phosphorylation of PITSLRE p110 isoforms accompanies their processing by caspases during fas-mediated cell death. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 26, p. 16601–16607, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.26.16601>

TANK, JG; THAKER, VS. Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. *Biologia Plantarum*, v. 55, n. 2, p. 201–212, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-011-0031-9>

TEO, Zhi Wei Norman; SONG, Shiyong; WANG, Yong Qiang; LIU, Jie; YU, Hao. New insights into the regulation of inflorescence architecture. *Trends in Plant Science* Elsevier, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.001>

THEISSEN, Günter; MELZER, Rainer; RUÜMLER, Florian. MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: Linking plant development and evolution. **Development**, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.134080>

THOMSON, Bennett; WELLMER, Frank. Molecular regulation of flower development. *In: Current Topics in Developmental Biology*. [s.l.] : Academic Press Inc., 2019. v. 131p. 185–210. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.007>

THOMÉ, Vanessa. **Caracterização da RanBP1 de *Nicotiana tabacum* e sua interação com NtCDKG;2 na putativa regulação do fuso mitótico**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

THOMÉ, Vanessa. **Proteínas parceiras de interação de NtCDKG;2 indicam sua atuação no metabolismo de RNA, na sinalização por auxina e na regulação do florescimento**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.

TINLAND, B.; KOUKOLIKOVA-NICOLA, Z.; HALL, M. N.; HOHN, B. The T-DNA-linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7442–7446, 1992. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.16.7442>

TREMBLEY, Janeen H.; HU, Dongli; HSU, Li Chung; YEUNG, Cho Yau; SLAUGHTER, Clive; LAHTI, Jill M.; KIDD, Vincent J. PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 4, p. 2589–2596, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109755200>

TROLET, Adrien; BALDRICH, Patricia; CRIQUI, Marie Claire; DUBOIS, Marieke; CLAVEL, Marion; MEYERS, Blake C.; GENSCHIK, Pascal. Cell cycle-dependent regulation and function of ARGONAUTE1 in plants. **Plant Cell**, v. 31, n. 8, p. 1734–1750, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.19.00069>

TUSKAN, G. A. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**, v. 313, n. 5793, p. 1596–1604, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1128691>

TUTEJA, Narendra; TRAN, Ngoc Quang; DANG, Hung Quang; TUTEJA, Renu. Plant MCM proteins: Role in DNA replication and beyond. **Plant Molecular Biology**, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-011-9836-3>

UMEDA, Masaaki; SHIMOTOHNO, Akie; YAMAGUCHI, Masatoshi. Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 9, p. 1437–1442, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pci170>

VAN LEENE, Jelle et al. A Tandem Affinity Purification-based Technology Platform to Study the Cell Cycle Interactome in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 7, p. 1226–1238, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M700078-MCP200>

VAN LEENE, Jelle et al. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Systems Biology**, v. 6, n. 1, p. 397, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2010.53>

VANDENBUSSCHE, Michiel; HORSTMAN, Anneke; ZETHOF, Jan; KOES, Ronald; RIJPKEMA, Anneke S.; GERATS, Tom. Differential Recruitment of WOX Transcription

Factors for Lateral Development and Organ Fusion in *Petunia* and *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, n. 8, p. 2269–2283, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.065862>

VANDEPOELE, Klaas et al. Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 316–328, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.066290.316>

VARAUD, Emilie; BRIOUDES, Florian; SZÉCSI, Judit; LEROUX, Julie; BROWN, Spencer; PERROT-RECHENMANN, Catherine; BENDAHDANE, Mohammed. AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates *Arabidopsis* petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. **Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 973–983, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.081653>

INCENTZ, Michel et al. Evaluation of monocot and eudicot divergence using the sugarcane transcriptome. **Plant Physiology**, v. 134, n. 3, p. 951–959, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.033878>

VITTING-SEERUP, Kristoffer; SANDELIN, Albin. IsoformSwitchAnalyzeR: analysis of changes in genome-wide patterns of alternative *splicing* and its functional consequences. **Bioinformatics**, v. 35, n. 21, p. 4469–4471, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btz247>

WAGNER, Doris; WELLMER, Frank; DILKS, Kieran; WILLIAM, Dilusha; SMITH, Michael R.; KUMAR, Prakash P.; RIECHMANN, José Luis; GREENLAND, Andrew J.; MEYEROWITZ, Elliot M. Floral induction in tissue culture: A system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation. **Plant Journal**, v. 39, n. 2, p. 273–282, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02127.x>

WANG, Bo; XUE, Jing Shi; YU, Ya Hui; LIU, Si Qi; ZHANG, Jia Xin; YAO, Xiao Zhen; LIU, Zhi Xue; XU, Xiao Feng; YANG, Zhong Nan. Fine regulation of ARF17 for anther development and pollen formation. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-017-1185-1>

WANG, Haifeng; YOU, Chenjiang; CHANG, Fang; WANG, Yingxiang; WANG, Lei; QI, Ji; MA, Hong. Alternative *splicing* during *Arabidopsis* flower development results in constitutive and stage-regulated isoforms. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. FEB, p. 1–9, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00025>

WANG, Jia Wei; CZECH, Benjamin; WEIGEL, Detlef. miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 738–749, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.014>

WANG, Shan Li; VISWANATH, Kotapati Kasi; TONG, Chii Gong; AN, Hye Ryun; JANG, Seonghoe; CHEN, Fure Chyi. Floral Induction and Flower Development of Orchids. **Frontiers in Plant Science**, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01258>

WANG, Xiaomin; GINGRICH, Daniel K.; DENG, Yunfei; HONG, Zonglie. A nucleostemin-like GTPase required for normal apical and floral meristem development in *Arabidopsis*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 8, p. 1446–1456, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0797>

WANG, Ying; DIEHL, Adam; WU, Feinan; VREBALOV, Julia; GIOVANNONI, James; SIEPEL, Adam; TANKSLEY, Steven D. Sequencing and comparative analysis of a

conserved syntenic segment in the solanaceae. **Genetics**, v. 180, n. 1, p. 391–408, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.108.087981>

WANG, Yu; LIU, Chang; YANG, Daiwen; YU, Hao; LIOU, Yih-Cherng. Pin1At encoding a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase regulates flowering time in Arabidopsis. **Molecular cell**, v. 37, n. 1, p. 112–22, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.020>

WILS, Christopher Ralf; KAUFMANN, Kerstin. Gene-regulatory networks controlling inflorescence and flower development in Arabidopsis thaliana. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.07.014>

WU, Jane Y.; MANIATIS, Tom. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative *splicing*. **Cell**, v. 75, n. 6, p. 1061–1070, 1993. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90316-I](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90316-I)

WU, Shuang; SCHEIBLE, Wolf Rüdiger; SCHINDELASCH, Dana; VAN DEN DAELE, Hilde; DE VEYLLER, Lieven; BASKIN, Tobias I. A conditional mutation in Arabidopsis thaliana separase induces chromosome non-disjunction, aberrant morphogenesis and cyclin B1;1 stability. **Development**, v. 137, n. 6, p. 953–961, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.041939>

WYNN, April N.; SEAMAN, Andrew A.; JONES, Ashley L.; FRANKS, Robert G. Novel functional roles for PERIANTHIA and SEUSS during floral organ identity specification, floral meristem termination, and gynoecial development. *Frontiers in Plant Science*, [S. l.], v. 5, n. APR, p. 130, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00130>

XI, Wanyan; GONG, Ximing; YANG, Qiaoyun; YU, Hao; LIOU, Yih Cherng. Pin1At regulates PIN1 polar localization and root gravitropism. **Nature Communications**, v. 7, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10430>

XING, Shuping; SALINAS, María; GARCIA-MOLINA, Antoni; HÖHMANN, Susanne; BERNDTGEN, Rita; HUIJSER, Peter. *SPL8* and miR156-targeted *SPL* genes redundantly regulate Arabidopsis gynoecium differential patterning. **The Plant Journal**, v. 75, n. 4, p. 566–577, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12221>

XU, Fang; XU, Shaohua; WIERMER, Marcel; ZHANG, Yuelin; LI, Xin. The cyclin L homolog MOS12 and the MOS4-associated complex are required for the proper *splicing* of plant resistance genes. **Plant Journal**, v. 70, n. 6, p. 916–928, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04906.x>

XU, Mingli; HU, Tieqiang; MCKIM, Sarah M.; MURMU, Jhadeswar; HAUGHN, George W.; HEPWORTH, Shelley R. Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 promote floral meristem fate and determinacy in a previously undefined pathway targeting APETALA1 and AGAMOUS-LIKE24. **Plant Journal**, v. 63, n. 6, p. 974–989, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04299.x>

XU, Xianfeng Morgan; ZHAO, Qiao; RODRIGO-PEIRIS, Thushani; BRKLJACIC, Jelena; HE, Chao Sylvia; MÜLLER, Sabine; MEIER, Iris. RanGAP1 is a continuous marker of the Arabidopsis cell division plane. **PNAS**, v. 105, n. 47, p. 18637–18642, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806157105>

XU, Yifeng; YAMAGUCHI, Nobutoshi; GAN, Eng Seng; ITO, Toshiro. When to stop: An update on molecular mechanisms of floral meristem termination. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 6, p. 1711–1718, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erz048>

YAMAGUCHI, Nobutoshi; WU, Miin Feng; WINTER, Cara M.; BERNIS, Markus C.; NOLE-WILSON, Staci; YAMAGUCHI, Ayako; COUPLAND, George; KRIZEK, Beth A.; WAGNER, Doris. A Molecular Framework for Auxin-Mediated Initiation of Flower Primordia. **Developmental Cell**, v. 24, n. 3, p. 271–282, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.017>

YAMAGUCHI, Nobutoshi; WU, Miin Feng; WINTER, Cara M.; WAGNER, Doris. LEAFY and polar auxin transport coordinately regulate arabidopsis flower development. **Plants**, v. 3, n. 2, p. 251–265, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants3020251>

YANG, Yau Wen; LAI, Kun Nan; TAI, Pon Yean; LI, Wen Hsiung. Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between Brassica and other angiosperm lineages. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 5, p. 597–604, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/PL00006502>

YE, Jian; COULOURIS, George; ZARETSKAYA, Irena; CUTCUTACHE, Ioana; ROZEN, Steve; MADDEN, Thomas L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

YOKOYAMA, Hideki; GRUSS, Oliver J.; RYBINA, Sofia; CAUDRON, Maiwen; SCHELDER, Malgorzata; WILM, Matthias; MATTAJ, Iain W.; KARSENTI, Eric. Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 5, p. 867–875, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200706189>

YU, Sha et al. Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. **Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3320–3332, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.101014>

ZHANG, Xiao-Ning et al. Transcriptome analyses reveal SR45 to be a neutral *splicing* regulator and a suppressor of innate immunity in Arabidopsis thaliana. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 772, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-4183-7>

ZHANG, Zuo; KRAINER, Adrian R. Involvement of SR Proteins in mRNA Surveillance. **Molecular Cell**, v. 16, n. 4, p. 597–607, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.031>

ZHAO, Yunde. Essential Roles of Local Auxin Biosynthesis in Plant Development and in Adaptation to Environmental Changes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 69, n. 1, p. 417–435, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040226>

ZHENG, Chenfei; YE, Meixia; SANG, Mengmeng; WU, Rongling. A regulatory network for mir156-spl module in arabidopsis thaliana. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246166>

ZHONG, Xiang-Yang; WANG, Pingping; HAN, Joonhee; ROSENFELD, Michael G.; FU, Xiang-Dong. SR Proteins in Vertical Integration of Gene Expression from Transcription to RNA Processing to Translation. **Molecular Cell**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.016>

ZHOU, Yubing; SHEN, Jacson K.; HORNICEK, Francis J.; KAN, Quancheng; DUAN, Zhenfeng. The emerging roles and therapeutic potential of cyclindependent kinase 11

(CDK11) in human cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 40846–40859, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8519>

ZHOU, Zhihong; FU, Xiang Dong. Regulation of *splicing* by SR proteins and SR protein-specific kinases. **Chromosoma**, NIH Public Access, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-013-0407-z>

ZHU, Cong; PERRY, Sharyn E. Control of expression and autoregulation of AGL15, a member of the MADS-box family. **Plant Journal**, v. 41, n. 4, p. 583–594, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02320.x>

APÊNDICE A

Análises qualitativas do experimento de RNA-seq comparando a expressão gênica em estigmas e estiletes de plantas silenciando *SC11* com a de plantas controle (SR1).

Na Figura A. 1 estão representadas as relações entre quantidade de expressão e variância dos genes com expressão detectável nas amostras de RNA-seq. Do lado esquerdo (Figura A. 1A), é possível observar que genes de baixa expressão (CPM menor que 1) têm influência na linha de tendência de variância-média (linha amarela). Segundo Guo et al. (2019), os valores de CPM em um experimento de RNA-seq se comportam como uma distribuição binomial negativa. Em contraste, genes de baixa expressão não seguem esse tipo de distribuição, e sua remoção é importante para evitar interferências nas análises subsequentes. Na Figura A. 1 está representada a linha de tendência da variância-média quando genes de baixa expressão são removidos. Como ilustrado nessa figura, a remoção desses genes representa mais adequadamente a distribuição dos valores.

Figura A. 1. Gráficos de tendência de variância-média da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de estigmas/estiletes de *N. tabacum*.

A - Gráfico representando a distribuição pré-filtragem de genes com baixa expressão ($\text{CPM} < 1$). Eixo x: valores transformados da quantificação da expressão de cada gene detectável nas amostras de RNA-seq; Eixo y: valores de raiz quadrada dos desvios-padrão para cada gene quantificado; Linha amarela: linha de tendência representando a distribuição dos valores (pontos pretos). **B** - Gráfico

representando a distribuição pós-filtragem, comparando as linhas de tendência pré- e pós-filtragem (linhas amarela e vermelha, respectivamente. Fonte: Autoria própria.

Na Figura A. 2 estão representadas as distribuições das quantificações de genes em cada uma das amostras utilizadas no RNA-seq antes e depois da normalização desses valores pelo método TMM. É importante destacar que a normalização da expressão é um passo importante na análise de RNA-seq, pois permite comparar a expressão de genes entre as amostras (ROBINSON; OSHLACK, 2010). Como ilustrado na Figura A. 2B, os valores transformados em $\log_2(\text{CPM})$ se distribuem igualmente entre as amostras, em contraste com a distribuição dos valores não-normalizados (Figura A. 2A).

Figura A. 2. Gráficos da distribuição da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de estigmas/estiletes de *N. tabacum*.

A - Gráfico representando a distribuição pré-normalização das quantificações de genes nas diferentes amostras. Eixo x: amostras de de RNA-seq; Eixo y: valores de contagem (quantificação) dos genes; barras: representam os valores máximo e mínimo; caixas: representam os quartis dos valores de quantificação; linha horizontal dentro da caixa: valor mediano. **B** - Gráfico representando a distribuição pós-normalização. Eixo x: amostras de de RNA-seq; Eixo y: valores de contagem normalizados, em $\log_2(\text{CPM})$, dos genes; barras: representam os valores máximo e mínimo; caixas: representam os quartis dos valores de quantificação; linha horizontal dentro da caixa: valor mediano. Fonte: Autoria própria.

REFERÊNCIAS DO APÊNDICE A

GUO, Wenbin; TZIOUTZIOU, Nikoleta; STEPHEN, Gordon; MILNE, Iain; CALIXTO, Cristiane; WAUGH, Robbie; BROWN, John; ZHANG, Runxuan. 3D RNA-seq - a powerful and flexible tool for rapid and accurate differential expression and alternative *splicing* analysis of RNA-seq data for biologists. **bioRxiv**, p. 656686, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/656686>.

ROBINSON, Mark D.; OSHLACK, Alicia. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.

APÊNDICE B

Resultado completo da análise de expressão diferencial de genes entre estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC/1* e plantas controle,

Na Tabela B. 1 estão representados todos os 1,510 genes diferencialmente expressos entre estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC/1* e as plantas controle. Todos os genes nessa tabela possuem diferenças na expressão que são significativas (FDR menor que 0,05). Os valores de FDR (todos menores que 0,05) não estão apresentados na tabela, para que essa fosse melhor visualizada, Nas análises de homologia, os valores de *e-value* para os alinhamentos também foram ocultados, visto que todos foram menores que 5×10^{-5} .

Tabela B. 1. Genes DE em estigmas/estiletos de plantas silenciando *SC11* em comparação com a planta controle. A tabela está organizada de acordo com os valores de $\log_2FC$, dos genes menos expressos para os genes mais expressos. **Núm. acesso:** número de acesso do gene no banco de dados NCBI; **Descrição:** nome do gene anotado no banco NCBI; **$\log_2FC$:** valores de $\log_2(Fold-change)$; **Análises de similaridade:** corresponde aos resultados de buscas de similaridade dos genes de *N. tabacum*, traduzidos em sequências de aminoácidos, com sequências de aminoácidos de *A. thaliana* com o programa *BLASTX*; **Araport:** número de acesso no banco de dados ThaleMine; **Cobertura:** porcentagem da sequência de *N. tabacum* que possui alinhamento com a sequência de *A. thaliana*; **Identidade:** porcentagem de aminoácidos idênticos entre a sequência traduzida do gene de *N. tabacum* com a sequência de *A. thaliana*; **Termos GO:** termos *Gene Ontology* que aparecem mencionados no texto principal deste trabalho; **Auxina:** termo “resposta à auxina”; **Des. Est. Rep.:** termo “desenvolvimento de estrutura reprodutiva”; **Proces. RNA:** termo “processamento de RNAs”; **Ciclo celular, Replicação de DNA, Reparo de DNA:** termos de mesmo nome. Os números de acesso estão ligados às páginas de internet correspondentes a seus bancos de dados.

Núm. Acesso	Descrição	$\log_2FC$	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107815404	uncharacterized LOC107815404	-8.33								
LOC107813731	uncharacterized LOC107813731	-6.74								
LOC107810483	protein virilizer homolog	-6.35	AT3G05680	77	63.1		S			
LOC107819173	uncharacterized LOC107819173	-6.09								
LOC107784146	cytochrome P450 87A3-like	-5.82	AT1G12740	92	46.9					
LOC107768796	uncharacterized LOC107768796	-5.81								
LOC107823712	uncharacterized LOC107823712	-5.63								
LOC107825532	multiprotein-bridging factor 1c-like	-5.42	AT2G42680	44	60.0					
LOC107774402	uncharacterized LOC107774402	-3.99								
LOC107799831	uncharacterized LOC107799831	-3.70								
LOC107768219	respiratory burst oxidase homolog protein B-like	-3.60	AT5G47910	84	61.5					
LOC107771987	cytochrome P450 98A2-like	-3.58	AT5G07990	91	37.2	S				
LOC107829287	viridiflorene synthase-like	-3.51	AT3G14490	85	36.2					
LOC107782428	uncharacterized LOC107782428	-3.32								
LOC107779913	uncharacterized LOC107779913	-3.14								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107773516	uncharacterized LOC107773516	-3.13	AT5G42370	35	69.7					
LOC107772875	pathogen-related protein-like	-3.00	AT1G78780	82	57.4					
LOC107763682	GDSL esterase/lipase LIP-4-like	-2.86	AT1G09390	70	54.0					
LOC107815980	uncharacterized LOC107815980	-2.74								
LOC107825009	salicylate carboxymethyltransferase-like	-2.73	AT5G04370	88	45.2					
LOC107809220	protein CHUP1, chloroplastic-like	-2.67	AT3G25690	41	64.0					
LOC107773467	uncharacterized mitochondrial protein AtMg00810-like	-2.53	ATMG00810	92	32.8					
LOC107790081	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1-like	-2.52	AT2G19590	67	65.6					
LOC107777210	premnaspirodiene oxygenase-like	-2.49	AT3G48280	80	41.3					
LOC107808924	trans-resveratrol di-O-methyltransferase-like	-2.48	AT4G35150	82	33.3					
LOC107775633	transcription factor HBP-1b(c38)-like	-2.45	AT1G68640	47	75.4		S			
LOC107819588	B3 domain-containing protein Os11g0197600-like	-2.44								
LOC107783017	salicylate carboxymethyltransferase-like	-2.41	AT5G04370	88	45.2					
LOC107765010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1-like	-2.38	AT2G19590	67	65.6					
LOC107814928	benzyl alcohol O-benzoyltransferase	-2.36	AT5G17540	76	59.1					
LOC107794675	branched-chain-amino-acid aminotransferase 2, chloro- plastic-like	-2.34	AT1G10060	77	59.8					
LOC107823992	vacuolar cation/proton exchanger 3-like	-2.33	AT1G55730	69	46.5					
LOC107798731	fasciclin-like arabinogalactan protein 21	-2.32								
LOC107785813	uncharacterized LOC107785813	-2.30								
LOC107767742	uncharacterized LOC107767742	-2.28								
LOC107795133	aspartate aminotransferase, mitochondrial-like	-2.26	AT5G11520	70	44.3					
LOC107820624	ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	-2.24	AT4G34410	45	44.7					
LOC107803767	protein QUIRKY-like	-2.23	AT1G04150	80	62.8					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107802581	uncharacterized LOC107802581	-2.23								
LOC107779782	rust resistance kinase Lr10-like	-2.20	AT1G66920	53	37.0					
LOC107793341	UDP-glycosyltransferase 87A1-like	-2.19	AT2G36970	73	30.6					
LOC107795363	beta-glucosidase 13-like	-2.17	AT5G44640	75	51.3					
LOC107793085	cyclin-D3-1-like	-2.16	AT3G50070	62	46.4		S		S	
LOC107798922	probable pectate lyase 12	-2.14	AT5G04310	70	61.0					
LOC107818398	glycine-rich protein-like	-2.14								
LOC107791537	fasciclin-like arabinogalactan protein 21	-2.11								
LOC107770744	histone H2B.2-like	-2.11	AT3G46030	43	95.7					
LOC107764651	glutamine synthetase-like	-2.08	AT3G53180	30	56.6					
LOC107819143	uncharacterized LOC107819143	-2.07								
LOC107797693	uncharacterized LOC107797693	-2.07								
LOC107807872	QWRF motif-containing protein 2-like	-2.04	AT2G44190	42	45.1		S			
LOC107822406	probable pectinesterase 68	-2.03	AT5G47500	73	78.5					
LOC107771257	calponin homology domain-containing protein DDB_G0272472-like	-2.03	AT1G49870	75	42.5					
LOC107786964	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g17525, mitochondrial-like	-2.02	AT2G17525	81	58.8					
LOC107792212	serine/threonine-protein kinase CDL1-like	-2.02	AT1G54820	54	60.8					
LOC107829478	inositol 2-dehydrogenase 2-like	-2.02	AT4G17370	80	76.5					
LOC107794617	glutaredoxin-C9-like	-2.01	AT5G14070	31	40.0		S			
LOC107803659	uncharacterized LOC107803659	-2.01								
LOC107798342	uncharacterized LOC107798342	-2.00								
LOC107770138	protein NRT1/ PTR FAMILY 7.2-like	-2.00	AT5G19640	79	45.5					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107779704	inorganic phosphate transporter 1-4-like	-1.98	AT2G32830	82	76.0					
LOC107819622	9-divinyl ether synthase-like	-1.95	AT5G42650	86	53.4					
LOC107781975	uncharacterized LOC107781975	-1.95								
LOC107820144	zinc-finger homeodomain protein 4-like	-1.95	AT1G14440	44	47.2		S			
LOC107805674	squamosa promoter-binding-like protein 8	-1.95	AT1G02065	65	48.7		S		S	
LOC107766674	wee1-like protein kinase	-1.93	AT1G02970	68	61.0				S	
LOC107824728	uncharacterized LOC107824728	-1.92								
LOC107828946	peroxidase 12-like	-1.91	AT1G71695	72	67.0					
LOC107786347	protein CUP-SHAPED COTYLEDON 3-like	-1.90	AT1G76420				S			
LOC107825243	uncharacterized LOC107825243	-1.90	AT5G48850	73	65.0					
LOC107832408	B3 domain-containing protein At3g19184-like	-1.89	AT3G19184	59	41.4					
LOC107808735	uncharacterized LOC107808735	-1.88	AT4G22600	68	46.7					
LOC107766632	protein terminal ear1 homolog	-1.87	AT3G26120	65	47.6					
LOC107797496	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1-like	-1.86	AT4G17000	87	35.0					
LOC107768404	protein NETWORKED 3A-like	-1.86	AT1G03470	66	43.8					
LOC107814561	histone H2A.1-like	-1.85	AT5G59870	42	89.3					
LOC107796724	agamous-like MADS-box protein AGL11	-1.85	AT4G09960	63	61.8		S			
LOC107832810	protein OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3-like	-1.84	AT5G11270	42	60.9					
LOC107768220	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein	-1.84	AT5G13870	68	70.8					
LOC107815210	protein DOWNY MILDEW RESISTANCE 6-like	-1.83	AT5G24530	56	67.9					
LOC107759552	scarecrow-like protein 32	-1.83	AT3G49950	57	61.0					
LOC107829366	purine permease 1-like	-1.82	AT4G18220	78	30.5					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107786295	serine/threonine-protein kinase CDL1-like	-1.82	AT3G58690	69	76.1					
LOC107760034	uncharacterized LOC107760034	-1.80								
LOC107778560	FACT complex subunit SPT16-like	-1.79	AT4G10710	76	72.3		S			S
LOC107800855	histone H2AX-like	-1.79	AT1G54690	61	80.3					
LOC107761538	F-box protein At1g10780-like	-1.79	AT1G10780	69	62.6					
LOC107821555	tetratricopeptide repeat protein 5-like	-1.79								
LOC107801465	uncharacterized LOC107801465	-1.78	AT3G48410	73	41.4					
LOC107781439	WEB family protein At1g75720-like	-1.77	AT1G58070	73	38.6					
LOC107827377	protein S-acyltransferase 18-like	-1.77	AT4G01730	82	52.6					
LOC107820784	transcription factor bHLH96-like	-1.77	AT5G46690	52	42.9					
LOC107811693	uncharacterized LOC107811693	-1.77	AT5G25960	63	45.3					
LOC107795144	protein ELF4-LIKE 3-like	-1.77	AT2G06255	42	71.3					
LOC107825899	DNA topoisomerase 2-like	-1.77	AT3G23890	86	66.0				S	
LOC107816883	VAN3-binding protein-like	-1.76	AT4G14740	81	58.5					
LOC107774566	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1	-1.76	AT5G51560	80	60.4					
LOC107785635	cell wall protein DAN4-like	-1.75	AT1G15190	37	39.3					
LOC107803275	uncharacterized LOC107803275	-1.75								
LOC107826649	lysM domain-containing GPI-anchored protein 2-like	-1.74	AT2G17120	62	45.9					
LOC107787968	auxin response factor 5-like	-1.74	AT1G19850	74	60.2	S	S			
LOC107826776	putative fasciclin-like arabinogalactan protein 20	-1.74	AT5G40940	62	34.3					
LOC107806163	aspartyl protease AED3-like	-1.74	AT5G07030	78	65.3					
LOC107820431	zinc finger CCCH domain-containing protein 53-like	-1.73	AT3G51950	49	73.0					
LOC107767536	cytochrome P450 94A2-like	-1.73	AT1G34540	84	46.3					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107790549	zinc finger CCCH domain-containing protein 19-like	-1.72									
LOC107766219	phragmoplast orienting kinesin 2-like	-1.72	AT3G19050	91	49.0				S		
LOC107766403	tetratricopeptide repeat protein 5-like	-1.70									
LOC107762235	uncharacterized LOC107762235	-1.70									
LOC107827004	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 6, chloroplastic-like	-1.70	AT5G15250	87	77.5						
LOC107803598	65-kDa microtubule-associated protein 5-like	-1.70	AT5G55230	76	48.5				S		
LOC107811666	polygalacturonase At1g48100-like	-1.70	AT1G02460	65	70.6						
LOC107766698	BRCT domain-containing protein At4g02110-like	-1.70	AT4G02110	34	65.2						
LOC107762696	syntaxin-112-like	-1.69	AT2G18260	68	52.6						
LOC107761668	transcription factor MYC2-like	-1.69	AT4G00870	73	39.5						
LOC107827765	glutathione S-transferase U7-like	-1.69	AT1G59670	69	39.0						
LOC107816434	auxin transporter-like protein 2	-1.69	AT2G21050	70	89.8	S	S				
LOC107762752	protein MIZU-KUSSEI 1-like	-1.68	AT2G37880	52	56.7						
LOC107808336	uncharacterized LOC107808336	-1.68									
LOC107827137	WAT1-related protein At1g68170-like	-1.68	AT2G37460	62	38.7						
LOC107766794	uncharacterized LOC107766794	-1.67	AT4G24265	69	33.6						
LOC107761791	protein SRG1-like	-1.66	AT4G25300	75	52.5						
LOC107791208	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g27290	-1.66	AT4G27290	83	52.9						
LOC107820437	ABC transporter C family member 2-like	-1.66	AT1G30410	98	69.9						
LOC107803402	uncharacterized isomerase BH0283-like	-1.66	AT4G02850	68	51.1						
LOC107820516	protein JASON-like	-1.65	AT1G04030	73	37.6						
LOC107777130	beta-galactosidase 16-like	-1.65	AT1G77410	80	64.9						

