UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GUSTAVO ANTÔNIO TEIXEIRA CHAVES

**Vias de sinalização por auxinas e sua interação
com o relógio biológico de cana-de-açúcar**

Versão corrigida da tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

22/12/2017

GUSTAVO ANTÔNIO TEIXEIRA CHAVES

**Vias de sinalização por auxinas e sua interação
com o relógio biológico de cana-de-açúcar**

*Dissertação/Tese apresentada ao
Instituto de Química da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica).*

Orientador (a): Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta

São Paulo
2017

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C512v	Chaves, Gustavo Antônio Teixeira Vias de sinalização por auxina e sua interação com o relógio biológico de cana-de-açúcar / Gustavo Antônio Teixeira Chaves. - São Paulo, 2017. 149 p. Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Hotta, Carlos Takeshi 1. Biologia molecular. 2. Biologia de plantas. 3. Relógio biológico. 4. Sinalização hormonal. 5. Cana-de-açúcar. I. T. II. Hotta, Carlos Takeshi, orientador.
-------	---

Aos meus pais, João e Ione.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta, pela orientação. Agradeço às agências de fomento FAPESP (processo nº 2013/08574-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP)¹ e CNPq, que financiaram a pesquisa apresentada nessa tese. Agradeço também à minha família, pelo suporte, aos funcionários do IQ, pelo serviço prestado, aos amigos e aos colegas de pesquisa, pela ajuda e companheirismo.

¹ As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

RESUMO

(Chaves, G.A.T.) **Vias de sinalização por auxinas e sua interação com o relógio biológico de cana-de-açúcar.** 2017. 149 p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O relógio biológico de plantas é uma rede regulatória de grande relevância para a adaptação dos organismos ao ambiente. Essa rede é composta por diversas vias de controle transcricional e pós-transcricional que se retroalimentam e geram ritmos biológicos. O controle exercido pelo relógio pode ser observado nos mais diversos aspectos da fisiologia e desenvolvimento de plantas. No presente projeto de pesquisa foi investigada a relação entre o relógio biológico e a sinalização por auxinas, uma classe de fitohormônios, em cana-de-açúcar. Foram utilizadas técnicas de expressão gênica, como RT-qPCR, para definição de um protocolo robusto de avaliação de respostas transcricionais a auxinas em plântulas de cana-de-açúcar geradas por organogênese direta. Após 1h da aplicação de 80 μ M auxina sintética ácido 1-naftalenoacético, foi possível observar controle transcricional evidente exercido pela aplicação de auxina sobre alguns genes. Também foi observado variação na resposta obtida, dependendo do horário do ciclo circadiano em que o estímulo era oferecido. Esse fenômeno de controle temporal sobre a resposta a um estímulo é chamado *gating*, sendo de grande relevância para a atuação do relógio biológico de plantas. A partir dessas observações foram realizadas análises de expressão gênica em larga escala, usando oligoarranjos, para compreensão mais aprofundada da conexão entre o relógio biológico e a sinalização por auxinas em cana-de-açúcar. Entre os genes diferencialmente expressos após estímulo com auxina, foi verificado grande presença de genes relacionados a respostas contra

estresse biótico. Além disso, as respostas observadas devem estar sobre o controle do relógio biológico de cana-de-açúcar. Diversos genes relacionados a combate a infecções, como quitinases e taumatinas, tiveram sua expressão alterada após aplicação de auxinas, sendo possível observar diferenças no padrão de expressão dos genes dependendo do horário em que auxina era aplicada. Dessa forma, o relógio biológico de cana-de-açúcar, a partir da sinalização por auxinas, deve exercer controle sobre as respostas a estresses bióticos nesse organismo. Os dados obtidos são inéditos e podem contribuir para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar assim como para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas focadas nesse cultivar, o qual apresenta grande relevância econômica.

Palavras-chave: relógio biológico; auxinas; cana-de-açúcar; oligoarranjos; RT-qPCR; biologia molecular.

ABSTRACT

(Chaves, G.A.T.) **Auxin signaling pathways and their interactions with the sugarcane circadian clock.** 2017. 149 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The circadian clock is a regulatory network with great relevance to fitness of plants. This network creates biological rhythms, influencing plants metabolism and their interaction with the environment. The clock is composed of interlocking feedback transcriptional and post-transcriptional pathways. In the presente study, we investigated the interconnection between circadian clock and signaling through auxins, a group of phytohormones with great impact to plant biology. Using RT-qPCR, it was established a protocol to measure transcriptional responses after synthetic auxin 1-naphtalenacetic acid (NAA) treatment. The biological material used was leaves of sugarcane plantlets generated by direct organogenesis. After 1h treatment with 80 μ M NAA, we observed obvious transcriptional responses in sugarcane plantlets. It was also possible to detect alterations of transcriptional responses according to the moment when the stimulus was offered. This temporal control is called gating and is of great relevance to plant circadian clocks. We then performed transcriptomic analysis, using oligoarrays, to get a deeper understanding of the results obtained. Indeed, it was verified that auxin stimulus is connected to biotic stress transcriptional responses and that these responses are clock-controlled. Transcripts coding for proteins like chitinases and thaumatins, which are related to biotic stress responses, were differentially expressed after auxin treatment. Also, the response of most genes was daytime-dependent. We conclude that sugarcane circadian clock, through auxin signaling, might exert control under biotic stress

responses in sugarcane. The data obtained are novelty and may contribute to increase sugarcane productivity and/or to development of new biotechnological tools dedicated to this cultivar.

Keywords: circadian clock; sugarcane; auxins; oligoarrays; RT-qPCR; molecular biology.

Sumário

1.INTRODUÇÃO	13
A. O relógio biológico de plantas	13
I. O oscilador central de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
II.. Vias de entrada e de saída de informação no relógio biológico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
III. Mecanismos de controle molecular característicos do relógio biológico de plantas	21
IV. <i>Gating</i> , um mecanismo característico do relógio biológico	23
B. Auxinas, uma classe de hormônios vegetais	25
I. Homeostase de auxinas nos tecidos vegetais	27
a) Biossíntese de auxinas	28
b) Transporte de auxinas	29
c) Conjugados de auxinas e catabolismo do hormônio	31
d) Sinalização celular em resposta a auxinas	34
C. Cana-de-açúcar, um cultivar de alto potencial	40
2.OBJETIVOS	44
3.MÉTODOS E ABORDAGENS	45
A. Obtenção de plântulas de cana-de-açúcar em larga escala	45
B. Análise de expressão gênica por reação de PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR)	46
I. Isolamento do RNA total e síntese do cDNA	46
II. Reação de PCR quantitativa precedida de transcrição reversa	47
III. Normalização dos dados de expressão gênica gerados por RT-qPCR usando múltiplos genes constitutivos	48
C. Tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com auxinas	49
I. Experimento 1: Identificação de genes responsivos a auxina em plântulas de cana-de-açúcar	50
II. Experimento 2: Investigação do efeito da concentração de auxina sobre as respostas transcricionais de plântulas de cana-de-açúcar	52

III. Experimento 3: Avaliação de resposta transcricional em plântulas de cana-de-açúcar expostas a auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano	53
IV. Experimento 4: Avaliação da resposta transcricional a auxina após diferentes tempos de exposição ao tratamento	54
V. Experimento 5: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de dois ciclos circadianos	55
VI. Experimento 6: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano	56
D. Análise de expressão gênica por <i>oligoarrays</i>	57
I. Material biológico usado	57
II. Extração de RNA, hibridização dos oligoarranjos e processamento da imagem	58
III. Normalização, processamento dos dados e anotação gênica	60
4. RESULTADOS	62
A. Obtenção de plântulas de cana-de-açúcar em larga escala	62
B. Avaliação de respostas transcricionais a tratamento com auxina em plântulas de cana-de-açúcar	64
I. Experimento 1: Identificação de genes responsivos a auxina em plântulas de cana-de-açúcar	69
II. Experimento 2: Investigação do efeito da concentração de auxina sobre as respostas transcricionais de plântulas de cana-de-açúcar	71
III. Experimento 3: Avaliação da resposta transcricional em plântulas de cana-de-açúcar expostas a auxina em diferentes pontos temporais de dois ciclos circadianos	73
IV. Experimento 4: Avaliação de resposta transcricional a auxina após diferentes tempos de exposição ao tratamento	79
V. Experimento 5: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de dois ciclos circadianos	81
VI. Experimento 6: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano	87
C. Análise de expressão gênica por oligoarranjos	89
5. DISCUSSÃO	98
A. Avaliação de respostas transcricionais a auxinas em plântulas de cana-de-açúcar	98

B. Investigação por oligoarranjos de controle temporal das respostas transcricionais a auxina em cana-de-açúcar	106
C. Evidências em plântulas de cana-de-açúcar de conexão entre respostas a patógenos e estímulo com auxina em contexto circadiano	109
6.CONCLUSÃO	128
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
8.ANEXOS	150

1. Introdução

As plantas apresentam diversas vias de sinalização direcionadas para respostas a estímulos ambientais. A percepção de variações de luminosidade e temperatura, assim como de variações rítmicas diárias e sazonais, permite que as plantas consigam lidar com esses estímulos de maneira adaptativa (Hotta et al., 2007).

Além da percepção do ambiente, as plantas apresentam redes metabólicas intrincadas e finamente reguladas que as permitem responder adequadamente a estímulos de desenvolvimento, garantindo seu crescimento e multiplicação. Hormônios, como auxinas, têm papel central no desenvolvimento de plantas, regulando diversos processos de crescimento, multiplicação e diferenciação celular ao longo do ciclo de vida do organismo (Hayashi, 2012).

A. O relógio biológico de plantas

Os seres vivos estão sujeitos às variações rítmicas diurnas e sazonais do ambiente. Essas oscilações ambientais são uma pressão evolutiva que deve estar diretamente relacionada ao surgimento de uma rede regulatória complexa, chamada relógio biológico, que percebe e otimiza a relação dos organismos com o ambiente durante o dia (Troein et al., 2009). O relógio biológico é responsável por criar ritmos circadianos que controlam processos fisiológicos diversos, aumentando a vantagem adaptativa dos organismos (Dodd, 2005; Green, 2002; Ouyang et al., 1998; Yerushalmi and Green, 2009). Relógios biológicos são encontrados em todos os domínios da vida, apresentando características em

comum, como autossuficiência na manutenção dos ritmos, capacidade de ajustar a fase e o período dos ritmos de acordo com estímulos ambientais, e capacidade de manutenção da atividade dentro de uma faixa de temperatura fisiologicamente relevante (McClung, 2006).

O primeiro experimento relatado em que foi observada a atuação do relógio biológico de plantas data de 1729, quando Jean-Jacques d'Ortous de Mairan observou que o movimento foliar rítmico de uma planta, provavelmente *Mimosa pudica*, tinha um período de cerca de 24 h e era mantido mesmo no escuro (de Mairan, 1729). Desse momento até os dias de hoje, o estudo dos ritmos biológico, ou cronobiologia, passou por grandes evoluções.

Na planta-modelo *Arabidopsis thaliana* foram reportados diversos processos, como movimento foliar, abertura da pétala, biossíntese e resposta a hormônios, abertura estomatal, resposta a estresse hídrico e dormência de sementes, como sendo regulados pelo relógio biológico (Hernando et al., 2017; Nakamichi, 2011). Sabe-se também que os genes relacionados aos processos regulados pelo relógio biológico também apresentam oscilação circadiana (Filichkin et al., 2011; Harmer et al., 2000; Hotta et al., 2013; Khan et al., 2010). A relevância do relógio biológico de plantas pode ser avaliada a partir da observação de que um grande número de plantas cultivadas, como milho, tomate, arroz, entre outras, tiveram, ao longo do seu processo de domesticação, modificações no funcionamento do seu relógio biológico ou de aspectos fisiológicos que são controlados por esse sistema (Bendix et al., 2015; Ko et al., 2016; Müller et al., 2015).

Atualmente, o relógio biológico de plantas pode ser descrito como uma rede regulatória formada por diversas alças de retroalimentação reguladas tanto

em nível transcricional como pós-transcricional (Beckwith and Yanovsky, 2014; Greenham and McClung, 2015; Hernando et al., 2017; Hsu and Harmer, 2014; Zhang and Kay, 2010). Em um modelo simplista, o relógio biológico é composto de vias de entrada de informação, vias de saída, e de um oscilador central, responsável pela manutenção da fase e do período do relógio. As vias de entrada são responsáveis por traduzir informação do ambiente para o oscilador central; enquanto as vias de saída controlam processos fisiológicos a partir do oscilador central. Dessa forma, o relógio biológico cria ritmos de aproximadamente 24 h.

I. O oscilador central de *Arabidopsis thaliana*

A composição do oscilador central da planta-modelo *Arabidopsis thaliana* foi evidenciada a partir de diversos estudos bioquímicos e genéticos. Os primeiros genes do relógio biológico a serem identificados em *Arabidopsis* foram os fatores de transcrição *CCA1*, *LHY*, fatores de transcrição que possuem domínios MYB, e *TOC1*, um fator de transcrição da família dos *PSEUDO RESPONSE REGULATORS (PRR)*. De fato, linhagens mutantes para esses genes apresentam período do relógio reduzido, ou arritmia para processos metabólicos controlados pelo relógio (Millar et al., 1995; Schaffer et al., 1998; Strayer et al., 2000; Wang and Tobin, 1998). Inicialmente foi proposto que o oscilador central era composto por vias de retroalimentação positiva e negativa entre esses três fatores de transcrição (Alabadí et al., 2001). Esses três fatores de transcrição em conjunto compunham o cerne de elementos responsáveis por manter o funcionamento do relógio em *Arabidopsis*.

No modelo apresentado por Alabadí e colaboradores (2001), o fator de transcrição *TOC1*, que apresenta pico de expressão durante a noite, teria um

efeito positivo sobre a expressão do par *CCA1/LHY*, mas seria reprimido por esses, por ligação direta a seu promotor. *CCA1* e *LHY* apresentam pico de expressão gênica durante a manhã, e se ligam a um motivo comumente encontrado em genes com expressão regulada pelo relógio, chamado *Evening Element* (EE). *CCA1* e *LHY* se ligam ao promotor de *TOC1*, reprimindo sua expressão (Alabadí et al., 2001; Harmer et al., 2000; Harmer and Kay, 2005). Entretanto, foi descoberto posteriormente que linhagens mutantes de *Arabidopsis* com perda de função para o gene *TOC1* ainda apresentam ritmos, mesmo que menores, apontando que mais componentes deveriam funcionar no relógio biológico desse organismo (Más et al., 2003a).

A identificação de novos elementos, assim como a caracterização da função precisa de *TOC1*, ajudaram a expandir e clarificar a rede de componentes que compõem o relógio biológico de *Arabidopsis*, tornando o modelo proposto por Alabadí e colaboradores (2001) desatualizado (Gendron et al., 2012; Huang et al., 2012; Pokhilko et al., 2012; Pruneda-Paz and Kay, 2010). Foi observado que *TOC1* funciona como um repressor transcricional, o que reorganizou a rede de comunicação entre os elementos do oscilador central. Propôs-se então um sistema em que as interações entre os componentes do relógio é toda baseada em repressão de atividade, o que ficou conhecido como “*repressilator*” (Elowitz and Leibler, 2000; Pokhilko et al., 2012). Mais recentemente, proteínas da família REVEILLE (RVE), fatores de transcrição que funcionam como ativadores de expressão e que são componentes essenciais para o funcionamento do relógio, foram descritos, reformulando mais uma vez a estrutura do relógio biológico de *Arabidopsis* (Hernando et al., 2017).

Atualmente já foram identificadas mais de 30 proteínas em *Arabidopsis* com função associada ao relógio e que devem compor o oscilador central nesse organismo (Hernando et al., 2017). Importantes componentes do oscilador central, além de *TOC1* e *CCA1/LHY*, incluem *PRR9* (PSEUDORESPONSE REGULATOR 9), *PRR5*, *PRR7*, *LUX* (*LUX ARRHYTHMO*), *GI* (*GIGANTEA*), *ELF3* (*EARLY FLOWERING 3*) e *ELF4*, *RVE8*, *RVE6*, *RVE4*, *LNK1* (*LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK REGULATED 1*) e *LNK2* (Hernando et al., 2017; Hsu and Harmer, 2014). Esses componentes interagem entre si através de vias de retroalimentação, com vias específicas funcionando em determinados momentos do ciclo, em um circuito genético que gera ritmos endógenos (Nagel and Kay, 2012; Nakamichi, 2011; Pokhilko et al., 2012).