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107775645	histone H3.2-like	-1.64	AT4G40030	64	91.7					
LOC107803097	dihydroflavonol-4-reductase	-1.64	AT5G42800	73	71.7					
LOC107778807	transcription factor HBP-1b(c38)-like	-1.64	AT1G68640	47	75.4		S			
LOC107786408	AAA-ATPase At4g25835-like	-1.64	AT4G30250	66	46.1					
LOC107765238	dof zinc finger protein DOF3.4-like	-1.64	AT3G50410	56	43.7	S			S	
LOC107772859	serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform-like	-1.64	AT3G25800	99	68.4					
LOC107822562	G2/mitotic-specific cyclin S13-7-like	-1.63	AT1G76310	73	39.0				S	
LOC107800257	uncharacterized LOC107800257	-1.63								
LOC107788017	arginine decarboxylase-like	-1.63								
LOC107797875	cytochrome P450 CYP72A219-like	-1.63	AT3G14690	85	45.6					
LOC107758984	protein DETOXIFICATION 42-like	-1.63	AT1G51340	75	67.5					
LOC107773152	agamous-like MADS-box protein AGL61	-1.63	AT4G36590	33	37.1					
LOC107826182	uncharacterized LOC107826182	-1.63	AT1G22030	37	49.4					
LOC107816226	monocopper oxidase-like protein SKU5	-1.63	AT5G48450	70	72.4					
LOC107824833	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase-like	-1.62	AT3G46940	51	81.2					S
LOC107775405	glycine oxidase-like	-1.62	AT5G48440	61	58.9					
LOC107824504	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	-1.62	AT3G46940	51	81.2					S
LOC107797887	probable inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At3g03770	-1.62	AT5G14210	74	38.2					
LOC107761045	uncharacterized LOC107761045	-1.62	AT5G58100	34	65.8					
LOC107823246	leucine-rich repeat receptor protein kinase EMS1-like	-1.61	AT1G55610	86	34.5					
LOC107769248	mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporter DTC-like	-1.61	AT5G19760	61	30.5					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107797521	probable alkaline/neutral invertase B	-1.61	AT4G34860	75	81.2					
LOC107821220	protein MIZU-KUSSEI 1-like	-1.60	AT2G37880	52	56.7					
LOC107772220	scopoletin glucosyltransferase-like	-1.60	AT4G34138	82	51.3					
LOC107798914	uncharacterized LOC107798914	-1.60								
LOC107767933	transcription factor bHLH96-like	-1.59	AT1G72210	66	45.4					
LOC107790212	uncharacterized LOC107790212	-1.59	AT1G64255	31	32.2					
LOC107771984	uncharacterized protein At4g00950-like	-1.59								
LOC107830440	reticuline oxidase-like	-1.59	AT5G44410	82	41.0					
LOC107759516	telomerase reverse transcriptase-like	-1.58	AT5G16850	79	48.9					
LOC107800531	RING-H2 finger protein ATL67-like	-1.58								
LOC107800861	histone H2AX-like	-1.57	AT1G08880	50	81.7					
LOC107774597	cyclin-dependent kinase inhibitor 3-like	-1.57	AT5G48820	56	48.7				S	
LOC107789894	sister chromatid cohesion 1 protein 3-like	-1.57	AT3G59550	82	37.3				S	
LOC107775913	CDT1-like protein a, chloroplastic	-1.57	AT2G31270	65	36.6				S	S
LOC107791227	flap endonuclease 1-like	-1.57	AT5G26680	75	82.2				S	S
LOC107800871	fasciclin-like arabinogalactan protein 21	-1.57								
LOC107822445	beta-galactosidase 3-like	-1.57	AT4G36360	78	71.2					
LOC107809546	agamous-like MADS-box protein AGL11	-1.56	AT4G09960	63	61.8		S			
LOC107800956	transcription factor bHLH94-like	-1.56	AT1G72210	66	45.4					
LOC107769802	protein trichome birefringence-like 6	-1.56	AT3G62390	78	54.8					
LOC107776881	dof zinc finger protein DOF2.5-like	-1.55	AT2G46590	58	45.1					
LOC107819581	B3 domain-containing transcription factor VRN1-like	-1.55	AT1G49480	33	38.5					
LOC107777436	uncharacterized LOC107777436	-1.54								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107777444	TPR repeat-containing protein ZIP4-like	-1.54	AT5G48390	93	57.1				S	
LOC107816438	uncharacterized LOC107816438	-1.54								
LOC107807244	protein QUIRKY-like	-1.54	AT5G48060	90	64.9					
LOC107797425	endoglucanase 24-like	-1.54	AT1G70710	86	60.9					
LOC107827570	probable aquaporin PIP1-5	-1.53	AT1G01620	79	88.0					
LOC107820566	uncharacterized LOC107820566	-1.53								
LOC107811080	uncharacterized LOC107811080	-1.53								
LOC107828687	THO complex subunit 1-like	-1.52	AT5G09860	72	82.6			S		
LOC107764055	pleiotropic drug resistance protein 3	-1.52	AT3G53480	95	67.0	S				
LOC107793890	uncharacterized LOC107793890	-1.52								
LOC107798290	protein yippee-like At3g08990	-1.52	AT3G08990	45	34.4					
LOC107810849	beta-glucosidase BoGH3B-like	-1.52	AT5G04885	75	65.2					
LOC107760589	uncharacterized LOC107760589	-1.52	AT3G18870	88	56.5					
LOC107784059	microtubule-binding protein TANGLED-like	-1.52	AT3G05330	64	52.6				S	
LOC107799833	BON1-associated protein 2-like	-1.51	AT3G61190	68	35.3					
LOC107790139	syntaxin-121-like	-1.51	AT3G52400	77	62.1					
LOC107808233	cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG3-like	-1.51	AT2G37210	62	75.8					
LOC107817790	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, chloroplastic-like	-1.51	AT3G03710	89	63.0			S		
LOC107813130	growth-regulating factor 3-like	-1.50	AT3G52910	60	47.9					
LOC107831335	protein cornichon homolog 4-like	-1.49	AT1G12390	41	54.5					
LOC107765603	uncharacterized LOC107765603	-1.49								
LOC107783794	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g09190-like	-1.49	AT1G09190	66	58.4					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107818805	histone H3.2	-1.49	AT4G40030	64	91.7					
LOC107827920	cysteine-rich repeat secretory protein 15-like	-1.48	AT3G60720	51	58.6					
LOC107781415	cellulose synthase-like protein D5	-1.48	AT1G02730	80	71.0				S	
LOC107759332	serine/threonine-protein kinase At3g07070-like	-1.48	AT3G07070	62	61.2					
LOC107816886	serine/threonine-protein kinase Nek2-like	-1.48	AT1G54510	78	62.1					
LOC107778480	F-box/LRR-repeat protein 17-like	-1.48	AT3G54650	77	60.0		S		S	
LOC107774752	uncharacterized LOC107774752	-1.48								
LOC107820340	uncharacterized LOC107820340	-1.47	AT1G05070	43	43.4					
LOC107764299	acyltransferase-like protein At1g54570, chloroplastic	-1.47	AT1G54570	39	64.5					
LOC107779738	high mobility group B protein 9	-1.47	AT1G55650	51	32.2					
LOC107784007	WAT1-related protein At5g40230-like	-1.46	AT5G40240	52	42.5					
LOC107795690	uncharacterized LOC107795690	-1.46								
LOC107789456	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g37250	-1.46	AT5G67280	85	48.1					
LOC107774668	DNA replication licensing factor MCM7-like	-1.46	AT4G02060	84	83.2				S	S
LOC107798848	fasciclin-like arabinogalactan protein 11	-1.46	AT5G03170	43	73.9					
LOC107814109	mRNA-decapping enzyme-like protein	-1.45	AT1G08370	51	76.3			S		
LOC107797453	uncharacterized LOC107797453	-1.45	AT5G24660	32	52.5					
LOC107804788	uncharacterized LOC107804788	-1.45								
LOC107784127	calcineurin B-like protein 1	-1.45	AT4G17615	53	82.2					
LOC107820463	uncharacterized LOC107820463	-1.45								
LOC107831337	uncharacterized LOC107831337	-1.45	AT3G60810	53	62.9					
LOC107800546	uncharacterized LOC107800546	-1.45								
LOC107810774	caffeoyl-CoA O-methyltransferase 6	-1.44	AT4G34050	72	81.2					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107794753	myosin heavy chain kinase B-like	-1.44	AT1G24530	70	37.0					
LOC107828329	ethylene-responsive transcription factor 13-like	-1.44	AT5G47220	73	40.4					
LOC107785429	homeobox-leucine zipper protein HAT3-like	-1.44	AT2G44910	35	58.9					
LOC107826928	arabinogalactan peptide 16-like	-1.44	AT5G24105	50	64.2					
LOC107784973	tetratricopeptide repeat protein 5-like	-1.44								
LOC107799027	uncharacterized LOC107799027	-1.44								
LOC107809041	patatin-17-like	-1.44	AT4G37060	72	47.8					
LOC107781216	importin subunit alpha-2-like	-1.44	AT4G16143	77	79.2					
LOC107819759	uncharacterized LOC107819759	-1.44								
LOC107812892	uncharacterized LOC107812892	-1.44	AT5G19900	41	69.8					
LOC107824988	probable helicase CHR10	-1.44	AT2G44980	76	58.0					
LOC107782229	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase-like	-1.43	AT5G27730	79	66.5					
LOC107828199	uncharacterized LOC107828199	-1.43								
LOC107798691	uncharacterized LOC107798691	-1.43								
LOC107828419	GDSL esterase/lipase At1g09390-like	-1.43	AT1G54790	73	43.4					
LOC107817958	ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like	-1.43	AT3G16770	70	42.0					
LOC107760307	glycine-rich cell wall structural protein-like	-1.43								
LOC107799705	DNA replication licensing factor MCM4-like	-1.42	AT2G16440	86	72.9				S	S
LOC107826020	kinesin-1-like protein PSS1	-1.42	AT3G63480	85	59.0		S		S	
LOC107811097	probable glutamate carboxypeptidase 2	-1.42	AT3G54720	83	57.9		S			
LOC107775779	rab9 effector protein with kelch motifs-like	-1.42	AT1G18610	41	37.4					
LOC107832568	polyamine oxidase 1	-1.42	AT5G13700	70	77.0					
LOC107829827	protein argonaute PNH1-like	-1.42	AT5G43810	79	74.9		S			

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107799156	transcription factor UNE10-like	-1.42	AT4G00050	68	47.1					
LOC107760073	probable E3 ubiquitin-protein ligase BAH1-like 1	-1.41	AT1G02860	61	62.4					
LOC107759234	uncharacterized LOC107759234	-1.41								
LOC107784565	histone H1-like	-1.41								
LOC107809288	Fanconi anemia group D2 protein homolog	-1.41	AT4G14970	86	52.5					
LOC107830916	DNA-damage-repair/toleration protein DRT102-like	-1.41	AT3G04880	69	62.8					S
LOC107764067	glutathione transferase GST 23-like	-1.41	AT3G09270	62	48.9					
LOC107787303	histone H3-like centromeric protein HTR12	-1.41								
LOC107812938	uncharacterized LOC107812938	-1.41	AT2G31920	83	37.0					
LOC107804233	RAN GTPase-activating protein 1-like	-1.40	AT3G63130	71	69.8				S	
LOC107765912	WD-40 repeat-containing protein MSI2-like	-1.40	AT2G16780	75	69.9					
LOC107759696	fimbrin-2-like	-1.40	AT5G48460	83	79.0					
LOC107799650	uncharacterized LOC107799650	-1.40	AT4G26410	56	55.6					
LOC107798039	beta-D-glucosyl crocetin beta-1,6-glucosyltransferase-like	-1.39	AT5G49690	84	32.4					
LOC107814456	double-stranded RNA-binding protein 4-like	-1.39	AT3G26932	56	36.6					
LOC107819676	uncharacterized LOC107819676	-1.39								
LOC107790838	serine/threonine-protein kinase CDL1-like	-1.39	AT3G58690	69	76.1					
LOC107775464	uncharacterized LOC107775464	-1.39	AT2G38780	43	62.9					
LOC107783790	uncharacterized LOC107783790	-1.38	AT3G62630	69	53.6					
LOC107831328	probable calcium-binding protein CML18	-1.38	AT3G10190	31	41.6					
LOC107830937	protein SULFUR DEFICIENCY-INDUCED 1-like	-1.38	AT5G48850	73	65.0					
LOC107823899	uncharacterized LOC107823899	-1.38	AT3G15351	66	60.0					
LOC107800142	zinc finger protein 4-like	-1.38								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107815131	transcription factor TCP4-like	-1.38	AT1G53230	52	38.6	S				
LOC107807022	mitotic checkpoint protein BUB3.1	-1.37	AT3G19590	64	85.1				S	
LOC107802179	uncharacterized LOC107802179	-1.37	AT3G03790	78	61.5					
LOC107816428	RPM1-interacting protein 4-like	-1.37	AT3G25070	61	34.9					
LOC107812251	uncharacterized LOC107812251	-1.37	AT1G25220	38	85.4					
LOC107771921	ABC transporter G family member 11-like	-1.37	AT1G17840	89	50.0		S			
LOC107814700	(E,E)-geranylinalool synthase-like	-1.37	AT1G61120	74	44.9					
LOC107794555	thaumatin-like protein 1	-1.37	AT4G38660	40	73.8					
LOC107828330	separase-like	-1.37	AT4G22970	95	39.7		S		S	
LOC107820279	scarecrow-like protein 28	-1.37	AT2G01570	75	37.1		S		S	
LOC107818114	formin-like protein 1	-1.37	AT3G25500	54	77.3					
LOC107789216	RING-H2 finger protein ATL16-like	-1.37	AT1G04360	56	45.8					
LOC107830712	uncharacterized LOC107830712	-1.36								
LOC107788254	small ubiquitin-related modifier 1-like	-1.36	AT5G55856	43	52.3					
LOC107819076	uncharacterized LOC107819076	-1.36	AT3G42170	38	36.4					
LOC107821048	ATP-dependent DNA helicase Q-like 4A	-1.36	AT1G10930	86	59.5					S S
LOC107798452	uncharacterized LOC107798452	-1.36								
LOC107817045	GPN-loop GTPase 1-like	-1.35	AT4G21800	65	77.8					
LOC107830492	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g56310-like	-1.35	AT3G46790	98	67.6			S		
LOC107787640	uncharacterized protein Osl_027940-like	-1.35								
LOC107788138	DUF21 domain-containing protein At4g14240-like	-1.35	AT4G14240	65	73.1					
LOC107786947	uncharacterized LOC107786947	-1.35	AT4G23930	49	43.8					
LOC107810092	remorin-like	-1.35	AT2G45820	61	59.2					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107788088	probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA4	-1.35	AT5G11320	93	69.8		S			
LOC107780638	formin-like protein 11	-1.34	AT3G05470	54	70.4					
LOC107802940	chemocyanin-like	-1.34	AT2G32300	55	41.2					
LOC107816046	probable sulfate transporter 3.4	-1.34	AT3G15990	84	73.3					
LOC107831936	alpha-N-acetylglucosaminidase-like	-1.34	AT5G13690	81	71.0		S			
LOC107768113	uncharacterized LOC107768113	-1.34	AT2G14880	46	60.1					
LOC107802952	axial regulator YABBY 1-like	-1.34	AT2G45190	54	66.7		S			
LOC107758985	uncharacterized LOC107758985	-1.34								
LOC107796170	WUSCHEL-related homeobox 1-like	-1.34	AT3G18010	71	40.8					
LOC107823904	CASP-like protein 1F1	-1.34	AT4G25040	43	33.6					
LOC107792980	uncharacterized LOC107792980	-1.34	AT1G45207	61	44.8					
LOC107801140	transcription repressor OFP12-like	-1.33	AT2G32100	38	40.8					
LOC107811955	putative lipid-transfer protein DIR1	-1.33	AT5G55410	63	33.3					
LOC107789014	transcription factor bHLH69-like	-1.33								
LOC107772839	uncharacterized LOC107772839	-1.33	AT2G20980	68	53.9					S
LOC107830684	inactive protein RESTRICTED TEV MOVEMENT 1-like	-1.33	AT1G73040	39	35.2					
LOC107769207	protein DMR6-LIKE OXYGENASE 2-like	-1.33	AT3G60290	31	58.8					
LOC107766358	amidophosphoribosyltransferase, chloroplastic-like	-1.33	AT4G34740	78	85.2					
LOC107770528	rac-like GTP-binding protein RAC2	-1.33	AT2G44690	53	81.3					
LOC107773390	heat stress transcription factor B-4-like	-1.33	AT1G46264	71	52.1					
LOC107804392	uncharacterized LOC107804392	-1.33	AT5G09860	72	82.6			S		
LOC107827376	uncharacterized LOC107827376	-1.33	AT4G01790	53	48.0					
LOC107798209	protein CHROMATIN REMODELING 24-like	-1.33	AT5G63950	54	69.8					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107792664	putative lipid-transfer protein DIR1	-1.33	AT5G48490	58	43.4					
LOC107815164	uncharacterized protein At1g66480-like	-1.33	AT2G01340	58	47.8					
LOC107778615	sister chromatid cohesion protein DCC1-like	-1.33	AT2G44580	67	58.4					
LOC107824739	WD-40 repeat-containing protein MSI1	-1.32	AT5G58230	75	91.5		S		S	S
LOC107817827	serine/threonine-protein kinase SRK2A-like	-1.32	AT1G60940	46	89.5					
LOC107814997	uncharacterized LOC107814997	-1.32	AT4G01270	54	58.9					
LOC107796519	probable inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At3g03770	-1.32	AT5G14210	74	38.2					
LOC107776090	thioredoxin M3, chloroplastic-like	-1.32	AT2G15570	34	63.8					
LOC107807893	protein argonaute 4A-like	-1.32	AT2G27040	87	68.8			S		
LOC107772823	patatin-T5-like	-1.32	AT4G37050	76	49.5					
LOC107802780	nuclear pore complex protein NUP214-like	-1.31	AT1G55540	47	53.2		S			
LOC107775021	uncharacterized LOC107775021	-1.31	AT2G32640	67	70.6					
LOC107829971	3-ketoacyl-CoA synthase 11-like	-1.31	AT2G26640	80	75.4					
LOC107782329	uncharacterized LOC107782329	-1.31	AT5G56530	70	78.8					
LOC107801011	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-1.31	AT2G29960	71	66.7					
LOC107795691	uncharacterized LOC107795691	-1.31	AT1G01920	73	62.4					
LOC107794585	RING-H2 finger protein ATL54-like	-1.31	AT1G72220	41	40.8					
LOC107831333	65-kDa microtubule-associated protein 3-like	-1.31	AT5G51600	81	46.9				S	
LOC107789435	uncharacterized LOC107789435	-1.31								
LOC107806159	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g13600-like	-1.31	AT4G02750	80	35.3					
LOC107824503	phospholipase D zeta 1-like	-1.31	AT3G05630	88	70.1	S				
LOC107760517	uncharacterized LOC107760517	-1.30	AT5G39520	52	49.2					
LOC107805228	uncharacterized LOC107805228	-1.30	AT5G64360	44	50.4		S			

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107820930	transcription factor MYB3-like	-1.30	AT1G35515	61	56.1					
LOC107830518	beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase 2-like	-1.30	AT5G10560	87	46.2					
LOC107794301	uncharacterized LOC107794301	-1.30	AT4G19950	73	60.4					
LOC107761631	RNA-binding protein BRN1-like	-1.30	AT4G03110	59	66.8		S			
LOC107827621	dof zinc finger protein DOF2.4-like	-1.30	AT3G55370	66	37.0					
LOC107804960	aladin-like	-1.30	AT3G56900	72	46.0					
LOC107799072	poly [ADP-ribose] polymerase 1-like	-1.30	AT2G31320	85	68.9					S S
LOC107761011	dynammin-related protein 4C-like	-1.30	AT1G60500	78	60.5					
LOC107817902	keratin, type I cytoskeletal 9-like	-1.29								
LOC107764202	putative kinase-like protein TMKL1	-1.29	AT5G53320	71	31.7					
LOC107791428	uncharacterized LOC107791428	-1.29								
LOC107814815	uncharacterized LOC107814815	-1.29								
LOC107762255	L-cysteine desulfhydrase-like	-1.29	AT3G62130	76	65.0					
LOC107810731	TOM1-like protein 2	-1.29	AT1G06210	58	57.5					
LOC107822440	protein CHROMATIN REMODELING 35-like	-1.29	AT2G16390	79	55.1			S		
LOC107759515	uncharacterized LOC107759515	-1.29	AT3G52110	60	41.3					
LOC107790561	flotillin-like protein 6	-1.29	AT5G64870	68	63.9					
LOC107816935	uncharacterized LOC107816935	-1.29								
LOC107765472	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase, chloroplastic-like	-1.29	AT4G34350	79	77.9					
LOC107761932	nitrogen regulatory protein P-II homolog	-1.28	AT4G01900	39	77.1					
LOC107795210	alcohol dehydrogenase-like	-1.28	AT4G22110	43	41.4					
LOC107775919	defensin-like protein P322	-1.28	AT2G02120	43	62.8					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107823653	membrane-bound transcription factor site-2 protease homo-log	-1.28									
LOC107808356	upstream activation factor subunit spp27-like	-1.28	AT3G19080	64	52.3						
LOC107812219	root phototropism protein 3-like	-1.28	AT5G64330	86	72.0						
LOC107775980	serine/threonine-protein kinase Nek2-like	-1.28	AT1G54510	78	62.1						
LOC107772989	uncharacterized LOC107772989	-1.28									
LOC107802292	uncharacterized protein At5g05190-like	-1.28	AT3G61670	61	57.1						
LOC107798916	probable WRKY transcription factor 21	-1.28	AT2G30590	55	56.0						
LOC107780768	uncharacterized LOC107780768	-1.28									
LOC107795010	DNA polymerase eta	-1.28	AT5G44740	75	76.8					S	S
LOC107806127	protein IQ-DOMAIN 14-like	-1.28	AT4G23060	46	43.6						
LOC107789167	transcription factor bHLH91-like	-1.28	AT2G31210	72	37.2		S				
LOC107782007	perakine reductase-like	-1.28	AT1G60710	77	59.4						
LOC107823475	uncharacterized LOC107823475	-1.28									
LOC107798652	potassium channel AKT2/3-like	-1.28	AT2G26650	79	42.6						
LOC107822216	S-adenosylmethionine synthase 1-like	-1.27	AT1G02500	76	93.9						
LOC107813996	uncharacterized LOC107813996	-1.27	AT5G48470	66	68.3						
LOC107770901	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal-like	-1.27	AT2G33150	78	78.4						
LOC107792917	uncharacterized LOC107792917	-1.27									
LOC107771834	uncharacterized LOC107771834	-1.27									
LOC107832426	probable inactive patatin-like protein 9	-1.27	AT3G63200	70	69.7						
LOC107816422	cell division control protein 45 homolog	-1.27	AT3G25100	78	72.8				S	S	S
LOC107817772	uncharacterized LOC107817772	-1.27	AT2G47230	52	35.8						
LOC107826559	homeobox protein knotted-1-like LET6	-1.27	AT1G62360	38	80.2		S				

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107817276	squamosa promoter-binding-like protein 8	-1.27	AT1G02065	65	48.7		S		S	
LOC107812044	myosin-11-like	-1.27	AT5G26770	67	64.5					
LOC107768359	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like	-1.27	AT5G17920	85	89.0					
LOC107806395	elicitor-responsive protein 1-like	-1.27	AT3G55470	54	48.7					
LOC107795520	uncharacterized LOC107795520	-1.27	AT1G53860	73	47.3					
LOC107823703	uncharacterized LOC107823703	-1.27	AT1G31040	59	79.8					
LOC107781973	probable beta-D-xylosidase 2	-1.27	AT1G02640	85	73.2					
LOC107768087	uncharacterized LOC107768087	-1.26	AT2G15730	50	64.9					
LOC107776088	probable receptor-like protein kinase At1g49730	-1.26	AT3G19300	68	60.5					
LOC107808925	uncharacterized LOC107808925	-1.26	AT3G53440	44	40.4					
LOC107796844	uncharacterized LOC107796844	-1.26	AT1G01840	56	34.6					
LOC107819824	jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like	-1.26	AT4G03400	86	69.4	S				
LOC107787874	kinesin-like protein KIFC3	-1.26	AT5G27550	79	60.6					
LOC107775403	protein FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3-like	-1.26	AT2G43280	43	43.5					
LOC107809661	mucin-5AC-like	-1.26								
LOC107763939	nucleolar protein 56-like	-1.26	AT3G12860	62	79.6					
LOC107824481	L-galactose dehydrogenase-like	-1.26	AT4G33670	74	80.1					
LOC107796782	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 1, chloroplast-like	-1.26	AT2G45300	72	74.2					
LOC107792919	uncharacterized LOC107792919	-1.26	AT3G02430	50	59.7					
LOC107800476	alcohol dehydrogenase-like	-1.25	AT1G22430	74	42.7					
LOC107815200	protein QUIRKY-like	-1.25	AT5G17980	76	71.5					
LOC107815121	caffeoylshikimate esterase-like	-1.25	AT3G62860	68	68.0					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107831330	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g01970-like	-1.25	AT1G01970	54	54.6					
LOC107807457	auxin response factor 5-like	-1.25	AT1G19850	74	60.2	S	S			
LOC107830607	cytochrome P450 89A2-like	-1.25	AT1G64940	75	51.8					
LOC107802284	putative lipid-transfer protein DIR1	-1.25	AT5G48490	58	43.4					
LOC107813680	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein-like	-1.25	AT4G16830	42	58.4					
LOC107784306	sec-independent protein translocase protein TATA, chloro- plastic-like	-1.25	AT5G28750	30	63.0					
LOC107774375	soluble inorganic pyrophosphatase 6, chloroplastic-like	-1.25	AT5G09650	64	81.9					
LOC107828133	FRIGIDA-like protein 5	-1.25	AT5G48385	67	32.2		S			
LOC107772684	uncharacterized LOC107772684	-1.25	AT2G45790	73	81.7					
LOC107814560	autophagy-related protein 18a-like	-1.25	AT3G62770	61	75.1					
LOC107770529	cytochrome c oxidase-assembly factor COX23, mitochon- drial-like	-1.25	AT1G02160	31	86.0					
LOC107804240	uncharacterized LOC107804240	-1.24								
LOC107774565	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g45350, chloroplastic-like	-1.24	AT2G22410	89	34.2					
LOC107799279	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta 1, mitochon- drial-like	-1.24	AT5G50850	79	35.2					
LOC107778724	protein WVD2-like 4	-1.24	AT2G35880	52	43.4					
LOC107790891	uncharacterized membrane protein At1g16860-like	-1.24	AT1G16860	59	40.7					
LOC107814297	ATP-dependent DNA helicase Q-like 1	-1.24	AT3G05740	75	66.8					S
LOC107768857	dehydrogenase/reductase SDR family member 12-like	-1.24	AT4G09750	48	79.6					
LOC107823544	protein RRP6-like 2	-1.24	AT5G35910	88	50.1			S		
LOC107794637	60S ribosomal protein L19-3-like	-1.24	AT4G02230	63	91.7					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107820519	BRCA1-associated RING domain protein 1-like	-1.24	AT1G04020	73	47.5				S		S
LOC107799124	DNA-binding protein HEXBP-like	-1.24	AT3G42860	59	48.1						
LOC107784555	CBS domain-containing protein CBSX1, chloroplastic-like	-1.24	AT4G34120	34	79.6						
LOC107767002	filament-like plant protein 7	-1.24	AT3G19370	60	34.9						
LOC107787841	uncharacterized LOC107787841	-1.24	AT1G75710	82	45.8						
LOC107780767	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 31-like	-1.23	AT5G08610	63	78.2						
LOC107777966	basic blue protein-like	-1.23	AT2G02850	63	57.9		S				
LOC107799883	uncharacterized LOC107799883	-1.23	AT5G66440	51	31.0						
LOC107815294	putative quinone-oxidoreductase homolog, chloroplastic	-1.23	AT4G13010	70	75.8						
LOC107823524	probable membrane-associated kinase regulator 2	-1.23	AT1G64080	49	33.7						
LOC107797640	methylthioribose kinase 1-like	-1.23	AT1G49820	66	74.3						
LOC107782347	wound-induced proteinase inhibitor 2-like	-1.23									
LOC107830857	glycosyltransferase family 92 protein Os08g0121900-like	-1.23	AT4G37420	74	48.1						
LOC107799229	myosin-11-like	-1.23	AT2G45460	79	49.3						
LOC107819758	probable DNA helicase MCM9	-1.23	AT2G14050	75	76.6				S	S	S
LOC107824825	uncharacterized LOC107824825	-1.23	AT5G28040	80	43.3						
LOC107764048	probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase At3g49630	-1.23	AT3G49620	75	55.4						
LOC107814722	AP-3 complex subunit sigma-like	-1.23	AT3G50860	47	71.1						
LOC107789440	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial	-1.23	AT3G22470	44	34.0						
LOC107819199	bromodomain-containing protein DDB_G0270170-like	-1.23	AT2G44430	52	42.3						
LOC107766361	probable ribosome-binding factor A, chloroplastic	-1.22	AT4G34730	51	71.5			S			
LOC107760987	probable histone H2A variant 1	-1.22	AT2G38810	38	88.0		S				

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107818010	uncharacterized LOC107818010	-1.22								
LOC107826194	patatin group D-3-like	-1.22	AT4G37070	76	41.9					
LOC107779593	mitochondrial import receptor subunit TOM6 homolog	-1.22								
LOC107776796	protein EXORDIUM-like 2	-1.22	AT5G64260	73	64.5					
LOC107759576	HMG1/2-like protein	-1.22	AT2G17560	32	51.8					
LOC107811884	copper-transporting ATPase PAA1, chloroplastic-like	-1.22	AT5G21930	91	42.8					
LOC107766562	methyltransferase-like protein 13	-1.22	AT5G04610	72	48.5					
LOC107764231	origin of replication complex subunit 1-like	-1.22	AT4G14700	70	70.4					S
LOC107806322	probable linoleate 9S-lipoxygenase 5	-1.22	AT1G55020	85	68.1					
LOC107806323	protein AUXIN RESPONSE 4-like	-1.22	AT1G54990	62	53.7	S				
LOC107810540	defensin-like protein P322	-1.22	AT2G02130	36	62.8					
LOC107831338	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU80	-1.22	AT1G48050	79	59.3					S
LOC107819127	chromatin modification-related protein EAF1 B-like	-1.22	AT3G24880	87	45.8					
LOC107795797	putative lipid-transfer protein DIR1	-1.22	AT5G55410	63	33.3					
LOC107805290	transcription factor TCP4-like	-1.22								
LOC107762847	sm-like protein LSM2	-1.22	AT1G03330	50	95.5			S		
LOC107798469	transcription repressor OFP7-like	-1.22	AT2G18500	41	66.3					
LOC107813434	histidine-containing phosphotransfer protein 1-like	-1.22	AT1G03430	43	57.0					
LOC107826444	SPX domain-containing protein 3-like	-1.22	AT2G45130	66	62.4					
LOC107769372	sm-like protein LSM4	-1.22	AT5G27720	44	100.0		S	S		
LOC107822432	uncharacterized LOC107822432	-1.22								
LOC107784909	uncharacterized LOC107784909	-1.21	AT4G28760	81	42.7					
LOC107764306	copper-transporting ATPase PAA1, chloroplastic-like	-1.21								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107800078	serine/threonine-protein kinase SMG1-like	-1.21								
LOC107775643	putative invertase inhibitor	-1.21	AT5G46940	53	34.0					
LOC107786678	RAB6A-GEF complex partner protein 1-like	-1.21	AT5G28350	84	71.9					
LOC107778286	myosin-12-like	-1.21	AT2G31900	79	83.0					
LOC107770592	probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase A6	-1.21	AT3G07320	71	66.4					
LOC107799442	zinc finger CCCH domain-containing protein 19-like	-1.21	AT2G16485	87	42.7					
LOC107821882	putative UPF0481 protein At3g02645	-1.21	AT4G31980	79	36.4					
LOC107788817	origin of replication complex subunit 5-like	-1.21	AT4G29910	71	54.8					S
LOC107760593	probable receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g34500	-1.21	AT4G34500	66	64.4					
LOC107792918	tRNA pseudouridine synthase A-like	-1.21	AT1G09800	67	65.2					
LOC107813436	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase 1, chloroplastic-like	-1.21	AT2G44040	62	73.8					
LOC107828151	uncharacterized LOC107828151	-1.21								
LOC107830494	uncharacterized LOC107830494	-1.21	AT1G71190	67	74.6					
LOC107763121	zinc finger CCCH domain-containing protein 69-like	-1.21	AT3G08505	43	57.7					
LOC107828333	WD-40 repeat-containing protein MSI1	-1.21	AT5G58230	75	91.5		S		S	S
LOC107822865	uncharacterized LOC107822865	-1.21	AT5G36740	41	45.5					
LOC107783375	uncharacterized protein YpgQ-like	-1.21	AT1G17330	55	74.7					
LOC107797700	chaperonin 60 subunit beta 2, chloroplastic-like	-1.21	AT3G13470	82	88.5					
LOC107805334	uncharacterized LOC107805334	-1.21	AT4G35080	74	61.5					
LOC107783026	uncharacterized LOC107783026	-1.21	AT1G77500	45	32.4					
LOC107779783	rust resistance kinase Lr10-like	-1.21	AT1G67000	54	44.1					
LOC107831593	uncharacterized LOC107831593	-1.21								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107773051	zinc finger CCCH domain-containing protein 5-like	-1.21								
LOC107797479	GDP-mannose 3,5-epimerase 1-like	-1.21	AT5G28840	75	90.5					
LOC107796439	methionine adenosyltransferase 2 subunit beta-like	-1.21	AT4G00560	57	64.6					
LOC107819712	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP62-like	-1.21	AT5G48570	77	77.8					
LOC107812404	PTI1-like tyrosine-protein kinase 2	-1.21	AT1G77280	66	44.7					
LOC107764799	uncharacterized LOC107764799	-1.21	AT5G66800	64	43.2					
LOC107787314	alpha-crystallin domain-containing protein 22.3-like	-1.20	AT1G54850	42	46.0					
LOC107827720	cis-abienol synthase, chloroplastic-like	-1.20	AT1G79460	92	40.1					
LOC107822438	probable receptor-like protein kinase At4g39110	-1.20	AT4G39110	79	62.4					
LOC107778955	protein NRT1/ PTR FAMILY 5.5-like	-1.20	AT2G38100	56	40.3					
LOC107803776	phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P-like	-1.20								
LOC107775735	isoamylase 2, chloroplastic-like	-1.20	AT1G03310	79	55.2					
LOC107807267	uncharacterized LOC107807267	-1.20	AT5G19430	66	54.5					
LOC107767634	33 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic	-1.20	AT3G52380	40	71.0			S		
LOC107762694	glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1	-1.20	AT4G39210	70	66.7					
LOC107800100	24-methylenesterol C-methyltransferase 2-like	-1.20	AT1G20330	74	83.9				S	S
LOC107803012	geranylgeranyl diphosphate reductase, chloroplastic-like	-1.20	AT1G74470	66	63.5					
LOC107811317	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g14770, mitochondrial-like	-1.20	AT5G14770	62	40.3					
LOC107796842	protein-ribulosamine 3-kinase, chloroplastic-like	-1.20	AT3G61080	71	80.5					
LOC107789419	F-box/kelch-repeat protein SKIP4-like	-1.20	AT3G61350	74	51.4					
LOC107786514	magnesium-dependent phosphatase 1-like	-1.20	AT2G14110	62	75.8					
LOC107774569	sm-like protein LSM8	-1.20	AT1G65700	31	86.7			S		