Da maneira como o relógio biológico de *A. thaliana* é descrito atualmente, temos quatro grupos de proteínas que promovem alças de controle umas sobre as outras. *ELF3*, *ELF4* e *LUX* são proteínas cujos genes apresentam perfil de expressão muito semelhante, com pico de expressão à noite. Essas três proteínas se agregam, formando um complexo proteico chamado Evening Complex (EC), o qual é responsável por reprimir a expressão de *LUX* e *PRR9* (Hernando et al., 2017). *TOC1* é um repressor transcricional cujo gene é expresso durante a noite, afetando a expressão de genes como *CCA1*, *LHY* e *PRR9*. *CCA1* também é um repressor transcricional, seu gene é expresso durante o dia, atuando sobre a expressão de *TOC1*. *RVE8*, *RVE6* e *RVE4* são ativadores da expressão de genes que têm pico de expressão durante a noite. Todos esses fatores de transcrição afetam vários outros genes, mas, de uma maneira simplificada, as interações estabelecidas entre eles compõem as vias de regulação de expressão que permitem a geração de ritmos de

aproximadamente 24 h no metabolismo da planta-modelo *A. thaliana* (figura 1) (Hernando et al., 2017; Millar, 2016).

Figura 1. Esquema simplificado do modelo mais recente da estrutura do oscilador central de *Arabidopsis thaliana* (modificado de Hernando et al, 2017).

A complexidade do relógio biológico de plantas torna-se maior devido ao fato de, além da regulação promovida temporalmente, como apresentado acima, há ainda uma regulação promovida espacialmente (Greenham and McClung, 2015). O primeiro dado apresentado nesse sentido foi a observação da capacidade de ajuste de fases distintas, a partir de ciclos claro-escuro desiguais, em diferentes cotilédones de um mesmo indivíduo (Thain et al., 2000). Atualmente temos diversas evidências da existência de diferentes relógios,

interconectados, mas operando em contextos celulares e teciduais separados (Bordage et al., 2016; Endo et al., 2014).

II. Vias de entrada e de saída de informação no relógio biológico de *Arabidopsis thaliana*

As principais vias de entrada de informação para o oscilador central são por respostas a estímulos de luz e temperatura. As informações geradas são usadas para sincronizar o relógio com as variações rítmicas do ambiente, ajustando a fase de respostas e mantendo períodos circadianos (Hotta et al., 2007). Alguns grupos de fotorreceptores já foram descritos como importantes para codificar informação de luz para o relógio biológico de *Arabidopsis*: criptocromos, sensores de luz azul (CRY1 e CRY2); fitocromos, sensores de luz vermelha (PHYA-E); Proteínas F-box da família ZEITLUPE (ZTL), sensíveis à luz azul (Hotta et al., 2007; Ito et al., 2012; Jones, 2009; Salome and McClung, 2005). Com exceção do caso de receptores ZTL, não se sabe como as informações de luz são processadas e integradas pelo relógio biológico de *A. thaliana* (Nohales and Kay, 2016).

As variações de temperatura também são percebidas e utilizadas como informação para o funcionamento preciso do relógio biológico. Variações com amplitude maior que 4°C são suficientes para regular a fase e o período de oscilação do relógio (Hotta et al., 2007; Salome and McClung, 2005). Já foi observado que variações na temperatura do ambiente afetam diferencialmente a expressão de genes como *PRRs* (*PSEUDO RESPONDE REGULATOR*), *ELF3* (*EARLY FLOWERING*), a proteína quinase CK2 e *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), componentes do oscilador central. Esses genes atuam sobre a atividade

transcricional de genes como *CCA1*, *PRR7/9* e *LUX (LUX ARRHYTHMO)*, para controlar o relógio biológico de acordo com a temperatura do ambiente (Edwards et al., 2006; Hotta et al., 2007; Portolés and Más, 2010; Salome et al., 2010; Thines and Harmon, 2010; Troncoso-Ponce and Mas, 2012). O fator de transcrição FLOWERING BASIC HELIX-LOOP-HELIX1 (FBH1) e a proteína HsfB2b, membro da família Heat Shock Factor (HSF), também deve atuar na resposta do relógio biológico a estímulos de temperatura (Kolmos et al., 2014; Nagel et al., 2014).

Genes *LNK*, *PRR7*, *GI* e *CRY* são potenciais integradores de estímulos de luz e temperatura dentro do oscilador central (Gould et al., 2014; Mizuno et al., 2014). Além disso, outros estímulos ambientais, como estresse salino ou biótico, podem afetar o funcionamento do relógio biológico, servindo como vias de entrada de informação (Greenham and McClung, 2015; Hernando et al., 2017).

Através das vias de saída de informação, o relógio biológico controla diversos processos fisiológicos de plantas. Algumas conexões moleculares entre o relógio biológico e as respostas celulares já foram descritas: o gene *RVE1* não é um componente do oscilador central, mas atua sobre a sinalização por auxinas dentro do contexto do relógio biológico, afetando os ritmos de crescimento celular (Rawat et al., 2009). *RVE8* e proteínas *LNK* estão relacionados à biossíntese de antocianinas (Pérez-García et al., 2015). O repressor transcricional *TOC1* é capaz de se ligar ao promotor de genes *PIF*, reprimindo sua expressão e afetando o crescimento celular estimulado por esses genes (Soy et al., 2016). Além disso, utilizando a técnica de ChIP-seq, foi possível observar que fatores de transcrição como *TOC1*, *PRR7* e *CCA1* se ligam a genes

associados às mais diversas funções biológicas, como resposta a estresse biótico, desenvolvimento, metabolismo de ácidos nucleicos, resposta a estresse oxidativo, resposta a ABA, resposta a seca, resposta a frio, adaptação a excesso de ferro, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de açúcar, entre outros (Huang et al., 2012; Liu et al., 2013; Nagel et al., 2015).

III. Mecanismos de controle molecular característicos do relógio biológico de plantas

O oscilador central atua de diferentes formas para exercer controle bioquímico sobre processos fisiológicos e assim manter os ritmos de acordo com as informações ambientais (Filichkin and Mockler, 2012; Harmer et al., 2000; Lu et al., 2005; Staiger and Green, 2011). A regulação no nível de expressão de diversos transcritos pode ocorrer, por exemplo, através de modificações na estrutura da cromatina. A repressão da expressão de *TOC1* por *CCA1* passa pela redução do nível de acetilação de histonas H3 no promotor desse gene. Por outro lado, a ativação da expressão de *TOC1* por *RVE8* passa por um aumento de H3 acetiladas no promotor do gene (Farinas and Mas, 2011; Perales and Mas, 2007). De fato, o nível de expressão de genes como *CCA1*, *GI* e *LHY* está correlacionado com os níveis de acetilação e metilação das histonas H3 na região promotora dos mesmos (Ni et al., 2009).

O controle da degradação de proteínas é outro mecanismo de funcionamento do relógio de plantas. Foi observado, por exemplo, que o receptor de luz ZTL controla a degradação de *TOC1* e *PRR5*. Esse receptor é parte de um complexo SCF E3 ubiquitina ligase que promove a degradação via

proteassomo desses fatores de transcrição (Ito et al., 2012; Kiba et al., 2007; Más et al., 2003b). Essa mesma atividade foi observada para homólogos de ZTL, como FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT AND F-BOX 1 (FKF1) e LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) (Baudry et al., 2010).

A fosforilação de proteínas também é utilizada como mecanismo de controle pós-traducional relevante para o funcionamento do relógio biológico de plantas. Foi observado que, tanto a expressão de genes de fosfatases e quinases, como o nível de fosforilação de diversas proteínas apresentam oscilação circadiana (Choudhary et al., 2015; Kusakina and Dodd, 2012). CCA1 e LHY, por exemplo, são fosforilados pela quinase CK2. Isso é relevante para a formação de dímeros entre esses fatores de transcrição e também para a interação dos mesmos com o DNA, o que afeta, em último caso, o funcionamento do oscilador central (Daniel et al., 2004).

Mais recentemente, tem ficado bastante evidente a relevância também de mecanismos de controle pós-transcricional sobre a atuação do relógio biológico de diferentes organismos, inclusive de plantas. *Splicing* alternativo (SA), controle sobre a estabilidade e transporte de mRNAs, controle da tradução e uso de RNAs não-codificantes devem ser relevantes para o funcionamento do relógio biológico de plantas (Nolte and Staiger, 2015; Romanowski and Yanovsky, 2015). O *splicing* alternativo é uma das formas de regulação pós-transcricional mais estudadas no relógio biológico de plantas, sendo que esse fenômeno já foi observado em transcritos de genes como *CCA1*, *LHY*, *RVE8*, *PRRs*, *TOC1*, *GI*, e *ELF3* (Nohales and Kay, 2016). Foi observado, por exemplo, que a presença de variantes de *splicing* do gene *CCA1* são relevantes para adaptação ao frio em *A. thaliana* (Seo et al., 2012).

IV. *Gating*, um mecanismo característico do relógio biológico

O relógio biológico permite a compartimentalização temporal de processos metabólicos e antecipação de mudanças ambientais em plantas, gerando uma vantagem adaptativa. Outra característica intrínseca ao relógio biológico de plantas, chamada “*gating*”, também confere vantagem adaptativa às plantas. *Gating* se refere à capacidade do relógio biológico de afetar a resposta da planta a um estímulo. Dessa forma, um estímulo de mesma intensidade dado em diferentes horas do dia provocará respostas de diferentes intensidades ou até mesmo diferentes respostas. O *gating* favorece as plantas ao permitir que as mesmas respondam a uma grande variedade e intensidade de sinais ambientais de acordo com o contexto temporal (Hotta et al., 2007).

Já foi observado *gating* do relógio biológico sobre diversos processos fisiológicos de plantas. Por exemplo, em espécies de planta como *Cosmos bipinnatus* e *Phaseolus vulgaris*, ocorrem variações diurnas na resposta de inibição de alongamento do caule por estímulo mecânico (Anderson-Bernadas et al., 1997; Van Gaal and Erwin, 2005).

O relógio biológico pode exercer esse tipo de controle sobre respostas fisiológicas ao afetar diretamente uma via metabólica, ou afetando uma via que indiretamente afeta uma resposta fisiológica, ou das duas maneiras (Hotta et al., 2007). O fenômeno de *gating* deve operar sobre a abundância de um sinalizador, sobre a atividade de uma via de sinalização ou sobre a concentração de um metabólito da via (Hotta et al., 2007) (Figura 2).

Por exemplo, genes que codificam para receptores de luz importantes para o funcionamento do relógio, mediando informação para o oscilador central,

Figura 2. Exemplos de como as diferentes respostas observadas pelo mecanismo de *gating* podem ser geradas (adaptado de Hotta et al, 2007).

também têm seus níveis regulados ritmicamente, dessa forma justificando o *gating* exercido pelo relógio sobre a resposta a estímulo luminoso em *Arabidopsis* (Harmer et al., 2000; Somers et al., 1998). No caso observado de *gating* exercido pelo relógio sobre o alongamento do hipocótilo de *Arabidopsis*, o controle é feito pelo Evening Complex (EC). Esse complexo proteico se liga diretamente ao promotor de genes de crescimento como PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) e PIF5 (Nusinow et al., 2011).

O *gating* de respostas a baixas temperaturas pode ser evidenciado pelo fato de o fator de transcrição induzido por frio C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 1 (CBF1) ser uma via de entrada de informação ambiental para o

oscilador ao regular a expressão do gene *LUX*. Ao mesmo tempo, esse fator de transcrição tem sua expressão regulada pelo relógio biológico (Chow et al., 2014).

A resposta a estresses abiótico e biótico também é modulada pelo relógio biológico em plantas (Greenham and McClung, 2015). No caso de respostas a patógenos, já foi observado como a exposição a *Pseudomonas syringae* em diferentes momentos do dia gera padrões diferentes de crescimento bacteriano na planta e de desenvolvimento da doença (Zhang et al., 2013). Até mesmo o controle temporal sobre respostas a herbivoria já foi relatado em *Arabidopsis* (Goodspeed et al., 2012).

Também foi observado *gating* de respostas hormonais em plantas. Arana e colaboradores (2011) demonstraram que a expressão de receptores de giberelina é controlada pelo relógio biológico e, dessa forma, as respostas da planta a esse hormônio variavam de acordo com o momento do dia em que a resposta era avaliada (Arana et al., 2011). A sinalização por auxinas é outra via hormonal para a qual já foi observada *gating* (Covington and Harmer, 2007). Nesse caso, foi observado que a exposição de *A. thaliana* a auxinas induzia respostas transcricionais diferentes dependendo do momento do ciclo circadiano em que as plantas recebiam o estímulo. Além disso, os autores observaram que a resposta de crescimento do cotilédone induzida por auxina também era regulada circadianamente (Covington and Harmer, 2007).

B. Auxinas, uma classe de hormônios vegetais

As auxinas, nomeadas a partir da palavra grega “auxein”, que significa crescer, são um conjunto de moléculas com atividade hormonal em plantas.

Essas moléculas modulam praticamente todos os processos fisiológicos e de desenvolvimento de plantas, como respostas trópicas à luz e gravidade, estabelecimento da arquitetura de raiz e caule, diferenciação de órgãos, desenvolvimento vascular, polaridade do embrião, dominância apical e resposta a estresses (Casimiro et al., 2003; Esmon et al., 2006; Fleming, 2005; Jenik, 2005; Leyser, 2017; Reinhardt, 2003; Shani et al., 2017; Woodward and Bartel, 2005). Os primeiros estudos com auxinas foram realizados ainda no século XIX, por cientistas como Charles Darwin e Theophil Ciesielski, que observaram o efeito de uma substância, ainda desconhecida, sobre os fenômenos de fototropismo e gravitropismo (Ciesielski, 1872; Darwin and Darwin, 1880).

As auxinas regulam os processos biológicos através de controle sobre a divisão, o crescimento e a diferenciação celular (Di Mambro et al., 2017; Perrot-Rechenmann, 2010). A principal auxina de plantas é o ácido indol-3-acético (AIA) (figura 3), de forma que é possível afirmar que auxinas são moléculas que apresentam atividade semelhante à de AIA (Paque and Weijers, 2016).

Figura 3. Estrutura química de algumas auxinas produzidas endogenamente. Adaptado de (Simon e Petrásek, 2011).

Diversos ensaios biológicos para observação de respostas de auxina foram desenvolvidos, permitindo a descoberta de novas moléculas, naturais ou sintéticas, que apresentam atividade de auxina (Woodward and Bartel, 2005). Ensaios de fototropismo, curvatura de caule de ervilha etiolada, efeito do

composto sobre caules de tomates ou sobre coleóptiles de trigo, crescimento de raiz a partir de calos de plantas ou efeito sobre a morfologia de raízes são alguns dos ensaios mais comuns (Woodward and Bartel, 2005).

Como dito, a principal auxina produzida por plantas é o AIA. Outras auxinas endógenas já foram identificadas, como AIB (ácido indol-3-butírico), AFA (ácido fenil-acético) e 4-Cl-AIA (ácido 4-cloroindol-3-acético) (Figura 3) (Simon and Petrášek, 2011; Woodward and Bartel, 2005). Apesar de serem quimicamente diferentes, uma característica comum entre algumas dessas moléculas é uma distância de cerca de 0,5 nm entre uma carga parcial positiva no anel aromático e uma carga parcial negativa no grupo carboxil (Miller, 1970).

Compostos sintéticos como 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e NAA (ácido 1-naftalenoacético) também apresentam atividade de auxina, sendo usados em ensaios biológicos (Woodward and Bartel, 2005). De fato, 2,4-D é um dos principais herbicidas usados no mundo por atuar seletivamente sobre ervas daninhas (dicotiledôneas) em plantações de cereais, causando inibição de crescimento, senescência e morte de tecidos nas plantas suscetíveis (Grossmann, 2009).

I. Homeostase de auxinas nos tecidos vegetais

A concentração de AIA nos tecidos é controlada pela síntese destes compostos, pela conversão reversível de conjugados de AIA e pelo seu catabolismo irreversível (Ludwig-Müller, 2011; Woodward and Bartel, 2005). Além do controle sobre o metabolismo das auxinas, o transporte direcional dessas moléculas e a sinalização celular associada promovem o equilíbrio adequado para a atuação dessas moléculas (Chapman and Estelle, 2009;

Hayashi, 2012; Ludwig-Müller, 2011; Petrásek and Friml, 2009; Zhao, 2010). A intrincada regulação sobre abundância, transporte e resposta de auxinas, exercida em diversos níveis, permite a utilização desses compostos para as mais diversas funções no desenvolvimento de plantas (Woodward and Bartel, 2005).

a) Biossíntese de auxinas

Mudas de *Arabidopsis* podem sintetizar AIA em diversos tecidos, como folhas, cotilédones e raízes, sendo que folhas novas apresentam a maior capacidade de produção (Ljung et al., 2001a, 2005). Diversas vias de biossíntese de auxinas já foram elucidadas, podendo ser divididas em dois grandes grupos, dependendo se o hormônio será sintetizado a partir do aminoácido triptofano ou não (Hayashi, 2012; Woodward and Bartel, 2005).

Evidências recentes apontam que a via do indol-3-piruvato (IPA) é a principal via de síntese de AIA. Nessa via, AIA é sintetizado a partir de triptofano em duas etapas enzimáticas, realizadas por uma triptofano amino transferase (TAA1) e uma flavina monooxygenase (YUCCA); IPA é o intermediário da via (Hayashi, 2012; Mashiguchi et al., 2011; Won et al., 2011). Alguns dados apontam para a possibilidade das enzimas TAA e YUCCA serem responsáveis também pela produção das auxinas endógenas PAA e 4-Cl-AIA (Enders and Strader, 2015).

Recentemente foi reportado o desenvolvimento de uma linhagem transgênica de trigo (*Triticum aestivum*) que apresentava superexpressão de um gene relacionado à enzima TAA1 de *Arabidopsis*. A linhagem transgênica obtida apresentou maior produção de grãos, além de maior peso, número de panículas,

ramificações da raiz lateral e acúmulo de nitrogênio nas partes aéreas (Shao et al., 2017).

Outras vias de biossíntese de AIA conhecidas são a via do indol-3-acetamida (IAM), a via do indol-3-acetaldoxima (IAOx) e a via da triptamina (TAM), nomeadas a partir de intermediários presentes nas mesmas. Entretanto, essas vias devem estar confinadas a contextos celulares ou teciduais específicos e/ou realizam uma pequena contribuição ao total de auxina produzida endogenamente (Sugawara et al., 2009; Tivendale et al., 2014).

b) Transporte de auxinas

Apesar de auxinas serem sintetizadas em diversos tecidos, o transporte de auxinas é um processo complexo e finamente regulado, sendo de maior relevância para a homeostase desse hormônio (Hayashi, 2012; Woodward and Bartel, 2005). Algumas proteínas transportadoras específicas para auxinas já foram identificadas, como proteínas da família PIN-FORMED (PIN) e um conjunto de transportadores ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B (ABCB), ambas responsáveis pela saída de AIA da célula, assim como transportadores de simporte de prótons da família AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX), responsáveis pelo influxo celular de auxina (Zazimalová et al., 2010).

O transporte direcional de auxina deve ocorrer como segue: no espaço apoplástico, de pH ligeiramente ácido, a principal auxina AIA está na forma protonada e é internalizada pelas células por difusão pela membrana e também por transportadores de simporte de prótons da família AUX1/LAX (Bennett et al., 1996; Peer et al., 2011; Yang and Murphy, 2009; Yang et al., 2006). Devido ao pH neutro do citoplasma, AIA fica ionizada e portanto precisa de transportadores

para ser exportada da célula; esse transporte é feito por proteínas carreadores PIN e por um conjunto de transportadores ABCB (Peer et al., 2011; Zazímalová et al., 2010).

As proteínas PIN podem ser divididas em dois grupos: longas e curtas. As proteínas longas, que em *Arabidopsis* são representadas pelas proteínas PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 e PIN7 (Enders and Strader, 2015). As proteínas PIN longas apresentam diferentes capacidades de transporte de compostos auxínicos. Por exemplo, a proteína PIN1, ao contrário da proteína PIN7, possui a capacidade de transporte de AIA, mas não transporta auxinas sintéticas como 2,4-D ou NAA (Blakeslee et al., 2007; Petrasek et al., 2006; Yang and Murphy, 2009).

Proteínas PIN longas se localizam assimetricamente na membrana plasmática, sendo que cada proteína apresenta um perfil de expressão e localização celular específicos, o que é da maior relevância para a regulação do desenvolvimento de plantas (Zazímalová et al., 2010). A presença das proteínas na membrana celular pode ser modificada a partir de endocitose e retorno dessas proteínas para a membrana. Esse processo apresenta grande relevância para que a planta responda adequadamente a estímulos ambientais e de desenvolvimento (Enders and Strader, 2015).

As proteínas PIN curtas, representadas em *Arabidopsis* pelas proteínas PIN5, PIN6 e PIN8, se localizam na membrana do retículo endoplasmático, transportando auxina, tanto AIA como NAA, para dentro dessa organela, provavelmente como uma forma de controlar a quantidade de auxina citoplasmática (Enders and Strader, 2015).

Os transportadores AUX1/LAX realizam o transporte de AIA e 2,4-D, mas não de NAA. São proteínas essenciais para o transporte polar de auxina,

desempenhando papéis diversos nos processos de desenvolvimento de plantas (Enders and Strader, 2015). Os transportadores ABCB são necessários para o efluxo de AIA, apesar de que alguns representantes desse grupo, como ABCB4 e ABCB21, podem realizar influxo de auxina em baixas concentrações citoplasmáticas desse hormônio (Enders and Strader, 2015; Kamimoto et al., 2012; Kubeš et al., 2012). Mutantes com defeitos na produção de transportadores ABCB apresentam fenótipos de desenvolvimento (Petrásek and Friml, 2009).

Ainda, ABCB4 parece contribuir para captação de auxina em raízes com baixa concentração de auxina (Santelia et al., 2005; Yang and Murphy, 2009) e um transportador de dupla função para auxina e nitrato (NTR1.1) foi apontado como relevante para captação de auxina em raízes em carência de nitrogênio (Krouk et al., 2010).

c) Conjugados de auxinas e catabolismo do hormônio

Nos tecidos vegetais, auxinas são comumente encontradas em formas inativas, conjugadas com aminoácidos ou glicose, ou na forma de ácido indol-3-butírico (AIB), ou ainda na forma metilada (Me-AIA). Todos esses compostos podem ser rapidamente convertidos a AIA livre (Korasick et al., 2013). Essas formas alternativas de auxina podem servir para armazenamento, transporte, compartimentalização, detoxificação de AIA em excesso e proteção contra degradação peroxidativa (Cohen and Bandurski, 1982; Woodward and Bartel, 2005). Alterações no metabolismo desses compostos promovem vários

fenótipos de desenvolvimento, apontando a relevância dos mesmos para o desenvolvimento de plantas (Enders and Strader, 2015).

Três tipos de conjugados de auxinas podem ser encontrados em plantas superiores: auxina conjugada a carboidratos por ligações éster, auxina conjugada a aminoácidos e a proteínas, ambos por ligação amida (Ludwig-Müller, 2011). A composição de conjugados de auxina encontrado em plantas varia entre espécies (Korasick et al., 2013). Conjugados de AIA com açúcar devem servir para armazenamento ou inativação da auxina, sendo realizados por enzimas UDP glicosiltransferases (Jackson et al., 2001; Korasick et al., 2013; Szerszen et al., 1994).

Vários conjugados de AIA com aminoácidos são encontrados, sendo que AIA-Ala, AIA-Leu, AIA-Asp, AIA-Glu e AIA-Trp são os que apresentam função mais elucidada. Em *Arabidopsis*, AIA-Ala e AIA-Leu apresentam atividade de auxina, possivelmente por contribuir para o conteúdo de AIA livre celular. AIA-Asp e AIA-Glu são pouco hidrolisados, sendo provavelmente direcionados para catabolismo de AIA, enquanto que AIA-Trp atua como inibidor de crescimento mediado por auxina (Bartel and Fink, 1995; Korasick et al., 2013; LeClere et al., 2002; Ostin et al., 1998; Rampey et al., 2004; Staswick, 2009). Importante citar que, em *Medicago truncatula*, AIA-Asp é um conjugado prontamente hidrolisável, podendo contribuir para o conteúdo de AIA celular (Campanella et al., 2008).

As enzimas que realizam a conjugação de AIA com aminoácidos pertencem ao grupo II da família GRETCHEN HAGEN3 (GH3) de amido acil sintetases (Westfall et al., 2010). Para a hidrólise e decomposição dos conjugados AIA-aminoácidos em *Arabidopsis*, diversas hidrolases são conhecidas, como IAA-LEUCINE RESISTANT1 (ILR1), ILR1-LIKE1 (ILL1), IAA-

ALANINE RESISTANT3 (IAR3), entre outras (Korasick et al., 2013). Essas enzimas atuam principalmente sobre os conjugados de AIA-Ala e AIA-Leu. Os conjugados de auxina com polipeptídeos de alto peso molecular podem atuar como forma de armazenamento de AIA ou como uma modificação pós-traducional de proteínas (Korasick et al., 2013).

AIB é um precursor de auxina produzido endogenamente. Esse composto é convertido a AIA nos peroxissomos a partir de enzimas dedicadas, num processo de β -oxidação (Korasick et al., 2013). AIB pode ser produzido a partir de AIA por uma AIB sintase (Ludwig-Müller et al., 1993) e deve ser uma forma relevante de armazenamento de auxina em plantas (Korasick et al., 2013). Me-AIA é uma auxina inativa e apolar, de forma que não deve necessitar de transportadores para ser translocada (Li et al., 2008; Yang et al., 2008). Esse compostos, em *Arabidopsis*, deve ser produzido pela enzima IAA CARBOXYMETHYLTRANSFERASE1 (IAMT1) e reconvertidos a AIA livre pela ação de metil esterases (Korasick et al., 2013).

As moléculas de auxina, principalmente AIA, podem entrar em vias catabólicas, as quais promovem a inativação do composto, provavelmente como alternativa para evitar o excesso de auxina, que pode ter efeitos tóxicos (Cohen and Bandurski, 1982; Woodward and Bartel, 2005). As moléculas de AIA podem seguir dois caminhos catabólicos: associação com aminoácidos ou carboidratos, formando conjugados que são direcionados para degradação, ou as moléculas de AIA podem ser catabolizadas pela conversão a ácido oxindol-3-acético, o primeiro elemento de uma via de degradação não-descarboxilativa (Korasick et al., 2013; Woodward and Bartel, 2005).

d) Sinalização celular em resposta a auxinas

A principal via de resposta celular a auxina em plantas é transcricional, de forma que centenas de genes têm sua expressão alterada rapidamente após exposição de plantas a auxina (Leyser, 2017; Paponov et al., 2008). Em *Arabidopsis*, os receptores celulares de auxina são proteínas F-box da família TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB). Juntamente com repressores transcricionais Auxin/INDOL-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) e os fatores de transcrição AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), é estabelecido o cerne da via de sinalização por auxinas (Lavy and Estelle, 2016). Linhagens mutantes para diversos desses genes apresentam fenótipos de desenvolvimento e vários estudos implicaram proteínas ARF em respostas transcricionais relacionadas a diversos aspectos da biologia de plantas terrestres (Lavy and Estelle, 2016; Woodward and Bartel, 2005)

As respostas transcricionais são controladas pela heterodimerização de ARFs com proteínas Aux-AIA, inibindo a atividade de ARFs (Tiwari et al., 2003). Dessa forma, a quantidade e os tipos de repressores Aux/AIA determinam a atividade transcricional de ARFs (Liscum and Reed, 2002; Mockaitis and Estelle, 2008).

Entre plantas terrestres, homólogos de receptores TIR1/AFB são amplamente conservados (Paponov et al., 2009). A via de transdução de sinal por auxina a partir desses receptores nucleares é dependente de degradação proteica via proteassomo, através do complexo ubiquitina ligase E3 da classe SCF (Hayashi, 2012; Woodward and Bartel, 2005). Os complexos de ubiquitina ligase do tipo SCF apresentam três subunidades proteicas: Skp1, Cullina e proteína F-box. As proteínas F-box são as responsáveis pela seleção do

substrato proteico que será marcado para degradação (Smalle and Vierstra, 2004).

Na via de sinalização por auxinas, as proteínas F-box TIR1/AFB apresentam, na sua região C-terminal, um bolso de ligação à auxina. A ligação de auxina nessa região é favorecida pela interação com um domínio das proteínas Aux/IAA (Tan et al., 2007), de forma que proteínas TIR1/AFB e Aux/IAA podem ser consideradas co-receptores de auxina (Leyser, 2017). A interação dessas proteínas favorece a ubiquitinação de proteínas Aux/IAA pelo complexo $SCR^{TIR1/AFB}$ e conseguinte degradação das mesmas (dos Santos Maraschin et al., 2009). Diferentes pares de interação entre as isoformas de TIR1/AFBs e Aux/IAAs apresentam diferentes níveis de afinidade entre si e para com a molécula de auxina (Calderón Villalobos et al., 2012).

Proteínas Aux/IAA são repressores transcricionais (Ulmasov, 1997). Elas não se ligam diretamente ao DNA, mas podem interagir com proteínas ARFs através de dimerização entre seus respectivos domínios C-terminal (Guilfoyle, 2015), inibindo a atividade de fator de transcrição das proteínas ARF (Korasick et al., 2014; Leyser, 2017; Pierre-Jerome et al., 2016). O domínio C-terminal das proteínas Aux/IAA, também chamado PB1, facilita a interação com os fatores de transcrição ARF, assim como a dimerização com outras proteínas Aux/IAA (Lavy and Estelle, 2016; Vernoux et al., 2011). Além disso, as proteínas Aux/IAA também podem se associar a correpressores da família TOPLESS (TPL), os quais se relacionam com proteínas que favorecem a repressão transcricional por alterarem a estrutura da cromatina (Szemenyei et al., 2008).

As proteínas ARF, por sua vez, são fatores de transcrição que se ligam a elementos cis-regulatórios, chamados AuxRE (do inglês, Auxin Response

Elements), presentes nos promotores de genes responsivos a auxina (Abel and Theologis, 1996). Proteínas ARF podem atuar como ativadores ou repressores transcricionais (Lavy and Estelle, 2016). As proteínas ARF também apresentam diferentes domínios, estando o C-terminal envolvido na formação de homodímeros, ou de heterodímeros com proteínas Aux/IAA (Lavy and Estelle, 2016). O domínio N-terminal dessas proteínas também é relevante para a formação de homodímeros, sendo essa a forma através da qual essas proteínas se ligam ao DNA (Boer et al., 2014).

A degradação via proteassomo das proteínas Aux/IAA remove a inibição sobre a atividade de ARFs, estimulando, ou inibindo, a expressão de genes de resposta a auxina (Lavy and Estelle, 2016).

As principais formas de regulação a que este sistema TIR1/AFB-Aux/IAA-ARF está sujeito são em nível de expressão gênica, regulação pós-transcricional e por interação entre as proteínas sinalizadoras (Hayashi, 2012). De fato, estudos apontam que as diversas interações possíveis entre os possíveis complementos de receptores TIR1/AFB e de diferentes proteínas Aux/IAA e ARFs encontrados em diferentes contextos celulares devem contribuir para a especificidade de resposta a auxina (Lavy and Estelle, 2016; Leyser, 2017). Além disso, a meia-vida de proteínas Aux/IAA é curta, sendo constantemente degradadas e sintetizadas. Os genes que codificam para essas proteínas são muito responsivos a auxina, de forma que as células devem estar continuamente ciclando suas proteínas Aux/IAA, adicionando plasticidade ao sistema (Abel et al., 1994; Abel and Theologis, 1996; Leyser, 2017).