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107793996	uncharacterized LOC107793996	-1.18	AT1G73760	80	32.0					
LOC107771609	40S ribosomal protein S12-like	-1.18	AT1G15930	37	71.0					
LOC107785718	bifunctional protein FOLD 1, mitochondrial-like	-1.18	AT2G38660	48	61.6					
LOC107809530	protein TPX2-like	-1.18	AT4G22860	69	42.0				S	
LOC107832342	eukaryotic translation initiation factor 4G-like	-1.18	AT3G60240	71	55.8					
LOC107794639	probable ethylene response sensor 1	-1.18	AT1G66340	76	70.0	S				
LOC107818520	tetratricopeptide repeat protein 7A-like	-1.18	AT1G27460	72	59.5					
LOC107787348	heavy metal-associated isoprenylated plant protein 3-like	-1.18								
LOC107799254	UPF0235 protein C15orf40 homolog	-1.18	AT1G49170	45	73.0					
LOC107772916	acylsugar acyltransferase 3-like	-1.18	AT3G30280	99	30.5					
LOC107775892	uncharacterized LOC107775892	-1.18	AT3G60400	63	49.1			S		
LOC107799791	probable Xaa-Pro aminopeptidase 3	-1.18	AT1G09300	73	70.1					
LOC107830495	probable importin subunit beta-4	-1.18	AT4G27640	61	71.5					
LOC107827727	FK506-binding protein 4-like	-1.18								
LOC107829225	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial-like	-1.18	AT2G14170	53	67.1					
LOC107816889	protein NETWORKED 1D-like	-1.18	AT1G03080	77	51.1					S
LOC107786513	uncharacterized LOC107786513	-1.18	AT4G33625	44	63.2					
LOC107789455	protein TIC 21, chloroplastic-like	-1.18	AT2G15290	51	75.6					
LOC107797886	uncharacterized LOC107797886	-1.18								
LOC107781895	protein RBL-like	-1.18	AT3G21060	68	73.0		S			
LOC107779204	rho-N domain-containing protein 1, chloroplastic	-1.18	AT1G06190	78	38.6			S		
LOC107773763	dual-specificity RNA methyltransferase RImN-like	-1.18	AT3G19630	66	76.8					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107817392	leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM3	-1.18	AT1G08590	77	38.8		S			
LOC107808405	bifunctional protein FoD 1, mitochondrial-like	-1.18	AT2G38660	48	61.6					
LOC107804510	dof zinc finger protein DOF3.4-like	-1.17	AT3G50410	56	43.7	S			S	
LOC107830509	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ-like	-1.17	AT5G10160	56	72.2					
LOC107831354	uncharacterized HIT-like protein MT1300	-1.17	AT5G48545	42	57.3					
LOC107812218	serine/threonine-protein kinase PEPKR2-like	-1.17	AT1G12680	57	58.3					
LOC107787876	mitogen-activated protein kinase kinase kinase NPK1-like	-1.17	AT1G09000	74	54.8		S			
LOC107800310	cyclin-C1-2-like	-1.17	AT5G48640	58	74.2				S	
LOC107808374	probable purine permease 11	-1.17	AT1G44750	77	63.7					
LOC107759126	uncharacterized LOC107759126	-1.17	AT5G56120	57	60.2					
LOC107769800	histone-lysine N-methyltransferase EZA1-like	-1.17	AT2G23380	92	54.3		S			
LOC107760984	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP63-like	-1.17								
LOC107773077	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g62930, chloroplastic-like	-1.17								
LOC107826761	peter Pan-like protein	-1.17	AT5G61770	62	78.9					
LOC107804381	THO complex subunit 1-like	-1.16	AT5G09860	72	82.6			S		
LOC107793216	uncharacterized LOC107793216	-1.16	AT5G12350	74	50.8					
LOC107815805	26S protease regulatory subunit S10B homolog B-like	-1.16	AT1G45000	71	94.5					
LOC107810183	uncharacterized LOC107810183	-1.16								
LOC107773925	uncharacterized protein At3g28850	-1.16	AT5G03870	80	46.3					
LOC107809856	uncharacterized LOC107809856	-1.16	AT5G26850	89	54.3					
LOC107777523	probable WRKY transcription factor 23	-1.16	AT3G62340	36	40.4					
LOC107759517	ATP synthase subunit O, mitochondrial-like	-1.16	AT5G13450	69	57.0					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107828516	aminoacylase-1-like	-1.16	AT4G38220	79	70.7					
LOC107819998	transcription factor SCREAM2-like	-1.16	AT2G40435	51	56.3					
LOC107787194	rho GTPase-activating protein 7-like	-1.16	AT5G19390	81	67.4				S	
LOC107792903	TVP38/TMEM64 family membrane protein slr0305-like	-1.16	AT1G12450	57	41.6					
LOC107812534	uncharacterized LOC107812534	-1.16	AT2G46980	53	37.3				S	
LOC107791973	trihelix transcription factor ASR3-like	-1.16	AT1G31310	46	60.6					
LOC107797280	cx9C motif-containing protein 4-like	-1.16								
LOC107803600	cytochrome P450 98A2-like	-1.16	AT2G40890	83	32.5					
LOC107789454	cell division cycle protein 123 homolog	-1.16	AT4G05440	73	60.1				S	
LOC107771986	uncharacterized LOC107771986	-1.16	AT2G46550	61	38.2					
LOC107792899	nuclear pore complex protein NUP160	-1.16	AT1G33410	85	47.8	S				
LOC107815194	plastid division protein PDV2-like	-1.16	AT2G16070	67	42.2					
LOC107810184	AT-hook motif nuclear-localized protein 9-like	-1.15	AT2G45850	57	47.6					
LOC107814816	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-like	-1.15	AT3G08505	43	57.7					
LOC107831030	K(+) efflux antiporter 2, chloroplastic-like	-1.15	AT1G01790	89	64.7					
LOC107818899	F-box/kelch-repeat protein At3g23880-like	-1.15								
LOC107782006	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g34300	-1.15	AT5G24080	81	32.6					
LOC107770526	nucleolin-like	-1.15	AT2G44710	63	61.2					
LOC107825682	protein SAD1/UNC-84 domain protein 1-like	-1.15	AT5G04990	58	52.4					
LOC107765395	uncharacterized LOC107765395	-1.15	AT5G64230	62	47.7					
LOC107803038	classical arabinogalactan protein 9-like	-1.15								
LOC107775741	protein PALE CRESS, chloroplastic-like	-1.15	AT2G48120	60	65.9			S		
LOC107763315	uncharacterized LOC107763315	-1.15	AT1G09320	61	42.7					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107764891	uncharacterized LOC107764891	-1.14	AT5G19900	41	69.8					
LOC107796854	uncharacterized LOC107796854	-1.14	AT5G19820	87	51.5		S			
LOC107780053	bifunctional riboflavin biosynthesis protein RIBA 1, chloro-plastic-like	-1.14	AT5G64300	72	75.3					
LOC107794891	zinc-finger homeodomain protein 2-like	-1.14	AT5G65410	58	47.6		S			
LOC107775890	uncharacterized LOC107775890	-1.14								
LOC107788226	ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	-1.14	AT1G06720	76	63.4					
LOC107830439	crossover junction endonuclease MUS81-like	-1.14	AT4G30870	81	54.3				S	S
LOC107811709	type I inositol polyphosphate 5-phosphatase 4-like	-1.14	AT3G63240	49	67.7					S
LOC107759681	uncharacterized LOC107759681	-1.14								
LOC107820783	uncharacterized LOC107820783	-1.14								
LOC107788813	ubiquitin-conjugating enzyme E2-23 kDa-like	-1.13	AT1G63800	62	80.9					
LOC107825338	DNA mismatch repair protein MSH6-like	-1.13	AT4G02070	83	63.1					S
LOC107760596	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase-like	-1.13	AT4G34480	71	67.7					
LOC107822083	uncharacterized LOC107822083	-1.13	AT3G22550	60	38.4					
LOC107803601	dr1-associated corepressor-like	-1.13	AT5G19490	58	45.3					
LOC107771837	leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM3	-1.13	AT4G20270	84	62.8		S			
LOC107762688	nucleoside diphosphate kinase 1-like	-1.13	AT4G09320	52	75.7					
LOC107795926	DExH-box ATP-dependent RNA helicase DExH3-like	-1.13	AT2G01130	70	60.5					
LOC107760590	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial-like	-1.13	AT1G79010	49	83.4					
LOC107790989	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g15690	-1.13	AT4G32450	58	36.3					
LOC107824336	40S ribosomal protein S8	-1.13	AT5G20290	63	81.9					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107804026	cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1-like	-1.13	AT2G02560	83	80.4	S	S			
LOC107775401	protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5-like	-1.13	AT3G07500	47	58.1					
LOC107784553	polyadenylate-binding protein 8-like	-1.13	AT1G49760	71	74.6					
LOC107796547	acyltransferase-like protein At1g54570, chloroplastic	-1.13	AT1G54570	39	64.5					
LOC107814296	uncharacterized LOC107814296	-1.13	AT1G56310	36	68.1					
LOC107793299	glycine-rich RNA-binding protein RZ1A-like	-1.13								
LOC107773479	phosphomannomutase-like	-1.13	AT2G45790	73	81.7					
LOC107830438	cell division control protein 48 homolog C-like	-1.13	AT3G01610	80	53.4		S		S	
LOC107824959	auxin-induced protein 22D-like	-1.13	AT5G43700	53	59.9	S				
LOC107770544	glutamate--tRNA ligase, cytoplasmic-like	-1.13	AT5G26710	80	72.6					
LOC107782008	uncharacterized LOC107782008	-1.12								
LOC107788752	putative nuclease HARBI1	-1.12	AT3G19120	55	70.7					
LOC107808711	microfibrillar-associated protein 1-like	-1.12	AT4G08580	70	69.7					
LOC107821526	glutathione synthetase, chloroplastic	-1.12	AT5G27380	76	70.8					
LOC107829510	uncharacterized protein At5g41620-like	-1.12	AT5G41620	65	35.2					
LOC107759178	solute carrier family 40 member 3, chloroplastic-like	-1.12	AT5G26820	75	65.5					
LOC107770537	uncharacterized LOC107770537	-1.12	AT4G17080	46	73.0					
LOC107830914	nudix hydrolase 20, chloroplastic-like	-1.12	AT5G19460	54	64.6					
LOC107818191	RAB6A-GEF complex partner protein 1-like	-1.12	AT3G61480	63	75.1					
LOC107799836	equilibrative nucleotide transporter 3-like	-1.12	AT4G05130	69	65.1					
LOC107791668	uncharacterized LOC107791668	-1.12	AT1G03180	82	52.2					
LOC107776499	AT-rich interactive domain-containing protein 6-like	-1.12	AT1G76510	45	59.5					
LOC107800137	protein CUP-SHAPED COTYLEDON 2-like	-1.12	AT5G53950	63	50.0		S			

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107815120	60S ribosomal protein L22-3-like	-1.12	AT3G05560	47	86.9					
LOC107777443	rhodanese-like domain-containing protein 4A, chloroplastic	-1.12	AT3G25480	45	53.0					
LOC107762256	protein FAM192A	-1.12	AT3G62140	66	55.5					
LOC107820495	endoglucanase 24-like	-1.12	AT4G39010	84	73.8					
LOC107827063	uncharacterized LOC107827063	-1.12	AT3G13460	53	44.2					
LOC107781589	transportin-1-like	-1.12	AT2G16950	76	73.9					
LOC107759942	protein downstream neighbor of Son-like	-1.12	AT3G54750	93	50.3					
LOC107762693	F-box protein At2g16365-like	-1.12								
LOC107827008	protein JASON-like	-1.12	AT1G06660	73	35.9					S
LOC107775982	annexin D3-like	-1.12	AT2G38760	79	55.2					
LOC107799397	nucleolar GTP-binding protein 1-like	-1.12	AT1G50920	78	76.6					
LOC107820513	protein PHR1-LIKE 1-like	-1.12	AT4G28610	55	54.4					
LOC107806239	calmodulin-binding protein 60 D-like	-1.12	AT4G25800	75	37.2					
LOC107825164	small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B'-like	-1.11	AT4G20440	33	88.0			S		
LOC107829227	proline iminopeptidase-like	-1.11	AT3G61540	78	75.3					
LOC107801378	protein BASIC PENTACYSSTEINE4-like	-1.11	AT2G21240	60	53.2					
LOC107793688	uncharacterized LOC107793688	-1.11	AT5G64480	94	47.2					
LOC107816239	RNA-binding protein 42-like	-1.11	AT3G04500	38	84.4					
LOC107808808	bZIP transcription factor 53-like	-1.11	AT1G75390	36	35.1					
LOC107779422	proline-rich protein PRCC-like	-1.11	AT2G19270	51	41.9					
LOC107811535	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g14470-like	-1.11	AT2G29760	80	36.8			S		
LOC107788253	GPI transamidase component PIG-T-like	-1.11	AT3G07140	80	62.6					
LOC107822560	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 4-like	-1.11	AT3G06190	57	75.2					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107793388	basic 7S globulin 2-like	-1.11	AT1G03220	86	49.3					
LOC107820549	uncharacterized LOC107820549	-1.11	AT5G25770	69	65.4					
LOC107794754	DNA topoisomerase 2-binding protein 1	-1.11	AT1G77320	83	50.0				S	
LOC107780849	cyclic pyranopterin monophosphate synthase, mitochondrial-like	-1.11	AT2G31955	51	82.0					
LOC107827912	major allergen Pru ar 1-like	-1.11	AT1G24020	35	32.3					
LOC107793908	kinesin-like protein KIF22	-1.11	AT1G55550	53	47.5					
LOC107768851	60S ribosomal protein L3-like	-1.11	AT1G43170	77	86.3		S			
LOC107766359	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1-like	-1.11	AT2G18040	44	78.0		S		S	
LOC107783647	WD repeat-containing protein 13-like	-1.11	AT2G16405	73	71.8					
LOC107811575	glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic-like	-1.11	AT4G16260	56	53.4					
LOC107774389	beta-glucosidase 12-like	-1.11	AT3G60140	86	49.5					
LOC107782466	zinc finger CCCH domain-containing protein 3-like	-1.11								
LOC107785780	probable pectate lyase 12	-1.11	AT3G53190	77	67.5					
LOC107773149	sphingoid long-chain bases kinase 2, mitochondrial-like	-1.11	AT2G46090	66	69.6					
LOC107823495	probable glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] 2, cytosolic	-1.11	AT2G41540	52	75.1					
LOC107826652	uncharacterized protein At1g04910-like	-1.11	AT1G20550	68	64.5					
LOC107763122	pre-mRNA-splicing factor SYF1-like	-1.11	AT5G28740	85	77.3			S		
LOC107798743	mitochondrial inner membrane protease ATP23-like	-1.11	AT3G03420	44	76.0					
LOC107783382	uncharacterized LOC107783382	-1.11								
LOC107791708	uncharacterized LOC107791708	-1.11	AT5G16360	64	41.2					
LOC107768847	kinetochore protein ndc80-like	-1.11	AT3G54630	70	44.7					
LOC107818819	auxin response factor 1-like	-1.10	AT3G61830	66	53.8	S				

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107825900	ferredoxin-thioredoxin reductase, variable chain-like	-1.10	AT5G08410	40	52.4					
LOC107803169	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase 2-like	-1.10	AT4G38800	61	73.8					
LOC107791921	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, chloroplastic-like	-1.10	AT2G02500	72	68.6					
LOC107769721	triosephosphate isomerase, chloroplastic-like	-1.10	AT2G21170	71	77.8					
LOC107766363	tRNA-dihydrouridine(47) synthase [NAD(P)(+)]-like	-1.10	AT4G38890	80	66.4					
LOC107802311	scarecrow-like protein 22	-1.10	AT3G60630	46	47.7					
LOC107807625	50S ribosomal protein L4-like	-1.10	AT2G20060	49	82.6					
LOC107796523	probable arabinosyltransferase ARAD1	-1.10	AT3G45400	60	64.2					
LOC107774742	major facilitator superfamily domain-containing protein 12-like	-1.10	AT2G44280	56	70.3					
LOC107772515	aspartyl protease family protein 2-like	-1.10	AT3G61820	78	63.3					
LOC107769278	gamma-tubulin complex component 4-like	-1.10	AT3G53760	81	70.7				S	
LOC107761922	uncharacterized LOC107761922	-1.10								
LOC107787492	cinnamoyl-CoA reductase 1-like	-1.10	AT1G09480	77	55.0					
LOC107781436	ATP phosphoribosyltransferase 2, chloroplastic-like	-1.10	AT1G09795	67	76.9					
LOC107799578	FHA domain-containing protein PS1-like	-1.10	AT1G34355	63	45.9				S	
LOC107771246	ras-related protein RABD1-like	-1.10	AT3G11730	62	85.8					
LOC107819579	uncharacterized LOC107819579	-1.10	AT2G15900	79	56.9					
LOC107805135	uncharacterized LOC107805135	-1.10	AT2G45380	66	33.0					
LOC107780300	uncharacterized LOC107780300	-1.10								
LOC107797885	uncharacterized LOC107797885	-1.10	AT5G18440	32	43.0					
LOC107807768	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase-like	-1.10	AT3G03250	42	44.0					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107781859	protein ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1-like	-1.10	AT5G48040	48	30.9					
LOC107824623	uncharacterized LOC107824623	-1.10	AT5G04860	79	44.7					
LOC107817076	coatomer subunit delta-like	-1.09	AT5G05010	63	80.9					
LOC107779259	flowering locus K homology domain-like	-1.09	AT3G04610	64	57.2		S			
LOC107784600	uncharacterized LOC107784600	-1.09	AT5G56120	57	60.2					
LOC107798461	uncharacterized LOC107798461	-1.09								
LOC107778527	uncharacterized LOC107778527	-1.09								
LOC107783228	uncharacterized LOC107783228	-1.09	AT4G26370	46	73.0					
LOC107824088	uncharacterized LOC107824088	-1.09	AT5G28830	76	52.0					
LOC107768848	uncharacterized LOC107768848	-1.09	AT2G01080	39	72.7					
LOC107827939	fructose-1,6-bisphosphatase class 1-like	-1.09	AT5G64380	76	68.5					
LOC107820524	rho GDP-dissociation inhibitor 1-like	-1.09	AT3G07880	39	54.7					
LOC107807346	uncharacterized LOC107807346	-1.09								
LOC107779009	DNA-directed RNA polymerase V subunit 1-like	-1.09	AT2G40030	85	49.0			S		
LOC107803524	protein gamma response 1-like	-1.09	AT3G52115	75	36.6			S	S	S
LOC107807489	uncharacterized LOC107807489	-1.09								
LOC107788833	probable helicase MAGATAMA 3	-1.09	AT4G15570	69	68.9					
LOC107827256	probable receptor-like protein kinase At1g11050	-1.09	AT1G11050	68	65.2					
LOC107819713	uncharacterized LOC107819713	-1.09								
LOC107759648	GATA transcription factor 24-like	-1.09	AT1G51600	55	53.7					
LOC107773161	exosome complex component RRP41 homolog	-1.09	AT3G61620	89	79.7			S		
LOC107807875	DNA gyrase subunit A, chloroplastic/mitochondrial-like	-1.09	AT3G10690	78	75.9					
LOC107806171	3-ketoacyl-CoA synthase 11-like	-1.09	AT1G19440	92	47.3					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107796745	uncharacterized LOC107796745	-1.09	AT2G15860	70	59.5					
LOC107786965	uncharacterized LOC107786965	-1.09								
LOC107776092	protein DJ-1 homolog C-like	-1.09	AT4G34020	48	65.7					
LOC107824172	T-complex protein 1 subunit theta-like	-1.09	AT3G03960	78	81.8					
LOC107774177	probable methyltransferase PMT13	-1.09	AT4G00740	81	81.3					
LOC107767570	chlorophyllase-2, chloroplastic-like	-1.09	AT1G19670	66	42.5					
LOC107775856	interactor of constitutive active ROPs 2, chloroplastic-like	-1.09	AT5G60210	75	41.0					
LOC107790563	nucleoside diphosphate kinase 1	-1.08	AT4G23895	65	59.4					
LOC107822433	flowering locus K homology domain-like	-1.08	AT3G04610	64	57.2		S			
LOC107822442	RNA-binding protein 28-like	-1.08	AT2G21440	93	45.4					
LOC107832404	formin-like protein 14	-1.08								
LOC107782221	probable U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4	-1.08								
LOC107796067	methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial-like	-1.08	AT1G03090	79	70.0					
LOC107771689	uncharacterized LOC107771689	-1.08	AT3G05100	52	79.5					
LOC107770532	putative casein kinase II subunit beta-4	-1.08	AT5G47080	52	76.9					
LOC107816605	transcriptional activator FHA1-like	-1.08	AT3G07220	48	91.3		S			
LOC107830010	sucrose synthase 2-like	-1.08	AT4G02280	82	80.0		S			
LOC107802593	uncharacterized protein At5g49945-like	-1.08	AT4G24330	70	64.4					
LOC107802592	DEXH-box ATP-dependent RNA helicase DEXH7, chloroplastic-like	-1.08	AT1G58060	88	61.4					
LOC107812591	aspartate--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial-like	-1.08	AT4G33760	65	84.1					
LOC107773252	uric acid degradation bifunctional protein TTL-like	-1.08	AT5G58220	76	59.1					
LOC107770023	pentatricopeptide repeat-containing protein At4g20740-like	-1.08	AT4G20740	53	60.3					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107774568	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit B-like	-1.08	AT2G02955	45	42.2		S				
LOC107768795	heat stress transcription factor A-7a-like	-1.08	AT3G22830	46	53.8						
LOC107830161	NAC domain-containing protein 21/22-like	-1.08	AT3G12977	44	47.6						
LOC107784593	transcription factor PIF3-like	-1.08	AT1G09530	38	74.6						
LOC107796521	NADH--cytochrome b5 reductase 1-like	-1.08	AT5G17770	68	87.8						
LOC107822472	sphingoid long-chain bases kinase 1-like	-1.08	AT5G23450	72	66.6						
LOC107788814	bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase 2, mitochondrial	-1.08	AT3G61440	72	75.2						
LOC107809867	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 5, chloroplastic-like	-1.08	AT1G02560	64	81.6						
LOC107775465	intron-binding protein aquarius	-1.08	AT2G38770	84	76.9			S			
LOC107828327	COP9 signalosome complex subunit 7-like	-1.08	AT1G02090	59	76.7						
LOC107768402	tubby-like F-box protein 3	-1.08	AT2G47900	47	77.1						
LOC107799895	kynurenine formamidase-like	-1.08	AT1G44542	60	57.8						
LOC107771438	guanine nucleotide-binding protein-like NSN1	-1.08	AT3G07050	70	74.0		S				
LOC107778866	uncharacterized LOC107778866	-1.08	AT5G66230	57	45.3						
LOC107799493	syntaxin-71-like	-1.07	AT3G09740	54	78.0						
LOC107827552	ascorbate transporter, chloroplastic-like	-1.07	AT4G00370	74	70.0						
LOC107760862	TBC1 domain family member 15-like	-1.07	AT2G20440	75	63.0						
LOC107777160	uncharacterized LOC107777160	-1.07	AT3G48410	73	41.4						
LOC107783771	copper-transporting ATPase PAA1, chloroplastic-like	-1.07									
LOC107814751	putative receptor-like protein kinase At4g00960	-1.07	AT4G05200	82	46.6						
LOC107788750	WW domain-binding protein 4-like	-1.07	AT1G49590	64	56.4			S			

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107775584	sucrose synthase 2-like	-1.07	AT4G02280	82	80.0		S			
LOC107816971	putative E3 ubiquitin-protein ligase RING1a	-1.07	AT3G27330	63	43.3					
LOC107803772	ribokinase-like	-1.07	AT4G28706	72	68.9					
LOC107761635	phytochromobilin:ferredoxin oxidoreductase, chloroplastic-like	-1.07	AT3G09150	55	61.6					
LOC107779006	NAD(P)H:quinone oxidoreductase-like	-1.07	AT3G27890	47	82.0					
LOC107806593	uncharacterized LOC107806593	-1.07	AT2G23390	70	66.1					
LOC107800809	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial	-1.07	AT1G62670	55	35.5			S		
LOC107804758	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP42-like	-1.07	AT3G21640	70	73.8	S				
LOC107814562	ATP-dependent DNA helicase Q-like SIM	-1.07	AT5G27680	81	53.7					S
LOC107778566	shaggy-related protein kinase NtK-1-like	-1.07	AT5G26751	69	91.9					
LOC107832725	F-box/kelch-repeat protein OR23-like	-1.07	AT4G03030	73	60.3					
LOC107781748	zinc finger CCHC domain-containing protein 7-like	-1.07	AT3G43590	33	39.5					
LOC107775067	uncharacterized LOC107775067	-1.07								
LOC107780480	protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial-like	-1.07	AT2G44520	56	68.5					
LOC107802559	protein WVD2-like 1	-1.07	AT1G54460	35	54.1					
LOC107777291	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD2-2	-1.07	AT4G00340	74	59.3					
LOC107798835	GATA transcription factor 17-like	-1.07								
LOC107792884	protein SDE2 homolog	-1.07	AT4G01000	80	40.5					
LOC107810474	ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-like	-1.07	AT3G62250	65	93.6					
LOC107795683	ABC transporter G family member 22-like	-1.07	AT5G06530	85	74.9					
LOC107791920	protein STICHEL	-1.07	AT2G02480	76	55.4					S

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107794017	ribonuclease P protein subunit p25-like protein	-1.07	AT1G76010	34	65.9					
LOC107760597	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2	-1.07	AT4G34460	70	82.3		S			
LOC107760264	vesicle-associated protein 1-1-like	-1.07	AT1G08820	52	52.3					
LOC107769373	F-actin-capping protein subunit alpha-like	-1.07	AT3G05520	68	70.7					
LOC107794794	transcription factor TCP8-like	-1.07	AT1G58100	41	45.6					
LOC107776882	ORM1-like protein 3	-1.07	AT1G01230	52	85.9					
LOC107789581	uncharacterized LOC107789581	-1.06								
LOC107826567	phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein SFH8-like	-1.06	AT2G21520	73	70.5					
LOC107803775	dynammin-related protein 1E-like	-1.06	AT3G60190	83	82.4				S	
LOC107821479	myosin-12-like	-1.06	AT1G54560	85	48.7					
LOC107793907	putative disease resistance RPP13-like protein 1	-1.06	AT3G14460	68	33.3					
LOC107788222	ER membrane protein complex subunit 2-like	-1.06	AT3G04830	67	77.5					
LOC107826041	uncharacterized LOC107826041	-1.06	AT1G01770	58	62.9					
LOC107804027	survival of motor neuron-related- <i>splicing</i> factor 30-like	-1.06	AT2G02570	62	69.3			S		
LOC107792504	uncharacterized LOC107792504	-1.06	AT3G07400	80	62.4					
LOC107826703	protein CUP-SHAPED COTYLEDON 2-like	-1.06	AT5G53950	63	50.0		S			
LOC107766793	DEXH-box ATP-dependent RNA helicase DEXH9-like	-1.06	AT1G59760	88	73.1			S		
LOC107810185	protein pleiotropic regulatory locus 1-like	-1.06	AT4G15900	76	73.6		S	S		
LOC107785364	uncharacterized LOC107785364	-1.06	AT5G64550	73	55.9					
LOC107829226	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial-like	-1.06	AT2G14170	53	67.1					
LOC107806866	synaptotagmin-4-like	-1.06	AT3G61050	73	78.6					
LOC107767241	auxin response factor 2-like	-1.06	AT4G23980	82	36.1	S				

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107790817	phytochrome A-associated F-box protein-like	-1.06	AT4G02440	62	59.5		S				
LOC107805133	probable protein S-acyltransferase 14	-1.06	AT3G60800	59	79.9						
LOC107766724	alanine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial-like	-1.06	AT5G22800	78	72.9		S	S			
LOC107831862	uncharacterized LOC107831862	-1.06	AT1G55040	52	61.6		S				
LOC107827331	DNA repair protein REV1-like	-1.06	AT5G44750	77	49.2						S
LOC107827709	GATA transcription factor 5-like	-1.06	AT4G36240	58	40.9						
LOC107763515	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g02370, mitochondrial-like	-1.06	AT4G01990	69	36.0						
LOC107796786	uncharacterized LOC107796786	-1.06	AT3G55240	32	58.8						
LOC107790291	zinc finger CCCH domain-containing protein 53-like	-1.06	AT3G21100	55	36.6						
LOC107775642	10 kDa chaperonin-like	-1.06	AT3G60210	60	70.9						
LOC107788832	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g06000-like	-1.06	AT2G06000	53	48.1						
LOC107778721	uncharacterized LOC107778721	-1.06	AT3G44150	59	76.3						
LOC107828152	glutathione S-transferase zeta class-like	-1.06	AT2G02390	52	66.5						
LOC107826719	protein kinase PINOID 2-like	-1.06	AT2G26700	93	57.0	S	S				
LOC107808434	uncharacterized LOC107808434	-1.06	AT4G05400	50	57.0						
LOC107824942	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial-like	-1.06	AT4G02580	56	82.4						
LOC107788753	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g39710-like	-1.06	AT5G39710	41	58.9		S				
LOC107816953	uncharacterized LOC107816953	-1.06									
LOC107792059	protein PHR1-LIKE 1-like	-1.06	AT5G29000	36	39.7						
LOC107768381	uncharacterized protein At3g49720-like	-1.06	AT5G65810	64	70.3						
LOC107805945	protein MCM10 homolog	-1.06	AT2G20980	68	53.9					S	
LOC107775339	probable glycosyltransferase At5g03795	-1.06	AT4G16745	66	34.5						

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107812049	putative serine/threonine-protein kinase haspin homolog	-1.05	AT1G09450	80	53.9				S	
LOC107810091	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 8-like	-1.05	AT4G00660	54	73.2			S		
LOC107816885	uncharacterized LOC107816885	-1.05	AT3G63290	70	51.4					
LOC107794250	diaminopimelate decarboxylase 1, chloroplastic-like	-1.05	AT3G14390	80	86.3					
LOC107816271	mitochondrial Rho GTPase 1-like	-1.05	AT5G27540	70	73.3		S			
LOC107789199	T-complex protein 1 subunit alpha-like	-1.05	AT3G20050	55	85.3					
LOC107791625	uncharacterized LOC107791625	-1.05	AT5G67610	68	35.5					
LOC107812934	serine/threonine-protein phosphatase PP2A-5 catalytic subunit-like	-1.05	AT2G42500	55	91.3					
LOC107775889	probable mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM21	-1.05	AT4G00026	44	73.6					
LOC107784060	uncharacterized LOC107784060	-1.05	AT3G05345	53	67.3					
LOC107812249	probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	-1.05	AT1G20200	78	82.2		S			
LOC107812047	probable receptor-like protein kinase At5g18500	-1.05	AT1G56720	56	73.1					
LOC107824930	uncharacterized LOC107824930	-1.05	AT4G39880	60	64.8					
LOC107814357	tryptophan synthase alpha chain-like	-1.05	AT3G54640	70	80.3					
LOC107791538	40S ribosomal protein S24-1	-1.05	AT3G04920	51	91.8					
LOC107816701	cis-abienol synthase, chloroplastic	-1.05	AT1G79460	92	40.1					
LOC107768112	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g02860-like	-1.05	AT5G02860	80	69.9					
LOC107789452	reticulon-like protein B11	-1.05	AT3G19460	43	56.9					
LOC107799778	ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 3 protein	-1.05	AT1G73730	50	59.9					
LOC107828685	ERI1 exoribonuclease 2-like	-1.05								
LOC107792552	uncharacterized LOC107792552	-1.05	AT1G49870	75	42.5					
LOC107776741	serine/threonine-protein kinase TOR-like	-1.05	AT1G50030	98	80.4	S	S	S		

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO					
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107787334	serine/arginine-rich <i>splicing</i> factor SC35-like	-1.05									
LOC107815806	bifunctional phosphatase IMPL2, chloroplastic-like	-1.05	AT4G39120	59	74.9						
LOC107798373	cytochrome P450 CYP736A12-like	-1.05	AT5G07990	91	37.2	S					
LOC107778826	exportin-2-like	-1.05	AT2G46520	80	68.3						
LOC107822702	60S acidic ribosomal protein P1-like	-1.05									
LOC107819788	L-ascorbate peroxidase 3, peroxisomal	-1.05	AT4G35000	75	85.0						
LOC107816486	ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6-like	-1.05	AT3G07170	53	50.7						
LOC107781438	nifU-like protein 2, chloroplastic	-1.05	AT5G49940	39	83.6						
LOC107778339	cullin-1-like	-1.05	AT4G02570	78	81.5	S	S		S		
LOC107784180	protein MICRORCHIDIA 6-like	-1.05	AT1G19100	68	52.7						S
LOC107784564	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial	-1.05	AT1G12700	60	39.1			S			
LOC107816093	DNA-directed RNA polymerase III subunit rpc31-like	-1.04	AT4G01590	34	34.2						
LOC107806728	uncharacterized LOC107806728	-1.04	AT3G07510	45	80.5						
LOC107786277	ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	-1.04	AT2G21270	81	71.6						
LOC107804222	uncharacterized LOC107804222	-1.04	AT5G26910	71	39.8						
LOC107769804	cytochrome c oxidase subunit 5C-2-like	-1.04	AT2G47380	33	79.4						
LOC107765314	synaptotagmin-1-like	-1.04	AT2G20990	90	75.3						
LOC107830739	sucrose-phosphatase 1-like	-1.04	AT1G51420	69	64.4						
LOC107818910	copper-transporting ATPase PAA1, chloroplastic-like	-1.04	AT4G33520	60	60.3						
LOC107772926	transcription factor bHLH62-like	-1.04	AT3G07340	80	41.8						
LOC107788415	tubulin alpha chain-like	-1.04	AT4G14960	76	96.5						
LOC107825165	60S ribosomal protein L36-2-like	-1.04	AT3G53740	41	81.2						
LOC107763119	thylakoid lumenal 19 kDa protein, chloroplastic-like	-1.04	AT3G63540	43	81.9						