Em resposta a aplicação de auxinas em plantas, diversos genes rapidamente apresentam expressão diferencial, sendo denominados genes de

resposta primária a auxinas. Entre eles, encontramos genes da família *GH3*, genes da família *Aux/IAA* e genes *SAUR* (do inglês, Small Auxin Up-regulated RNAs). Esses genes devem estar envolvidos em vias de retroalimentação negativa, para controle das respostas a auxinas (Benjamins and Scheres, 2008).

Até recentemente não se sabia precisamente a função dos genes *SAUR*, em grande parte devido ao elevado número de elementos dentro dessa família, gerando redundância funcional. Entretanto, técnicas recentes permitiram a geração de linhagens de *A. thaliana* simultaneamente mutantes para vários genes dessa família. Observou-se então que transcritos *SAUR* estão relacionados a diversos aspectos da biologia de plantas, inclusive ao crescimento celular em resposta a auxina (Ren and Gray, 2015; Spartz et al., 2012; Xu et al., 2017).

Segundo a hipótese do crescimento ácido, as auxinas promovem a estimulação de ATPases bombeadoras de prótons presentes na membrana (H^+ ATPases). A consequente acidificação do apoplasto afeta a extensibilidade da parede celular e promove o crescimento da célula (Hager, 2003; Kutschera, 1994). Através da via de sinalização por TIR1/AFBs, auxinas estimulam a expressão de genes *SAUR*, os quais modulam a atividade das ATPases de membrana (Chae et al., 2012; Spartz et al., 2012). Foi observado que várias proteínas *SAUR* promovem a fosforilação do domínio C-terminal de H^+ ATPases, revertendo a função auto-inibitória desse domínio. Além disso, proteínas *SAUR* se ligam a fosfatases PP2C, inibindo sua atividade. Sabe-se que essas fosfatases são responsáveis por reprimir a atividade de diversas H^+ ATPases (Schweighofer et al., 2004; Spartz et al., 2014). Esses dados reforçam que o fenômeno de crescimento ácido induzido por auxina é uma resposta controlada

transcricionalmente a partir da via de sinalização canônica TIR1/AFB-Aux/IAA/-ARF, além de evidenciar a função molecular das proteínas SAUR (Fendrych et al., 2016).

Além da resposta transcricional a auxina, a qual deve ser responsável pela maior parte dos efeitos biológicos associados a auxinas, observam-se fenômenos celulares, em resposta a aplicação de auxina, que ocorrem numa escala de tempo que não permite a associação dos mesmos a respostas transcricionais; um exemplo é o aumento da concentração citoplasmática de cálcio em células de raiz de *Arabidopsis* após aplicação de auxina, o que ocorre em cerca de 10 segundos (Leyser, 2017; Monshausen et al., 2011). Isso sugere que outros receptores de auxina devem existir. Um desses potenciais receptores é a proteína de membrana Auxin Binding Protein 1 (ABP1). ABP1 liga auxinas com alta afinidade, principalmente em pHs mais ácidos, como o do apoplasto (Leyser, 2017; Löbner and Klämbt, 1985; Napier, 1995). Grande parte das proteínas ABP1 devem ficar retidas no retículo endoplasmático, mas há evidências apontando que essa proteína deve ser secretada (Jones and Herman, 1993; Napier, 1997).

Ao longo dos anos, várias abordagens genéticas foram realizadas na busca do entendimento da função de ABP1, desde a geração de mutantes *knock-out* para a proteína, o qual era embrionicamente letal (Chen et al., 2001), passando por linhagens que apresentavam mutações pontuais na estrutura da proteína, super-expressão, até versões que não apresentavam a sequência de retenção no retículo endoplasmático (Leyser, 2017; Powers and Strader, 2016). Diversos efeitos relacionados a esses mutantes foram observados, principalmente relacionadas à endocitose mediada por clatrin, alteração na

localização das proteínas PIN1, reorientação de microtúbulos e regulação do ciclo celular (Chen et al., 2014, 2012; Robert et al., 2010; Sauer and Kleine-Vehn, 2011).

Entretanto, recentemente, a publicação de um mutante nulo para a proteína ABP1, obtido a partir do sistema CRISPR/Cas9, e que não apresenta nenhum fenótipo óbvio, promoveu uma reconsideração dos resultados anteriores obtidos para essa proteína (Gao et al., 2015). De fato, foi constatado que vários dos resultados obtidos para essa proteína apresentam pouco valor científico ou nenhum; por exemplo, o mutante nulo para ABP1 reportado anteriormente, que era embrionicamente letal, na realidade era um mutante para o gene *BELAYA SMERT*, localizado proximalmente ao gene *ABP1* (Leyser, 2017; Michalko et al., 2015; Powers and Strader, 2016). Dessa forma, a função e a relevância da proteína ABP1 para a biologia de plantas ficou em questão, sendo necessários mais estudos para definir a função e relevância dessas proteínas.

Alguns experimentos realizados com expressão induzível da sequência antisenso do gene *ABP1* apontaram resultados mais robustos (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009), levantando a possibilidade de que talvez essa proteína tenha mais relevância após alterações imediatas, mais do que em contextos em que ela é eliminada terminantemente; de fato, essa proteína pode ter sua função realizada por outras proteínas redundantes dentro do contexto em questão (Leyser, 2017).

Um outro receptor de auxina, o qual deve estar relacionado ao controle da divisão celular, é a proteína de fase S associada a quinase 2A (SKP2A) (Leyser, 2017; Powers and Strader, 2016). SKP2A é uma proteína F-box associada a um complexo SCF de ligação de ubiquitina que regula a proteólise dos fatores de

transcrição E2FC e DPB, envolvidos no controle da progressão do ciclo celular (del Pozo, 2006; del Pozo et al., 2002; Jurado et al., 2010, 2008).

Entre os diversos aspectos da biologia de plantas, aos quais a sinalização por auxinas está associada, encontra-se relativamente pouca referência conectando esse hormônio a resistência a estresse biótico. Hormônios como salicilato, jasmonato, etileno e ácido abscísico apresentam papel preponderante sobre resposta e resistência a patógenos (Atamian and Harmer, 2016; Bari and Jones, 2009; Pieterse et al., 2012; van Loon et al., 2006). Entretanto, recentemente, começou a ser estabelecido o papel relevante das auxinas na resistência a diversos patógenos, tanto biotróficos como necrotóxicos (Llorente et al., 2008; Mutka et al., 2013; Navarro et al., 2006; Qi et al., 2012; Robert-Seilantantz et al., 2011). De fato, o efeito da sinalização por auxinas na interação entre planta e patógeno pode ser independente do balanço por jasmonato e salicilato (Robert-Seilantantz et al., 2011).

C. Cana-de-açúcar, um cultivar de alto potencial de produção

Taxonomicamente, cana-de-açúcar faz parte do gênero *Saccharum*, família *Poaceae*, subfamília *Panicoidea*, apresentando grande proximidade genética a plantas como sorgo ou gramíneas dos gêneros *Erianthus* e *Miscanthus* (Amalraj and Balasundaram, 2006). As plantas de cana-de-açúcar cultivadas atualmente são linhagens híbridas de cruzamentos entre duas espécies, *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*, com pequenas contribuições de *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *Erianthus* e *Miscanthus* (Dillon et al., 2007; Paterson et al., 2013). Como resultado desses cruzamentos, as linhagens

de cana-de-açúcar são altamente poliplóides e aneuplóides (D'Hont, 2005; D'Hont and Glaszmann, 2001).

As linhagens comerciais produzidas atualmente têm seus cromossomos derivados principalmente de *S. officinarum* (70%-80%), e uma porção menor de *S. spontaneum* (10%-20%) (D'Hont, 2005; D'Hont et al., 2008, 1996). *S. officinarum* é uma variedade que apresenta colmos grossos e com grande acúmulo de sacarose, enquanto *S. spontaneum* apresenta pouca produção de açúcar, mas elevada resistência a estresses (Paterson et al., 2013).

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea perene com fotossíntese C4, apresentando grande eficiência fotossintética, além de altas taxas de produção de sacarose e biomassa (Goldemberg, 2007). Essas plantas armazenam sacarose em seus colmos, de forma que a quantidade desse dissacarídeo pode representar até 63% do seu peso seco (Bull and Glasziou, 1963).

A cana-de-açúcar tem sido utilizada para produção de energia, seja na forma de etanol, obtido pela fermentação da sacarose obtida de seus colmos, ou na forma de energia elétrica, obtida a partir da queima do bagasso residual (de Souza et al., 2014). Recentemente, devido à alta produtividade deste cultivar, o interesse comercial também tem sido direcionado para a possibilidade de produção de etanol de segunda geração, o qual é obtido a partir da fermentação de açúcares hidrolisados da biomassa da planta (Amorim et al., 2011). A grande possibilidade de produção de açúcar e álcool a partir de cana-de-açúcar, assim como o potencial de utilização de seus subprodutos, coloca esse cultivar numa posição de grande relevância mundial (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011).

Graças à sua capacidade de acúmulo de açúcar e alta produtividade, a cana-de-açúcar é o cultivar com maior tonelagem entre as plantas cultivadas

(Dal-Bianco et al., 2012). No último levantamento de safra para cana-de-açúcar, realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), referente ao período 2016/2017, a produtividade média brasileira está estimada em 72,6 ton/ha, um valor que, apesar de ter sido 5,6% menor em relação à safra anterior, é considerado normal, dado que no período 2015/2016 o Brasil apresentou uma safra recorde. Comparando com o período 2011/2012, a safra brasileira de cana-de-açúcar cresceu 4,6%. A produtividade de cana-de-açúcar no Brasil nos anos mais recentes é apresentada na figura 4 (dados obtidos no site www.conab.gov.br). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo responsável por 39% da produção mundial (FAOSTAT 2016).

Figura 4. Produção anual de cana-de-açúcar no Brasil segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB).

Análises transcriptômicas realizados com amostras de cana-de-açúcar coletadas por 48 h a cada 4 h mostraram que o relógio biológico de cana-de-açúcar consegue gerar períodos próximos de 24 h, como esperado. Além disso,

as análises apontam que cerca de 32% dos transcritos medidos em cana-de-açúcar são controlados pelo relógio biológico (Hotta et al., 2013), uma proporção maior do que o observado para a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, ou em outros cultivares como milho e arroz (Covington et al., 2008; Filichkin et al., 2011; Khan et al., 2010; Michael et al., 2008).

Entre os diversos processos biológicos apontados como sendo controlados pelo relógio biológico em cana-de-açúcar, observa-se que a sinalização hormonal também parece sofrer controle circadiano. Transcritos que codificam para proteínas envolvidas na síntese, transporte e sinalização de auxina apresentam oscilação rítmica, indicativo de estarem sob regulação do relógio biológico (Hotta et al., 2013). Esse controle do relógio biológico sobre a sinalização hormonal já é conhecido para *Arabidopsis*, em que foi observado inclusive que o relógio biológico modula temporalmente as respostas da planta a auxina por mecanismo de *gating* (Covington and Harmer, 2007).

A via de sinalização de auxinas, assim como o relógio biológico, são redes intrincadas que exercem profunda influência sobre os mais diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento em plantas, como apresentado acima. A interação entre essas vias em cana-de-açúcar é alvo de estudo desse trabalho. O estudo dessas redes deve ser interessante para o desenvolvimento e utilização de ferramentas biotecnológicas que possam aumentar a produtividade deste cultivar.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto de pesquisa foi estudar, em cana-de-açúcar, a sinalização por auxinas e sua interação com o relógio biológico, uma rede regulatória responsável pela percepção e resposta a estímulos ambientais rítmicos.

A. Estratégias

- i. Estabelecer uma metodologia de geração de plântulas de cana-de-açúcar em larga escala a partir de tecido embrionário obtido de plantas adultas;
- ii. Analisar o perfil de resposta gênica de cana-de-açúcar a auxina, como tempo de resposta e curva dose-resposta.
- iii. Confirmar, usando análise de expressão gênica por transcrição reversa (RT-qPCR), a fase de expressão de genes que foram identificados como sendo regulados pelo relógio biológico em cana-de-açúcar em experimentos anteriores (Hotta et al., 2013).
- iv. Verificar a existência de *gating* do relógio biológico em cana-de-açúcar através da medição das respostas de auxina em diferentes períodos do ciclo circadiano de cana-de-açúcar;
- v. Realizar análises transcriptômicas, usando *oligoarrays*, para identificação de genes que respondem a auxina adicionada em momentos diferentes do ciclo circadiano das plântulas.

3. MÉTODOS E ABORDAGENS

A. Obtenção de plântulas de cana-de-açúcar em larga escala

Um protocolo de obtenção de plântulas de cana-de-açúcar foi desenvolvido a partir de um conjunto de protocolos de organogênese indireta (Pandey et al., 2011; Patel, 2011; Taylor et al., 1992). Foram utilizados discos foliares com cerca de 3 mm de extensão, cortados até 5 cm abaixo do meristema apical de plantas de cana-de-açúcar adultas, cultivar SP80-3280. Os discos foliares foram cultivados em escuro constante, a 27° C, em meio Murashige & Skoog (Murashige and Skoog, 1962) com adição de sacarose 3% (meio MS) e 3 mg/l ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), uma auxina sintética, para a desdiferenciação tecidual.

Os discos foliares, cultivados por um período de 15 a 40 dias, foram transferidos para meio de regeneração, composto de meio MS com adição de 0,1 mg/l auxina sintética ácido 1-naftanelonacético (NAA) e 0,2 mg/l Benzilaminopurina (BAP), uma citocinina sintética. Os discos foliares foram transferidos para meio de regeneração novo a cada 20 dias, até a regeneração de parte aérea. Pequenos agregados de folhas já regenerados foram excisados do restante do disco foliar, transferidos para meio de regeneração novo e subcultivados até que as unidades individualizadas tivessem cerca de 5 cm. Após esse estágio, as plântulas jovens foram transferidas para meio MS sem hormônios. Com cerca de 20 dias de cultivo em meio MS, observa-se desenvolvimento de raiz. As plântulas de cana-de-açúcar obtidas nessa etapa, após mais 10 dias em meio MS novo, foram consideradas adequadas para a realização dos experimentos de respostas biológicas de cana-de-açúcar.

O cultivo das plântulas de cana-de-açúcar, assim como o dos discos

foliares para regeneração, foi realizado a 27° C, em regime de claro/escuro 12L/12E (12 h luz/ 12 h escuro).

As plântulas usadas para realização dos experimentos circadianos ficaram em luz constante 24 h antes do início do experimento, até o horário de coleta do material.

B. Análise de expressão gênica por reação de PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR)

I. Isolamento do RNA total e síntese do cDNA

O material biológico utilizado para as análises de expressão gênica foram folhas de plântulas de cana-de-açúcar. Cerca de 100 mg de folhas congeladas e trituradas foram utilizados para extração de RNA total. O RNA foi extraído com o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific), como indicado pelo fornecedor. O RNA total obtido foi tratado com DNase (New England BioLabs), seguindo as indicações do fornecedor com uma alteração: a degradação enzimática de DNA pela DNase foi realizada a 37 °C por 30 min. O RNA tratado foi quantificado e avaliado em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) sendo considerado bom para análises posteriores se as razões de absorbância 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm fossem maior que 1,8 e 2,0, respectivamente (Udvardi et al., 2008). A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose. A reação com a enzima DNase foi avaliada por PCR em Tempo Real, como descrito abaixo, para controle da eficiência da reação.

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA, sendo que a reação foi realizada com enzima Transcriptase Reversa (RT) do kit SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fornecedor.

II. Reação de PCR quantitativa precedida de transcrição reversa

Para os ensaios de PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) foi utilizado o fluoróforo SYBr Green (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com 10 ng/μl cDNA, usando iniciadores (*primers*) específicos visando a geração de produtos de amplificação com tamanho de aproximadamente 80-140 pares de bases (Udvardi et al., 2008). Os *primers* foram planejados com o auxílio do programa Primer3 (disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a partir da sequência de transcritos putativos, denominados SAS (*Sugarcane Assembled Sequences*), obtidos no banco de dados SUCEST (Vettore, 2003). As sequências dos iniciadores utilizados nos experimentos apresentados nesse trabalho estão apresentadas na sessão “Anexos”.

Para todas as reações foram incluídos controles negativos dos iniciadores utilizados. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador em tempo real (Applied Biosystems, modelo Gene 7500 Fast), utilizando-se o seguinte programa: 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 30 s a 60 °C. O *software* do equipamento gera curvas de amplificação e dissociação dos iniciadores para cada amostra analisada e oferece o cálculo automático do Ct (*Cycle threshold*), que corresponde ao número de ciclos de reação realizados até que a emissão de fluorescência ultrapasse um valor base estipulado.

Os valores de expressão gênica normalizada foram gerados a partir da normalização da expressão dos genes de interesse pelos dados de expressão de múltiplos genes constitutivos, seguindo o que foi proposto por (Vandesompele et al., 2002), como será detalhado abaixo.

Os dados de expressão gênica relativa foram obtidos a partir dos valores de expressão gênica normalizada entre grupos tratamento e controle e calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme proposto por (Livak and Schmittgen, 2001). Os ensaios foram realizados com pelo menos duas réplicas biológicas, sendo que cada réplica biológica era composta de um conjunto de, pelo menos, três plântulas individuais.

III. Normalização dos dados de expressão gênica gerados por RT-qPCR usando múltiplos genes constitutivos

A partir do proposto por (Vandesompele et al., 2002), foi utilizado o *software* Genorm v. 3.0 para avaliar a estabilidade de diversos genes constitutivos em plântulas de cana-de-açúcar, assim como para seleção do conjunto de genes mais estáveis nos experimentos realizados. O método proposto faz uma medição da estabilidade de expressão de genes constitutivos com base nos níveis de expressão não-normalizados. É gerado um valor M , para cada gene constitutivo, referente à média de variação par-a-par dos dados de expressão do gene constitutivo em questão em relação a todos os outros analisados. Desta forma, é estabelecido quais genes apresentam maior estabilidade de expressão. Genes com maior estabilidade de expressão apresentam menores valores de M .

Para a escolha do melhor conjunto de genes constitutivos a serem utilizados para a normalização dos dados, são utilizados os valores de variação par-a-par de fatores de normalização correspondentes a dados de expressão de conjuntos de genes constitutivos em que, sucessivamente, se excluía o gene

constitutivo com maior valor de M . Um grande valor de variação significa que a adição do gene tem um efeito significativo para o cálculo do fator de normalização, de forma que esse gene deveria ser incluído nas análises. Os autores recomendam o uso de um valor de 0,15 como referência, abaixo do qual a inclusão de um gene constitutivo não é relevante. É importante ressaltar que o fator de normalização, da forma como é proposto, foi calculado a partir da média geométrica nos níveis de expressão dos genes constitutivos utilizados.

Foram testados os seguintes genes constitutivos: *ScGAPDH*, *ScACT*, *ScATP*, *ScTUB*, *Sc60S* e *ScILR1*, os quais codificam putativamente para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, actina, ATP sintase, tubulina, rRNA 60S e AIA-aminoácido hidrolase, respectivamente. Após a seleção dos genes mais estáveis, um fator de normalização gerado a partir da média geométrica dos níveis de expressão desses genes foi utilizado para a normalização dos genes de interesse.

C. Tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com auxinas

As plântulas que foram usadas em experimentos de RT-qPCR para avaliar resposta transcricional a estímulo por auxina receberam o seguinte tratamento: após 10 dias em meio MS novo, um grupo de plântulas foi borrifado com 10 ml de tratamento auxina, composto de solução de auxina sintética ácido 1-naftalenoacético (NAA), ou com 10 ml de tratamento controle, composto de solução preparada a partir da diluição de álcool absoluto, o solvente utilizado para a dissolução de NAA, nas mesmas proporções utilizadas para preparação da solução de auxina.

Para padronização do tratamento com auxina que fosse mais eficiente

para obtenção de resposta transcricional em plântulas de cana-de-açúcar, assim como para a investigação da resposta transcricional dessas plântulas ao estímulo com auxina, foram realizados diversos experimentos, os quais são apresentados a seguir:

I. Experimento 1: Identificação de genes responsivos a auxina em plântulas de cana-de-açúcar

Plântulas de cana-de-açúcar, obtidas como proposto acima, ambientadas em regime de claro/escuro 12L/12E, foram borrifadas com tratamento auxina (20 μ M NAA) ou tratamento controle na segunda hora de luz. Diferentes grupos de plantas receberam o tratamento pelos seguintes períodos de tempo: 20 min, 1 h, 2 h e 4 h. Grupos de plantas diferentes também receberam o tratamento controle pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as folhas foram removidas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo então armazenadas a -80 °C até o momento da extração do RNA. Foram utilizadas duas réplicas biológicas por tratamento, sendo cada réplica biológica composta por três plântulas individuais.

Os transcritos de cana-de-açúcar (SAS) que tiveram suas expressões analisadas por RT-qPCR estão relacionados ao metabolismo de auxina (AUX), metabolismo de parede celular (PCEL), metabolismo de hormônio etileno (ETL), metabolismo de lipídios (LIP), relógio biológico (REL), sinalização celular por hormônio ácido abscísico (ABA), além de genes considerados constitutivos (CONS), utilizados para normalização dos dados. Na tabela 1 estão apresentadas a identificação das SAS e o nome de cada gene que tiveram suas expressões avaliadas nesse experimento. Entre parênteses, encontra-se o

aspecto funcional ao qual cada gene deve estar relacionado em cana-de-açúcar. O nome de cada gene, assim como o aspecto funcional ao qual ele foi associado, foram baseados em identidade/similaridade, a partir do alinhamento de sequências entre as SAS e os genomas de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* e *Sorghum bicolor*.

Tabela 1. Nomenclatura das SAS e anotação gênica dos transcritos analisados por RTqPCR no experimento 1.

SAS	Gene*
SCCCRT1C01F08.g	ScSAURa (AUX)
SCRFST1041C05.g	ScGH3a (AUX)
SCCCAM2004G02.g	ScPIN1a (AUX)
SCVPRZ2041G12	ScGH3b (AUX)
SCCCCL6003D08.g	ScTIR1a (AUX)
SCEQRT2093D08.g	ScAux/IAAa (AUX)
SCCCLR1001A11.g	ScTSAa (AUX)
SCCCSB1002H04.g	ScTOC1 (REL)
SCCCLR2C02A05.g	ScEXPa (PCEL)
SCAGLR1064F05.g	ScCESa (PCEL)
SCAGLR1043E04.g	ScCYPa (LIP)
SCCCLR2C01F06.g	2C01F06 (UNK)
SCEPRZ1010E06.g	ScPP2C (ABA)
SCUTST3086G11.g	ScCAB2 (REL)
SCVPRZ3029B05.g	ScAux/IAAb (AUX)
SCCCRT2001H11.g	ScARFa (AUX)
SCJLLR1033E07.g	ScEXPb (PCEL)
SCEPAM2015F01.g	ScARFb (AUX)
SCEPLR1008A10.g	ScAux/IAAc (AUX)
SCCCLR1024F10.g	ScARFc (AUX)
SCCCCL3005F04.g	ScARFd (AUX)
SCJFAM1068H09.g	ScAOX3a (AUX)
SCCCCL4002F06.g	ScTSAb (AUX)
SCCCCL6003A11.g	ScAux/IAAd (AUX)
SCEQLB1063H10.g	ScAux/IAAe (AUX)
SCVPRZ2036F01.g	ScAux/IAAf (AUX)
SCJFRZ2009F04.g	ScAux/IAAg (AUX)
SCJLRT1006C06.g	ScACSa (ETL)
SCJLRT1023B12.g	ScPIN1b (AUX)
SCEPRZ3129G07.g	ScGH3c (AUX)

(continuação da tabela 1)

SAS	Gene*
<i>SCCCLR1048E10.g</i>	<i>ScLHY (REL)</i>
<i>SCACLR1057C07.g</i>	<i>ScPRR7/3 (REL)</i>
<i>SCCCLR1072A03.g</i>	<i>ScATP (CONS)</i>
<i>SCCCRZ1002H03.g</i>	<i>ScTUB (CONS)</i>
<i>SCCGAM2027G09.g</i>	<i>ScGAPDH (CONS)</i>

*Os termos entre parênteses se referem à categoria funcional em que os transcritos podem ser classificados: AUX – metabolismo de auxinas; PCEL – metabolismo de parede celular; ETL – metabolismo de etileno; LIP – metabolismo de lipídios; REL – relógio biológico; ABA – metabolismo de ácido abscísico; CONS – genes considerados constitutivos

II. Experimento 2: Investigação do efeito da concentração de auxina sobre as respostas transcricionais de plântulas de cana-de-açúcar

Plântulas de cana-de-açúcar foram borrifadas com tratamento controle ou auxina (10 μ M a 80 μ M NAA) e, após quatro horas, tiveram suas folhas removidas e congeladas rapidamente para posterior análise de expressão gênica usando RT-qPCR. Grupos de plântulas diferentes foram borrifados com tratamento controle ou com as seguintes concentrações de NAA: 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M. A primeira borrifagem foi realizada na segunda hora de luz do ciclo claro/escuro (ZT2) ao qual as plântulas estavam submetidas. Após duas horas da primeira borrifagem, foi realizada uma reborrifagem das plântulas, utilizando o tratamento acumulado na base dos potes em que as plantas estavam. Foram utilizadas três réplicas biológicas por tratamento, sendo cada réplica composto por quatro plântulas individuais. Na tabela 2 são apresentados os transcritos de cana-de-açúcar avaliados no experimento apresentado. A nomenclatura entre parênteses segue o padrão proposto acima.

Tabela 2. Nomenclatura das SAS e anotação gênica dos transcritos analisados por RTqPCR no experimento 2.

SAS	Gene
<i>SCJLLR1033E07.g</i>	<i>ScEXPb (PCEL)</i>
<i>SCCCLR2C02A05.g</i>	<i>ScEXPa (PCEL)</i>
<i>SCEQRT2093D08.g</i>	<i>ScAux/IAAa (AUX)</i>
<i>SCRFST1041C05.g</i>	<i>ScGH3a (AUX)</i>
<i>SCVPRZ2041G12</i>	<i>ScGH3b (AUX)</i>
<i>SCEPRZ1010E06.g</i>	<i>ScPP2C (ABA)</i>
<i>SCCCRT2001H11.g</i>	<i>ScARFa (AUX)</i>
<i>SCCCLR1001A11.g</i>	<i>ScTSAa (AUX)</i>
<i>SCCCRT1C01F08.g</i>	<i>ScSAURa (AUX)</i>
<i>SCEPAM2015F01.g</i>	<i>ScARFb (AUX)</i>
<i>SCCCAM2004G02.g</i>	<i>ScPIN1a (AUX)</i>
<i>SCCCCL6003D08.g</i>	<i>ScTIR1a (AUX)</i>
<i>SCAGLR1043E04.g</i>	<i>ScCYPa (LIP)</i>
<i>SCCCLR2C01F06.g</i>	<i>2C01F06 (UNK)</i>
<i>SCCCSB1002H04.g</i>	<i>ScTOC1 (REL)</i>
<i>SCVPRZ3029B05.g</i>	<i>ScAux/IAAb (AUX)</i>
<i>SCUTST3086G11.g</i>	<i>ScCAB2 (REL)</i>
<i>SCAGLR1064F05.g</i>	<i>ScCESa (PCEL)</i>
<i>SCCCLR1072A03.g</i>	<i>Sc.ATP (CONS)</i>
<i>SCCCRZ1002H03.g</i>	<i>ScTUB (CONS)</i>
<i>SCJFRZ2009G01.g</i>	<i>Sc60S (CONS)</i>

III. Experimento 3: Avaliação de resposta transcricional em plântulas de cana-de-açúcar expostas a auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano

Plântulas de cana-de-açúcar foram transferidas para condição de luz constante e, após 24 h na nova condição, foram borrifadas com tratamento controle e auxina em diferentes pontos temporais. Considerando como ZT0 o início do dia subjetivo, ou seja, a primeira hora após 24 h de luz constante, os tratamentos foram aplicados nos pontos ZT2, ZT8, ZT14 e ZT20, em horas. O tratamento auxina consistia de auxina sintética 80 μ M NAA. Após duas horas da primeira borrifagem, foi realizada uma reborrifagem das plântulas utilizando o

tratamento acumulado na base dos potes em que as plantas estavam. Após quatro horas da primeira exposição ao tratamento, as plântulas tiveram suas folhas removidas para posterior análise por RT-qPCR, de forma que o material foi coletado nos pontos ZT6, ZT12, ZT18 e ZT24. Foram utilizadas quatro réplicas biológicas, sendo que cada réplica era composta de quatro plântulas individuais. Na tabela 3 são apresentados os transcritos de cana-de-açúcar avaliados no experimento apresentado. A nomenclatura entre parênteses segue o padrão proposto acima.

Tabela 3. Nomenclatura das SAS e anotação gênica dos transcritos analisados por RTqPCR no experimento 3.

SAS	Gene
<i>SCVPRZ2041G12</i>	<i>ScGH3b (AUX)</i>
<i>SCJLLR1033E07.g</i>	<i>ScEXPb (PCEL)</i>
<i>SCCCAM2004G02.g</i>	<i>Sc.PIN1a (AUX)</i>
<i>SCVPRZ3029B05.g</i>	<i>ScAux/IAAb (AUX)</i>
<i>SCCCCL6003A11.g</i>	<i>ScAux/IAAd (AUX)</i>
<i>SCJFAM1068H09.g</i>	<i>ScAOX3a (AUX)</i>
<i>SCCCCL4002F06.g</i>	<i>ScTSAb (AUX)</i>
<i>SCSBRZ3119G01.g</i>	<i>ScILR1 (CONS)</i>
<i>SCCCLR1072A03.g</i>	<i>ScATP (CONS)</i>
<i>SCEPLR1008A10.g</i>	<i>ScAux/IAAc (AUX)</i>
<i>SCCCLR1024F10.g</i>	<i>ScARFc (AUX)</i>
<i>SCCCCL3005F04.g</i>	<i>ScARFd (AUX)</i>
<i>SCCCLR1048E10.g</i>	<i>ScLHY (REL)</i>
<i>SCACLR1057C07.g</i>	<i>ScPRR7 (REL)</i>
<i>SCCCSB1002H04.g</i>	<i>ScTOC1 (REL)</i>
<i>SCCCRZ1002H03.g</i>	<i>ScTUB (CONS)</i>
<i>SCJFRZ2009G01.g</i>	<i>Sc60S (CONS)</i>

IV. Experimento 4: Avaliação de resposta transcricional a auxina após diferentes tempos de exposição ao tratamento

Plântulas de cana-de-açúcar receberam auxina sintética 80 μ M NAA por 30 min, 1 h, 2 h ou 4 h, sem reborrifagem em nenhum dos casos. O tratamento

controle também foi aplicado pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as folhas foram removidas, congeladas em N₂ (l) e armazenadas a -80 °C. Foram utilizadas três réplicas biológicas por tratamento, sendo cada réplica composta de três plântulas individuais. Na tabela 4 são apresentados os transcritos de cana-de-açúcar avaliados no experimento apresentado. A nomenclatura entre parênteses segue o padrão proposto acima.

Tabela 4. Nomenclatura das SAS e anotação gênica dos transcritos analisados por RTqPCR no experimento 4.