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107804046	uncharacterized LOC107804046	-1.04	AT3G61200	63	41.3					
LOC107765345	uncharacterized LOC107765345	-1.04	AT1G02110	49	87.7					
LOC107827297	uncharacterized LOC107827297	-1.04								
LOC107761664	rho GTPase-activating protein 5-like	-1.04	AT2G46710	55	57.9					
LOC107801569	auxin-responsive protein IAA13-like	-1.04	AT2G33310			S				
LOC107783792	zinc finger matrin-type protein 2-like	-1.04	AT3G05760	37	80.6					
LOC107802560	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g62470, mitochondrial-like	-1.04	AT3G62470	64	68.2					
LOC107786674	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g46050, mitochondrial-like	-1.04	AT4G18750	91	35.5		S	S		
LOC107760985	2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic-like	-1.04	AT3G63410	64	76.4					
LOC107817395	uncharacterized LOC107817395	-1.04	AT1G10690	99	46.5				S	
LOC107804044	cell division protein FtsY homolog, chloroplastic-like	-1.04	AT2G45770	66	80.1					
LOC107802169	ABC transporter C family member 2-like	-1.04	AT1G30400	91	66.9					
LOC107768787	MACPF domain-containing protein At4g24290-like	-1.04	AT4G24290	68	73.4					
LOC107792603	uncharacterized LOC107792603	-1.04								
LOC107760694	50S ribosomal protein L1, chloroplastic-like	-1.04								
LOC107812486	mitochondrial arginine transporter BAC2-like	-1.04	AT4G15010	62	62.7					
LOC107779282	uncharacterized LOC107779282	-1.04	AT1G02960	30	39.2					
LOC107760550	pre-mRNA- <i>splicing</i> factor 18-like	-1.04	AT1G03140	68	78.0			S		
LOC107775639	acyl carrier protein 1, mitochondrial-like	-1.04	AT2G44620	50	71.3					
LOC107803523	DNA-damage-repair/toleration protein DRT100-like	-1.04	AT5G12940	73	59.9					
LOC107768377	myb-like protein X	-1.04								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107817844	CTL-like protein DDB_G0274487	-1.04	AT5G13760	50	68.7					
LOC107829145	bifunctional epoxide hydrolase 2-like	-1.04	AT3G05600	65	61.5					
LOC107762938	mannosylglycoprotein endo-beta-mannosidase	-1.04	AT1G09010	81	70.0					
LOC107794111	PI-PLC X domain-containing protein At5g67130-like	-1.04	AT1G13680	52	32.4					
LOC107765592	glycine-rich protein DOT1-like	-1.04								
LOC107797279	probable magnesium transporter NIPA4	-1.04	AT1G34470	62	80.2					
LOC107779149	probable flavin-containing monooxygenase 1	-1.04	AT1G19250	71	41.4					
LOC107770141	IRK-interacting protein-like	-1.04	AT2G45260	72	76.8					
LOC107792098	cationic amino acid transporter 2, vacuolar-like	-1.04	AT1G58030	68	73.8					
LOC107770536	60S ribosomal protein L37a-like	-1.04	AT3G10950	48	93.5					
LOC107808155	proteasome assembly chaperone 2-like	-1.04	AT3G18940	76	64.8					
LOC107806587	cell cycle checkpoint control protein RAD9A-like	-1.04	AT3G05480	35	59.4				S	S
LOC107807804	transcription factor bHLH96-like	-1.03	AT1G72210	66	45.4					
LOC107797072	agamous-like MADS-box protein AGL15	-1.03	AT5G13790	56	51.8	S	S			
LOC107795848	gibberellin-regulated protein 14-like	-1.03								
LOC107774599	uncharacterized LOC107774599	-1.03	AT3G24820	49	46.5					
LOC107797600	regulatory protein NPR5-like	-1.03	AT2G41370	69	77.4		S			
LOC107799232	ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1-like	-1.03	AT1G01930	57	48.6					
LOC107778986	ribosome-recycling factor, chloroplastic-like	-1.03	AT3G63190	59	64.6					
LOC107790245	uncharacterized LOC107790245	-1.03	AT1G65020	62	61.1					
LOC107781108	CTL-like protein DDB_G0288717	-1.03	AT4G38640	76	67.4					
LOC107789134	microtubule-associated protein TORTIFOLIA1-like	-1.03	AT2G07170	77	47.4					
LOC107783309	oxalate--CoA ligase-like	-1.03	AT3G48990	75	78.0		S			

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107828056	uncharacterized LOC107828056	-1.03								
LOC107796437	uncharacterized LOC107796437	-1.03								
LOC107772749	PITH domain-containing protein At3g04780	-1.03	AT3G04780	56	88.6					
LOC107822567	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase, chloro-plastic/chromoplastic	-1.03	AT2G26930	57	75.8					
LOC107802338	trihelix transcription factor ASIL2-like	-1.03	AT2G44730	32	68.3					
LOC107793757	methionine aminopeptidase 2B-like	-1.03	AT3G59990	63	92.6					
LOC107760576	B3 domain-containing protein At5g42700-like	-1.03	AT5G42700	54	53.2					
LOC107777441	hemolysin A-like	-1.03	AT3G25470	51	70.0					
LOC107829822	mevalonate kinase-like	-1.03	AT5G27450	67	68.3					
LOC107828332	uncharacterized LOC107828332	-1.03	AT1G68140	49	52.9					
LOC107773147	uncharacterized LOC107773147	-1.03	AT4G01290	63	39.0					
LOC107819049	uncharacterized LOC107819049	-1.03	AT5G17610	33	70.0					
LOC107771687	la-related protein 1-like	-1.03	AT1G53645	31	66.8					
LOC107774571	serrate RNA effector molecule-like	-1.03	AT2G27100	61	68.0			S		
LOC107816667	bZIP transcription factor 53-like	-1.03	AT1G75390	36	35.1					
LOC107811727	uncharacterized LOC107811727	-1.03								
LOC107783757	uncharacterized LOC107783757	-1.03								
LOC107782883	cell division cycle 20.2, cofactor of APC complex-like	-1.03	AT4G33270	63	95.5				S	
LOC107784061	sucrose nonfermenting 4-like protein	-1.03	AT1G09020	56	74.0					
LOC107819715	uncharacterized LOC107819715	-1.03								
LOC107779205	U-box domain-containing protein 3-like	-1.03	AT3G54790	80	50.4					
LOC107813804	uncharacterized LOC107813804	-1.03								
LOC107820968	putative tRNA (cytidine(34)-2'-O)-methyltransferase	-1.03	AT5G26880	64	72.2			S		

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107798605	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g09820-like	-1.03	AT5G39710	41	58.9		S			
LOC107832784	putative protein phosphatase 2C 76	-1.03	AT3G63340	52	50.7					
LOC107800656	rhodanese-like domain-containing protein 6	-1.03	AT1G09280	88	63.7					
LOC107783795	dihydrolipoyl dehydrogenase 2, chloroplastic-like	-1.03	AT4G16155	79	85.9					
LOC107798907	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like	-1.03	AT5G17920	85	89.0					
LOC107764551	protein HUA2-LIKE 2-like	-1.03	AT2G48160	40	57.1		S	S		
LOC107790893	cytochrome b5-like	-1.02	AT5G53560	35	66.3					
LOC107831475	GATA transcription factor 11-like	-1.02	AT1G08000	55	35.8					
LOC107831043	serine/threonine-protein kinase MHK-like	-1.02	AT4G13020	60	62.4					
LOC107801867	autophagy-related protein 2-like	-1.02	AT3G19190	92	44.2					
LOC107760278	uncharacterized LOC107760278	-1.02	AT3G05670	39	46.4					
LOC107778886	60S ribosomal protein L18-2	-1.02	AT3G05590	46	84.0					
LOC107779260	probable fructokinase-4	-1.02	AT1G06730	68	56.4					
LOC107815844	zinc finger CCCH domain-containing protein 5-like	-1.02	AT1G10320	39	74.4					
LOC107799333	transcription factor bHLH96-like	-1.02	AT1G72210	66	45.4					
LOC107811891	spastin-like	-1.02	AT2G45500	70	67.2					
LOC107825241	uncharacterized protein At4g13200, chloroplastic-like	-1.02	AT4G13200	32	71.6					
LOC107763513	uncharacterized LOC107763513	-1.02	AT3G62370	72	65.9					
LOC107794954	metal-independent phosphoserine phosphatase-like	-1.02	AT4G38370	61	65.8					
LOC107798210	probable receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g57670	-1.02	AT5G63940	71	50.3					
LOC107771196	ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	-1.02	AT4G34410	45	44.7					
LOC107789588	homoserine kinase-like	-1.02	AT2G17265	56	75.0					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107786279	kinesin-like protein NACK2	-1.02	AT2G21300	73	66.5					
LOC107771521	tRNA:m(4)X modification enzyme TRM13 homolog	-1.02	AT4G01880	82	60.4					
LOC107782424	ABC transporter C family member 5-like	-1.02	AT1G04120	83	78.7					
LOC107817391	uncharacterized LOC107817391	-1.02	AT1G79270	56	38.5					
LOC107791922	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3-B-like	-1.02	AT1G14450	30	79.6					
LOC107782564	high mobility group B protein 6-like	-1.02	AT4G23800	79	57.8					
LOC107789453	PRKR-interacting protein 1-like	-1.02								
LOC107791530	uncharacterized LOC107791530	-1.02								
LOC107830271	uncharacterized LOC107830271	-1.02	AT3G08020	84	50.6					
LOC107764081	transcription repressor OFP6-like	-1.02								
LOC107820528	small nuclear ribonucleoprotein Sm D1-like	-1.02	AT4G02840	42	95.8			S		
LOC107808327	rac-like GTP-binding protein 5	-1.02	AT4G35020	48	91.4	S				
LOC107794251	bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase-like	-1.02	AT4G34570	69	72.1					
LOC107768546	histone H2AX-like	-1.02	AT1G08880	50	81.7					
LOC107786766	probable manganese-transporting ATPase PDR2	-1.02	AT5G23630	91	78.9					
LOC107800013	protein ABIL1-like	-1.02	AT2G46225	59	62.3					
LOC107817044	DNA repair helicase XPB1-like	-1.02	AT5G41370	85	86.4					S
LOC107790910	serine/threonine-protein kinase SRK2E	-1.02	AT4G33950	60	88.4					
LOC107781632	GTP-binding protein SAR1B-like	-1.02	AT1G56330	58	92.7					
LOC107776111	keratinocyte proline-rich protein-like	-1.02								
LOC107781854	cytochrome P450 CYP73A100-like	-1.02	AT2G40890	83	32.5					
LOC107816699	early nodulin-like protein 3	-1.02	AT5G25090	58	41.2					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107762846	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 2-like	-1.02	AT3G06190	57	75.2					
LOC107811032	alpha-N-acetylglucosaminidase-like	-1.02	AT5G13690	81	71.0		S			
LOC107807237	COP9 signalosome complex subunit 2-like	-1.02	AT2G26990	83	85.9					
LOC107767831	ubiquitin-conjugating enzyme E2 28-like	-1.02	AT4G27960	52	91.1					
LOC107813997	uncharacterized protein At5g48480-like	-1.02	AT5G48480	57	44.9					
LOC107807876	proline--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial-like	-1.02	AT5G52520	81	79.7		S			
LOC107827562	alpha-N-acetylglucosaminidase-like	-1.02	AT5G13690	81	71.0		S			
LOC107770139	arginase 1, mitochondrial	-1.02	AT4G08900	61	88.4					
LOC107766309	ankyrin repeat domain-containing protein 29	-1.02	AT3G04710	84	63.8					
LOC107792626	BTB/POZ domain-containing protein At3g22104-like	-1.02	AT5G48800	66	31.3					
LOC107775978	probable ribose-5-phosphate isomerase 3, chloroplastic	-1.02	AT3G04790	66	73.5					
LOC107818216	light-inducible protein CPRF2-like	-1.02	AT5G28770	83	39.0					
LOC107806328	long chain acyl-CoA synthetase 6, peroxisomal-like	-1.02	AT5G27600	46	60.6					
LOC107812937	major facilitator superfamily domain-containing protein 12-like	-1.02	AT3G60070	61	63.6					
LOC107760859	casein kinase I-like	-1.01	AT1G03930	61	71.5					
LOC107821348	FHA domain-containing protein PS1-like	-1.01	AT1G34355	63	45.9				S	
LOC107798744	60S acidic ribosomal protein P2A-like	-1.01	AT3G44590	50	68.5					
LOC107824053	translocase of chloroplast 120, chloroplastic-like	-1.01	AT3G16620	76	77.4					
LOC107816187	THO complex subunit 7A-like	-1.01	AT5G16790	78	77.0			S		
LOC107800014	UDP-D-xylose:L-fucose alpha-1,3-D-xylosyltransferase MGP4-like	-1.01	AT4G01220	49	83.2					
LOC107768445	uncharacterized LOC107768445	-1.01	AT3G07440	50	67.3					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107775640	protein TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 4, chloro-plastic-like	-1.01	AT2G44640	80	57.0						
LOC107824184	fatty acid amide hydrolase-like	-1.01	AT5G64440	65	67.9						
LOC107807087	endoglucanase 17-like	-1.01	AT1G02800	74	75.0						
LOC107792209	neurogenic protein mastermind-like	-1.01									
LOC107808928	uncharacterized LOC107808928	-1.01	AT1G55360	66	73.3						
LOC107788187	receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g45590	-1.01	AT2G45590	54	53.8						
LOC107800862	protein SLOW WALKER 1-like	-1.01	AT2G47990	78	58.6			S	S		
LOC107816859	cytochrome b5	-1.01	AT5G53560	35	66.3						
LOC107790040	uncharacterized LOC107790040	-1.01	AT2G44410	34	45.6						
LOC107816459	GPI transamidase component PIG-S-like	-1.01	AT3G07180	75	60.1						
LOC107782225	translationally-controlled tumor protein homolog	-1.01	AT3G05540	63	75.1						
LOC107770534	transcription factor IIIB 60 kDa subunit-like	-1.01	AT3G09360	76	48.3						
LOC107824950	protein OSB2, chloroplastic-like	-1.01	AT5G44785	55	50.8						
LOC107826164	uncharacterized LOC107826164	-1.01	AT1G79570	64	64.2						
LOC107830512	non-specific lipid-transfer protein-like protein At5g64080	-1.01	AT2G13820	60	43.2						
LOC107781437	ribosome biogenesis protein BOP1 homolog	-1.01	AT2G40360	64	68.9			S			
LOC107780078	uncharacterized LOC107780078	-1.01	AT2G20480	32	73.3						
LOC107760218	high mobility group B protein 7-like	-1.01	AT5G23420	53	52.1						
LOC107789170	protein transport protein SEC23-like	-1.01	AT2G21630	87	67.8						
LOC107787724	siroheme synthase-like	-1.01	AT5G40850	57	74.7						
LOC107776336	uncharacterized LOC107776336	-1.01									
LOC107778282	putative B3 domain-containing protein At5g58280	-1.01	AT3G19184	59	41.4						
LOC107806258	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3-like	-1.01	AT2G22310	63	86.6						

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107775267	cytochrome P450 78A7-like	-1.01	AT1G01190	82	48.0					
LOC107828881	acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial-like	-1.01	AT5G48370	78	75.4					
LOC107830269	tRNA-dihydrouridine(20/20a) synthase-like	-1.01	AT3G63510	64	73.3					
LOC107761600	serine/arginine-rich <i>splicing</i> factor RS41-like	-1.01	AT4G25500	37	68.1			S		
LOC107797147	chaperone protein dnaJ A6, chloroplastic-like	-1.01	AT2G22360	72	72.1					
LOC107767614	translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon-like	-1.01	AT2G34970	73	62.9					
LOC107780193	uncharacterized LOC107780193	-1.01	AT3G22530	40	47.4					
LOC107790560	dol-P-Man:Man(7)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,6-mannosyl-transferase-like	-1.01	AT1G02145	73	67.5					
LOC107796723	homeobox protein LUMINIDEPENDENS-like	-1.01	AT4G02560	60	55.2		S			
LOC107784885	fasciclin-like arabinogalactan protein 21	-1.01								
LOC107782984	cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG1-like	-1.01	AT2G37210	62	75.8					
LOC107796434	50S ribosomal protein HLP, mitochondrial-like	-1.01	AT1G17560	36	57.6		S			
LOC107761629	uncharacterized LOC107761629	-1.00	AT2G32910	40	43.5					
LOC107798608	BTB/POZ domain-containing protein NPY2-like	-1.00	AT2G14820	69	64.5					
LOC107775406	poly(A)-specific ribonuclease PARN-like	-1.00	AT3G25430	70	51.8			S		
LOC107780609	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19a-like	-1.00								
LOC107819691	uncharacterized LOC107819691	-1.00	AT1G58060	88	61.4					
LOC107790113	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 3	-1.00	AT3G02875	73	59.4					
LOC107807402	uncharacterized LOC107807402	-1.00								
LOC107807770	probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 2, mitochondrial	-1.00	AT1G71180	66	55.3					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107822856	uncharacterized LOC107822856	-1.00								
LOC107802773	uncharacterized LOC107802773	-1.00	AT4G26410	56	55.6					
LOC107803552	translocase of chloroplast 159, chloroplastic-like	-1.00	AT4G02510	52	68.9					
LOC107827626	uncharacterized protein PB1E7.01c-like	-1.00								
LOC107789211	zinc finger protein 598-like	-1.00	AT3G62240	69	63.6					
LOC107774570	60S ribosomal protein L30-like	-1.00	AT1G36240	42	85.7					
LOC107786276	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	-1.00	AT1G19910	51	98.8					
LOC107792463	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 24-like	-1.00	AT2G47330	70	76.1					
LOC107800637	spermatogenesis-associated protein 20-like	-1.00	AT4G03200	75	73.5					
LOC107807261	kinesin-like protein KIF18B	-1.00	AT1G18550	83	58.8					
LOC107798837	uncharacterized LOC107798837	-1.00	AT4G13030	54	30.3					
LOC107819869	transcriptional elongation regulator MINIYO-like	-1.00	AT4G38440	93	46.0					
LOC107832251	uncharacterized LOC107832251	-1.00	AT3G05850	34	30.4					
LOC107768060	uncharacterized LOC107768060	-1.00								
LOC107788640	serine/threonine-protein kinase Nek5-like	-1.00	AT3G44200	62	58.2					
LOC107827101	myosin-binding protein 7-like	-1.00	AT3G54740	66	42.6					
LOC107771982	auxin response factor 11-like	-1.00	AT4G23980	82	36.1	S				
LOC107803123	uncharacterized LOC107803123	1.01	AT3G19800	60	53.8					
LOC107782218	uncharacterized LOC107782218	1.01								
LOC107799020	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like	1.01	AT3G19000	62	66.2					
LOC107762708	uncharacterized LOC107762708	1.01								
LOC107785633	transcription factor CYCLOIDEA-like	1.02	AT1G67260	41	34.9		S			
LOC107792199	UDP-glucuronate:xylan alpha-glucuronosyltransferase 1-like	1.02	AT3G18660	75	65.2					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107816051	miraculin-like	1.02	AT1G73260	69	31.9					
LOC107805560	auxin-induced protein 15A-like	1.02	AT4G38840	40	57.1	S				
LOC107768442	flowering-promoting factor 1-like protein 3	1.02	AT5G24860	50	64.2		S			
LOC107769647	uncharacterized LOC107769647	1.02								
LOC107808033	protein translation factor SUI1 homolog	1.03	AT5G54940	45	83.0					
LOC107806455	ribonuclease 3-like	1.03	AT1G26820	52	33.2					
LOC107777694	monoglyceride lipase-like	1.03	AT1G73480	67	60.4					
LOC107774027	agamous-like MADS-box protein AGL8 homolog	1.03	AT5G60910	55	54.9		S			
LOC107781132	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog	1.03	AT1G04350	64	59.6					
LOC107775986	probable transcription factor KAN4	1.03	AT5G42630	55	47.7		S			
LOC107824916	ABC transporter B family member 2-like	1.04	AT4G25960	92	76.9					
LOC107812573	very-long-chain enoyl-CoA reductase-like	1.04	AT5G16010	73	60.4					
LOC107777828	uncharacterized LOC107777828	1.04	AT5G04860	79	44.7					
LOC107773855	uncharacterized LOC107773855	1.04								
LOC107816253	protein DETOXIFICATION 33-like	1.04	AT1G47530	78	75.6		S			
LOC107764561	light-induced protein, chloroplastic-like	1.05	AT4G22240	66	77.3					
LOC107818357	lecithin-cholesterol acyltransferase-like 1	1.05	AT1G27480	89	61.0					
LOC107761738	linoleate 9S-lipoxygenase 6-like	1.05	AT1G55020	85	68.1					
LOC107763589	uncharacterized LOC107763589	1.05								
LOC107832070	zinc finger protein ZAT4-like	1.05	AT2G28200	31	34.2					
LOC107810512	GDSL esterase/lipase At2g04570-like	1.05	AT2G24560	86	42.5					
LOC107817021	peroxidase P7-like	1.05	AT5G58400	69	64.9					
LOC107799886	uncharacterized LOC107799886	1.06								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107798146	LOB domain-containing protein 37-like	1.06	AT4G37540	61	56.8					
LOC107762154	purine permease 3-like	1.06	AT2G33750	77	53.5					
LOC107769654	vicilin-like seed storage protein At2g18540	1.06	AT2G18540	50	52.3					
LOC107785865	pleiotropic drug resistance protein 1-like	1.06	AT1G15520	87	71.3					
LOC107807068	RING-H2 finger protein ATL3-like	1.06	AT1G53820	34	40.8					
LOC107796212	uncharacterized LOC107796212	1.06								
LOC107783528	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme-like	1.06	AT3G02470	72	63.9					
LOC107761143	cytochrome P450 77A1-like	1.07	AT3G10560	80	60.4					
LOC107788266	non-specific lipid-transfer protein 2-like	1.07	AT5G38170	59	42.6					
LOC107768883	NAC domain-containing protein 19-like	1.07								
LOC107792628	pectinesterase 2.1-like	1.07	AT1G11580	73	44.1					
LOC107818669	L-type lectin-domain containing receptor kinase VII.1-like	1.07	AT4G04960	72	62.3					
LOC107779812	toll-like receptor 13	1.08	AT1G15740	73	57.7					
LOC107796567	dof zinc finger protein DOF2.1-like	1.08	AT2G28510	76	35.6					
LOC107787923	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g27290	1.08	AT4G27300	83	48.5					
LOC107794016	bidirectional sugar transporter SWEET7-like	1.08	AT4G10850	77	54.9					
LOC107798515	protein trichome birefringence-like 26	1.09	AT1G01430	61	52.7					
LOC107773301	nuclear factor related to kappa-B-binding protein-like	1.09	AT3G45830	56	57.1					
LOC107783735	dirigent protein 23-like	1.09	AT2G21100	86	45.6					
LOC107825436	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 25	1.10	AT4G30270	81	70.1					
LOC107819387	calmodulin-like protein 8	1.10	AT5G37780	68	78.2					
LOC107811392	betaine aldehyde dehydrogenase, chloroplastic-like	1.10	AT1G74920	82	72.9					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107771026	uncharacterized LOC107771026	1.10								
LOC107773607	proteasome assembly chaperone 4-like	1.10	AT1G48170	33	70.0					
LOC107793457	bidirectional sugar transporter SWEET12-like	1.11	AT3G48740	63	51.7		S			
LOC107773641	uncharacterized LOC107773641	1.11								
LOC107821565	metal-nicotianamine transporter YSL2-like	1.11	AT5G53550	79	72.8		S			
LOC107797536	uncharacterized LOC107797536	1.12								
LOC107763380	receptor-like protein 12	1.12	AT3G05660	79	41.4					
LOC107815637	asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]-like	1.12	AT3G47340	77	85.4					
LOC107803049	formin-like protein 4	1.12	AT1G24150	68	53.1					
LOC107802367	dnaJ protein ERDJ2A-like	1.12	AT1G79940	72	76.0					
LOC107804084	protein NEN1-like	1.12								
LOC107807299	uncharacterized LOC107807299	1.12								
LOC107778581	serine carboxypeptidase-like 13	1.13	AT2G22970	80	52.3					
LOC107821158	RING-H2 finger protein ATL60-like	1.13	AT1G53820	34	40.8					
LOC107791770	ribulose biphosphate carboxylase small chain S41, chloro- plastic-like	1.13	AT5G38420	58	78.0					
LOC107784944	pre-mRNA cleavage factor Im 25 kDa subunit 1-like	1.13	AT4G29820	62	63.8			S		
LOC107800721	cytochrome P450 93A3-like	1.13	AT5G06900	96	49.5					
LOC107762230	putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltrans- ferase Mb0746c	1.13	AT5G42760	69	64.7					
LOC107779506	uncharacterized LOC107779506	1.14								
LOC107812891	probable calcium-binding protein CML15	1.14	AT3G25600	42	75.8					
LOC107815522	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 7-like	1.14	AT3G23000	71	51.5					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107811198	uncharacterized LOC107811198	1.20	AT4G38490	42	42.0					
LOC107807779	uncharacterized LOC107807779	1.20								
LOC107773215	GDSL esterase/lipase At1g29670-like	1.20	AT1G29670	84	47.1					
LOC107806153	uncharacterized LOC107806153	1.21	AT1G72030	66	60.4					
LOC107775446	uncharacterized LOC107775446	1.21								
LOC107765058	ABC transporter C family member 10-like	1.22	AT3G59140	80	65.9					
LOC107772873	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 21-like	1.22	AT2G33730	82	81.0			S		
LOC107807837	uncharacterized LOC107807837	1.22								
LOC107792782	auxin-repressed 12.5 kDa protein-like	1.23	AT1G28330	46	49.6					
LOC107813613	chalcone synthase A	1.23	AT5G13930	81	85.0	S				
LOC107781959	glycine-rich cell wall structural protein-like	1.23								
LOC107798583	uncharacterized LOC107798583	1.23	AT1G19490	65	31.4					
LOC107798149	mitogen-activated protein kinase kinase YODA-like	1.24	AT5G66850	40	62.9					
LOC107789472	glutamate decarboxylase-like	1.24	AT2G02010	85	71.0					
LOC107796681	uncharacterized LOC107796681	1.25								
LOC107807254	chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic	1.25	AT1G29930	79	87.5					
LOC107791684	uncharacterized LOC107791684	1.25								
LOC107764034	uncharacterized LOC107764034	1.25								
LOC107763767	glutathione S-transferase L3-like	1.26	AT5G02790	60	68.4					
LOC107769771	uncharacterized LOC107769771	1.26								
LOC107798456	uncharacterized LOC107798456	1.26	AT3G05680	77	63.1			S		
LOC107769257	protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3-like	1.26	AT1G12110	83	61.6	S				
LOC107823176	uncharacterized LOC107823176	1.26	AT1G52565	41	44.5					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107762761	heme-binding-like protein At3g10130, chloroplastic	1.26	AT3G10130	67	71.0					
LOC107827440	uncharacterized LOC107827440	1.26								
LOC107818384	keratin, type I cytoskeletal 9-like	1.27								
LOC107821946	E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER-like	1.27	AT2G15580	53	42.6					
LOC107796698	aspartic proteinase-like protein 2	1.27	AT1G05840	50	72.4					
LOC107808355	uncharacterized LOC107808355	1.27								
LOC107804567	protein CHUP1, chloroplastic-like	1.27	AT3G25690	41	64.0					
LOC107823075	pathogenesis-related protein STH-2-like	1.27								
LOC107811858	probable magnesium transporter NIPA2	1.28	AT3G23870	47	68.8					
LOC107791294	glycine-rich protein-like	1.28								
LOC107800244	GDSL esterase/lipase At5g03980-like	1.28	AT5G03980	68	46.3					
LOC107802826	F-box/kelch-repeat protein At3g23880-like	1.29	AT3G23880	64	32.9					
LOC107778620	fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	1.29	AT4G26530	80	84.0					
LOC107795900	uncharacterized LOC107795900	1.30	AT4G23160	30	48.5					
LOC107818894	uncharacterized LOC107818894	1.30								
LOC107799507	uncharacterized LOC107799507	1.30								
LOC107766234	uncharacterized LOC107766234	1.30								
LOC107798523	U-box domain-containing protein 12-like	1.30								
LOC107801018	uncharacterized LOC107801018	1.30	AT3G02420	64	71.6					
LOC107767480	uncharacterized LOC107767480	1.31	AT2G09970	36	50.7					
LOC107823326	rust resistance kinase Lr10-like	1.32	AT1G66910	73	35.3					
LOC107763028	purple acid phosphatase 22-like	1.32	AT3G20500	79	61.6					
LOC107800702	probable inactive purple acid phosphatase 16	1.32	AT3G10150	72	66.9					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA	Reparo de DNA
LOC107811775	uncharacterized LOC107811775	1.32									
LOC107763019	uncharacterized LOC107763019	1.32									
LOC107782292	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24-like	1.32	AT4G30270	81	70.1						
LOC107796869	BURP domain protein RD22-like	1.33	AT5G25610	48	61.9						
LOC107777013	pathogen-related protein-like	1.33	AT1G78780	82	57.4						
LOC107830572	uncharacterized LOC107830572	1.33	AT2G15730	50	64.9						
LOC107826262	uncharacterized LOC107826262	1.33									
LOC107773187	uncharacterized LOC107773187	1.35									
LOC107820197	uncharacterized LOC107820197	1.36	AT1G11940	66	57.6						
LOC107817582	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase	1.36	AT3G14420	68	92.5						
LOC107782000	importin-5-like	1.36	AT5G19820	87	51.5		S				
LOC107832274	uncharacterized LOC107832274	1.36									
LOC107831828	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase-like	1.36	AT3G14420	68	92.5						
LOC107807886	3-ketoacyl-CoA synthase 20-like	1.37	AT1G01120	84	59.5						
LOC107809726	uncharacterized LOC107809726	1.38									
LOC107784379	protein NRT1/ PTR FAMILY 6.2-like	1.38	AT2G26690	86	76.8						
LOC107776231	pyruvate, phosphate dikinase, chloroplastic	1.39	AT4G15530	81	83.8						
LOC107786414	peroxidase P7-like	1.39	AT1G14550	72	54.3						
LOC107772017	heat shock protein 83-like	1.39	AT5G52640	82	86.0						
LOC107806733	probable trehalose-phosphate phosphatase H	1.39	AT1G35910	67	65.1						
LOC107822422	putative F-box protein At1g32420	1.39									
LOC107786108	RHOMBOID-like protein 8	1.40	AT1G77860	41	52.9						
LOC107800707	uncharacterized LOC107800707	1.41	AT5G04000	31	48.9						

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107770733	basic endochitinase	1.41	AT1G02360	75	55.9					
LOC107831753	defensin-like protein	1.42	AT2G02140	43	38.7					
LOC107763686	uncharacterized LOC107763686	1.42								
LOC107808074	late blight resistance protein R1-A-like	1.43								
LOC107765801	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 12-like	1.43	AT5G43440	53	51.5					
LOC107827891	proteinase inhibitor I-B-like	1.43	AT5G43570	36	39.7					
LOC107830212	urease accessory protein F-like	1.44	AT1G21840	35	70.6					
LOC107798495	oleosin 1-like	1.44	AT2G25890	91	48.8					
LOC107797241	receptor-like protein 12	1.45	AT1G07390	93	36.8					
LOC107789951	triacylglycerol lipase 2-like	1.45	AT5G14180	68	62.9					
LOC107807688	ribonuclease S-7-like	1.45	AT1G26820	52	33.2					
LOC107761609	UDP-glycosyltransferase 73C2-like	1.47	AT2G36780	80	56.8					
LOC107783737	uncharacterized LOC107783737	1.47								
LOC107791919	uncharacterized LOC107791919	1.48								
LOC107825011	uncharacterized LOC107825011	1.48	AT2G44060	75	72.6		S			
LOC107796753	heptahelical transmembrane protein 1-like	1.48	AT4G37680	66	43.5					
LOC107819415	B3 domain-containing protein REM9-like	1.49	AT4G31680	37	42.1					
LOC107807834	uncharacterized LOC107807834	1.50	AT4G29310	77	46.1					
LOC107768390	RHOMBOID-like protein 9, chloroplastic	1.50	AT5G38510	62	46.8					
LOC107780740	uncharacterized LOC107780740	1.50								
LOC107818368	pectin acetylesterase 8-like	1.51	AT4G19420	51	54.3					
LOC107815458	uncharacterized LOC107815458	1.51	AT1G27990	78	65.2					
LOC107811350	cytochrome P450 84A1-like	1.51	AT5G04330	65	60.0					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107795681	BAG family molecular chaperone regulator 6-like	1.53								
LOC107774988	germacrene C synthase-like	1.53	AT3G14540	72	35.1					
LOC107824118	tyrosine/DOPA decarboxylase 5-like	1.53	AT2G20340	83	54.2					
LOC107798318	importin-5-like	1.53	AT5G19820	87	51.5		S			
LOC107781780	uncharacterized LOC107781780	1.54								
LOC107812329	non-specific lipid-transfer protein 1	1.55	AT3G51600	46	47.5					
LOC107781921	uncharacterized LOC107781921	1.55								
LOC107771097	zinc finger CCCH domain-containing protein 20-like	1.55	AT2G19810	66	55.3					
LOC107768612	TMV resistance protein N-like	1.55	AT5G36930	65	34.4					
LOC107828336	uncharacterized protein At1g04910-like	1.57	AT1G22460	72	61.7					
LOC107781824	uncharacterized LOC107781824	1.57	AT4G35720	59	37.3					
LOC107820702	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g24080	1.57	AT5G24080	81	32.6					
LOC107785054	uncharacterized LOC107785054	1.59								
LOC107809160	uncharacterized LOC107809160	1.60	AT2G01818	54	46.6					
LOC107812621	GDSL esterase/lipase LTL1-like	1.60	AT5G33370	80	66.5					
LOC107761788	protein SRG1-like	1.60	AT1G17020	89	54.3					
LOC107767639	uncharacterized LOC107767639	1.61								
LOC107829047	uncharacterized LOC107829047	1.62	AT1G10657	40	55.3					
LOC107793188	uncharacterized LOC107793188	1.63								
LOC107775937	uncharacterized protein At5g65660-like	1.63								
LOC107821505	gibberellin 2-beta-dioxygenase 1-like	1.64	AT1G78440	73	58.6					
LOC107759673	homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like	1.65	AT4G36740	60	60.0		S			
LOC107828106	dirigent protein 21-like	1.65	AT2G21100	86	45.6					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107830187	pathogenesis-related protein STH-2-like	1.67								
LOC107770644	uncharacterized LOC107770644	1.68								
LOC107770934	non-specific lipid-transfer protein 2-like	1.69	AT5G59310	54	41.3					
LOC107774166	exocyst complex component EXO70B1-like	1.70	AT5G13150	85	47.6					
LOC107824681	anther-specific protein TA-29	1.71								
LOC107804864	shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase-like	1.71	AT5G57840	77	42.5					
LOC107804135	photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplastic-like	1.72	AT1G79040	66	75.2					
LOC107781413	uncharacterized LOC107781413	1.72	AT5G58630	54	32.4					
LOC107796351	proteinase inhibitor I-B-like	1.73	AT5G43570	36	39.7					
LOC107760129	non-specific lipid-transfer protein 2-like	1.74	AT2G38530	51	53.4					
LOC107763684	abscisic stress-ripening protein 2	1.76								
LOC107795987	receptor-like protein 12	1.76	AT3G05650	84	35.8					
LOC107759897	uncharacterized LOC107759897	1.77	AT3G42170	38	36.4					
LOC107782348	uncharacterized LOC107782348	1.77								
LOC107808759	peroxidase 12-like	1.78	AT1G71695	72	67.0					
LOC107831358	uncharacterized LOC107831358	1.79								
LOC107765268	uncharacterized LOC107765268	1.79	AT3G23530	83	69.6					
LOC107780744	uncharacterized LOC107780744	1.79								
LOC107764661	protein SENESENCE-ASSOCIATED GENE 21, mitochondrial-like	1.81	AT4G02380	39	52.6					
LOC107822530	type IV inositol polyphosphate 5-phosphatase 11-like	1.81	AT1G47510	63	60.4	S				
LOC107817490	premnaspirodiene oxygenase-like	1.81	AT5G25120	84	41.3					
LOC107790388	gibberellin 2-beta-dioxygenase 1-like	1.82	AT1G30040	77	56.1					
LOC107816896	tonoplast dicarboxylate transporter-like	1.82	AT5G47560	80	70.8					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107807529	gibberellin 2-beta-dioxygenase 8-like	1.83	AT4G21200	78	69.5					
LOC107823104	uncharacterized LOC107823104	1.84								
LOC107783069	methylecgonone reductase-like	1.85	AT1G59960	71	50.2					
LOC107815073	patatin-like protein 2	1.85	AT4G37060	72	47.8					
LOC107802690	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g24080	1.86	AT5G24080	81	32.6					
LOC107828861	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g24080	1.86	AT1G34300	80	36.9					
LOC107780162	laccase-12-like	1.87	AT2G40370	73	76.9					
LOC107772986	uncharacterized LOC107772986	1.88								
LOC107802436	uncharacterized LOC107802436	1.89	AT5G61820	45	57.6					
LOC107824752	early light-induced protein, chloroplastic-like	1.89	AT3G22840	64	53.6					
LOC107800252	uncharacterized LOC107800252	1.89	AT4G31560	33	49.5					
LOC107804577	purine permease 3-like	1.90	AT2G33750	77	53.5					
LOC107831815	cytochrome P450 76A2-like	1.91	AT3G52970	78	42.9					
LOC107759823	uncharacterized LOC107759823	1.92								
LOC107775833	NAC transcription factor 29-like	1.93	AT1G69490	48	66.4		S			
LOC107803490	uncharacterized LOC107803490	1.96	AT3G11310	43	36.4					
LOC107760124	non-specific lipid-transfer protein 2-like	1.97	AT1G19260	45	39.7					
LOC107820425	polygalacturonase QRT3	1.97	AT4G20040	79	60.7					
LOC107809148	uncharacterized LOC107809148	1.99								
LOC107779436	single myb histone 5-like	1.99	AT1G49950	32	45.2	S				
LOC107797369	uncharacterized LOC107797369	2.00	AT1G19260	45	39.7					
LOC107808763	uncharacterized transporter YBR287W-like	2.01	AT1G71090	67	70.1	S				

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107784032	uncharacterized LOC107784032	2.01	AT1G56220	52	43.9					
LOC107767796	carbonic anhydrase, chloroplastic-like	2.02	AT3G01500	70	66.9					
LOC107789489	protein ODORANT1-like	2.03	AT4G28110	50	68.2					
LOC107791470	uncharacterized LOC107791470	2.05	AT4G35720	59	37.3					
LOC107776217	uncharacterized LOC107776217	2.06								
LOC107812321	carbonic anhydrase, chloroplastic-like	2.08	AT5G14740	87	64.5					
LOC107827801	uncharacterized LOC107827801	2.08								
LOC107760440	probable glutathione S-transferase	2.09	AT2G29450	72	45.4					
LOC107799312	cytochrome P450 84A1-like	2.10	AT5G07990	91	37.2	S				
LOC107825956	uncharacterized LOC107825956	2.10								
LOC107796641	uncharacterized LOC107796641	2.11								
LOC107793639	uncharacterized LOC107793639	2.12								
LOC107820822	probable flavonol synthase 5	2.15	AT3G19000	62	66.2					
LOC107787623	glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2-like	2.15	AT3G24090	48	77.5					
LOC107822857	uncharacterized LOC107822857	2.16								
LOC107783527	proline dehydrogenase 2, mitochondrial-like	2.18	AT3G30775	68	60.0					
LOC107770469	homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like	2.20	AT4G36740	60	60.0	S				
LOC107780999	uncharacterized LOC107780999	2.21								
LOC107829459	telomere repeat-binding factor 1-like	2.22								
LOC107802874	uncharacterized LOC107802874	2.22	AT1G06740	57	36.8					
LOC107766213	uncharacterized LOC107766213	2.23								
LOC107785794	uncharacterized LOC107785794	2.24								
LOC107801372	agmatine coumaroyltransferase-2-like	2.26	AT5G48930	91	34.6					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107767157	uncharacterized LOC107767157	2.33								
LOC107806886	uncharacterized LOC107806886	2.34								
LOC107804137	uncharacterized LOC107804137	2.35								
LOC107832655	indole-3-acetate O-methyltransferase 1-like	2.38	AT5G55250	86	72.7					
LOC107818277	alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase-like	2.38	AT4G33790	80	59.4				S	
LOC107786138	uncharacterized LOC107786138	2.40								
LOC107804715	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-1-like	2.41	AT2G29960	71	66.7					
LOC107775540	cell wall / vacuolar inhibitor of fructosidase 1-like	2.43	AT1G47960	65	42.9					
LOC107790224	uncharacterized LOC107790224	2.43								
LOC107777295	uncharacterized LOC107777295	2.45	AT1G72100	63	43.0		S			
LOC107771086	O-acyltransferase WSD1-like	2.47	AT3G49190	71	31.7					
LOC107824759	uncharacterized LOC107824759	2.50								
LOC107776481	uncharacterized LOC107776481	2.50								
LOC107785655	peroxisomal membrane protein 11-4-like	2.51	AT3G47430	74	71.9					
LOC107768165	L-ornithine N5-acetyltransferase NATA1-like	2.51	AT2G39030	76	45.7					
LOC107771539	anther-specific protein TA-29-like	2.53								
LOC107806576	carbonic anhydrase, chloroplastic-like	2.54	AT5G14740	87	64.5					
LOC107788057	uncharacterized protein At4g04775-like	2.58								
LOC107822606	uncharacterized LOC107822606	2.60								
LOC107828560	translation initiation factor IF-1, chloroplastic	2.60								
LOC107788569	protein ODORANT1-like	2.61	AT4G21440	48	71.7					
LOC107766996	nuclear transcription factor Y subunit A-7-like	2.64	AT1G30500	43	39.2					
LOC107812915	uncharacterized LOC107812915	2.65								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107787417	FK506-binding protein 5-like	2.67								
LOC107794476	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog	2.69	AT1G06620	80	53.4					
LOC107814798	uncharacterized LOC107814798	2.69								
LOC107794739	uncharacterized LOC107794739	2.71								
LOC107819906	uncharacterized LOC107819906	2.72								
LOC107793453	peroxidase P7-like	2.77	AT5G58400	69	64.9					
LOC107765749	nodulation-signaling pathway 2 protein-like	2.80	AT4G08250	58	59.2					
LOC107783459	uncharacterized LOC107783459	2.81								
LOC107781375	uncharacterized LOC107781375	2.81								
LOC107823588	uncharacterized LOC107823588	2.82								
LOC107825454	uncharacterized LOC107825454	2.84								
LOC107787664	uncharacterized LOC107787664	2.84								
LOC107786324	uncharacterized LOC107786324	2.86								
LOC107772481	uncharacterized LOC107772481	2.86								
LOC107797247	uncharacterized LOC107797247	2.87								
LOC107801460	uncharacterized LOC107801460	2.87								
LOC107771524	uncharacterized LOC107771524	2.90								
LOC107777661	peroxidase P7-like	2.91	AT1G14550	72	54.3					
LOC107772584	protein DMR6-LIKE OXYGENASE 2-like	2.91	AT3G19000	62	66.2					
LOC107777049	uncharacterized LOC107777049	2.93								
LOC107797196	embryonic protein DC-8-like	2.93	AT2G18340	51	34.6		S			
LOC107781531	abscisic acid 8'-hydroxylase 4-like	2.94	AT3G19270	77	67.1					
LOC107777562	uncharacterized LOC107777562	2.99								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107830482	aquaporin PIP2-1-like	2.99	AT2G37170	86	75.7					
LOC107812825	acidic mammalian chitinase-like	3.01	AT4G19800	52	39.7					
LOC107768611	uncharacterized LOC107768611	3.03								
LOC107759120	uncharacterized LOC107759120	3.04								
LOC107799889	cysteine protease inhibitor 8-like	3.04	AT1G73260	69	31.9					
LOC107776205	uncharacterized LOC107776205	3.05								
LOC107803668	uncharacterized LOC107803668	3.07								
LOC107814505	low-temperature-induced 65 kDa protein-like	3.09	AT5G52300	49	35.2					
LOC107768353	uncharacterized LOC107768353	3.10	AT1G64850	68	68.4					
LOC107824177	uncharacterized LOC107824177	3.11								
LOC107817673	uncharacterized LOC107817673	3.12	AT1G79040	66	75.2					
LOC107813753	uncharacterized LOC107813753	3.14								
LOC107763249	abscisic acid and environmental stress-inducible protein TAS14-like	3.14								
LOC107784557	uncharacterized LOC107784557	3.15								
LOC107830255	uncharacterized LOC107830255	3.23								
LOC107828077	uncharacterized LOC107828077	3.23								
LOC107810861	homeobox-leucine zipper protein ATHB-7-like	3.24								
LOC107769314	uncharacterized LOC107769314	3.27								
LOC107797647	transketolase, chloroplastic-like	3.28	AT2G45290	80	56.1					
LOC107829542	uncharacterized LOC107829542	3.36								
LOC107765971	uncharacterized LOC107765971	3.37								
LOC107788926	eukaryotic translation initiation factor 5B-like	3.38	AT1G76810	60	67.2					
LOC107787412	malate synthase, glyoxysomal	3.39	AT5G03860	84	82.2					

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107793800	uncharacterized LOC107793800	3.39								
LOC107778174	GDSL esterase/lipase At1g28580-like	3.40	AT1G28650	82	45.4					
LOC107812010	uncharacterized LOC107812010	3.40								
LOC107795976	uncharacterized LOC107795976	3.45								
LOC107791754	15 kDa selenoprotein-like	3.46	AT1G05720	51	71.1					
LOC107818523	uncharacterized LOC107818523	3.47								
LOC107802513	mitochondrial amidoxime-reducing component 1-like	3.47	AT5G44720	62	53.9					
LOC107791298	uncharacterized LOC107791298	3.49								
LOC107812305	WAS/WASL-interacting protein family member 3-like	3.49								
LOC107785251	universal stress protein A-like protein	3.52	AT1G68300	53	56.1					
LOC107793215	late embryogenesis abundant protein Dc3-like	3.53	AT1G52690	61	50.6		S			
LOC107792731	uncharacterized LOC107792731	3.54								
LOC107770748	uncharacterized LOC107770748	3.58								
LOC107813958	uncharacterized LOC107813958	3.61								
LOC107828296	uncharacterized LOC107828296	3.65								
LOC107830230	uncharacterized LOC107830230	3.67								
LOC107760350	uncharacterized LOC107760350	3.70								
LOC107800974	uncharacterized LOC107800974	3.73								
LOC107810930	uncharacterized LOC107810930	3.76								
LOC107827624	uncharacterized LOC107827624	3.89								
LOC107809012	uncharacterized LOC107809012	3.90								
LOC107761364	serine/arginine-rich <i>splicing</i> factor SR30-like	3.90	AT1G09140	48	71.7			S		
LOC107779063	uncharacterized LOC107779063	3.92								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade			Termos GO				
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107814383	uncharacterized LOC107814383	3.95								
LOC107783392	uncharacterized LOC107783392	3.96								
LOC107767525	uncharacterized LOC107767525	4.03								
LOC107760204	uncharacterized LOC107760204	4.19								
LOC107767449	uncharacterized LOC107767449	4.19								
LOC107820120	uncharacterized LOC107820120	4.21								
LOC107782725	low-temperature-induced 65 kDa protein-like	4.23	AT5G52300	49	35.2					
LOC107788637	basic proline-rich protein-like	4.24	AT3G19430	41	61.4					
LOC107759159	DNA-3-methyladenine glycosylase-like	4.24	AT3G12040	56	67.2					S
LOC107800407	uncharacterized LOC107800407	4.27								
LOC107821700	uncharacterized LOC107821700	4.28	AT1G68300	53	56.1					
LOC107816903	uncharacterized LOC107816903	4.29								
LOC107772355	uncharacterized LOC107772355	4.39								
LOC107794464	latex serine proteinase inhibitor-like	4.41	AT1G73325	59	34.5					
LOC107799226	uncharacterized LOC107799226	4.51								
LOC107781345	uncharacterized LOC107781345	4.56								
LOC107799734	ribose-phosphate pyrophosphokinase 1-like	4.58	AT1G32380	61	85.0					
LOC107774244	uncharacterized LOC107774244	4.59								
LOC107828681	uncharacterized LOC107828681	4.73								
LOC107819915	abscisic acid and environmental stress-inducible protein TAS14-like	4.76								
LOC107810007	uncharacterized LOC107810007	4.82	AT1G19260	45	39.7					
LOC107797564	uncharacterized LOC107797564	5.02								
LOC107809318	uncharacterized LOC107809318	5.06								

Núm. Acesso	Descrição	log ₂ FC	Análise de similaridade				Termos GO			
			Araport	Cobertura	Identidade	Auxina	Des. Est. Rep.	Proces. RNA	Ciclo celular	Replicação de DNA
LOC107764073	uncharacterized LOC107764073	5.06								
LOC107793008	uncharacterized LOC107793008	5.12								
LOC107808227	uncharacterized LOC107808227	5.13								
LOC107821450	uncharacterized LOC107821450	5.36								
LOC107802858	uncharacterized LOC107802858	5.37								
LOC107809415	uncharacterized LOC107809415	5.39	AT1G07985	36	53.1					
LOC107781201	uncharacterized LOC107781201	5.39								
LOC107829955	uncharacterized LOC107829955	5.52								
LOC107794140	uncharacterized LOC107794140	5.77								
LOC107822037	uncharacterized LOC107822037	5.90								
LOC107792863	uncharacterized LOC107792863	5.90								
LOC107761372	zinc finger BED domain-containing protein RICESLEEPER 1-like	5.92								
LOC107822863	miraculin-like	6.00	AT1G17860	66	35.7					
LOC107772118	uncharacterized LOC107772118	6.17								
LOC107761215	COP9 signalosome complex subunit 7-like	6.30								
LOC107781276	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570	6.71	AT3G47090	58	32.5					
LOC107826754	uncharacterized LOC107826754	6.82								
LOC107783689	uncharacterized LOC107783689	6.95								
LOC107766236	kirola-like	7.13	AT1G70840	63	37.5					
LOC107812821	uncharacterized LOC107812821	7.30								
LOC107813935	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24-like	7.31	AT4G25810	63	61.5					

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE C

Resultados da análise de enriquecimento de termos GO para os 1.087 putativos homólogos em *A. thaliana* dos genes DE em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SCI1*. Essa análise foi realizada com o programa *AgriGOv2.0* (TIAN et al., 2017). Na Tabela C. 1, estão listados os termos enriquecidos da categoria “Processo Biológico”. Na Tabela C. 2, estão listados os termos GO enriquecidos da categoria “Função Molecular”. Na Tabela C. 3, estão listados os termos GO da categoria “Componente Celular”.

Tabela C. 1. Lista dos 160 termos GO enriquecidos da categoria “Processo Biológico” para os 1.087 genes de *A. thaliana* putativos homólogos de genes DE em estigmas/estiletes de plantas de *N. tabacum* silenciando *SCI1*. **Termo GO:** número de acesso do termo; **Descrição:** nome do termo; **Núm. de genes DE:** número de genes homólogos dos genes DE em *A. thaliana* que podem ser associados ao termo; **Núm. Referência:** número de genes totais de *A. thaliana* que podem ser associados ao termo; **p-valor:** valor de probabilidade do termo não estar enriquecido; **FDR:** taxa de falso descobrimento, corresponde ao p-valor ajustado pelo método de Benjamini-Hochberg.

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0044699	single-organism process	511	9448	9.30E-21	5.30E-17
GO:0044763	single-organism cellular process	360	6591	1.10E-13	2.70E-10
GO:0008152	metabolic process	581	12035	1.40E-13	2.70E-10
GO:0044710	single-organism metabolic process	236	3970	6.10E-12	8.60E-09
GO:0009987	cellular process	599	12771	1.20E-11	1.40E-08
GO:0046483	heterocycle metabolic process	249	4433	3.10E-10	2.90E-07
GO:1901360	organic cyclic compound metabolic process	259	4700	7.20E-10	5.30E-07
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	254	4588	7.40E-10	5.30E-07
GO:0071704	organic substance metabolic process	505	10672	1.40E-09	8.70E-07
GO:0007049	cell cycle	54	558	3.20E-09	1.80E-06
GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	232	4178	4.10E-09	2.10E-06
GO:0042221	response to chemical	171	2853	5.80E-09	2.50E-06
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	213	3768	5.60E-09	2.50E-06
GO:0044237	cellular metabolic process	468	9879	1.00E-08	4.10E-06
GO:0050896	response to stimulus	319	6250	1.20E-08	4.60E-06

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0006259	DNA metabolic process	51	539	1.70E-08	6.20E-06
GO:0032502	developmental process	186	3233	2.00E-08	6.70E-06
GO:0009605	response to external stimulus	107	1582	2.60E-08	8.10E-06
GO:0032501	multicellular organismal process	176	3032	2.90E-08	8.80E-06
GO:0007275	multicellular organism development	165	2811	4.30E-08	1.20E-05
GO:0048731	system development	123	1929	4.90E-08	1.30E-05
GO:0006950	response to stress	196	3506	5.90E-08	1.50E-05
GO:0044238	primary metabolic process	462	9890	9.10E-08	2.20E-05
GO:0000003	reproduction	111	1721	1.40E-07	3.30E-05
GO:0044702	single organism reproductive process	102	1544	1.60E-07	3.70E-05
GO:0044707	single-multicellular organism process	165	2875	1.70E-07	3.80E-05
GO:0010033	response to organic substance	125	2023	1.90E-07	4.10E-05
GO:0048856	anatomical structure development	177	3146	2.00E-07	4.10E-05
GO:0044767	single-organism developmental process	176	3131	2.30E-07	4.60E-05
GO:0022414	reproductive process	109	1715	3.60E-07	6.80E-05
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	309	6241	4.10E-07	7.50E-05
GO:0009058	biosynthetic process	309	6255	5.00E-07	8.90E-05
GO:0009628	response to abiotic stimulus	123	2022	5.30E-07	9.10E-05
GO:0009791	post-embryonic development	101	1576	7.00E-07	0.00012
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	293	5913	9.00E-07	0.00015
GO:0033554	cellular response to stress	64	858	9.50E-07	0.00015
GO:0048523	negative regulation of cellular process	49	594	1.40E-06	0.00021
GO:0006082	organic acid metabolic process	76	1099	1.40E-06	0.00021
GO:0050789	regulation of biological process	266	5306	1.50E-06	0.00021
GO:0050794	regulation of cellular process	247	4857	1.50E-06	0.00021
GO:0044711	single-organism biosynthetic process	107	1735	1.70E-06	0.00024
GO:0065007	biological regulation	296	6062	2.60E-06	0.00036
GO:0016070	RNA metabolic process	182	3403	3.00E-06	0.0004
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	159	2889	3.20E-06	0.00041

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	163	2980	3.30E-06	0.00042
GO:0051301	cell division	34	358	3.80E-06	0.00047
GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic process	171	3174	4.30E-06	0.00052
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	62	864	4.50E-06	0.00053
GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	161	2957	4.90E-06	0.00056
GO:0019222	regulation of metabolic process	171	3181	4.80E-06	0.00056
GO:0048608	reproductive structure development	82	1265	5.50E-06	0.0006
GO:0061458	reproductive system development	82	1265	5.50E-06	0.0006
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	96	1557	6.10E-06	0.00066
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	31	320	7.00E-06	0.0007
GO:0044249	cellular biosynthetic process	285	5870	7.00E-06	0.0007
GO:0043436	oxoacid metabolic process	67	973	6.70E-06	0.0007
GO:0006996	organelle organization	85	1335	7.00E-06	0.0007
GO:0022402	cell cycle process	34	370	7.30E-06	0.00071
GO:0051704	multi-organism process	99	1631	8.00E-06	0.00077
GO:0044281	small molecule metabolic process	97	1597	9.70E-06	0.00092
GO:0006260	DNA replication	19	146	1.10E-05	0.001
GO:0010154	fruit development	52	702	1.20E-05	0.0011
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	163	3058	1.30E-05	0.0012
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	160	2998	1.50E-05	0.0013
GO:0099402	plant organ development	65	961	1.60E-05	0.0013
GO:0001101	response to acid chemical	76	1181	1.50E-05	0.0013
GO:0048827	phyllome development	41	508	1.60E-05	0.0014
GO:0048519	negative regulation of biological process	59	848	1.80E-05	0.0015
GO:0042742	defense response to bacterium	32	354	1.80E-05	0.0015
GO:0009617	response to bacterium	37	441	1.90E-05	0.0016
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	42	531	2.00E-05	0.0016
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	148	2752	2.30E-05	0.0018
GO:0009651	response to salt stress	44	574	2.60E-05	0.002

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	147	2739	2.70E-05	0.0021
GO:0003006	developmental process involved in reproduction	90	1496	2.90E-05	0.0022
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	48	653	3.00E-05	0.0022
GO:0051321	meiotic cell cycle	19	158	3.00E-05	0.0022
GO:0055114	oxidation-reduction process	93	1566	3.30E-05	0.0024
GO:0009725	response to hormone	96	1631	3.40E-05	0.0025
GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	143	2666	3.60E-05	0.0026
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	146	2734	3.60E-05	0.0026
GO:0051726	regulation of cell cycle	21	191	3.90E-05	0.0027
GO:0006629	lipid metabolic process	65	994	4.10E-05	0.0028
GO:0071840	cellular component organization or biogenesis	149	2812	4.30E-05	0.0029
GO:0048367	shoot system development	60	896	4.30E-05	0.0029
GO:2000112	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	142	2657	4.50E-05	0.003
GO:0016054	organic acid catabolic process	16	121	4.50E-05	0.003
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	276	5805	4.70E-05	0.003
GO:0051707	response to other organism	75	1210	5.50E-05	0.0035
GO:0009607	response to biotic stimulus	77	1253	5.70E-05	0.0036
GO:0043207	response to external biotic stimulus	75	1212	5.80E-05	0.0036
GO:0051716	cellular response to stimulus	150	2856	6.10E-05	0.0038
GO:0016043	cellular component organization	132	2456	6.80E-05	0.0042
GO:0019219	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	135	2529	7.50E-05	0.0045
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	9	41	7.60E-05	0.0045
GO:0048316	seed development	47	661	7.70E-05	0.0046
GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthetic process	146	2781	7.90E-05	0.0046
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	131	2443	8.00E-05	0.0047

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:2001141	regulation of RNA biosynthetic process	131	2445	8.30E-05	0.0047
GO:1903506	regulation of nucleic acid-templated transcription	131	2445	8.30E-05	0.0047
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	132	2474	9.30E-05	0.0052
GO:0010468	regulation of gene expression	147	2814	9.30E-05	0.0052
GO:0048366	leaf development	30	356	0.00011	0.0058
GO:0009892	negative regulation of metabolic process	39	521	0.00012	0.0063
GO:0009719	response to endogenous stimulus	98	1732	0.00011	0.0063
GO:0044282	small molecule catabolic process	18	162	0.00012	0.0064
GO:0006970	response to osmotic stress	45	636	0.00012	0.0064
GO:0006397	mRNA processing	28	324	0.00012	0.0064
GO:0048285	organelle fission	24	257	0.00012	0.0064
GO:0010629	negative regulation of gene expression	33	415	0.00014	0.007
GO:0006281	DNA repair	26	295	0.00015	0.0079
GO:0009790	embryo development	41	571	0.00018	0.0091
GO:0010605	negative regulation of macromolecule metabolic process	36	480	0.0002	0.01
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	27	318	0.0002	0.01
GO:0031327	negative regulation of cellular biosynthetic process	29	355	0.00022	0.011
GO:0031425	chloroplast RNA processing	6	19	0.00023	0.012
GO:0031324	negative regulation of cellular metabolic process	32	412	0.00025	0.012
GO:0006351	transcription, DNA-templated	133	2559	0.00025	0.012
GO:2000113	negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	27	323	0.00026	0.012
GO:0097659	nucleic acid-templated transcription	133	2561	0.00026	0.012
GO:0009890	negative regulation of biosynthetic process	29	360	0.00028	0.013
GO:0016101	diterpenoid metabolic process	8	39	0.00028	0.013
GO:0032774	RNA biosynthetic process	133	2566	0.00028	0.013
GO:0009056	catabolic process	82	1430	0.00028	0.013

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0044712	single-organism catabolic process	41	585	0.00029	0.013
GO:0006270	DNA replication initiation	6	20	0.0003	0.013
GO:0009991	response to extracellular stimulus	21	225	0.00032	0.014
GO:0009793	embryo development ending in seed dormancy	35	478	0.00037	0.016
GO:1903046	meiotic cell cycle process	13	104	0.00037	0.016
GO:0009733	response to auxin	31	407	0.00042	0.019
GO:0016071	mRNA metabolic process	31	409	0.00046	0.02
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	20	215	0.00046	0.02
GO:0051172	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	28	356	0.0005	0.021
GO:0010558	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	27	339	0.00052	0.022
GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	16	154	0.00056	0.023
GO:1901575	organic substance catabolic process	72	1249	0.00057	0.024
GO:0031668	cellular response to extracellular stimulus	19	204	0.00062	0.026
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	17	172	0.00064	0.026
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	32	438	0.00067	0.027
GO:0006396	RNA processing	45	693	0.00069	0.028
GO:0048513	animal organ development	31	422	0.00074	0.03
GO:0071496	cellular response to external stimulus	19	208	0.00077	0.031
GO:0009753	response to jasmonic acid	20	225	0.00077	0.031
GO:0006261	DNA-dependent DNA replication	12	99	0.00079	0.031
GO:0051276	chromosome organization	34	482	0.00082	0.032
GO:0010035	response to inorganic substance	56	926	0.00082	0.032
GO:1903047	mitotic cell cycle process	20	228	0.0009	0.035
GO:0042594	response to starvation	16	162	0.00091	0.035
GO:1903507	negative regulation of nucleic acid-templated transcription	20	231	0.001	0.039
GO:1902679	negative regulation of RNA biosynthetic process	20	231	0.001	0.039

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0098542	defense response to other organism	56	936	0.001	0.039
GO:0045934	negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	21	249	0.0011	0.04
GO:0009743	response to carbohydrate	14	133	0.0011	0.04
GO:0051253	negative regulation of RNA metabolic process	20	232	0.0011	0.04
GO:0000280	nuclear division	19	215	0.0011	0.04
GO:1901699	cellular response to nitrogen compound	11	89	0.0011	0.041
GO:0046395	carboxylic acid catabolic process	12	105	0.0013	0.046
GO:0071214	cellular response to abiotic stimulus	18	202	0.0013	0.048
GO:0009267	cellular response to starvation	15	153	0.0014	0.05
GO:0006721	terpenoid metabolic process	14	137	0.0014	0.05

Fonte: Autoria própria.

Tabela C. 2. Lista dos 43 termos GO enriquecidos da categoria “Função Molecular” para os 1.087 genes de *A. thaliana* putativos homólogos de genes DE em estigmas/estiletes de plantas de *N. tabacum* silenciando *SC11*. **Termo GO:** número de acesso do termo; **Descrição:** nome do termo; **Núm. de genes DE:** número de genes homólogos dos genes DE em *A. thaliana* que podem ser associados ao termo; **Núm. Referência:** número de genes totais de *A. thaliana* que podem ser associados ao termo; **p-valor:** valor de probabilidade do termo não estar enriquecido; **FDR:** taxa de falso descobrimento, corresponde ao p-valor ajustado pelo método de Benjamini-Hochberg.

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0005488	binding	606	12081	1.80E-18	1.20E-15
GO:0003824	catalytic activity	488	9101	1.20E-18	1.20E-15
GO:0005515	protein binding	226	3669	7.20E-13	3.10E-10
GO:1901363	heterocyclic compound binding	394	7718	5.20E-11	1.60E-08
GO:0097159	organic cyclic compound binding	394	7737	7.20E-11	1.80E-08
GO:0016787	hydrolase activity	188	3279	2.10E-08	4.50E-06
GO:0016817	hydrolase activity, acting on acid anhydrides	65	826	1.40E-07	1.70E-05
GO:1901265	nucleoside phosphate binding	188	3370	1.40E-07	1.70E-05

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0000166	nucleotide binding	188	3370	1.40E-07	1.70E-05
GO:0036094	small molecule binding	191	3434	1.30E-07	1.70E-05
GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	148	2515	2.10E-07	2.40E-05
GO:0003677	DNA binding	143	2417	2.60E-07	2.80E-05
GO:0016462	pyrophosphatase activity	63	809	3.00E-07	2.90E-05
GO:0016818	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	63	817	4.10E-07	3.70E-05
GO:0017111	nucleoside-triphosphatase activity	60	766	4.80E-07	4.00E-05
GO:0032550	purine ribonucleoside binding	149	2612	1.10E-06	7.50E-05
GO:0001883	purine nucleoside binding	149	2612	1.10E-06	7.50E-05
GO:0097367	carbohydrate derivative binding	153	2696	9.90E-07	7.50E-05
GO:0032553	ribonucleotide binding	151	2664	1.30E-06	7.60E-05
GO:0001882	nucleoside binding	149	2618	1.20E-06	7.60E-05
GO:0032549	ribonucleoside binding	149	2617	1.20E-06	7.60E-05
GO:0017076	purine nucleotide binding	149	2633	1.60E-06	9.00E-05
GO:0032555	purine ribonucleotide binding	149	2631	1.60E-06	9.00E-05
GO:0005524	ATP binding	131	2248	1.90E-06	9.90E-05
GO:0032559	adenyl ribonucleotide binding	132	2364	1.30E-05	0.00063
GO:0046872	metal ion binding	190	3673	1.30E-05	0.00063
GO:0030554	adenyl nucleotide binding	132	2366	1.30E-05	0.00063
GO:0043169	cation binding	190	3678	1.40E-05	0.00063
GO:0043167	ion binding	195	3821	2.10E-05	0.00092
GO:0003676	nucleic acid binding	224	4558	4.60E-05	0.002
GO:0004386	helicase activity	21	197	5.90E-05	0.0024
GO:0008094	DNA-dependent ATPase activity	11	69	0.00016	0.0064
GO:0042623	ATPase activity, coupled	31	389	0.00021	0.0079
GO:0042802	identical protein binding	22	236	0.00024	0.0088
GO:0008092	cytoskeletal protein binding	24	270	0.00024	0.0088
GO:0016887	ATPase activity	37	530	0.00059	0.02

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0003678	DNA helicase activity	8	44	0.00058	0.02
GO:0016740	transferase activity	183	3791	0.00063	0.021
GO:0016830	carbon-carbon lyase activity	13	115	0.00088	0.029
GO:0008017	microtubule binding	14	132	0.001	0.032
GO:0016491	oxidoreductase activity	84	1547	0.0011	0.035
GO:0016706	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors	10	77	0.0013	0.04
GO:0016829	lyase activity	29	406	0.0016	0.047

Fonte: Autoria própria.