SAS	Gene
<i>SCVPRZ2041G12</i>	<i>ScGH3b (AUX)</i>
<i>SCJLLR1033E07.g</i>	<i>ScEXPb (PCEL)</i>
<i>SCCCAM2004G02.g</i>	<i>ScPIN1a (AUX)</i>
<i>SCSBRZ3119G01.g</i>	<i>ScILR1 (CONS)</i>
<i>SCCCLR1072A03.g</i>	<i>ScATP (CONS)</i>
<i>SCJFRZ2009F04.g</i>	<i>ScAux/IAAg (AUX)</i>
<i>SCVPRZ3029B05.g</i>	<i>ScAux/IAAb (AUX)</i>
<i>SCCCRZ1002H03.g</i>	<i>ScTUB (CONS)</i>
<i>SCJFRZ2009G01.g</i>	<i>Sc60S (CONS)</i>

V. Experimento 5: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de dois ciclos circadianos

Plântulas de cana-de-açúcar colocadas em luz constante por 24 h foram borrifadas com 80 µM NAA ou tratamento controle a cada quatro horas, por 44 h (dois ciclos circadianos). A primeira borrifagem foi realizada no início da primeira hora do segundo dia subjetivo, ou seja, após as primeiras 24 h de luz constante. Após uma hora de tratamento, as folhas foram removidas, congeladas em N₂ (l) e armazenadas a -80 °C.

Foram utilizadas três réplicas biológicas por tratamento, sendo cada réplica composta de três plântulas individuais. Na tabela 5 são apresentados os

transcritos de cana-de-açúcar avaliados no experimento apresentado. A nomenclatura entre parênteses segue o padrão proposto acima.

Tabela 5. Nomenclatura das SAS e anotação gênica dos transcritos analisados por RTqPCR no experimento 5.

SAS	Gene
<i>SCCCAM2004G02.g</i>	<i>ScPIN1a (AUX)</i>
<i>SCVPRZ2041G12</i>	<i>ScGH3b (AUX)</i>
<i>SCJFRZ2009F04.g</i>	<i>ScAux/IAAg (AUX)</i>
<i>SCCCSB1002H04.g</i>	<i>ScTOC1 (REL)</i>
<i>SCVPRZ3029B05.g</i>	<i>ScAux/IAAb (AUX)</i>
<i>SCJFAM1068H09.g</i>	<i>ScAOX3a (AUX)</i>
<i>SCCCCL6003A11.g</i>	<i>ScAux/IAAd (AUX)</i>
<i>SCCCLR1048E10.g</i>	<i>ScLHY (REL)</i>
<i>SCACLR1057C07.g</i>	<i>ScPRR7 (REL)</i>
<i>SCCCLR1072A03.g</i>	<i>ScATP (CONS)</i>
<i>SCCCRZ1002H03.g</i>	<i>ScTUB (CONS)</i>
<i>SCJFRZ2009G01.g</i>	<i>Sc60S (CONS)</i>
<i>SCSBRZ3119G01.g</i>	<i>ScILR1 (CONS)</i>

VI. Experimento 6: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano

Plântulas de cana-de-açúcar colocadas em luz constante por 24 h foram borrifadas com tratamento controle ou com auxina 80 μ M NAA a cada quatro horas, por 20 h (um ciclo circadiano). A primeira borrifagem foi realizada no início da primeira hora do segundo dia subjetivo, ou seja, após as primeiras 24 h de luz constante. Após uma hora de tratamento, as folhas foram removidas, congeladas em N₂ (l) e armazenadas a -80 °C.

Foram utilizadas seis réplicas biológicas por tratamento, sendo cada réplica composta de três plântulas individuais. Na tabela 6 são apresentados os transcritos de cana-de-açúcar avaliados no experimento apresentado. A

nomenclatura entre parênteses segue o padrão proposto acima.

Tabela 6. Nomenclatura das SAS e anotação gênica dos transcritos analisados por RTqPCR no experimento 6.

SAS	Gene
SCCCAM2004G02.g	<i>ScPIN1a</i> (AUX)
SCVPRZ2041G12	<i>ScGH3b</i> (AUX)
SCCCLR1048E10.g	<i>ScLHY</i> (REL)
SCCCSB1002H04.g	<i>ScTOC1</i> (REL)
SCJFRZ2009G01.g	<i>Sc60S</i> (CONS)
SCQGSD2047F01.g	Hipotético
SCCCAM1002G07.g	Hipotético
SCCCLR1072A03.g	<i>ScATP</i> (CONS)
SCCCRZ1002H03.g	<i>ScTUB</i> (CONS)
SCSBRZ3119G01.g	<i>ScILR1</i> (CONS)

D. Análise de expressão gênica por *oligoarrays*

I. Material biológico utilizado

O material biológico usado no experimento de avaliação de expressão gênica por *oligoarrays* para investigar as respostas transcricionais a estímulo por auxina em cana-de-açúcar corresponde ao material obtido no experimento 5, descrito acima. Resumidamente, as plântulas haviam sido colocadas sob luz constante por 24 h e foram então borrifadas com 80 μ M NAA ou tratamento controle a cada quatro horas. Foi utilizado o material biológico referente ao primeiro ciclo circadiano, ou seja, 24 h. A primeira borrifagem foi realizada no início da primeira hora do segundo dia subjetivo, ou seja, após as primeiras 24 horas de luz constante. Depois de uma hora de exposição aos tratamentos, controle ou NAA, as folhas das plântulas foram cortadas e imediatamente congelada em N₂ (l). As amostras foram mantidas refrigeradas a -80 °C até serem processadas.

II. Extração do RNA, hibridização dos oligoarranjos e processamento da imagem

Cerca de 100 mg de folhas congeladas e trituradas de plântulas de cana-de-açúcar foram utilizados para extração de RNA total. O RNA foi extraído com o reagente Trizol[®] (Thermo Fisher Scientific) como indicado pelo fornecedor. O RNA total obtido foi tratado com DNase (BioLabs), seguindo as indicações do fornecedor com uma alteração: a etapa de degradação enzimática de DNA realizada pela enzima DNase foi realizada a 37 °C por 30 min. O RNA tratado foi quantificado e avaliado em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies), sendo considerado bom para análises posteriores se as razões de absorbância 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm fossem maiores que 1,8 e 2,0, respectivamente (Udvardi et al., 2008). A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose. Após tratamento com DNase I, as amostras foram purificadas com RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo o protocolo do Kit RNA Cleanup e então tiveram sua integridade e qualidade verificadas usando NanoChip BioAnalyzer (Agilent).

As lâminas de oligoarranjos que foram hibridizadas com as amostras de cRNA de cana-de-açúcar tratadas com tratamento controle ou auxina têm formato 4 x 44 K e foram produzidas pela empresa Agilent, como descrito em (Lembke et al., 2012). Brevemente, a partir do projeto de ESTs de cana-de-açúcar (SUCEST, descrito em (Vettore, 2003)), foram reunidas 14.521 sequências de transcritos de cana-de-açúcar (SAS). Desse total de transcritos, apenas os mais representativos foram usados para compor os oligoarranjos. Cada lâmina tem um total de 45.220 spots, sendo 1.217 controles Agilent e

43.803 *probes* relacionadas a SAS. As *probes* estão apresentadas em duplicata no arranjo, de forma que cada arranjo tem 21.901 *probes* únicas, sendo 14.521 *probes* relacionadas à SAS no sentido senso e 7.380 no sentido antisenso.

As amostras foram preparadas e hibridizadas seguindo o protocolo Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling, Agilent Technologies). Os controles Spike foram preparados usando o kit RNA Spike-In Two-Color (Agilent Technologies) de acordo com o indicado pelo fabricante, e foram usados nas reações de amplificação e marcação. cRNAs amplificados e marcados com Cianina 5 (Cy5) ou Cianina 3 (Cy3) foram obtidos a partir de 2 µg de RNA total das amostras controle e auxina. A amplificação e marcação das amostras foram realizadas com o kit Quick Amp Labeling, que usa a enzima T7 RNA Polimerase. Os cRNAs marcados e amplificados foram purificados usando colunas RNeasy mini spin do kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) e quantificadas usando NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer (Thermo Scientific). A hibridização das lâminas foi realizada seguindo protocolo do kit Gene Expression Hybridization (Agilent Technologies). Após 17 h de hibridização, as lâminas foram lavadas com Gene Expression Wash Buffer 1 e Gene Expression Wash Buffer 2 (Agilent Technologies) com 0,005% Triton X-102, de acordo com o protocolo Agilent. As lâminas foram escaneadas usando um scanner GenePix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e Agilent Scan Settings. Para cada ponto experimental foram utilizadas duas réplicas biológicas, com troca dos marcadores fluorescentes entre as réplicas biológicas.

III. Normalização, processamento dos dados e anotação gênica

Para extração dos dados, foi utilizado o software Feature Extraction 9.5.3.1 (Agilent Technologies), usando o protocolo GE2_v5_95_Feb07, com pequenos ajustes. Inicialmente, foi aplicada uma correção de ruído de fundo sobre os dados. Posteriormente, os dados foram normalizados em duas etapas: uma primeira normalização, linear, aplicada sobre todo o arranjo, e uma segunda não-linear, LOWESS (Yang et al., 2002), utilizada para corrigir erros relacionados a intensidade do sinal dos fluoróforos e a variações causadas por procedimentos experimentais.

A identificação de genes com expressão aberrante (*outliers*) foi realizada usando uma modificação do método HTSelf (Vêncio and Koide, 2005), adaptada para a plataforma Agilent. O método HTSelf tradicionalmente usa apenas uma normalização dos dados, e foi alterado para usar as duas normalizações aplicadas separadamente aos sinais. Um modelo gênico foi considerado diferencialmente expresso quando se obtinha uma confiança de 90% para cada conjunto referência, de acordo com a modificação do método HTSelf. Um gene foi considerado expresso somente quando a maioria dos spots (70%) apresentavam o mesmo perfil de expressão em um experimento, como definido pelo método HTSelf. Um transcrito foi considerado enriquecido em dada situação somente se o nível de expressão foi considerado significativo nas duas réplicas biológicas.

A grande maioria dos genes identificados como diferencialmente expressos já haviam sido enquadrados em categorias funcionais, como proposto

em (Lembke et al., 2012). Entretanto, todos os genes foram re-analizados da seguinte forma: foram realizados alinhamentos por BLAST de cada SAS contra os genomas de sorgo (*Sorghum bicolor*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oriza sativa*) e *Arabidopsis thaliana*. Os genes que apresentavam maior identidade/similaridade em cada um desses genomas foram utilizados como referência para definir a qual categoria funcional, dentre as 30 categorias iniciais propostas em (Lembke et al., 2012), deveria estar anotada cada SAS. Para os propósitos referentes a esse projeto de pesquisa, foi inserida uma nova categoria, “Estresse Abiótico”, a qual se refere a genes relacionados a resposta a estresses não-bióticos.

4. Resultados

A. Obtenção de plântulas de cana-de-açúcar em larga escala

Para realização dos experimentos apresentados ao longo desse trabalho, foram utilizadas plântulas de cana-de-açúcar geradas por organogênese indireta.

Inicialmente, foi proposto que a obtenção das plântulas seria padronizada a partir de meristema lateral de plantas adultas. Apesar dessa estratégia já ter sido descrita como bem-sucedida (Taylor, 1997), não foi possível reproduzir tais resultados; foram tentadas estratégias diversas para a sanitização dos embriões e para organogênese. Apesar da sanitização ter sido padronizada com sucesso, a organogênese não foi reproduzida, mesmo com alterações na composição e concentração de auxinas e citocininas no meio de cultura (dados não-mostrados).

Seguindo o que é observado na literatura da área, mudamos a estratégia para obtenção de plântulas, por organogênese direta (Ali et al., 2008; Khan et al., 2008; Pandey et al., 2011; Patel, 2011; Taylor, 1997), a partir dos discos foliares mais internos, próximo ao meristema apical, de uma planta adulta de cana-de-açúcar.

Os discos foliares foram primeiramente cultivados em escuro constante, em meio MS contendo ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), uma auxina sintética, para desdiferenciação dos discos foliares. Após um período de 15 a 40 dias nesse meio, os discos foram passados para meio de regeneração de folhas e raízes, contendo 0,1 mg/l ácido 1-naftanelonacético (NAA), uma auxina sintética, e 0,2 mg/l Benzilaminopurina (BAP), uma citocinina sintética. Inicialmente foram

tentadas estratégias usando também o hormônio cinetina (Kin), entretanto as combinações contendo cinetina não foram bem-sucedidas. Dessa forma, os hormônios utilizados para regeneração de parte aérea e de raiz, citocininas e auxinas, respectivamente (Woodward and Bartel, 2005) foram oferecidos em conjunto no meio de cultura.

Após algum tempo no meio contendo auxina e citocinina, houve grande taxa de regeneração de folhas nos discos foliares, permitindo a separação de plântulas individuais, as quais foram cultivadas em meio MS sem hormônios até o momento de realização dos experimentos.

O protocolo foi padronizado a partir de alguns trabalhos disponíveis na literatura científica (Pandey et al., 2011; Patel, 2011; Taylor et al., 1992). O protocolo utilizado apresentou baixo custo, simplicidade e grande eficiência, gerando material biológico em quantidade mais que suficiente para realização dos experimentos. Na figura 5, são mostradas algumas fotos das plântulas de cana-de-açúcar geradas.

Figura 5. Plântulas de cana-de-açúcar produzidas por organogênese direta a partir de discos foliares imaturos obtidos de plantas adultas.

B. Avaliação de respostas transcricionais a tratamento com auxina em plântulas de cana-de-açúcar

O objetivo principal do presente projeto de pesquisa é avaliar se o relógio biológico de cana-de-açúcar exerce influência sobre as respostas biológica a auxinas nesse organismo. Para tanto, buscamos obter um ensaio robusto para acessar respostas transcricionais a auxina em plântulas de cana-de-açúcar. Posteriormente, investigamos se as respostas transcricionais observadas eram afetadas pelo relógio biológico.

Alguns cuidados foram colocados em prática para realização de RT-qPCR de forma a obtermos resultados reprodutíveis e que permitissem uma precisa avaliação das respostas transcricionais. A primeira proposição foi em relação ao material utilizado. Todos os experimentos de expressão gênica apresentados nesse trabalho foram realizados a partir das folhas das plântulas de cana-de-açúcar. Para garantir um perfil de expressão homogêneo, apenas as partes verdes localizadas cerca de 0,5 cm acima da bainha foram utilizados. Também se teve o cuidado de realizar os experimentos com conjuntos de plantas, ou seja, cada réplica biológica avaliada é composta de conjuntos de 3 a 5 cinco plantas processadas conjuntamente. Dessa forma, a diversidade biológica é avaliada de maneira mais direta, diminuindo as chances de observarmos eventuais variações individuais ou relacionadas a variação somaclonal (Larkin and Scowcroft, 1981).

Uma outra estratégia utilizada para aumentar a precisão dos dados obtidos, especificamente os dados gerados por PCR em tempo real, foi a normalização da expressão gênica usando múltiplos genes constitutivos. Já foi

observado que diversos genes ditos constitutivos podem apresentar variação de expressão entre diferentes tecidos e tratamentos, não sendo adequados para normalização de expressão gênica (Borowski et al., 2014; Czechowski, 2005; Gutierrez et al., 2008; Manoli et al., 2012; Moura et al., 2012; Vandesompele et al., 2002). Ao longo do processo de padronização dos experimentos de RT-qPCR, foram usados os níveis de expressão de seis diferentes genes considerados constitutivos: *ScGAPDH*, *ScACT*, *ScATP*, *ScTUB*, *Sc60S* e *ScILR1*, os quais codificam putativamente para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, actina, ATP sintase, tubulina, rRNA 60S e AIA-aminoácido hidrolase, respectivamente.

Os genes constitutivos acima foram avaliados nos diferentes experimentos realizados ao longo desse projeto de pesquisa, como pode ser observado nas figuras 6, 7 e 8. As análises de estabilidade de expressão apontaram que o grupo de genes mais estáveis no conjunto de experimentos realizados era composto de *ScATP*, *ScTUB* e *Sc60S*.

Após a seleção dos genes mais estáveis, realizada a partir dos dados gerados pelo *software* Genorm, um fator de normalização, constituído da média geométrica dos níveis de expressão dos genes mais estáveis, foi utilizado para o cálculo da expressão normalizada dos genes de interesse. A utilização do *software Genorm* e o método de normalização dos dados está descrito na sessão “Métodos e Abordagens”.