Tabela C. 3. Lista dos 54 termos GO enriquecidos da categoria “Componente Celular” para os 1.087 genes de *A. thaliana* putativos homólogos de genes DE em estigmas/estiletes de plantas de *N. tabacum* silenciando *SC11*. **Termo GO:** número de acesso do termo; **Descrição:** nome do termo; **Núm. de genes DE:** número de genes homólogos dos genes DE em *A. thaliana* que podem ser associados ao termo; **Núm. Referência:** número de genes totais de *A. thaliana* que podem ser associados ao termo; **p-valor:** valor de probabilidade do termo não estar enriquecido; **FDR:** taxa de falso descobrimento, corresponde ao p-valor ajustado pelo método de Benjamini-Hochberg.

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0044464	cell part	979	22662	5.10E-21	2.50E-18
GO:0005623	cell	979	22664	5.30E-21	2.50E-18
GO:0044428	nuclear part	95	1078	4.60E-13	1.40E-10
GO:0044424	intracellular part	888	20693	2.10E-12	4.80E-10
GO:0005622	intracellular	888	20721	3.30E-12	6.30E-10
GO:0044446	intracellular organelle part	278	4882	4.10E-12	6.30E-10
GO:0044422	organelle part	278	4894	5.30E-12	7.10E-10
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	115	1543	3.70E-11	3.80E-09

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0043228	non-membrane-bounded organelle	115	1543	3.70E-11	3.80E-09
GO:0005737	cytoplasm	613	13406	6.50E-10	6.10E-08
GO:0031981	nuclear lumen	68	824	1.30E-08	1.10E-06
GO:0005829	cytosol	126	1993	5.20E-08	4.10E-06
GO:0005694	chromosome	36	323	6.00E-08	4.30E-06
GO:0043229	intracellular organelle	785	18517	2.40E-07	1.60E-05
GO:0043226	organelle	785	18527	2.80E-07	1.70E-05
GO:0000228	nuclear chromosome	21	140	5.00E-07	3.00E-05
GO:0071944	cell periphery	226	4309	5.60E-07	3.10E-05
GO:0070013	intracellular organelle lumen	72	1008	8.90E-07	4.20E-05
GO:0031974	membrane-enclosed lumen	72	1008	8.90E-07	4.20E-05
GO:0043233	organelle lumen	72	1008	8.90E-07	4.20E-05
GO:0044444	cytoplasmic part	495	10923	1.00E-06	4.60E-05
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	769	18205	1.20E-06	5.00E-05
GO:0043227	membrane-bounded organelle	769	18217	1.30E-06	5.50E-05
GO:0005730	nucleolus	37	390	1.50E-06	5.80E-05
GO:0044430	cytoskeletal part	31	302	2.40E-06	8.90E-05
GO:0032991	macromolecular complex	149	2658	2.70E-06	9.60E-05
GO:0009536	plastid	216	4213	4.90E-06	0.00017
GO:0005856	cytoskeleton	35	380	5.10E-06	0.00017
GO:0044454	nuclear chromosome part	18	125	5.40E-06	0.00017
GO:0005886	plasma membrane	195	3735	5.50E-06	0.00017
GO:0043234	protein complex	109	1834	6.60E-06	0.0002
GO:0005634	nucleus	448	9924	9.30E-06	0.00027
GO:0009507	chloroplast	211	4148	1.10E-05	0.0003
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	26	252	1.40E-05	0.00038
GO:0044427	chromosomal part	26	259	2.10E-05	0.00057

Termo GO	Descrição	Núm. de genes DE	Núm. Referência	p-valor	FDR
GO:0099513	polymeric cytoskeletal fiber	22	209	4.70E-05	0.0012
GO:0099512	supramolecular fiber	22	209	4.70E-05	0.0012
GO:0005874	microtubule	20	193	0.00012	0.0031
GO:0030054	cell junction	58	901	0.00015	0.0036
GO:0005911	cell-cell junction	58	901	0.00015	0.0036
GO:0000790	nuclear chromatin	10	59	0.0002	0.0046
GO:0009506	plasmodesma	57	899	0.00025	0.0053
GO:0055044	symplast	57	899	0.00025	0.0053
GO:0016020	membrane	380	8532	0.00025	0.0053
GO:0009524	phragmoplast	12	91	0.0004	0.0083
GO:0009570	chloroplast stroma	48	740	0.00047	0.0096
GO:0005635	nuclear envelope	14	122	0.00049	0.0099
GO:0005654	nucleoplasm	27	359	0.0011	0.022
GO:0009532	plastid stroma	48	774	0.0012	0.022
GO:0097526	spliceosomal tri-snRNP complex	5	19	0.0016	0.029
GO:0044434	chloroplast part	77	1419	0.0018	0.034
GO:0000785	chromatin	13	127	0.002	0.035
GO:0031965	nuclear membrane	7	42	0.002	0.035
GO:0044435	plastid part	78	1455	0.0023	0.04

Fonte: Autoria própria.

REFERÊNCIAS DO APÊNDICE C

TIAN, Tian; LIU, Yue; YAN, Hengyu; YOU, Qi; YI, Xin; DU, Zhou; XU, Wenying; SU, Zhen. AgriGO v2.0: A GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. W1, p. W122–W129, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx382>.

APÊNDICE D

D.1 Análises qualitativas do experimento de RNA-seq comparando a expressão gênica durante o ciclo celular da cultura de células BY-2.

Na Tabela D. 1 estão descritas as amostras utilizadas para a análise da expressão gênica durante o ciclo celular em BY-2 por RNA-seq. Estão descritos os números de acesso das amostras sequenciadas no trabalho de Trolet et al. (2019) depositadas no banco de dados SRA. Ainda na Tabela D. 1 está apresentada a porcentagem de *reads* mapeadas ao transcriptoma referência de *N. tabacum* para cada amostra. Mais de 84% das *reads* foram mapeadas em todas as amostras utilizadas.

Na Figura D. 1 está ilustrado o gráfico resultante da análise de PCA para as 12 amostras de sequenciamento. O componente PC1 corresponde a 34,23% dos genes com mais alta variância entre as amostras. Já o componente PC2 representa os 18,37% dos genes com a segunda mais alta variância. O resultado da análise permite dizer que as amostras se agrupam de acordo com a condição que representam.

Nessa análise de RNA-seq, dos 69.196 genes anotados de *N. tabacum*, 46.266 (66,9%) deles são expressos nas amostras utilizadas, com expressão maior que 1 CPM em pelo menos 3 amostras (total maior que 3 CPM). Na Figura D. 2. estão representadas as relações entre quantidade de expressão e variância dos genes com expressão detectável nas amostras de RNA-seq analisadas. Do lado esquerdo (Figura D. 1A), é possível observar que genes de baixa expressão (CPM menor que 3) têm influência na linha de tendência de variância-média (linha amarela). Assim como mencionado anteriormente, os valores de CPM em um experimento de RNA-seq se comportam como uma distribuição binomial negativa, e genes de baixa expressão não seguem essa distribuição (GUO et al. 2019). Na Figura D. 1B está representada a linha de tendência da variância-média após a remoção dos genes de baixa expressão. Como mostra a figura, a remoção desses genes adequa a linha de tendência à distribuição dos valores.

Tabela D. 1. Características das amostras de sequenciamento produzidas por Trolet et al. (2019) para as diferentes fases do ciclo celular de BY-2. **Acesso SRA:** Número de acesso da biblioteca de sequenciamento no repositório *Sequence Read Archive* (trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/); **Abrev.:** abreviações de cada amostra; **Réplica:** número da réplica biológica; **Fase do ciclo:** fases do ciclo às quais pertencem as amostras; **Pares de reads:** quantidade de pares de sequências na biblioteca de sequenciamento; **% mapeadas:** porcentagem das reads com mapeamento no transcriptoma de *N. tabacum*.

Acesso SRA	Abrev.	Réplica	Fase do ciclo	Pares de reads	% mapeadas
SRR7992605	G1_1	1	G1	45.002.950	85,54
SRR7992609	G1_2	2		41.009.946	84,63
SRR7992613	G1_3	3		52.316.052	85,46
SRR7992602	S_1	1	S	50.522.426	86,06
SRR7992606	S_2	2		55.308.224	85,94
SRR7992610	S_3	3		38.884.870	86,17
SRR7992603	G2_1	1	G2	59.205.796	84,40
SRR7992607	G2_2	2		48.543.144	84,15
SRR7992611	G2_3	3		54.419.848	85,01
SRR7992604	M_1	1	M	45.408.786	86,66
SRR7992608	M_2	2		63.588.632	84,96
SRR7992612	M_3	3		54.852.384	86,40

Fonte: Autoria própria.

Figura D. 1. Análise de PCA das amostras de RNA-seq do ciclo celular de BY-2.

Eixo x: PC1 representa 34,23% dos genes, os quais possuem alta variância de expressão entre as amostras analisadas. Eixo y: PC2 representa 18,37% dos genes com a segunda mais alta variância de expressão. A análise mostra que as réplicas biológicas se agrupam de acordo com suas condições experimentais. Fonte: Autoria própria.

Figura D. 2. Gráficos de tendência de variância-média da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de células BY-2.

A - Gráfico representando a distribuição pré-filtragem de genes com baixa expressão ($\text{CPM} < 3$). Eixo x: valores transformados da quantificação da expressão de cada gene detectável nas amostras de RNA-seq; Eixo y: valores de raiz quadrada dos desvios-padrão para cada gene quantificado; Linha amarela: linha de tendência representando a distribuição dos valores (pontos pretos). **B** - Gráfico representando a distribuição pós-filtragem, comparando as linhas de tendência pré- e pós-filtragem (linhas amarela e vermelha, respectivamente). Fonte: Autoria própria.

Na Figura D. 3 estão representadas as distribuições das quantificações de genes em cada uma das amostras utilizadas no RNA-seq antes e depois da normalização desses valores pelo método TMM. É importante destacar que a normalização da expressão é um passo importante na análise de RNA-seq, pois permite comparar a expressão de genes entre as amostras (ROBINSON; OSHLACK, 2010). Como ilustrado na Figura D. 3B, os valores transformados em $\log_2(\text{CPM})$ se distribuem igualmente entre as amostras, em contraste com a distribuição dos valores não-normalizados (Figura D. 3A).

Figura D. 3. Gráficos da distribuição da expressão dos genes quantificados por RNA-seq de células BY-2.

A - Gráfico representando a distribuição pré-normalização das quantificações de genes nas diferentes amostras. Eixo x: amostras de de RNA-seq; Eixo y: valores de contagem (quantificação) dos genes; barras: representam os valores máximo e mínimo; caixas: representam os quartis dos valores de quantificação; linha horizontal dentro da caixa: valor mediano. **B** - Gráfico representando a distribuição pós-normalização. Eixo x: amostras de de RNA-seq; Eixo y: valores de contagem normalizados, em $\log_2(\text{CPM})$, dos genes; barras: representam os valores máximo e mínimo; caixas: representam os quartis dos valores de quantificação; linha horizontal dentro da caixa: valor mediano. Fonte: Autoria própria.

D.2 Co-expressão de genes durante o ciclo celular em células BY-2 de *N. tabacum*.

O resultado do agrupamento de genes de acordo com seus perfis de co-expressão durante o ciclo celular está representado na Figura D. 4. Dos 46.266 genes expressos em BY-2 durante o ciclo celular, 39,212 (84,7%) possuem perfis de expressão distintos nas diferentes fases do ciclo. É importante ressaltar que nessa análise, genes com padrão de expressão contínuo (pouca variação entre as diferentes fases) não são representados. Dessa forma, a análise de co-expressão resultou em 18 grupos representando diferentes perfis de expressão durante o ciclo celular em BY-2.

Na Tabela D. 2 estão descritos 65 genes DE associados aos termos GO “ciclo celular”, “replicação de DNA” e “reparo de DNA”, identificados na comparação entre estigmas/estiletos de plantas silenciando *SC11* e as plantas controle. Nessa tabela é possível observar que esses genes podem se associar a perfis de expressão específicos durante o ciclo celular em BY-2. Esses resultados reforçam sua potencial participação nesse processo biológico.

Na Tabela D. 3 está descrito o teste hipergeométrico para avaliar o enriquecimento de *clusters* entre os 65 genes DE expressos em estigmas/estiletos de plantas silenciando *SC11*. Estão representados quantos genes DE se associaram a cada *cluster*, em comparação com a composição de todos os *clusters*. Foram considerados como enriquecidos os *clusters* os quais tiveram FDR (*p*-valor no teste hipergeométrico corrigido pelo método de Benjamini-Hochberg) menor que 0,05.

Figura D. 4. Perfis de co-expressão gênica identificados durante o ciclo celular em BY-2.

Eixo x: fases do ciclo celular, G¹: *gap 1*; S: síntese; G²: *gap 2*; M: mitose. Eixo y: Escore-Z são os valores padronizados de expressão pelo programa *clust*. Fonte: Autoria própria.

Tabela D. 2. Tabela dos genes DE associados ao ciclo celular em estigmas/estiletes de plantas silenciando *SC11*, com os seus perfis de co-expressão durante o ciclo em células BY-2. **Núm. Acesso:** número de acesso do gene no banco de dados NCBI; **Descrição:** descrição do gene anotado no banco NCBI; **Cluster:** representação gráfica do grupo de co-expressão ao qual os genes se agrupam.

Núm. acesso	Descrição	Abreviação	Cluster
LOC107803598	65-kDa microtubule-associated protein 5-like	NtMAP65-5
LOC107814297	ATP-dependent DNA helicase Q-like 1	NtRECQ11	
LOC107821048	ATP-dependent DNA helicase Q-like 4A	NtRECQ4A	
LOC107814562	ATP-dependent DNA helicase Q-like SIM	NtRECQSIM	
LOC107816422	cell division control protein 45 homolog	NtCDC45	
LOC107830439	crossover junction endonuclease MUS81-like	NtMUS81	
LOC107794754	DNA topoisomerase 2-binding protein 1	NtMEI1	
LOC107759159	DNA-3-methyladenine glycosylase-like	NtMAGa	
LOC107826020	kinesin-1-like protein PSS1	NtPSS1	
LOC107764231	origin of replication complex subunit 1-like	NtORC1	
LOC107819196	proline-rich receptor-like protein kinase PERK10	NtPERK10	
LOC107803524	protein gamma response 1-like	NtGR1	
LOC107827008	protein JASON-like	NtJASON	
LOC107804233	RAN GTPase-activating protein 1-like	NtRANGAP1	
LOC107828330	separase-like	NtESP	
LOC107812534	uncharacterized LOC107812534	NtASY3
LOC107820519	BRCA1-associated RING domain protein 1-like	NtBARD1	
LOC107795010	DNA polymerase eta	NtPOLε	
LOC107817044	DNA repair helicase XPB1-like	NtXPB1	
LOC107827331	DNA repair protein REV1-like	NtREV1	
LOC107791227	flap endonuclease 1-like	NtFEN1	
LOC107769278	gamma-tubulin complex component 4-like	NtGCP4	
LOC107788817	origin of replication complex subunit 5-like	NtORC5	
LOC107819758	probable DNA helicase MCM9	NtMCM9	
LOC107805945	protein MCM10 homolog	NtMCM10	
LOC107760693	structural maintenance of chromosomes protein 5-like	NtSMC5	

Núm. acesso	Descrição	Abreviação	Cluster
LOC107817395	uncharacterized LOC107817395		
LOC107824739	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1a	
LOC107828333	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1b	
LOC107824504	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	NtDUT1	
LOC107824833	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase-like	NtDUT1-like	
LOC107825338	DNA mismatch repair protein MSH6-like	NtMSH6
LOC107778480	F-box/LRR-repeat protein 17-like	NtFBL17	
LOC107789894	sister chromatid cohesion 1 protein 3-like	NtSYN3	
LOC107772839	uncharacterized LOC107772839	NtMCM10-like	
LOC107830438	cell division control protein 48 homolog C-like	NtCDC48C
LOC107778560	FACT complex subunit SPT16-like	NtSPT16a	
LOC107766359	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1-like	NtPIN1L	
LOC107769279	blue-light photoreceptor PHR2-like	NtPHR2
LOC107787194	rho GTPase-activating protein 7-like	NtPHGAP2
LOC107791920	protein STICHEL	NtSTI
LOC107831333	65-kDa microtubule-associated protein 3-like	NtMAP65-3	
LOC107825899	DNA topoisomerase 2-like	NtTOPII	
LOC107807022	mitotic checkpoint protein BUB3.1	NtBUB3.1	
LOC107824196	protein POLYCHOME-like	NtGIG1	

Núm. acesso	Descrição	Abreviação	Cluster
LOC107812049	putative serine/threonine-protein kinase haspin homolog	NtHaspin	C8
LOC107765238	dof zinc finger protein DOF3.4-like	NtOBP1a	C10
LOC107803775	dynammin-related protein 1E-like	NtDL1E	
LOC107766219	phragmoplast orienting kinesin 2-like	NtPOK2	
LOC107800862	protein SLOW WALKER 1-like	NtSWA1	C11
LOC107784180	protein MICRORCHIDIA 6-like	NtMORC6	C12
LOC107775913	CDT1-like protein a, chloroplastic	NtCDT1A	C13
LOC107789454	cell division cycle protein 123 homolog	NtCDC123	
LOC107799072	poly [ADP-ribose] polymerase 1-like	NtPARP1	
LOC107800100	24-methylenesterol C-methyltransferase 2-like	NtSMT2	C14
LOC107782883	cell division cycle 20.2, cofactor of APC complex-like	NtCDC20.1	
LOC107781415	cellulose synthase-like protein D5	NtCSLD5	
LOC107799578	FHA domain-containing protein PS1-like	NtPS1b	
LOC107822562	G2/mitotic-specific cyclin S13-7-like	NtCycB1;2	
LOC107784059	microtubule-binding protein TANGLED-like	NtTAN1	
LOC107795213	myb-related protein 3R-1-like	NtMYB3R-1	
LOC107809530	protein TPX2-like	NtTPX2	
LOC107778339	cullin-1-like	NtCUL1	

Núm. acesso	Descrição	Abreviação	Cluster
LOC107764604	DNA-3-methyladenine glycosylase-like	NtMAGb

Fonte: Autoria própria.

Tabela D. 3. Dados e resultados do teste hipergeométrico de enriquecimento de *clusters*. **Cluster:** nomes dos grupos de co-expressão; **Número de genes DE:** número de genes DE expressos em estigmas/estiletos de plantas silenciando *SC11* que podem ser associados ao ciclo celular; **Número na Referência:** distribuição de todos os 39.212 genes de BY-2 que possuem padrões de co-expressão durante o ciclo celular nessa cultura de células; **Teste Hipergeom.:** resultados em *p*-valores do teste de distribuição hipergeométrica; **FDR:** *p*-valores corrigidos pelo método de Benjamini-Hochberg; *: indica os valores de FDR < 0,05.

Cluster	Número de genes DE	% de genes DE	Número na Referência	% de genes totais	Teste Hipergeom.	FDR
C0	17	26,15	5238	13,36	0,001	0,019*
C1	13	20,00	3214	8,20	0,001	0,012*
C2	6	9,23	2070	5,28	0,071	0,319
C3	3	4,62	1186	3,02	0,178	0,292
C4	1	1,54	1964	5,01	0,124	0,320
C5	1	1,54	1548	3,95	0,198	0,274
C6	1	1,54	575	1,47	0,370	0,392
C7	0	-	1366	3,48	0,102	0,306
C8	5	7,69	2289	5,84	0,150	0,299
C9	0	-	519	1,32	0,424	0,424
C10	3	4,62	1971	5,03	0,227	0,292
C11	1	1,54	2179	5,56	0,096	0,344
C12	1	1,54	1180	3,01	0,280	0,315
C13	3	4,62	5238	13,36	0,015	0,092
C14	8	12,31	5136	13,10	0,147	0,331
C15	0	-	1044	2,66	0,176	0,317
C16	0	-	794	2,02	0,268	0,322
C17	2	3,08	2105	5,37	0,188	0,283
TOTAL	65	100	39212	100		

Fonte: Autoria própria.

REFERÊNCIAS DO APÊNDICE D

GUO, Wenbin; TZIOUTZIOU, Nikoleta; STEPHEN, Gordon; MILNE, Iain; CALIXTO, Cristiane; WAUGH, Robbie; BROWN, John; ZHANG, Runxuan. 3D RNA-seq - a powerful and flexible tool for rapid and accurate differential expression and alternative *splicing* analysis of RNA-seq data for biologists. **bioRxiv**, p. 656686, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/656686>.

ROBINSON, Mark D.; OSHLACK, Alicia. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.

TROLET, Adrien; BALDRICH, Patricia; CRIQUI, Marie Claire; DUBOIS, Marieke; CLAVEL, Marion; MEYERS, Blake C.; GENSHCHIK, Pascal. Cell cycle-dependent regulation and function of ARGONAUTE1 in plants. **Plant Cell**, v. 31, n. 8, p. 1734–1750, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.19.00069>.

APÊNDICE E

Informações complementares da análise de sequências de CDKGs de plantas.

Na Figura E. 1 está representada uma porção do alinhamento entre as 22 sequências de CDKGs utilizadas na análise filogenética descrita no item 4.1.6.2. (Resultados e Discussão, Capítulo II – p. 136). Nessa figura, duas principais informações estão ilustradas: i) a sequência de AtCDKG;1 é a única cujo domínio quinase se inicia com o tripeptídeo 'SRS', em comparação com o 'CRS' encontrado em todas as outras; ii) as sequências de AtCDKG;1, PtCDKG;1-like1 e PtCDKG;1-like2 possuem uma extensão de 4 (AtCDKG;1) e 6 aminoácidos (PtCDKG;1-like1 e 2) nesse domínio. Adicionalmente, é possível observar na sequência de CrCDKG-like, os aminoácidos que diferem da maioria das sequências de CDKGs de outras espécies (Figura E. 1). Essas diferenças justificam o posicionamento mais externo das sequências na árvore filogenética.

Na Figura E. 2 está representada a árvore filogenética de máxima verossimilhança das sequências de CDKGs de plantas (em A) associada às representações dos éxons que compõe as CDSs de cada sequência (em B). Essa representação foi feita de acordo com as disponíveis nos bancos de dados NCBI e Phytozome. É importante ressaltar que essa estrutura é apenas uma representação, e os tamanhos reais dos éxons e íntrons foram redimensionados para permitir a comparação entre as diferentes sequências.

Na Figura E. 3 está representada a árvore filogenética (em A), associada às representações dos domínios quinase e motivos RS dessas sequências (em B). O tamanho da porção N-terminal (em branco) e do domínio quinase (em cinza) é proporcional ao comprimento, em aminoácidos, das sequências. Dipeptídeos RS estão representados também na figura, e sua posição na porção N-terminal é estimada, não exata.

Figura E. 2. Árvore filogenética e representações das sequências de aminoácidos de CDKGs de plantas.

A - Árvore de máxima verossimilhança de CDKGs de plantas **B** - Representação dos éxons (barras pretas) que contribuem para as CDSs das sequências de aminoácidos analisadas na árvore. Fonte: Autoria própria.

Figura E. 3. Árvore filogenética e representações das sequências de aminoácidos de CDKGs de plantas.

A - Árvore de máxima verossimilhança de CDKGs de plantas **B** - Representação do tamanho das sequências de aminoácidos analisadas na árvore. Em branco: porções N-terminais das sequências; Em cinza: domínios quinase; Em azul: dipeptídeos RS. Barra = 50 aminoácidos (os dipeptídeos RS não estão em escala). Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE F

Artigo científico para submissão em revista científica da área (Plant Science).

Title: SCI1 and NtCDKG;2 are involved in the regulation of cell cycle in *Nicotiana tabacum*

Authors: Pedro Boscariol Ferreira^{a,b,*}, Edward Jose Strini^{a,b}, Greice Lubini^{a,b}, Vanessa Thome^{a,b}, Vitor Favaretto Pinot^{a,b}, Joelma Oliveira Cruz^{a,b}, Andrea Carla Quiapim^a, Gustavo Henrique Goldman^c, Maria Helena de Souza Goldman^{a,*}

^aDepartamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil - 14040-901

^bPPG - Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil - 14049-900

^cDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil - 14040-903

*Corresponding authors: Prof. Dr. Maria Helena S. Goldman
Departamento de Biologia
FFCLRP, Universidade de São Paulo
Avenida Bandeirantes, 3900
Ribeirão Preto, SP - CEP 14040-901 BRAZIL
Phone: 55-16-3315-3702; FAX: 55-16-3315-4886
Email: mgoldman@ffclrp.usp.br

Pedro Boscariol Ferreira
E-mail: pedrobf@usp.br

ABSTRACT

Floral organ development is dependent on coordinated events integrating organ identity, cell differentiation, proliferation and expansion. *SCI1* affects cell proliferation in stigmas and styles, influencing their final size. It has been proposed that *SCI1* performs its role by inhibiting Cyclin-Dependent Kinase/Cyclin complexes, while being part of the auxin signaling pathway. We investigated the role of *SCI1* in the stigma/style by high-throughput methods, namely RNA-seq, pulldown, and yeast two-hybrid screenings. In the differential gene expression analysis, we found that the silencing of *SCI1* affects the expression of cell cycle-related and auxin-responsive genes. The affected cell cycle genes can be mostly linked to the S and G2 phases, and are all down-regulated in plants silencing *SCI1*. Differentially expressed genes can also be associated with auxin, including AUXIN RESPONSE FACTOR genes, which are down-regulated. In the protein-protein interaction assays, we found the potential target of *SCI1* inhibition, NtCDKG;2, and other partners involved in cell cycle. We also screened for interaction partners of NtCDKG;2 by yeast two-hybrid, and found interaction partners related to the cell cycle process. Our findings further our understanding of how *SCI1* is involved in the regulation of pistil development, and a role for NtCDKG;2 in the cell cycle is proposed.

Keywords: cell cycle, pistil development, tobacco, transcriptome, auxin

Highlights

- The silencing of *SCI1* affects gene expression in the tobacco pistil
- Most genes affected are involved in cell cycle and auxin signaling
- Interaction partners of *SCI1* are involved in cell cycle regulation
- NtCDKG;2 is a possible target of inhibition by *SCI1* during cell cycle

1 INTRODUCTION

The development of floral organs involves a complex network of genes and hormones that regulate organ identity, cell proliferation and cell expansion [1,2]. Fine-tuned coordination of cell divisions during flower development is essential for reproduction, since this process determines the size and shape of floral organs [2,3]. While tobacco has been extensively used as a model plant in genetics in the past (reviewed in [4]), most in-depth gene function studies regarding flower development are published in *Arabidopsis* [2]. Thus, there are many knowledge gaps regarding the molecular pathways during the flower development of tobacco. With the recent publishing of tobacco genomes [5,6], it is interesting to resume the unveiling of these developmental pathways in this Solanaceae.

Hormones are key players during plant organ development, inducing the transition from the vegetative to the reproductive phase and coordinating floral organ growth [2,7,8]. Notably auxin has two very important roles in flower development: it determines floral meristem formation and termination [7,9]. It is also important in controlling the growth of the gynoecium, exemplified by the presence of an auxin maxima in styles during development [1,10]. Early studies of auxin in tobacco show its ability to induce floral bud formation [11,12], but molecular characterization of its function has been most extensively studied in *Arabidopsis thaliana*. Local auxin synthesis in *Arabidopsis* is mediated by the YUCCA genes, which when disrupted, affect floral organ number, size, and fertility [7,9]. Important genes shortly downstream of auxin are PIN and PINOID (PID), controlling the polar transport of auxin, and MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (MP/ARF5), regulating the expression of the transcription factors LEAFY (LFY), AINTEGUMENTA (ANT), and AINTEGUMENTA-LIKE 6 (AIL6), master regulators of floral meristem identity, and growth [2,13]. During differentiation, plants with disrupted auxin signaling show several alterations in floral organs [7,9].

In addition, auxin has also been directly linked to cell cycle control in both *Arabidopsis* and tobacco. It regulates expression of the key cell cycle regulators Cyclin-Dependent Kinase A;1 (NtCDKA;1), Cyclin D3;1 (NtCycD3;1 and AtCYCD3;1), and CDK inhibitors KRP1 and KRP2 [14-16]. There is also evidence of auxin effects on E2F transcription factors, essential for DNA replication [17,18]; and on other cell cycle-related genes (see [19] for a review). Large-scale studies in synchronized tobacco and *Arabidopsis* cell cultures also show cell cycle modulated activity of several auxin-responsive genes [20,21]. CDK/Cyclin complexes and their inhibitors are key cell cycle regulators highly conserved in eukaryotes. In plants, most of these complexes have been resolved, and their roles are mostly well understood (reviewed in [22,23]). Additionally, CDKs have been described in processes other than cell cycle control, such as transcription, *splicing*, and developmental processes, and functional studies are still revealing new roles for these proteins (see examples in [24-28]).

Our group has previously reported the gene SCI1, which is a tissue-specific cell cycle regulator that participates in the auxin signaling pathway [29,31]. The

alteration of the expression of *SCI1* affects stigma and style size in both tobacco and Arabidopsis, as a result of altered cell proliferation [29,31]. *SCI1* has been proposed to be a stigma/style-specific cell cycle regulator potentially inhibiting CDK/Cyclin complexes [30], and it is both affected by and affects auxin-responsive genes [30,31]. In Arabidopsis, *AtSCI1* contains 7 motifs in its upstream regulatory region similar to those in *YUC1*, *YUC2*, and *YUC4* genes, and 2 motifs shared with *CYCB1;1* [30]. The expression of *AtSCI1* is reduced in *yuc2yuc6* and *npv1* mutants, which are auxin-deficient, and both share the phenotype seen in *sci1*^{-/-} mutants of larger stigmas and styles [31]. In tobacco, the participation of *SCI1* in the auxin signaling pathway is suggested by the different expression of *NtIAA13* and *NtIAA19* in stigmas/styles of plants silencing *SCI1* in comparison to the wild-type [30].

In order to better understand the mechanism by which *SCI1* affects proliferation in the stigma and style of tobacco, we decided to perform an RNA-seq of plants silencing *SCI1* and the wild-type. We also screened for interaction partners of *SCI1* by both *pulldown* and yeast two-hybrid to understand the molecular context of *SCI1*. Our findings further the knowledge on how *SCI1* is involved in cell proliferation in the pistil, and we found the potential CDK it inhibits during this process. A mechanism of action involving *SCI1*-*NtCDKG;2* is proposed.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Accession numbers

Supplementary Table 2 contains the accession numbers of all the differentially expressed (DE) genes, and their corresponding homologs in Arabidopsis, determined by blastx against the Araport11 peptide database. The blastx results were filtered by query coverage (>30%), identity of residues (>30%), and e-values (<0.00005) - full results in Table S3.

2.2 Plant materials and growing conditions.

Wild-type (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1) and transgenic tobacco plants (*SCI1* Ri14.2 - DePaoli et al., 2011) were grown in greenhouse under natural conditions in Ribeirão Preto – SP, Brazil (Latitude - 21° 10'24" S, Longitude - 47° 48'24" W; average temperature of 22 °C in winter and 27 °C in summer; difference in day length is less than 2 h between summer and winter). Plant tissues were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C. *Nicotiana benthamiana* plants, cultivated in fitotron (55% humidity, 16-h day/8-h night cycles, 26 °C), were used for transient gene expression used in BiFC and Co-localization experiments.

2.3 RNA-seq analyses

Equal masses of stages 1-6 were pooled to prepare 3 independent biological replicates for each condition. Briefly, at stage 1 floral organs are completely differentiated and will only grow and mature until anthesis occurs (stage 12). RNA was extracted with miRCURY™ RNA Isolation Kit – Cell & Plant (Exiqon). Approximately 5 µg RNA for each sample was sent for sequencing at the Beijing

Genome Institute (BGI - China). In brief, RNA samples were enriched with mRNA with oligo(dT) beads, cDNA libraries were constructed with random hexamers, and these were sequenced in Illumina HiSeq™ 2000 in 2x90bp paired-end mode. The raw data has been deposited in the Sequence Read Archive (NCBI) under accession number [pending]. Additionally, publicly available reads from cell cycle phases of synchronized *N. tabacum* BY-2 cells generated by [32], were downloaded from the Sequence Read Archive (SRA – NCBI). All the sequencing libraries were aligned to a reference transcriptome of *N. tabacum* (NCBI – GCF_000715135.1_Ntab-TN90) with the Salmon v1.2.0 software [33]. The aligned data was used to analyse differential gene expression using the ThreeDRNAseq R package [34,35]. Gene Ontology Enrichment analysis was made in the Araport11 ThaleMine app (bar.utoronto.ca/thalemine) using a cutoff of Holm-Bonferroni FDR < 0.05. Clusterization analysis of gene expression profiles during cell cycle of BY-2 cells was made with the software clust v1.12.0 [36]. Parameters used in the bioinformatic analyses are described in Appendix S1.

2.4 qRT-PCR analysis

For RT-qPCR analysis of the selected DE genes, we first tested amplification efficiency of primers only in cDNA samples from wild-type plants. Equal parts of Trizol-extracted RNA from stages 1-6 were pooled and 5 µg were treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific), and cDNA was synthesized with the SuperScript™ III kit (Invitrogen), according to instructions from the manufacturer. The test was performed with fixed primer concentrations and 6 serial 2-fold dilutions of this cDNA. Standard curves were constructed, and all primers had between 85-110% efficiency. This step also aided in the determination of cDNA dilutions ideal for detection between Cq 5-25. The 4-fold dilution was used for genes *NtMCM4*, *NtRAD9A*, *NtBUB3.1*, *NtCYCB1;2* and *NtRecQ4A*, while no dilution was used for genes *NtCDC45*, *NtKIP3*, and *NtWEE1*. Control genes were *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH)* and *RIBOSOMAL PROTEIN L2 (RPL2)*. The *de facto* analysis was made with cDNA synthesized as described above, but with the same RNA samples used in the RNA-seq. Real-time RT-PCR was performed with the GoTaq® qPCR Master Mix for Dye-Based Detection (Promega) in a 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), with cycling program: (1) 50°C, 1 min; (2) 95°C, 10 min; (3) 40 cycles of 95°C, 15 s and 60°C for 1 min. A dissociation step of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 15 s and 60°C for 15 s was added in the end. Data was obtained and analysed in 7500 Fast Software v2.3. Fold-change was determined by the $\Delta\Delta Cq$ method. Correlation with RNA-seq data was computed with the ggpubr R package. All primer sequences are listed in Supplemental Table 4.

2.5 Yeast two-hybrid

Protein-protein interaction assays were performed as described in [37]. In the screenings, coding sequences for *NtCDKG;2* and *SCI1* were inserted in the pDEST32 plasmid (bait), used to transform PJ69-4A yeast cells. The transformed cells were subsequently transformed with a prey library constructed with cDNA clones from stigmas and styles inserted in the pDEST22 plasmid. The screening was performed in -LWH and -LWA dropout media, and positive colonies were selected

from the plate after 72 h of growth. Peer-to-peer assays were made to confirm interactions. Yeast cells were co-transformed with the bait and isolated prey plasmids, and grown on -LWH dropout medium. Controls of interaction strength were from the ProQuest™ Yeast Two-Hybrid System (Invitrogen). For the quantitative assay, ONPG was used as a substrate, and assay was performed as described in the ProQuest™ Yeast Two-Hybrid System manual (Invitrogen). Three biological replicates were used, and three technical replicates for each were assayed.

2.6 Gene constructions and plant transformations

Coding sequences (CDS) of genes were amplified to be flanked by attB1 and attB2 Gateway recombination sites. Entry plasmids were obtained by BP recombination with the pDONOR221 vector using the BP Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific). For BiFC, entry clones were combined with vectors pK7m34GW (backbone - [38]), pEN-L4-2-R1 (promoter pCaMV35S - [39]), and either pEN-R2-hGFP-L3 or pEN-R2-tGFP-L3 (amino- and carboxi-termini of eGFP, respectively - [40]). The expression plasmids were obtained by LR reaction with LR Clonase II Plus Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific). For the co-localization experiment, the NtCDKG;2 entry clone was recombined with pK7WGF2 [40], allowing for the expression of GFP-NtCDKG;2; the NtCDKF;1 entry clone was recombined with vectors pK7m34GW, pEN-L4-2R1, and pEN-R2-mCherryStop-L3 [41], allowing for expression of NtCDKF;1-mCherry. All clones were Sanger-sequenced to confirm the adequate fusions and absence of mutations. Each construction was individually introduced in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1RifR (pGV2260) and transformation was checked by PCR. For both BiFC and co-localization experiments, young *N. benthamiana* leaves were co-transformed with *A. tumefaciens* containing the plasmids of interest according to [42]. Leaves were analysed after 2-5 days post-infection. Leaves were cut into 5 x 5 mm squares into PBS buffer, and stained with 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI - final concentration 0.15 µg/mL) by vacuum infiltration for 30 min, and subsequently washed in PBS buffer prior to imaging under a Leica TCP SP5 Confocal Microscope. Images were post-processed to enhance contrast and add scales in the Leica LAS X software.

3 RESULTS

3.1 Plants silencing *SCI1* show differential gene expression in RNA-seq

In order to further assess the mechanism through which *SCI1* affects cell proliferation during pistil development, we performed an RNA-seq experiment. We compared the expression between young stigmas and styles plants silencing *SCI1* and wild-type plants, and identified 771 differentially expressed (DE) genes that passed the false discovery rate cutoff (FDR < 0.05, Table S1). Of these DE genes, 23.48% are up-regulated, while 76.52% is down-regulated. In a functional Gene Ontology (GO) enrichment analysis with 597 Arabidopsis homologs of the DE genes, we detected that the categories “cell cycle process”, “DNA metabolic process”, “reproductive process”, “developmental process”, “multicellular organismal process”,

“negative regulation of gene expression”, and “cellular localization”, encompassing 69 genes, are enriched in plants silencing *SCI1* (Figure 1A, Table 1). We further investigated individual gene functions for DE genes in these categories for both *N. tabacum* genes and their Arabidopsis homologs, by literature searches.

Among the down-regulated genes there are 4 cyclins: NtCyclinB1;2 (fold-change (FC) = -1.79), NtCycD3;1 (FC = -1.94), NtCycC1;2 (FC = -1.12), and NtCycL1;1 (FC = -1.07). In *N. tabacum*, both NtCycB1;2 and NtCycD3;1 have been associated with cell cycle, the first in the G2/M transition and the latter in both G1/S and G2/M transitions (Kawamura et al, 2006; Breyne et al 2012). In Arabidopsis, all but CycC1;2 have been associated with cell cycle. AtCycB1;2 has been described as an important mitosis-inducing cyclin, and is a part of the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome [43,44]. Different from *N. tabacum*, Arabidopsis CycD3;1 seems to be important only in the G1/S transition [45]. AtCycL1 is involved in cell cycle [46], but no specific roles have been proposed, and more recently it is being characterized as an important protein in *splicing* regulation [28,47].

In the enriched GO categories, there is also *NtCYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 3* (*NtKRP3*, FC = -1.60), an homolog of Arabidopsis *KRP3*, and member of the ICK/KRP cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors that, when down-regulated, increases expression of EF2-dependent genes, thus being inhibitors of the cell cycle in the G1/S transition [48]. Interestingly, 10 genes whose homologs in Arabidopsis are targets of the E2F transcription factor [49] are down-regulated: *NtMINICHROMOSOME MAINTANENCE 4* (*NtMCM4*, FC = -1.49), *NtMCM9* (FC = -1.23), *NtCELL DIVISION CONTROL 45* (*NtCDC45*, FC = -1.22), *NtATP-DEPENDENT DNA HELICASE Q 1* (*NtRECQ1*, FC = -1.2), *NtSISTER CHROMATID COHESION 1 HOMOLOG 3* (*NtSYN3*, FC = -1.28), *NtF-BOX-LIKE 17* (*NtFBL17*, FC = -1.43), *NtDUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1* (*NtDUT1*, FC = -1.66), *NtMUTS HOMOLOG 6* (*NtMSH6*, FC = -1.17), *NtDNA POLYMERASE H* (*NtPOLH*, FC = -1.11), and *NtPOLLEN SEMI-STERILITY1* (*NtPSS1*, FC = -1.32).

In addition to *NtMCM4* and *NtMCM9*, there are 3 more down-regulated members of the MINICHROMOSOME MAINTANENCE complex - *NtMCM7* (FC = -1.44), *NtMCM10* (FC = -1.19), and *NtMCM10-like* (FC = -1.15). These five genes, together with subunits *NtORC1* (FC = -1.27) and *NtORC5* (FC = -1.18) from the ORIGIN OF REPLICATION COMPLEX-1.39, *NtCDC45* and the *NtFLAP ENDONUCLEASE 1* (*NtFEN1*, FC =) have conserved homologs in Arabidopsis important in DNA replication during phase S of the cell cycle [50].

We also found that some of these genes with homologs potentially involved in DNA damage repair, including the aforementioned *NtMCM4*, *NtMCM7*, *NtMCM9*, *NtSYN3*, *NtMSH6*, *NtCDC45*, *NtDUT1*, *NtFEN1*, and *NtPOLH* with addition of *NtRAD9A* (FC = -1.01), *NtFANCONI ANEMIA GROUP D2 PROTEIN* (*NtFACND2*, FC = -1.29), *NtBREAST CANCER ASSOCIATED RING DOMAIN 1* (*NtBARD1*, FC = -1.09), *NtMICRORCHIDIA 6* (*NtMORC6*, FC = -1.12), *NtDNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION 2* (*NtDRT102*, FC = -1.41), *NtGAMMA-RESPONSE GENE 1* (*NtGR1*, FC = -1.06), *NtPOLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1* (*NtPARP1*, FC = -1.21), *NtSTRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 5* (*NtSMC5*, FC = -

1.16), *NtFACT COMPLEX SUBUNIT SPT16* (*NtSPT16a*, FC = -1.81 and *NtSPT16b*, FC = -1.15), and *NtSTICHEL* (*NtSTI*, FC = -1.08), and the 3 members of the DNA Helicase Q family (*NtRecQI*, *NtRecQ4A*:FC = -1.29, and *NtRecQSim*:FC = -1.09). The only up-regulated gene in the enriched categories is *NtDNA-3-METHYLADENINE GLYCOSYLASE* (*NtMAG*, FC = 3.19), whose homolog is probably involved in base excision repair in Arabidopsis, but no additional roles have been characterized [51]. The *NtBUB3.1* is another down-regulated gene, that is an homolog of Arabidopsis BUB3.1, a member of the spindle assembly checkpoint during mitosis that also participates in cytokinesis [52]. In this step of the cell cycle, we can also include the gene *NtEXTRA SPINDLE POLES 1* (*NtESP1*, FC = -1.3), which in Arabidopsis regulates the separation of chromatids following the correct spindle assembly [53].

We evaluated the expression of 7 of the down-regulated genes by RT-qPCR, and the differential expression was similar between both methods, with a Pearson correlation coefficient of $R = 0.9$, $p\text{-value} = 0.0059$ (Figure 1B and Figure S1). We additionally analyzed the expression of *NtWEE1* in these samples, since it is an important kinase in cell cycle checkpoints and is highly expressed in the S/G2 boundary in *N. tabacum* [54] and it appears down-regulated in the RNA-seq analysis, but with an adjusted $p\text{-value}$ exceeding the cutoff (FC = -1.62, $p\text{-value} = 0.08$, Figure 1B). With this result, we can propose that the RNA-seq is sufficient to explore hypothesis of the effect of *SCI1* silencing in the stigmas and styles of *N. tabacum*.

3.2 Genes affected by *SCI1* have differential expression during the BY-2 cell cycle

We performed an additional RNA-seq analysis of synchronized BY-2 cells with sequencing data from Trolet et al 2019 ([32], NCBI SRA study SRP164893), and gene expression profiles confirmed that the genes tested by RT-qPCR, including *NtWEE1*, have different expression during the cell cycle (Figure 2A). We further detected that in the BY-2 cell cycle context, *SCI1* begins to be expressed in the M phase, with a slight peak in G1, decreasing expression through S and the lowest expression in G2. This result agrees with localization experiments of *SCI1*-GFP in BY-2 cells, which shows that *SCI1*-GFP disappears during the M phase, reappearing after telophase/cytokinesis (Strini et al, submitted).

We also analyzed the co-expression of genes in this RNA-seq data, which generated 18 different clusters of normalized gene expression profiles during the cell cycle in BY-2 cells (Figure S2). *SCI1* belongs to Cluster 5, characterized by high expression in phases G1 and M, average expression in S and the lowest expression in G2 (Figure 2A). We compared all 771 DE genes in plants silencing *SCI1* with this dataset, and found that 503 of them have different expression behaviors during the cell cycle, fitting in different clusters (Figure 2B). An overrepresentation analysis show that DE genes are mostly expressed in the G1 and M phases (Cluster 13), which is concurrent with *SCI1* expression peaks (Figure 2B). The difference between clusters 5 and 13 resides in different behaviors in phases G2 and M, since in Cluster

5 there is average expression in S and low in G2, while in Cluster 13, the lowest expression is in S (Figure 2B).

3.3. SCI1 interacts with cell cycle-related genes

To investigate the molecular relationships of the SCI1 protein, a Yeast Two-Hybrid (Y2H) screening of stigma and style clones was performed, and partners Nt14-3-3 D2, NtADK S2 and NtHOMEBOX 22 (NtHB22) were of notice. NtADK S2 is an adenosine kinase which has been described as a key protein involved in the cytokinin-mediated cell cycle regulation in tobacco [55]. As for NtHB22, it is a zinc finger homeodomain-containing protein, which is preferentially expressed in flowers of *Arabidopsis* and may have important roles in development [56]. In a pulldown experiment with recombinant GST-SCI1, we recovered interaction partners with roles in cell division. Notably, both NtCDKB;1 and NtCycB1;1 were identified, and both have an important role in the G2/M checkpoint [57,58]. Other interacting proteins with a putative cell cycle relationship are a MAPK, a CDPK and both 14-3-3A and 14-3-3D proteins. Another interesting partner is an homolog of *Arabidopsis* CDKG;2, NtCDKG;2, which has been associated with cell cycle and *splicing* [21,28]. The interaction between SCI1 and NtCDKG;2 has been confirmed by BiFC (Figure 3).

3.4 NtCDKG;2 may be a link between SCI1 and the cell cycle

In a Y2H screening of clones from stigmas and styles using NtCDKG;2 as a bait, we identified clones coding for proteins with possible roles in cell cycle. The interactions with NtUNICORN-like, NtFBL17, NtPP2A-A2, NtPP2A-C5, NtTCP7, NtTCP8, NtHB22, and NtCDKF;1 were confirmed by peer-to-peer Y2H assays (Figure 4). Additionally, we tested the interaction between some of these proteins with SCI1, and proteins interacting with SCI1 with NtCDKG;2, to assess if they have additional common partners (Figure 5). The NtUNICORN-like protein is a homolog of *Arabidopsis* AGC2 Kinase 4 (AT3G20830), and it affects cell cycle by reduced expression of cyclins and elevated expression of CDK inhibitors [59]. NtF-BOX like protein 17 (NtFBL17) is the homolog of FBL17, an F-BOX protein involved in cell cycle control by targeting degradation of CDK inhibitors [60,61]. Two subunits of the Protein Phosphatase 2A were found: NtPP2A-4, and NtPP2A-A2. The PP2A-4 is a catalytic subunit of this trimeric phosphatase complex, while PP2A-A2 is one of the regulatory subunits. Phosphatase PP2A is involved in several biological processes, but is a spatial regulator of cell division [62]. Both NtTCP7 and NtTCP8 are members of the Class I TCP transcription factors, which act redundantly and affect cell proliferation and endoreduplication in *Arabidopsis* [63,64].

NtCDKF;1 is an homolog of AtCDKF;1, which has been described as a kinase important for cell cycle progression and transcription [65]. We further confirmed the interaction of NtCDKG;2 and NtCDKF;1 by quantitative Y2H assays, Bimolecular

Fluorescence Complementation assay and a Co-localization assay (Figure 5). In the quantitative Y2H, the interaction is stronger than the control for strong interactions, which suggests an important relationship between these CDKs. Interestingly, the co-localization assay shows that, in a phase that resembles Anaphase, both proteins are in a pattern intercalating the separating chromosomes (Figure 5C), which indicates an active role for these proteins in the cell cycle.

3.5 Auxin-responsive genes are also differentially expressed in plants silencing SCI1

Since we have previously shown that SCI1 participates in auxin signaling in both tobacco [29,30] and Arabidopsis [31], we investigated whether the DE genes in our RNA-seq had associations with this hormone. We identified 21 genes with homologs in Arabidopsis associated with the GO terms containing the word 'auxin' (Table 2). Of these, 13 are down-regulated and 5 are up-regulated. In the down-regulated set, there are 5 genes of the AUXIN RESPONSE FACTOR family, homologs of Arabidopsis ARF1 (NtARF1, FC = -1.11), ARF2 (NtARF2, FC = -1.16), ARF5 (NtARF5a, FC = -1.54; NtARF5b, FC = -1.27), and ARF11 (NtARF11, FC = -1.01), that have several roles in plant development. NtARF2 is differentially expressed during the cell cycle in tobacco cells [20], and Arabidopsis ARF2 is involved in cell proliferation regulation during flower development [66]. The *NtSQUAMOSA-PROMOTER BINDING 8* (NtSPL8, FC = -1.82) gene is highly expressed in flower buds and in the pistil of tobacco [67], which is also true for its Arabidopsis homolog, *SPL8*, affecting gynoecium development probably by a pathway shared with *miR156* and YUCCA-regulated auxin signaling [68].

Up-regulated genes include the AUX/IAA family gene *NtIAA14* (FC = 1.14), which is auxin-responsive and expressed in flower buds and open flowers, preferentially in carpels and the stigma [69]. NtIAA14 is closely related to both IAA14 and IAA7 from Arabidopsis. The IAA7/AXR2 protein is involved in regulation of flowering time by affecting LEAFY and SOC1 levels, and is targeted to degradation by auxin through the SCF^{TIR1} complex [70,71]. As for IAA14/SLR, it is involved in the auxin-dependent lateral root formation [72]. There are also two up-regulated genes coding NtHB40 (*NtHB40a*, FC = 1.63; *NtHB40b*, FC = 2.18), and Arabidopsis HB40 is preferentially expressed in flowers and is induced by LEAFY, but no mechanism of action is known [73,74].

In the RNA-seq analysis of cell cycle expressed genes with data from [32], we could identify that some of the auxin-responsive DE genes have different expression profiles (Figure 6). No particular profile is enriched for these genes, and they seem to have different roles during cell cycle. For example, both *NtARF5* genes are more expressed in G2 and M, while *NtARF1* is more expressed in G1 and S, and *NtARF2* is more expressed in M (Figure 3). The genes *NtNUCLEAR PORE COMPLEX PROTEIN 160* (NtNUP160, FC = -1.06), *NtETHYLENE RESPONSE SENSOR 1* (NtEIN1, FC = -1.16), *NtAUXIN RESISTANT 4* (NtAXR4, FC = -1.23) and *NtIAA14* have constant expression during cell cycle, thus not showing in the expression profiles (only profiles without constant expression are clustered). As for *NtSPL8* and

TRANSPARENT TESTA genes *NtTT4* (FC = 1.26) and *NtTT7* (FC = 2.38), they are apparently not expressed in BY-2 cells, as expected for genes dependent on spatiotemporal-specific activation.

4 DISCUSSION

We have previously shown that *SCI1* affects cell proliferation in the upper pistil of both tobacco and Arabidopsis, without altering final morphology of the flower (DePaoli et al., 2011; 2012; 2014). We have also found that this process occurs mediated by auxin signaling in both species [29-31]. Our RNA-seq analysis of plants silencing *SCI1* shows the differential expression of genes involved with cell cycle and auxin signaling in stigmas and styles.

Since *SCI1* inhibits cell proliferation and as we have shown here, begins being expressed after the M phase with a peak in G1 in BY-2 cells, we can hypothesize that it regulates the G1/S transition. This hypothesis is supported by the great amount of DE genes with roles in DNA replication. Thus, it is possible that in plants silencing *SCI1*, cells go fast through G1/S, accumulating in the M phase. This would result in underrepresentation of genes from phases G1/S/G2 in the pooled samples, which might explain the overall down-regulation of these cell cycle-related genes in plants silencing *SCI1*. In Arabidopsis, for example, *CYCD3;1* regulates the G1/S transition, and its overexpression results in smaller cell sizes and abnormal cell cycle distribution in the shoot apex, probably as a result of accumulation of cells in G2 that do not complete mitosis [75]. It is important to notice that the expression of *SCI1* in BY-2 cells is low (maximum TPM is 14), and spatiotemporal regulation of *SCI1* in the stigmas/styles should be considered when interpreting our results.

Another possibility is that cell proliferation is de-repressed in plants silencing *SCI1*, possibly affecting the integrity of DNA replication and/or chromosome segregation. In our RNA-seq, there are down-regulated genes with homologs involved in both DNA repair (i.e. *NtRecQ4A*, *NtRAD9A*) and chromosome segregation (i.e. *NtSMC5*, *NtESP*, *NtSYN3*). This possibility is furthered by the fact that *sci1* Arabidopsis mutants and tobacco plants silencing *SCI1* show fertility defects [29,31].

Some of the DE genes have homologs in Arabidopsis whose mutants show similar phenotypes to what is seen when *SCI1* expression is altered. For example, both the *sci1-1* [31] and *arf2-9* [66] mutants exhibit elongated styles. ARF genes are also targets of *miR164b*, which has conserved targets ARF2, ARF3, and ARF4 in Arabidopsis, tomato and tobacco, and affects flower development [76]. As we've shown, *NtARF2* is down-regulated in plants silencing *SCI1* and is also differentially expressed during the cell cycle in tobacco BY-2 cells ([20] and this work). Schruff et al. [66] propose that extra cell division in *mnt/arf2-9* mutants may be a result of delayed transition from the proliferative to the differentiated state, since mutants have organs with more cells without having altered morphology. Interestingly, *ARF2* expression is elevated in Arabidopsis *pnh/zll-1* mutants [77], and an homolog of *AtPNH/ZLL*, *NtPNH1* (LOC107829827) is down-regulated 1.43 times in our RNA-seq. These genes regulate stem cell maintenance in the shoot apex meristem, and

deregulation of this mechanism is congruent with the phenotypes observed when *SCI1* expression is disturbed - similar to *arf2-9* mutants, the pistil has more cells, but morphology is maintained.

Another interesting correlation is that *NtSPL8* has a mutant of its homolog in Arabidopsis, *sp/8-1*, with shorter styles probably as a result of altered auxin signaling in the gynoecium [68]. This phenotype is similar to that of *SCI1* overexpression in tobacco [29]. The *sp/8-1* mutants also have less expression of *YUC4* during early stages of development in the stigma/style [68]. The YUCCA/NPY genes are upstream regulators of *AtSCI1* [31], and *SCI1* is more expressed in early stages of development [29]. These relationships point to the participation of *SCI1* in a mechanism of floral organ development in an auxin-dependent manner, affecting cell proliferation.

The investigation of interacting partners of *SCI1* led to us further our hypothesis that *SCI1* acts as a signaling effector, as most interactions with cell cycle proteins were identified and/or confirmed by pulldown/BiFC, methods that make it possible to detect proteins in complexes. In the Y2H assays, which detect direct interactions, we identified 3 proteins with possible connections to cell cycle: NtADK 2S, NtHB22, and Nt14-3-3D. NtADK 2S is an adenosine kinase that, in tobacco, participates in the G2/M transition and in the inactivation of cytokinins. Its homolog in Arabidopsis, ADK2, also affects cytokinin interconversion and cell proliferation in leaves, and it interacts with the SAUR-like auxin-responsive protein SAUR70 [78,79]. It has been proved that an adequate balance between cytokinins and auxins is essential to several biological processes, such as cell cycle progression, apical meristem maintenance/differentiation, and the development of the gynoecium and female gametophyte [78,79].

Both NtCDKG;2 and *SCI1* interact with NtHB22, which is an HD-Zip I class transcription factor whose homolog in Arabidopsis is highly expressed in open flowers, but also expressed in inflorescences [56]. Thus, we can propose that the *SCI1*-NtCDKG;2 interaction is temporally and spatially located in developing flowers. The interaction of *SCI1* with NtCDKG;2 has further implications in their possible roles in cell proliferation control during pistil development. As we have also shown here, the NtCDKG;2 partner *NtFBL17* is down-regulated in stigmas and styles of plants silencing *SCI1*. Arabidopsis SCF^{FBL17} has been extensively linked with cell cycle regulation in both mitosis and gametogenesis, and its null mutant produces fully sterile flowers with a slightly longer stigma/style [61]. Furthermore, mutant lines deficient in *FBL17* expression have higher expression of *CYCB1;2*, and *CYCD3;1*, and homologs of both cyclins are down-regulated in plants silencing *SCI1*. It could be said that since *NtFBL17* is also down-regulated in these plants, they should have been up-regulated. However, cell cycle regulation is very complex, involving transcript- and protein-level regulations that can only be understood by focused analyses.

NtCDKG;2 also interacts with NtCDKF;1, which is involved in both transcription control and cell cycle control by acting as a CDK-activating kinase [26,65,80]. The strong interaction we identified between NtCDKG;2 and NtCDKF;1 suggests that the

latter could also be an activator of NtCDKG;2. CDKGs are being recently investigated in Arabidopsis, and so far CDKG;2 has been linked to cell cycle, flowering time, and *splicing* [21,27,28,81,82]. Our work also contributes to the characterization of this class of CDKs which is possibly regulated by *SCI1*. Thus, *SCI1* may act as a signaling protein during the development of the upper pistil, helping integrate signals affecting cell cycle in this organ, and NtCDKG;2 might be its target.

To summarize our findings in the context of a hypothetical model (Figure 7), we could argue that *SCI1* is an effector of the auxin signaling pathway, controlled by YUC2/6, and acting on auxin-responsive elements. This signaling network also could be responsible to adequately control cell cycle progression in proliferating pistil tissues. The inhibition of NtCDKG;2 by *SCI1* in the protein level might be one of the mechanisms by which it controls cell cycle, since *NtCDKG;2* gene expression is not altered in plants silencing *SCI1* (Figure S3). The minutiae of this mechanism will be better understood if we investigate the effects of *SCI1* silencing in earlier stages of development, as we know that its effect on proliferation begins in early stages of floral development [29], after organ identity is already established.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank MSc. Elisabete Rosa Milani, technician from Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal – LMMC, (supported by FAPESP process 2004/08868-0) for the assistance with Confocal imaging. We would also like to thank Prof. Dr. Cristiane Paula Gomes Calixto and Prof. Dr. Luiz Eduardo Vieira Del Bem for their assistance in the interpretation of RNA-seq data. The plant expression vectors were kindly provided by the VIB – PSB, Ghent University (Belgium).

Funding: This work has been supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processes 12/50562-2 and 16/20486-3), and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq grant N/A), fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to G.L. and P.B.F., and fellowships from CNPq to J.O.C., V.F.P. and V.T.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Pedro Boscarol Ferreira: Formal Analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing - Original draft preparation. **Edward José Strini:** Conceptualization, Investigation, Validation, Visualization. **Andrea Carla Quiapim:** Investigation, Resources. **Vitor Favaretto Pinoti:** Investigation, Validation. **Greice Lubini:** Investigation, Validation, Visualization, Writing - Original draft preparation. **Vanessa Thomé:** Investigation, Validation. **Joelma de Oliveira Cruz:** Investigation, Validation. **Gustavo Henrique Goldman:** Resources, Writing - Reviewing and Editing. **Maria Helena de Souza Goldman:** Conceptualization, Supervision, Project Administration, Funding Acquisition, Resources, Writing - Reviewing and Editing.

LEGENDS

Table 1. Differentially Expressed Genes with homologs associated with the GO terms ‘cell cycle’ (GO:0007049), ‘cell cycle process’ (GO:0022402), ‘DNA metabolic process’ (GO:0006259), ‘DNA replication’ (GO:0006260), and ‘DNA replication initiation’ (GO:0006270). Araport11 match corresponds to matches of a blastx search against the Araport11 database, and results were filtered by query coverage (>30%), identity of residues (>30%), and e-values (<0.00005). Boldened entries correspond to genes checked by RT-qPCR (Figure 1B). The full association of genes with GO terms can be found in Table S2, blastx results in Table S3.

Table 2. Differentially Expressed Genes with homologs associated with the GO term ‘response to auxin’ (GO:0009733). Araport11 match corresponds to matches of a blastx search against the Araport11 database, and results were filtered by query coverage (>30%), identity of residues (>30%), and e-values (<0.00005) - data available in Table S3.

Figure 1. A - Gene Ontology enrichment of Arabidopsis homologs of the differentially expressed genes in stigmas and styles of plants silencing *SCI1* in comparison to the wild-type. Categories enriched in the dataset in comparison to the reference (TAIR10 2017, adjusted p-value < 0.05). B - Comparison of fold-change values found in the RNA-seq and RT-qPCR experiments. Error bars were calculated by standard deviation. The *NtWEE1* gene appears to be differentially expressed by RNA-seq, but its p-value is higher than the 0.05 cutoff (p-value = 0.08).

Figure 2. A - Normalized expression profiles of genes during BY-2 cell cycle phases. The profiles confirm that the genes checked by RT-qPCR have different expression in different cell cycle phases. B - Analysis of cluster enrichment for differentially expressed genes in the stigmas/styles of plants silencing *SCI1*. Background = cluster representation of the total of genes (39616 genes). Expression profiles of Clusters 5, and 13 are highlighted. *SCI1* belongs to Cluster 5, while Cluster 13 is overrepresented in DE genes of plants silencing *SCI1*. * - indicates adjusted p-value < 0.05.

Figure 3. A - Identification of *NtCDKG;2* as an interaction partner of *SCI1* by pull-down (a) and by BiFC (b-g) assays. (a) SDS-PAGE analysis of sample eluted from the pull-down test, carried out with the heterologous protein GST-*SCI1*, expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta cells and nuclear-enriched extract of stigmas/styles proteins of *N. tabacum* wild type plants; M: molecular weight marker; 1, 2 and 3: eluted sample tested in biological triplicate; Black arrow indicates the localization of the bands that have been identified as *NtCDKG;2*. B - (b,e) indicates interaction of *SCI1*-nGFP and *NtCDKG;2*-cGFP; (c, d) DAPI chromatin staining; (d,g) merged

channels; White arrows: nucleolar region similar to periphery of nucleolus; Scale bars: 5 μ m.

Figure 4. Yeast Two-Hybrid assays of SCI1 and NtCDKG;2 and putative interaction partners. -LW: control medium; -LWH: assay medium (*HIS3* reporter gene). AD: Protein fused with GAL4 Activation Domain; BD: Protein fused with GAL4 DNA binding domain.

Figure 5. A - Beta-galactosidase activity on ONPG substrate from transformants expressing control interactions (strong, weak, and negative), autoactivation control (NtCDKG;2-BD x pAD plasmid), and the assayed interaction (NtCDKG;2-BD x NtCDKF;1-AD). B - BiFC Assay in *Nicotiana benthamiana* leaves transiently expressing p35S::NtCDKG;2-nGFP and p35S::NtCDKF;1-cGFP. The interaction is visible in the GFP channel. Bar = 5 μ m. C - Co-localization assay in *N. benthamiana* leaves transiently expressing p35S::GFP-NtCDKG;2 and p35S::NtCDKF;1-mCherry. Two different cells are shown. Bar = 5 μ m.

Figure 6. Expression profiles during the cell cycle of auxin responsive genes differentially expressed in plants silencing *SCI1*. In red = down-regulated genes; in green = up-regulated genes.

Figure 7. Proposed model for SCI1 participation in the pistil development. SCI1 is a participant of the auxin signaling pathway, resulting in the regulation of cell proliferation during growth of the stigma and style.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1. Complete differential gene expression results (Excel Spreadsheet).

Table S2. Complete GO analysis results (Excel Spreadsheet).

Table S3. Complete blastx analysis results (Excel Spreadsheet).

Figure S1. Correlation between the RNA-seq and RT-qPCR experiments.

Figure S2. Clusters of co-expressed genes during BY-2 cell cycle.

Figure S3. Expression of *NtCDKG;2* in Stigmas and Style of Wild-type plants, and transgenic plants silencing *SC11*. There is no significant alteration in expression.