Os experimentos realizados, assim como os resultados obtidos, são apresentados a seguir.

Figura 6. Dados obtidos do software Genorm sobre estabilidade de expressão dos genes *ScATP*, *ScTUB*, *ScGAPDH* e *Sc60S* em plântulas de cana-de-açúcar que receberam 80 μ M NAA por períodos de 20 min, 1 h ou 4 h.

Figura 7. Dados obtidos do software Genorm sobre estabilidade de expressão dos genes *ScATP*, *ScTUB*, *Sc60S*, *ScGAPDH* e *ScACT* em plântulas de cana-de-açúcar que receberam NAA em concentração de 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, ou tratamento controle, por 4 h.

Figura 8. Dados obtidos do software Genorm para estabilidade de expressão dos genes *ScATP*, *ScTUB*, *Sc60S*, *ScGAPDH*, *ScACT* e *ScILR1* em plântulas de cana-de-açúcar que receberam 80 μ M NAA, por 4 h (com reborrifagem), em quatro pontos temporais diferentes de um ciclo circadiano.

I. Experimento 1: Identificação de genes responsivos a auxina em plântulas de cana-de-açúcar

A literatura científica carece de trabalhos em que se tenha analisado respostas biológicas de cana-de-açúcar a tratamento com auxina. A partir disso, e tendo como foco respostas transcricionais, foi montando um experimento preliminar para investigação de transcritos que apresentassem respostas transcricionais após tratamento com auxina. O experimento consistia em borrifar 10 ml de solução contendo auxina 20 μ M ácido 1-naftalenoacético (NAA), ou tratamento controle, sobre plântulas de cana-de-açúcar. As plântulas estavam em regime de claro/escuro e receberam os tratamentos na 2 h após o acendimento das luzes (ZT2). Grupos de plântulas ficaram expostas ao tratamento por períodos de 20 min, 1 h ou 4 h, e depois tiveram suas folhas removidas para posterior análise por RT-qPCR. Foram utilizadas duas réplicas biológicas por tratamento, sendo que cada réplica consistia em um conjunto de cinco plântulas individuais.

Buscando identificar genes responsivos a auxina em cana-de-açúcar, foi avaliada a expressão de um conjunto de 30 genes de interesse. A maioria desses genes está relacionada ao metabolismo de auxinas. Entretanto, nessa lista também se encontram genes putativamente relacionados ao relógio biológico, metabolismo de parede celular e metabolismo dos hormônios etileno e ácido abscísico (Tabela 1). Os resultados obtidos apontaram, primeiramente, que só era possível observar expressão diferencial entre tratamentos controle e auxina após 4 h de exposição ao tratamento. Posto isso, foi considerado que houve expressão diferencial entre tratamento e controle quando observada variação de 25% para cima ou para baixo nas duas réplicas biológicas testadas, ou uma

variação de 50% para cima ou para baixo em pelo menos uma das réplicas biológicas (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação de expressão diferencial após aplicação de auxina sintética NAA a 20 uM por 4 horas em plântulas* de cana-de-açúcar.

Gene	Expressão Diferencial entre Tratamento e Controle**
<i>2C01F06</i>	sim
<i>ScACSa</i>	não
<i>ScARFa</i>	sim
<i>ScARFb</i>	sim
<i>ScARFc</i>	não
<i>ScARFd</i>	não
<i>ScAux/IAAa</i>	sim
<i>ScAux/IAAb</i>	sim
<i>ScAux/IAAc</i>	não
<i>ScAux/IAAd</i>	não
<i>ScAux/IAAe</i>	não
<i>ScAux/IAAf</i>	não
<i>ScAux/IAAg</i>	não
<i>ScAOX3a</i>	não
<i>ScCAB2</i>	sim
<i>ScCESa</i>	sim
<i>ScCYPa</i>	sim
<i>ScEXPa</i>	sim
<i>ScEXPb</i>	sim
<i>ScGH3a</i>	sim
<i>ScGH3b</i>	sim
<i>ScGH3c</i>	não
<i>ScPIN1a</i>	sim
<i>ScPIN1b</i>	não
<i>ScPP2C</i>	sim
<i>ScSAURa</i>	sim
<i>ScTIR1a</i>	sim
<i>ScTSAa</i>	sim
<i>ScTSAb</i>	não
<i>ScTOC1</i>	sim

*foram utilizadas duas réplicas biológicas por tratamento, sendo que cada réplica biológica era um conjunto de cinco plântulas individuais.

**foram considerados diferencialmente expressos os genes cuja expressão normalizada pelos constitutivos no tratamento com auxina, relativamente à expressão normalizada no tratamento controle, foi maior que 1,25 ou menor 0,75 nas duas réplicas biológicas testadas, ou maior que 2 em pelo menos uma das réplicas biológicas.

A partir dos dados obtidos, 18 genes apresentaram expressão diferencial como proposto (tabela 7) e foram utilizados em experimentos posteriores para avaliar respostas transcricionais a auxinas. Além disso, o período de 4 h ficou

definido para investigação de outros parâmetros da resposta transcricional ao estímulo com auxina, pois é o que nos permitiu observar maiores respostas.

II. Experimento 2: Investigação do efeito da concentração de auxina sobre as respostas transcricionais de plântulas de cana-de-açúcar

A partir da lista de genes obtida no experimento anterior, e estabelecendo 4 h como um período de tratamento suficiente para a observação de respostas transcricionais a auxina em plântulas de cana-de-açúcar, foi realizado um experimento para se testar qual a concentração de NAA nos permitiria observar uma resposta transcricional após tratamento com tal auxina sintética. Nesse experimento, as plântulas estavam em regime de claro/escuro e foram borrifadas com tratamento controle ou NAA em ZT2. O NAA foi aplicado nas concentrações de 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M. A solução de tratamento aplicada que ficou excedente, retida no fundo dos potes em que as plântulas estavam, foi reborrifada na metade do tempo de tratamento, ou seja, após 2 h da primeira aplicação.

Após as 4 h de tratamento, cada conjunto de plantas foi processado como indicado na sessão “Métodos e Abordagens” para avaliação de resposta transcricional por RT-qPCR. Nesse experimento, foram utilizadas três réplicas biológicas, sendo cada réplica composta de um conjunto de quatro plantas.

Os dados de expressão relativa dos genes de interesse estão apresentados na figura 9. A aplicação de 80 μ M NAA gera nas plântulas de cana-de-açúcar uma resposta transcricional evidente, sendo mais adequada para avaliar robustamente esse tipo de resposta.

Figura 9. Análise de expressão gênica de dezoito genes em plântulas de cana-de-açúcar. As plântulas foram tratadas com diferentes concentrações de auxina sintética NAA por quatro horas, com reborrifagem do tratamento aplicado após metade do período de exposição. Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de três réplicas biológicas, sendo que cada réplica biológica é o conjunto de quatro plântulas individuais. *expressão relativa maior que 2,5x.

A expressão obtida para os genes *ScGH3b*, *ScPIN1a*, *ScAux/IAAa*, e *ScEXPb*, que putativamente codificam para uma proteína conjugadora de auxina, uma proteína envolvida no transporte de auxina, uma proteína envolvida

no controle transcricional por auxinas e uma proteína envolvida no metabolismo de parede celular, respectivamente, apresentaram as respostas transcripcionais mais intensas (fig. 9A e 9B).

Dessa forma, 80 μ M NAA foi definido como um tratamento que nos permite observar a resposta transcricional a auxina sintética NAA em plântulas de cana-de-açúcar. Além disso, os quatro genes que apresentaram respostas transcripcionais evidentes se tornaram os principais marcadores para avaliar esse tipo de resposta nos próximos experimentos.

III. Experimento 3: Avaliação de resposta transcricional em plântulas de cana-de-açúcar expostas a auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano

Considerando os experimentos apresentados anteriormente, foi possível obter um sistema reacional para avaliação de respostas transcripcionais à auxina NAA em plântulas de cana-de-açúcar. O próximo passo foi investigar previamente se a resposta transcricional avaliada poderia ser modulada pelo relógio biológico através do fenômeno de *gating*, no qual uma resposta biológica a um dado estímulo varia de acordo com o horário do dia em que esse estímulo é oferecido ao organismo (Hotta et al., 2007).

Posto isso, foi montado um experimento em que plântulas receberam tratamento controle ou 80 μ M NAA por 4 h com reborrifagem na metade do tempo do tratamento. No experimento em questão, as plântulas foram colocadas em luz constante, e após as primeiras 24 h nessa condição, foram expostas aos tratamentos. Os tratamentos foram aplicados em quatro pontos do dia, intervalados em seis horas. Considerando como ZT0 (0 h após o amanhecer

subjetivo) o início do dia subjetivo, a primeira hora após 24 h de luz constante, os tratamentos foram aplicados nos pontos ZT2, ZT8, ZT14 e ZT20, e o material foi coletado, respectivamente, nos pontos ZT6, ZT12, ZT18 e ZT24. Completando 4 h de tratamento, foram coletadas as folhas das plântulas, as quais foram armazenadas a -80 °C e processadas posteriormente para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR, como proposto na sessão “Métodos e Abordagens”. Foram utilizadas quatro réplicas biológicas, sendo que cada réplica era composta de quatro plântulas individuais.

Primeiramente foi avaliada a expressão de genes do relógio biológico de cana-de-açúcar (figura 10). Os genes avaliados apresentaram um padrão de expressão rítmico (Figura 10A, 10C e 10E), mas não foram responsivos à auxina (Figura 10B, 10D e 10F). Os genes avaliados, *ScLHY*, *ScTOC1* e *ScPRR7*, já haviam sido avaliados em trabalho publicado anteriormente por nosso grupo (Hotta et al., 2013).

O perfil de oscilação desses genes é bem evidente nos dados apresentados, estando dentro do esperado para os pontos temporais em que as plântulas foram coletas (Hotta et al., 2013).

Nas figuras 11, 12 e 13 são apresentados os dados de expressão obtidos no experimento em questão para 10 genes. Os dados são apresentados como expressão normalizada, ou seja, estão normalizados pela expressão gênica dos constitutivos avaliados (gráfico à esquerda), e como expressão relativa, em que os dados de expressão dos genes no tratamento com 80 μ M

Figura 10. Expressão de três genes do relógio biológico de cana-de-açúcar, obtida por RTqPCR, após tratamento de plântulas com 80 μ M NAA por 4 h (com reborrifagem). O tratamento foi aplicado em quatro horários diferentes de um ciclo circadiano. Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de quatro réplicas biológicas, sendo que cada réplica biológica era um conjunto de quatro plântulas individuais.

NAA normalizada pela expressão dos constitutivos foram normalizados pela expressão normalizada do tratamento controle (gráficos à direita).

Entre os diversos genes analisados, pode-se observar que a resposta nos níveis de expressão dos genes *ScGH3b* e *ScPIN1a* apresentam grande reprodutibilidade entre os experimentos apresentados, se tornando genes marcadores de resposta transcricional a auxina nas plântulas de cana-de-açúcar. A resposta transcricional do gene *ScGH3b* (fig. 11A), assim como a do

Figura 11. Avaliação da expressão de cinco genes em plântulas de cana-de-açúcar após quatro horas de exposição a 80 μ M NAA (com reborrifagem) em quatro períodos de tempo diferentes de um ciclo circadiano. Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de quatro réplicas biológicas, sendo que cada réplica era um conjunto de quatro plântulas individuais. Os valores de expressão são apresentados como expressão normalizada, em relação à expressão de quatro genes constitutivos, e como expressão relativa, em que a expressão normalizada do tratamento com auxina é relativizada pela expressão normalizada do tratamento controle. *expressão relativa maior que 2,5.

gene *ScIAA.C* (fig. 13B), ao longo dos quatro pontos temporais avaliados, apresenta-se razoavelmente diferente, o que pode ser observado, de maneira menos óbvia, no perfil de resposta dos genes *ScAOX3* (fig. 12E) e *ScAux/IAAd* (fig. 13C). Para o gene *ScPIN1a*, pode-se observar uma resposta evidente ao tratamento com auxina, como esperado, porém, sem que essa resposta pareça ser diferente nos pontos temporais em que o experimento foi realizado. Dessa forma, os dados apontam para a possibilidade de o relógio biológico de cana-de-açúcar estar modulando as respostas transcricionais a auxina dos genes *ScGH3b* e *ScIAAc*, havendo a possibilidade disso se estender para as respostas observadas para os genes *ScPIN1a*, *ScAOX3* e *ScAux/IAAd*.

Figura 12. Avaliação da expressão de cinco genes em plântulas de cana-de-açúcar após quatro horas de exposição a 80 μ M NAA (com reborrifagem) em quatro períodos de tempo diferentes de um ciclo circadiano. Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de quatro réplicas biológicas, sendo que cada réplica era um conjunto de quatro plântulas individuais. Os valores de expressão são apresentados como expressão normalizada, em relação à expressão de quatro genes constitutivos, e como expressão relativa, em que a expressão normalizada do tratamento com auxina é relativizada pela expressão normalizada do tratamento controle. *expressão relativa maior que 2,5

Figura 13. Avaliação da expressão de cinco genes em plântulas de cana-de-açúcar após quatro horas de exposição a 80 μ M NAA (com reborrifagem) em quatro períodos de tempo diferentes de um ciclo circadiano. Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de quatro réplicas biológicas, sendo que cada réplica era um conjunto de quatro plântulas individuais. Os valores de expressão são apresentados como expressão normalizada, em relação à expressão de quatro genes constitutivos, e como expressão relativa, em que a expressão normalizada do tratamento com auxina é relativizada pela expressão normalizada do tratamento controle. *expressão relativa maior que 2,5

IV. Experimento 4: Avaliação de resposta transcricional a auxina após diferentes tempos de exposição ao tratamento

Foram apresentados acima experimentos em que foi possível observar respostas transcricionais robustas a auxina. Além disso, foi possível observar indicativos de modulação, pelo relógio biológico, das respostas transcricionais a auxinas nas plântulas de cana-de-açúcar analisadas. Antes de realizar um experimento circadiano em maior escala, foi realizado um experimento para verificar dois aspectos: qual o período de tempo de exposição ao tratamento que seria mais adequado para observação das respostas transcricionais a auxina e qual o efeito da reborrifagem sobre as respostas transcricionais observadas nos experimentos anteriores.

O experimento foi realizado da seguinte forma: plântulas de cana-de-açúcar submetidas a condições de claro/escuro foram borrifadas com tratamentos controle ou 80 μ M NAA. As plantas, antes de terem suas folhas removidas e congeladas, ficaram expostas ao tratamento por 30 min, 1 h, 2 h ou 4 h. O tratamento por 4 h, não incluiu reborrifagem em metade do tempo. O experimento foi realizado com três réplicas biológicas, sendo cada réplica composta de um conjunto de três plântulas individuais.

Os resultados da expressão de cinco genes, avaliada por RT-qPCR, são apresentados na figura 14.

Os resultados apresentados mostram que a aplicação de 80 μ M NAA sobre plântulas de cana-de-açúcar apresentou resposta transcricional diferencial mais evidente após 1 h de tratamento, para todos os genes avaliados (fig. 14). De fato, no primeiro experimento apresentado, foi investigado o efeito de aplicação de auxina em plântulas de cana-de-açúcar por diferentes tempos,

Figura 14. Avaliação de expressão gênica de plântulas de cana-de-açúcar tratadas com auxina sintética 80 μ M NAA, ou com tratamento controle (CT), por diferentes períodos de tempo. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão de três réplicas biológicas, sendo que cada réplica biológica é um conjunto de três plântulas individuais. *expressão relativa maior que 2,5.

inclusive 1 h, porém nesse experimento a concentração de auxina utilizada era inferior (20 μ M) à testada no presente experimento (80 μ M).

Além disso, o que se observa na resposta transcricional das plântulas que receberam tratamento por 4 h sem reborrifagem é diferente do que vinha sendo observado anteriormente (figs. 9 e 11), se assemelhando mais à resposta observada após 2 h de tratamento (figura 14).