REFERENCES

- [1] S. Simonini, L. Østergaard, Female reproductive organ formation: A multitasking endeavor, in: *Curr. Top. Dev. Biol.*, Academic Press Inc., 2019: pp. 337–371. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.10.004>.
- [2] B. Thomson, F. Wellmer, Molecular regulation of flower development, in: *Curr. Top. Dev. Biol.*, Academic Press Inc., 2019: pp. 185–210. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.007>.
- [3] L. Moubayidin, L. Østergaard, Gynoecium formation: an intimate and complicated relationship, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 45 (2017) 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.02.005>.
- [4] C. Gebhardt, The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research, *Theor. Appl. Genet.* 129 (2016) 2281–2294. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>.
- [5] N. Sierro, J.N.D. Battey, S. Ouadi, N. Bakaher, L. Bovet, A. Willig, S. Goepfert, M.C. Peitsch, N. V. Ivanov, The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms4833>.
- [6] K.D. Edwards, N. Fernandez-Pozo, K. Drake-Stowe, M. Humphry, A.D. Evans, A. Bombarely, F. Allen, R. Hurst, B. White, S.P. Kernodle, J.R. Bromley, J.P. Sanchez-Tamburrino, R.S. Lewis, L.A. Mueller, A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency, *BMC Genomics*. 18 (2017) 448. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3791-6>.
- [7] Y. Cheng, Y. Zhao, A Role for Auxin in Flower Development, *J. Integr. Plant Biol.* 49 (2007) 99–104. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00412.x>.
- [8] L. Bögre, Z. Magyar, E. López-Juez, New clues to organ size control in plants, *Genome Biol.* 9 (2008) 226. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-7-226>.
- [9] Y. Zhao, Essential Roles of Local Auxin Biosynthesis in Plant Development and in Adaptation to Environmental Changes, *Annu. Rev. Plant Biol.* 69 (2018) 417–435. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040226>.
- [10] N. Marsch-Martínez, S. de Folter, Hormonal control of the development of the gynoecium, *Curr. Opin. Plant Biol.* 29 (2016) 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.12.006>.

- [11] M.J.M. Smulders, G.F.E. Janssen, A.F. Croes, G.W.M. Barendse, G.J. Wullems, Auxin regulation of flower bud formation in tobacco explants, *J. Exp. Bot.* 39 (1988) 451–459. <https://doi.org/10.1093/jxb/39.4.451>.
- [12] M. Naderi, A. Caplan, P.H. Berger, Phenotypic characterization of a tobacco mutant impaired in auxin polar transport, *Plant Cell Rep.* 17 (1997) 32–38. <https://doi.org/10.1007/s002990050347>.
- [13] N. Yamaguchi, M.F. Wu, C.M. Winter, M.C. Berns, S. Nole-Wilson, A. Yamaguchi, G. Coupland, B.A. Krizek, D. Wagner, A Molecular Framework for Auxin-Mediated Initiation of Flower Primordia, *Dev. Cell.* 24 (2013) 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.017>.
- [14] A.S. Hemerly, P. Ferreira, J. de Almeida Engler, M. Van Montagu, G. Engler, D. Inze, *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division, *Plant Cell.* 5 (1993) 1711–1723. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.12.1711>.
- [15] C. Richard, Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions, *J. Exp. Bot.* 52 (2001) 1625–1633. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.361.1625>.
- [16] H. Harashima, K. Kato, A. Shinmyo, M. Sekine, Auxin is required for the assembly of A-type cyclin-dependent kinase complexes in tobacco cell suspension culture, *J. Plant Physiol.* 164 (2007) 1103–1112. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.005>.
- [17] Z. Magyar, L. De Veylder, A. Atanassova, L. Bakó, D. Inzé, L. Bögre, The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division, *Plant Cell.* 17 (2005) 2527–2541. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033761>.
- [18] B. Berckmans, V. Vassileva, S.P.C. Schmid, S. Maes, B. Parizot, S. Naramoto, Z. Magyar, C. Lessa Alvim Kamei, C. Koncz, L. Bögre, G. Persiau, G. de Jaeger, J. Friml, R. Simon, T. Beeckman, L. de Veylder, Auxin-Dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *arabidopsis* E2Fa by lateral organ boundary proteins, *Plant Cell.* 23 (2011) 3671–3683. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088377>.
- [19] C. Perrot-Rechenmann, Cellular responses to auxin: division versus expansion., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001446>.
- [20] P. Breyne, R. Dreesen, K. Vandepoele, L. De Veylder, F. Van Breusegem, L. Callewaert, S. Rombauts, J. Raes, B. Cannoot, G. Engler, D. Inzé, M. Zabeau, Transcriptome analysis during cell division in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 14825–14830. <https://doi.org/10.1073/pnas.222561199>.
- [21] M. Menges, S.M. De Jager, W. Gruissem, J.A.H. Murray, Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control, *Plant J.* 41 (2005) 546–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x>.
- [22] C. Gutierrez, 25 Years of Cell Cycle Research: What's Ahead?, *Trends Plant Sci.* 21 (2016) 823–833. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.007>.
- [23] G. Banerjee, D. Singh, A.K. Sinha, Plant cell cycle regulators: Mitogen-activated protein kinase, a new regulating switch?, *Plant Sci.* 301 (2020) 110660. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110660>.

- [24] W. Wang, X. Chen, HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in Arabidopsis, *Development*. 131 (2004) 3147–3156. <https://doi.org/10.1242/dev.01187>.
- [25] A. Czerednik, M. Busscher, B.A.M. Bielen, M. Wolters-Arts, R.A. de Maagd, G.C. Angenent, Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between CDKB and CDKA1 cell cycle genes, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 2605–2617. <https://doi.org/10.1093/jxb/err451>.
- [26] M. Hajheidari, S. Farrona, B. Huettel, Z. Koncz, C. Koncz, CDKF;1 and CDKD Protein Kinases Regulate Phosphorylation of Serine Residues in the C-Terminal Domain of Arabidopsis RNA Polymerase II, *Plant Cell*. 24 (2012) 1626–1642. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096834>.
- [27] X. Ma, Z. Qiao, D. Chen, W. Yang, R. Zhou, W. Zhang, M. Wang, CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2 regulates salinity stress response and salt mediated flowering in Arabidopsis thaliana, *Plant Mol. Biol.* 88 (2015) 287–299. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0324-z>.
- [28] C. Nibau, M. Gallemí, D. Dadarou, J.H. Doonan, N. Cavallari, Thermo-Sensitive Alternative *Splicing* of FLOWERING LOCUS M Is Modulated by Cyclin-Dependent Kinase G2, *Front. Plant Sci.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01680>.
- [29] H.C. DePaoli, M.S. Brito, A.C. Quiapim, S.P. Teixeira, G.H. Goldman, M.C. Dornelas, M.H.S. Goldman, Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development, *New Phytol.* 190 (2011) 882–895. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03660.x>.
- [30] H. DePaoli, G. Goldman, M.-H. Goldman, SCI1, the first member of the tissue-specific inhibitors of CDK (TIC) class, is probably connected to the auxin signaling pathway, *Plant Signal. Behav.* (2012). <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18525>.
- [31] H.C. DePaoli, M.C. Dornelas, M.H.S. Goldman, SCI1 is a component of the auxin-dependent control of cell proliferation in Arabidopsis upper pistil, *Plant Sci.* 229 (2014) 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.003>.
- [32] A. Trolet, P. Baldrich, M.C. Criqui, M. Dubois, M. Clavel, B.C. Meyers, P. Genschik, Cell cycle-dependent regulation and function of ARGONAUTE1 in plants, *Plant Cell*. 31 (2019) 1734–1750. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00069>.
- [33] R. Patro, G. Duggal, M.I. Love, R.A. Irizarry, C. Kingsford, Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression, *Nat. Methods*. 14 (2017) 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>.
- [34] C.P.G. Calixto, W. Guo, A.B. James, N.A. Tzioutziou, J.C. Entizne, P.E. Panter, H. Knight, H.G. Nimmo, R. Zhang, J.W.S. Brown, Rapid and dynamic alternative *splicing* impacts the arabidopsis cold response transcriptome[CC-BY], *Plant Cell*. 30 (2018) 1424–1444. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00177>.
- [35] W. Guo, N. Tzioutziou, G. Stephen, I. Milne, C. Calixto, R. Waugh, J. Brown, R. Zhang, 3D RNA-seq - a powerful and flexible tool for rapid and accurate differential expression and alternative *splicing* analysis of RNA-seq data for biologists, *BioRxiv*. (2019) 656686. <https://doi.org/10.1101/656686>.

- [36] B. Abu-Jamous, S. Kelly, Clust: automatic extraction of optimal co-expressed gene clusters from gene expression data, *Genome Biol.* 19 (2018) 172. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1536-8>.
- [37] S. de Folter, R.G.H. Immink, Yeast Protein–Protein Interaction Assays and Screens, in: *Methods Mol. Biol.*, Methods Mol Biol, 2011: pp. 145–165. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-154-3_8.
- [38] M. Karimi, B. De Meyer, P. Hilson, Modular cloning in plant cells, *Trends Plant Sci.* 10 (2005) 103–105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.01.008>.
- [39] M. Karimi, A. Depicker, P. Hilson, Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors, *Plant Physiol.* 145 (2007) 1144–1154. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106989>.
- [40] J. Boruc, E. Mylle, M. Duda, R. De Clercq, S. Rombauts, D. Geelen, P. Hilson, D. Inze, D. Van Damme, E. Russinova, Systematic Localization of the Arabidopsis Core Cell Cycle Proteins Reveals Novel Cell Division Complexes, *Plant Physiol.* 152 (2010) 553–565. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148643>.
- [41] E. Mylle, M.C. Codreanu, J. Boruc, E. Russinova, Emission spectra profiling of fluorescent proteins in living plant cells, *Plant Methods.* 9 (2013) 10. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-10>.
- [42] I.A. Sparkes, J. Runions, A. Kearns, C. Hawes, Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2019–2025. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>.
- [43] A. Schnittger, U. Schöbinger, Y.D. Stierhof, M. Hülskamp, Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes., *Curr. Biol.* 12 (2002) 415–20.
- [44] K. Fülöp, S. Tarayre, Z. Kelemen, G. Horváth, Z. Kevei, K. Nikovics, L. Bakó, S. Brown, A. Kondorosi, E. Kondorosi, Arabidopsis anaphase-promoting complexes: Multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy, *Cell Cycle.* 4 (2005) 4084–4092. <https://doi.org/10.4161/cc.4.8.1856>.
- [45] M. Menges, A.K. Samland, S. Planchais, J.A.H. Murray, The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis, *Plant Cell.* 18 (2006) 893–906. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039636>.
- [46] J. Van Leene, J. Hollunder, D. Eeckhout, G. Persiau, E. Van De Slijke, H. Stals, G. Van Isterdael, A. Verkest, S. Neiryneck, Y. Buffel, S. De Bodt, S. Maere, K. Laukens, A. Pharazyn, P.C.G.G. Ferreira, N. Eloy, C. Renne, C. Meyer, J. Faure, J. Steinbrenner, J. Beynon, J.C. Larkin, Y. Van de Peer, P. Hilson, M. Kuiper, L. De Veylder, H. Van Onckelen, D. Inzé, E. Witters, G. De Jaeger, Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in Arabidopsis thaliana, *Mol. Syst. Biol.* 6 (2010) 397. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.53>.
- [47] F. Xu, S. Xu, M. Wiermer, Y. Zhang, X. Li, The cyclin L homolog MOS12 and the MOS4-associated complex are required for the proper *splicing* of plant resistance genes, *Plant J.* 70 (2012) 916–928. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04906.x>.
- [48] Y. Cheng, L. Cao, S. Wang, Y. Li, X. Shi, H. Liu, L. Li, Z. Zhang, L.C. Fowke, H. Wang, Y. Zhou, Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes upregulates the E2F

- pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in *Arabidopsis*, *Plant J.* 75 (2013) 642–655. <https://doi.org/10.1111/tpj.12228>.
- [49] K. Vandepoele, K. Vlieghe, K. Florquin, L. Hennig, G.T.S.S. Beemster, W. Gruissem, Y. Van De Peer, D. Inzé, L. De Veylder, D. Inze, L. De Veylder, Genome-wide identification of potential plant E2F target genes., *Plant Physiol.* 139 (2005) 316–328. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066290.316>.
- [50] R.W. Shultz, V.M. Tatineni, L. Hanley-Bowdoin, W.F. Thompson, Genome-Wide Analysis of the Core DNA Replication Machinery in the Higher Plants *Arabidopsis* and *Rice*, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1697–1714. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101105>.
- [51] A. Santerre, A.B. Britt, Cloning of a 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 2240–2244. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2240>.
- [52] M.-C.C. Caillaud, L. Paganelli, P. Lecomte, L. Deslandes, M. Quentin, Y. Pecrix, M. Le Bris, N. Marfaing, P. Abad, B. Favery, Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division, *PLoS One.* 4 (2009) e6757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006757>.
- [53] P.N. Moschou, A.P. Smertenko, E.A. Minina, K. Fukada, E.I. Savenkov, S. Robert, P.J. Hussey, P. V. Bozhkov, The caspase-related protease separase (EXTRA SPINDLE POLES) regulates cell polarity and cytokinesis in *arabidopsis*, *Plant Cell.* 25 (2013) 2171–2186. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113043>.
- [54] G.S. Cook, A.L. Grønlund, I. Siciliano, N. Spadafora, M. Amini, R.J. Herbert, M.B. Bitonti, K. Graumann, D. Francis, H.J. Rogers, Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 2093–2106. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert066>.
- [55] Z. Kwade, A. Świątek, A. Azmi, A. Goossens, D. Inzé, H. Van Onckelen, L. Roef, Identification of four adenosine kinase isoforms in tobacco By-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17512–17519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411428200>.
- [56] Q.K.G.K.-G.K.-G. Tan, V.F. Irish, The *Arabidopsis* zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development., *Plant Physiol.* 140 (2006) 1095–1108. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070565>.
- [57] D.A. Sorrell, M. Menges, J.M.S. Healy, Y. Deveaux, C. Amano, Y. Su, H. Nakagami, A. Shinmyo, J.H. Doonan, M. Sekine, J.A.H. Murray, Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow-2 cells, *Plant Physiol.* 126 (2001) 1214–1223. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1214>.
- [58] M.C. Criqui, Y. Parmentier, A. Derevier, W.-H. Shen, A. Dong, P. Genschik, Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells, *Plant J.* 24 (2000) 763–773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2000.t01-1-x>.
- [59] S. Scholz, J. Pleßmann, B. Enugutti, R. Hüttl, K. Wassmer, K. Schneitz, The AGC protein kinase UNICORN controls planar growth by attenuating PDK1 in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS Genet.* 15 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007927>.

- [60] X. Zhao, H. Harashima, N. Dissmeyer, S. Pusch, A.K. Weimer, J. Bramsiepe, D. Bouyer, S. Rademacher, M.K. Nowack, B. Novak, S. Sprunck, A. Schnittger, A General G1/S-Phase Cell-Cycle Control Module in the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*, *PLoS Genet.* 8 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002847>.
- [61] S. Noir, K. Marrocco, K. Masoud, A. Thomann, A. Gusti, M. Bitrian, A. Schnittger, P. Genschik, The Control of *Arabidopsis thaliana* Growth by Cell Proliferation and Endoreplication Requires the F-Box Protein FBL17, *Plant Cell.* 27 (2015) 1461–1476. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135301>.
- [62] L. Spinner, A. Gadeyne, K. Belcram, M. Goussot, M. Moison, Y. Duroc, D. Eeckhout, N. De Winne, E. Schaefer, E. Van De Slijke, G. Persiau, E. Witters, K. Gevaert, G. De Jaeger, D. Bouchez, D. Van Damme, M. Pastuglia, A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms2831>.
- [63] J.A. Aguilar-Martínez, N. Sinha, Analysis of the role of *Arabidopsis* class I TCP genes AtTCP7, AtTCP8, AtTCP22, and AtTCP23 in leaf development, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00406>.
- [64] G. Zhang, H. Zhao, C. Zhang, X. Li, Y. Lyu, D. Qi, Y. Cui, L. Hu, Z. Wang, Z. Liang, S. Cui, TCP7 functions redundantly with several Class I TCPs and regulates endoreplication in *Arabidopsis*, *J. Integr. Plant Biol.* 61 (2019) 1151–1170. <https://doi.org/10.1111/jipb.12749>.
- [65] M. Umeda, A. Shimotohno, M. Yamaguchi, Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants, *Plant Cell Physiol.* 46 (2005) 1437–1442. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci170>.
- [66] M.C. Schruff, M. Spielman, S. Tiwari, S. Adams, N. Fenby, R.J. Scott, The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs, *Development.* 133 (2006) 251–261. <https://doi.org/10.1242/dev.02194>.
- [67] Y.Y. Han, Y.Q. Ma, D.Z. Li, J.W. Yao, Z.Q. Xu, Characterization and phylogenetic analysis of fifteen NtabSPL genes in *Nicotiana tabacum* L. cv. Qinyan95, *Dev. Genes Evol.* 226 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00427-015-0522-3>.
- [68] S. Xing, M. Salinas, A. Garcia-Molina, S. Höhmann, R. Berndtgen, P. Huijser, *SPL8* and miR156-targeted *SPL* genes redundantly regulate *Arabidopsis* gynoecium differential patterning, *Plant J.* 75 (2013) 566–577. <https://doi.org/10.1111/tpj.12221>.
- [69] A. Dargeviciute, C. Roux, A. Decreux, F. Sitbon, C. Perrot-Rechenmann, Molecular cloning and expression of the early auxin-responsive Aux/IAA gene family in *Nicotiana tabacum*, *Plant Cell Physiol.* 39 (1998) 993–1002. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029311>.
- [70] W.M. Gray, S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser, M. Estelle, Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins, *Nature.* 414 (2001) 271–276. <https://doi.org/10.1038/35104500>.
- [71] Y.-X. Mai, L. Wang, H.-Q. Yang, A Gain-of-Function Mutation in *IAA7/AXR2* Confers Late Flowering under Short-day Light in *Arabidopsis*, *J. Integr. Plant Biol.* 53 (2011) 480–492. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01050.x>.

- [72] H. Fukaki, S. Tameda, H. Masuda, M. Tasaka, Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the solitary-root/IAA14 gene of Arabidopsis, *Plant J.* 29 (2002) 153–168. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01201.x>.
- [73] D. Wagner, F. Wellmer, K. Dilks, D. William, M.R. Smith, P.P. Kumar, J.L. Riechmann, A.J. Greenland, E.M. Meyerowitz, Floral induction in tissue culture: A system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation, *Plant J.* 39 (2004) 273–282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02127.x>.
- [74] E. Henriksson, A.S.B. Olsson, H. Johannesson, H. Johansson, J. Hanson, P. Engström, E. Söderman, Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships, *Plant Physiol.* 139 (2005) 509–518. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063461>.
- [75] W. Dewitte, C. Riou-Khamlichi, S. Scofield, J.M.S. Healy, A. Jacqmard, N.J. Kilby, J.A.H. Murray, Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3, *Plant Cell.* 15 (2003) 79–92. <https://doi.org/10.1105/tpc.004838>.
- [76] J.P. Alvarez, I. Pekker, A. Goldshmidt, E. Blum, Z. Amsellem, Y. Eshed, Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species, *Plant Cell.* 18 (2006) 1134–1151. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040725>.
- [77] F. Roodbarkelari, F. Du, E. Truernit, T. Laux, ZLL/AGO10 maintains shoot meristem stem cells during Arabidopsis embryogenesis by down-regulating ARF2-mediated auxin response, *BMC Biol.* 13 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0180-y>.
- [78] S. Schoor, S. Farrow, H. Blaschke, S. Lee, G. Perry, K. von Schwanzenberg, N. Emery, B. Moffatt, Adenosine kinase contributes to cytokinin interconversion in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 157 (2011) 659–672. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181560>.
- [79] M. Dreze, A.-R. Carvunis, B. Charlotiaux, M. Galli, S.J. Pevzner, M. Tasan, Y.-Y. Ahn, P. Balumuri, A.-L. Barabasi, V. Bautista, P. Braun, D. Byrdsong, H. Chen, J.D. Chesnut, M.E. Cusick, J.L. Dangl, C. de los Reyes, A. Dricot, M. Duarte, J.R. Ecker, C. Fan, L. Gai, F. Gebreab, G. Ghoshal, P. Gilles, B.J. Gutierrez, T. Hao, D.E. Hill, C.J. Kim, R.C. Kim, C. Lurin, A. MacWilliams, U. Matrubutham, T. Milenkovic, J. Mirchandani, D. Monachello, J. Moore, M.S. Mukhtar, E. Olivares, S. Patnaik, M.M. Poulin, N. Przulj, R. Quan, S. Rabello, G. Ramaswamy, P. Reichert, E.A. Rietman, T. Rolland, V. Romero, F.P. Roth, B. Santhanam, R.J. Schmitz, P. Shinn, W. Spooner, J. Stein, G.M. Swamilingiah, S. Tam, J. Vandenhaute, M. Vidal, S. Waaijers, D. Ware, E.M. Weiner, S. Wu, J. Yazaki, Evidence for Network Evolution in an Arabidopsis Interactome Map, *Science* (80-.). 333 (2011) 601–607. <https://doi.org/10.1126/science.1203877>.
- [80] H. Takatsuka, R. Ohno, M. Umeda, The Arabidopsis cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation, *Plant J.* 59 (2009) 475–487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03884.x>.
- [81] N. Cavallari, C. Nibau, A. Fuchs, D. Dadarou, A. Barta, J.H. Doonan, The cyclin-dependent kinase G group defines a thermo-sensitive alternative *splicing* circuit modulating the expression of Arabidopsis ATU2AF65A, *Plant J.* (2018). <https://doi.org/10.1111/tpj.13914>.

[82] T. Kanno, P. Venhuizen, M.T. Wu, P. Chiou, C.L. Chang, M. Kalyna, A.J.M. Matzke, M. Matzke, A collection of pre-mRNA *splicing* mutants in *arabidopsis thaliana*, G3 Genes, Genomes, Genet. 10 (2020) 1983–1996. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400998>.

TABLES

Table 1

Gene ID	Description	Symbols	Araport11 match	Adjusted p-value	log2 Fold-change
LOC107789454	cell division cycle protein 123 homolog	NtCDC123	AT4G05440	0.0148	-1.04
LOC107800310	cyclin-C1-2-like	NtCycC1;2	AT5G48630	0.0157	-1.12
LOC107785812	cyclin-L1-1-like	NtCycL1;1	AT2G26430	0.0132	-1.07
LOC107803775	dynamamin-related protein 1E-like	NtDL1E	AT3G60190	0.0120	-1.05
LOC107787876	mitogen-activated protein kinase kinase kinase NPK1-like	NtNP1	AT1G09000	0.0392	-1.17
LOC107766359	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1-like	NtPIN1AT	AT2G18040	0.0154	-1.04
LOC107803598	65-kDa microtubule-associated protein 5-like	NtMAP65-5	AT5G55230	0.0120	-1.67
LOC107781415	cellulose synthase-like protein D5	NtCSLD5	AT1G02730	0.0131	-1.53
LOC107793085	cyclin-D3-1-like	NtCycD3;1	AT3G50070	0.0267	-1.94
LOC107774597	cyclin-dependent kinase inhibitor 3-like	NtKRP3	AT5G48820	0.0125	-1.60
LOC107778480	F-box/LRR-repeat protein 17-like	NtFBL17	AT3G54650	0.0128	-1.43
LOC107822562	G2/mitotic-specific cyclin S13-7-like	NtCycB1;2	AT5G06150	0.0120	-1.79
LOC107769278	gamma-tubulin complex component 4-like	NtGCP4	AT3G53760	0.0452	-1.25
LOC107826020	kinesin-1-like protein PSS1	NtPSS1	AT3G63480	0.0186	-1.32
LOC107768847	kinetochore protein ndc80-like	NtNDC80	AT3G54630	0.0321	-1.20
LOC107784059	microtubule-binding protein TANGLED-like	NtTAN1	AT3G05330	0.0120	-1.43
LOC107807022	mitotic checkpoint protein BUB3.1	NtBUB3.1	AT3G19590	0.0142	-1.29
LOC107766219	phragmoplast orienting kinesin 2-like	NtPOK2	AT3G19050	0.0321	-1.64

LOC107779422	proline-rich protein PRCC-like	NtPRCC	AT2G19270	0.0120	-1.07
LOC107820516	protein JASON-like	NtJASON	AT1G04030	0.0120	-1.52
LOC107820019	protein POLLENLESS 3-like	NtMS5	AT4G20900	0.0312	-1.17
LOC107825682	protein SAD1/UNC-84 domain protein 1-like	NtSUN1	AT5G04990	0.0120	-1.10
LOC107807872	QWRF motif-containing protein 2-like	NtQRF2	AT2G44190	0.0120	-1.85
LOC107804233	RAN GTPase-activating protein 1-like	NtRANGAP1	AT3G63130	0.0128	-1.37
LOC107828330	separase-like	NtESP	AT4G22970	0.0132	-1.30
LOC107805674	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8	AT1G02065	0.0120	-1.92
LOC107804222	uncharacterized LOC107804222	NtTRM8	AT5G26910	0.0266	-1.07
LOC107812534	uncharacterized LOC107812534	NtASY3	AT2G46980	0.0404	-1.31
LOC107820519	BRCA1-associated RING domain protein 1-like	NtBARD1	AT1G04020	0.0283	-1.09
LOC107806587	cell cycle checkpoint control protein RAD9A-like	NtRAD9A	AT3G05480	0.0176	-1.01
LOC107825338	DNA mismatch repair protein MSH6-like	NtMSH6	AT4G02070	0.0143	-1.17
LOC107825899	DNA topoisomerase 2-like		AT3G23890	0.0254	-1.65
LOC107809288	Fanconi anemia group D2 protein homolog	NtFACND2	AT4G14970	0.0132	-1.29
LOC107803524	protein gamma response 1-like		AT3G52115	0.0358	-1.06
LOC107789894	sister chromatid cohesion 1 protein 3-like	NtSYN3	AT3G59550	0.0216	-1.54
LOC107760693	structural maintenance of chromosomes protein 5-like	NtSMC5	AT5G15920	0.0148	-1.16
LOC107777444	TPR repeat-containing protein ZIP4-like	NtZIP4	AT5G48390	0.0186	-1.62
LOC107816422	cell division control protein 45 homolog	NtCDC45	AT3G25100	0.0165	-1.22
LOC107799705	DNA replication licensing factor MCM4-like	NtMCM4	AT2G16440	0.0120	-1.49

LOC107774668	DNA replication licensing factor MCM7-like	NtMCM7	AT4G02060	0.0132	-1.44
LOC107764231	origin of replication complex subunit 1-like	NtORC1	AT4G14700	0.0120	-1.27
LOC107800100	24-methylenesterol C-methyltransferase 2-like	NtSMT2	AT1G20330	0.0170	-1.25
LOC107778615	sister chromatid cohesion protein DCC1-like	NtDCC1	AT2G44580	0.0170	-1.28
LOC107830438	cell division control protein 48 homolog C-like	NtCDC48C	AT3G01610	0.0120	-1.17
LOC107819758	probable DNA helicase MCM9	NtMCM9	AT2G14050	0.0411	-1.23
LOC107824739	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1a	AT5G58230	0.0132	-1.19
LOC107828333	WD-40 repeat-containing protein MSI1	NtMSI1b	AT5G58230	0.0120	-1.21
LOC107787314	alpha-crystallin domain-containing protein 22.3-like	NtAcd22.3	AT1G54850	0.0134	-1.26
LOC107824504	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	NtDUT1	AT3G46940	0.0186	-1.66
LOC107830916	DNA-damage-repair/toleration protein DRT102-like	NtDRT102	AT3G04880	0.0145	-1.41
LOC107799072	poly [ADP-ribose] polymerase 1-like	NtPARP1	AT2G31320	0.0120	-1.21
LOC107760987	probable histone H2A variant 1	NtH2A.1	AT2G38810	0.0126	-1.19
LOC107798209	protein CHROMATIN REMODELING 24-like	NtCHR24	AT5G63950	0.0120	-1.28
LOC107784180	protein MICRORCHIDIA 6-like	NtMORC6	AT1G19100	0.0126	-1.12
LOC107759516	telomerase reverse transcriptase-like	NtTERT	AT5G16850	0.0210	-1.81
LOC107763315	uncharacterized LOC107763315	NtAGDP1	AT1G09320	0.0341	-1.23
LOC107799442	zinc finger CCCH domain-containing protein 19-like	NtNERD	AT2G16485	0.0285	-1.29
LOC107759159	DNA-3-methyladenine glycosylase-like	NtMAG	AT3G12040	0.0399	3.19
LOC107814297	ATP-dependent DNA helicase Q-like 1	NtRECQ1	AT3G05740	0.0367	-1.20

LOC107821048	ATP-dependent DNA helicase Q-like 4A	NtRECQ4A	AT1G10930	0.0185	-1.29
LOC107814562	ATP-dependent DNA helicase Q-like SIM	NtRECQSIM	AT5G27680	0.0341	-1.09
LOC107795010	DNA polymerase eta	NtPOLH	AT5G44740	0.0438	-1.11
LOC107778560	FACT complex subunit SPT16-like	NtSPT16a	AT4G10710	0.0120	-1.81
LOC107778561	FACT complex subunit SPT16-like	NtSPT16b	AT4G10710	0.0127	-1.15
LOC107791227	flap endonuclease 1-like	NtFEN1	AT5G26680	0.0126	-1.39
LOC107791920	protein STICHEL	NtSTI	AT2G02480	0.0128	-1.08
LOC107788817	origin of replication complex subunit 5-like	NtORC5	AT4G29910	0.0395	-1.18
LOC107805945	protein MCM10 homolog	NtMCM10	AT2G20980	0.0449	-1.19
LOC107772839	uncharacterized LOC107772839	NtMCM10-like	AT2G20980	0.0349	-1.15

Table 2

Gene ID	Description	Symbols	Araport11 match	Adjusted p-value	Log2 Fold-Change	
LOC107818819	auxin response factor 1-like	NtARF1	AT1G59750	0.0120	-1.11	Down-regulated
LOC107771982	auxin response factor 11-like	NtARF11	AT4G23980	0.0449	-1.01	
LOC107767241	auxin response factor 2-like	NtARF2	AT5G62000	0.0266	-1.16	
LOC107787968	auxin response factor 5-like	NtARF5a	AT1G19850	0.0185	-1.54	
LOC107807457	auxin response factor 5-like	NtARF5b	AT1G19850	0.0128	-1.27	
LOC107816434	auxin transporter-like protein 2	NtLAX2	AT2G21050	0.0120	-1.74	

LOC107804026	cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1-like	NtCAND1	AT2G02560	0.0281	- 1.11
LOC107808474	inositol-3-phosphate synthase-like	NtMIPS2	AT2G22240	0.0170	- 1.08
LOC107792899	nuclear pore complex protein NUP160	NtNUP160	AT1G33410	0.0120	- 1.06
LOC107804758	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP42-like	NtTWD1	AT3G21640	0.0237	- 1.02
LOC107764068	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase, chloroplastic-like	NtPUR7	AT3G21110	0.0286	- 1.09
LOC107794639 ₁	probable ethylene response sensor 1	NtEIN1	AT1G66340	0.0120	- 1.16
LOC107806323	protein AUXIN RESPONSE 4-like	NtAXR4	AT1G54990	0.0120	- 1.23
LOC107808327	rac-like GTP-binding protein 5	NtRAC5	AT4G35020	0.0240	- 1.04
LOC107805674	squamosa promoter-binding-like protein 8	NtSPL8	AT1G02065	0.0120	- 1.92
LOC107815530	auxin-responsive protein IAA14-like	NtIAA14	AT4G14550	0.0314	1.14
LOC107813613	chalcone synthase A	NtTT4	AT5G13930	0.0120	1.26
LOC107799312	cytochrome P450 84A1-like	NtTT7	AT5G07990	0.0128	2.38
LOC107759673	homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like	NtHB40a	AT4G36740	0.0385	1.63
LOC107770469	homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like	NtHB40b	AT4G36740	0.0120	2.18
LOC107769257	protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3-like	NtNPF6.3	AT1G12110	0.0132	1.10

Up-regulated

FIGURES

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

	-LW		-LWH	
	BD	AD	BD	AD
NtADK2S		x		x
NtHB22				
NtFBL17				
NtPP2A-A2				
NtPP2A-4				
NtUNICORN-like	x		x	
NtTCP7				
NtTCP8	x		x	
NtCDKF;1				

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Supplemental Figures

Figure S1

Pearson correlation coefficient between the RNA-seq and RT-qPCR experiments. RNA-seq values were given as log2Fold-change, and RT-qPCR as $\Delta\Delta Cq$.

Figure S2

Clusters of co-expressed gene during BY-2 cell cycle. In the Y axis, values of normalized expression (Z-scores) are given. In the X axis, phases G1, S, G2 and M are represented sequentially.

Figure S3

Expression levels of *NtCDKG;2* in stigmas/styles of wild-type (SR1) tobacco plants (left), and transgenic plants silencing *SCI1* (Silenced *SCI1*, right).