V. Experimento 5: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de dois ciclos circadianos

A partir dos experimentos apresentados acima, foi proposto um protocolo interessante para avaliação de respostas transcricionais a auxinas em plântulas de cana-de-açúcar: 1 h de exposição a tratamentos controle ou 80 μ M NAA. Considerando que já havia sido previamente observada uma modulação do relógio biológico sobre as respostas a auxina em plântulas de cana-de-açúcar (figura 11), foi montado um experimento circadiano mais abrangente.

Nesse experimento, plântulas de cana-de-açúcar foram transferidas para ambiente em luz constante por 24 h antes do início do experimento. Na primeira hora do segundo dia sob luz constante, as plântulas recebem tratamento controle ou 80 μ M NAA, como padronizado. Os tratamentos foram aplicados, a partir da primeira hora, a cada 4 h por 44 h, ou seja, dois ciclos circadianos. Considerando ZT0 como a primeira hora de luz do segundo dia subjetivo, os tratamentos foram aplicados nos pontos ZT0, ZT4, ZT8, sucessivamente até o ZT44.

Após 1 h de exposição ao tratamento, as plântulas tiveram suas folhas removidas e congeladas, para serem processadas e analisadas por RT-qPCR,

como detalhado na sessão “Métodos e Abordagens”. A normalização dos dados de expressão foi feita usando os valores de expressão dos genes *ScATP1*, *ScTUB* e *Sc60S*. Amostras referentes ao primeiro ciclo circadiano desse experimento foram utilizadas para análises transcriptômicas por *oligoarrays*, como será descrito posteriormente.

Inicialmente foi avaliada a expressão de genes do relógio biológico de cana-de-açúcar (Figura 15). A análise dos valores de expressão dos genes *ScLHY*, *ScTOC1* e *ScPRR7* mostram que o relógio biológico de cana-de-açúcar gera padrões de oscilação robustos, de aproximadamente 24h, como esperado. Também se pode observar que a aplicação de 80 μ M NAA não causa variações nos níveis de expressão desses genes, em relação ao tratamento controle, e não muda o período ou a fase de oscilação dos genes em questão.

Figura 15. Genes do relógio biológico de cana-de-açúcar apresentam oscilações rítmicas robustas de aproximadamente 24 h. Plântulas de cana-de-açúcar foram borrifadas com tratamento controle ou 80 μ M NAA e após 1 h de tratamento as folhas das plântulas foram coletadas para avaliação de expressão gênica por RTqPCR. Os dados apresentados se referem a média $\pm$ desvio padrão de três réplicas biológicas, sendo cada réplica biológica um conjunto de três plântulas individuais.

Foi avaliada a expressão de genes putativamente relacionados ao metabolismo de auxinas em cana-de-açúcar e que apresentaram oscilação circadiana em experimentos anteriores em cana-de-açúcar (Hotta et al., 2013) (Figura 16). De fato, foi possível observar que alguns genes apresentaram níveis de expressão rítmicos ao longo do período de tempo avaliado. Interessantemente, esses genes não apresentaram resposta gênica diferencial após aplicação de 80 μ M NAA.

Também foram analisados os perfis de expressão gênica de *ScGH3b* e *ScPIN1a* (Figuras 17 e 18). Como visto acima, esses genes se tornaram os marcadores de respostas transcricionais a auxina no presente projeto de pesquisa. A análise de expressão de ambos os genes, em condições circadianas, ao longo de 48 h, após aplicação de tratamento controle ou 80 μ M NAA, mostrou resultados interessantes.

Os genes apresentaram resposta diferencial ao tratamento, como esperado, em todos os pontos temporais em que foram avaliados. Os dados de expressão gênica de *ScGH3b* mostram que o gene apresenta variação na intensidade de resposta a 80 μ M NAA, dependendo do horário do dia em que 80 μ M NAA foi aplicada sobre os indivíduos. Os dados mostram uma leve tendência de variação na intensidade de resposta entre os pontos do primeiro ciclo circadiano, com uma grande diferença de resposta quando 80 μ M NAA foi aplicada no ZT16.

Os dados de expressão obtidos para *ScPIN1a*, apesar de apresentarem diferenças de expressão menos evidentes do que as observadas para *ScGH3b*, parecem apresentar oscilação circadiana ao longo dos dois ciclos circadianos.

De fato, a resposta observada entre os pontos ZT4 e ZT12 é um forte indicativo que esse gene tem sua resposta regulada diferencialmente ao longo do dia.

Figura 16. Avaliação da expressão de genes putativamente envolvidos na homeostase de auxinas em cana-de-açúcar ao longo de 44 h em condições circadianas. Plântulas de cana-de-açúcar foram borrifadas com tratamento controle ou 80 μ M NAA e após 1 h de tratamento as folhas foram coletadas para avaliação de expressão gênica por RTqPCR. Os dados apresentados se referem a média $\pm$ desvio padrão de três réplicas biológicas, sendo cada réplica biológica um conjunto de três plântulas individuais.

Figura 17. Avaliação por RTqPCR, em plântulas de cana-de-açúcar sob condições circadianas, dos níveis de expressão de *ScGH3b*, por 44 h, após aplicação de tratamento controle ou com 80 μ M NAA a por 1 h. O nível de expressão de *Sc.GH3b* após aplicação de auxina apresenta-se bastante diferente no ponto temporal ZT16, em relação aos outros pontos temporais. Os dados apresentados se referem a média $\pm$ desvio padrão de três réplicas biológicas, sendo cada réplica biológico um conjunto de três plântulas individuais.

Figura 18. Avaliação por RTqPCR, em plântulas de cana-de-açúcar sob condições circadianas, dos níveis de expressão de *ScPIN1a*, por 44 h, após aplicação de tratamento controle ou com 80 μ M NAA a por 1 h. O nível de expressão de *ScPIN1a* parece ser diferente entre os pontos temporais de cada ciclo circadiano. Os dados apresentados se referem a média $\pm$ desvio padrão de três réplicas biológicas, sendo cada réplica biológico um conjunto de três plântulas individuais.

VI. Experimento 6: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano

A fim de obter confirmação em relação aos resultados obtidos no experimento apresentado na sessão anterior, foi realizado um experimento bastante semelhante ao apresentado anteriormente, apenas com as seguintes alterações: as plântulas de cana-de-açúcar receberam os tratamentos controle ou 80 μ M NAA durante apenas um ciclo circadiano, ou seja, até 20 h após o amanhecer do segundo dia subjetivo; foram utilizadas seis réplicas biológicas por tratamento, sendo cada réplica composta de um conjunto de três plântulas individuais.

A expressão dos genes *ScGH3b* e *ScPIN1a* foi avaliada (figura 19), assim como a expressão de dois genes, anotados como hipotéticos, que apresentaram grande modulação do relógio biológico sobre a resposta transcricional a auxina nos experimentos de *oligoarranjos* (figura 22), como será descrito posteriormente.

Como pode ser observado na figura 19, os dados de expressão para *ScGH3b* e *ScPIN1a* não respondem exatamente como observado em experimentos anteriores, apesar de o padrão de resposta ser mantido. *ScGH3b* apresenta-se com expressão ativada por tratamento com auxina, o que também pode ser apontado para o gene *ScPIN1a*, mesmo que para esse a resposta transcricional tenha sido menor. A resposta de grande ativação transcricional no ZT16 foi observada, mas não foi tão alta como observado no experimento anterior (figura 17), apontando que a resposta observada anteriormente deve-se a variação biológica e/ou experimental.

Figura 19. Dados de expressão por PCR em tempo real de amostras de plântulas de cana-de-açúcar borrifadas com auxina sintética 80 μ M NAA em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano. Os dados de expressão de quatro genes são apresentados à esquerda como dados da expressão normalizados pela expressão de quatro genes constitutivos, e à direita como dados de expressão relativa da expressão normalizada das amostras controle em relação ao grupo tratado com NAA. Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de seis réplicas biológicas, sendo que cada réplica biológica é um conjunto de três plântulas.

Os níveis de expressão diferencial para os dois genes que apresentaram grande modulação de resposta a auxina nos arranjos (figura 22) tiveram pequena

ou nenhuma expressão diferencial nos experimentos de RT-qPCR (figura 19). Apesar das barras de erro impedirem a afirmação com base estatística, ambos os genes apresentaram tendência de resposta a auxina bastante modulada pelo relógio biológico, podendo vir a ser exemplos de *gating* da resposta ao tratamento aplicado.

C. Análise de expressão gênica por *oligoarrays*

Nos experimentos de análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR) apresentados, foi possível observar que as respostas transcricionais a auxina em plântulas de cana-de-açúcar, para um mesmo estímulo, variam de acordo com o momento de um ciclo circadiano em que o estímulo é ofertado. Além disso, os dados apontam que o relógio biológico de cana-de-açúcar tem funcionamento robusto nas plântulas utilizadas.

Posto isso, foi realizada uma análise de expressão gênica por *oligoarrays*, ou oligoarranjos, uma técnica de transcriptômica, ou seja, de verificação de expressão gênica em larga escala (Malone and Oliver, 2011). As amostras utilizadas nessa análise são as amostras geradas no experimento 5, como apresentado na subseção “Experimento 5: Avaliação de respostas transcricionais a auxina em diferentes pontos temporais de dois ciclos circadianos”, dentro da sessão “Métodos e Abordagens”. Dessa forma, foi avaliado globalmente o perfil de expressão de genes de cana-de-açúcar, comparando amostras que receberam tratamento controle ou auxina em seis pontos temporais de um ciclo circadiano.

As amostras foram hibridizadas em uma lâmina 4 x 44 K Agilent contendo 21.901 sondas referentes a transcritos de cana-de-açúcar, como proposto em (Lembke et al., 2012). Desse total de sondas, 14.521 eram referentes a sequências senso e 7.380 a sequências antisense. Na figura 20, pode-se observar a congruência entre alguns dados obtidos do arranjo e dados gerados por RT-qPCR, mostrando que os dados de arranjo e de RT-qPCR geram o mesmo perfil de resposta.

Figura 20. Comparação dos dados gerados por oligoarranjos com dados gerados por RTqPCR. Os dados de arranjo estão identificados de A1 ou A2, dependendo da réplica biológica, Ct ou NAA, dependendo se a réplica recebeu tratamento controle ou com 80 μ M NAA. São apresentados dois dados de arranjo e um de RTqPCR, por tratamento, em cada ponto temporal. Os genes analisados se referem ao metabolismo de auxina, *ScAOX3*, ou ao relógio biológico de cana-de-açúcar, *ScLHY*, *ScTOC1* e *ScPRR7*.

Um total de 282 genes foram identificados como diferencialmente expressos, usando uma modificação do método HTSelf (Vêncio and Koide, 2005), como descrito na sessão Métodos e Abordagens (Figura 21)

Foi possível observar a modulação que o relógio biológico de cana-de-açúcar exerce sobre as respostas transcricionais a auxina (figura 21). Há uma grande variação no perfil de resposta gênica dependendo do horário de aplicação do tratamento. Essa variação é observada tanto no número de genes diferencialmente expressos em cada ponto temporal, assim como no perfil de expressão desses. No ZT4 e no ZT12, a maioria dos genes diferencialmente expressos está reprimida, enquanto que nos ZT8 e ZT16 a maioria desses genes está ativada.

Figura 21. Número de genes diferencialmente expressos em plântulas de cana-de-açúcar após tratamento com auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano. As plântulas foram tratadas com 80 μ M NAA por 1 h, e tiveram as folhas analisadas usando-se oligoarranjos para avaliação de expressão gênica global. Um total de 282 genes únicos apresentaram-se como diferencialmente expressos no experimento.

Para alguns genes foi possível observar um perfil de resposta ao tratamento variando qualitativamente, dependendo do horário do dia em que foi aplicado o tratamento (figura 22). Além disso, fica bastante claro que o ZT16 é o ponto em que a resposta transcricional a auxina é mais intensa, com maior número de genes diferencialmente expressos sendo detectados nesse ponto.

Figura 22. Perfil de expressão de dois genes após tratamento com auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano. Os dados se referem a média da razão de emissão de fluorescência das amostras tratada com veículo em relação às amostras tratadas com auxina. Os dados são apresentados em escala logarítmica e se referem às duas réplicas biológicas usadas no experimento de hibridização de oligonúcleos. Ambos os genes são anotados como hipotéticos.

Para investigar mais a fundo o controle exercido pelo relógio biológico sobre as respostas a auxina em cana-de-açúcar, verificamos os genes diferencialmente expressos a partir de uma classificação funcional. O intuito era acessar se havia funções gênicas mais representadas, assim como o perfil de expressão desses genes. Os genes diferencialmente expressos foram anotados a categorias funcionais a partir de análises de similaridade/identidade com genes de sorgo (*Sorghum bicolor*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis*

thaliana. Os genes foram classificados às categorias funcionais propostas em (Lembke et al., 2012), com adição de uma nova categoria, chamada “Estresse Abiótico”, a qual deve conter genes relacionados especificamente a esse tipo de estresse. A representatividade das categorias funcionais às quais foram classificados os 282 genes diferencialmente expressos em nosso experimento está apresentada na figura 23.

Figura 23. Representatividade de cada classe funcional à qual foram anotados os 282 genes diferencialmente expressos após tratamento com 80 μ M NAA em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano. As classes funcionais apresentadas foram propostas em (Lembke et al, 2012), com exceção da classe “Resposta a estresse abiótico”, proposta nesse experimento.

A classe funcional mais representada entre os genes diferencialmente expressos é a “Transdução de sinal”. Essa categoria engloba genes que codificam para elementos envolvidos em cascatas de sinalização, como receptores, quinases, fosfatases e fatores de transcrição. Diversos genes associados a sinalização por auxinas, como *Aux/IAA*, são encontrados nessa

classe (Figura 24). Interessante notar que a grande maioria desses genes apresentaram expressão diferencial durante a noite subjetiva, no ZT16 (Figura 25).

Figura 24. Representatividade de cada classe funcional à qual foram anotados os genes diferencialmente expressos após tratamento com 80 µM NAA em cada ponto temporal de um ciclo circadiano em que foi aplicado tratamento à plântulas. As classes funcionais apresentadas foram propostas em (Lembke et al, 2012).

A categoria funcional “Resposta a patógeno” também aparece bem representada. Dentro dessa categoria funcional estão genes que, majoritariamente, são expressos em resposta a interação com patógenos e/ou herbivoria; dessa forma, podemos encontrar uma grande quantidade de genes que putativamente codificam para quitinases, endoglucanases, germinas, taumatinas e inibidores de proteases.

Figura 25. Número de genes anotados como relacionados a sinalização celular e que apresentaram, em experimento com oligoarranjos de DNA, expressão diferencial após tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano. Os genes foram classificados em ativado ou reprimido, de acordo com a natureza da regulação da expressão gênica observada.

As outras classes funcionais que mais apresentaram genes diferencialmente expressos foram: “Metabolismo de carboidratos”, composto por transcritos relacionados a metabolismo energético e ao metabolismo de carboidratos associados a parede celular; “Transporte”, composta por transcritos relacionados a transportadores de substratos diversos; “Metabolismo de parede

celular”, composta de transcritos que devem estar majoritariamente associados a alterações na estrutura da parede celular.

Considerando a grande presença de transcritos associados a resposta a patógenos, investigamos mais a fundo as respostas obtidas para essa classe funcional.

A figura 24 mostra que a presença de um grande número de genes relacionados a resposta a patógeno é uma constante ao longo dos dia e noite subjetivos aos quais as plantas estavam expostas, sendo que, no começo do dia subjetivo (ZT0) e no final da noite subjetiva (ZT20), a presença desses genes é menor, assim como o efeito transcricional gerado em resposta a auxina.

Dada a presença de uma grande quantidade de genes relacionados a resposta a patógeno, analisamos, em todos os pontos temporais, o perfil de expressão dos genes relacionados a resposta a estresse biótico (figura 26).

Figura 26. Número de genes anotados como relacionados a resposta a estresse biótico e que apresentaram, em experimento com oligoarranjos de DNA, expressão diferencial após tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano. Os genes foram classificados em ativado ou reprimido, de acordo com a natureza da regulação da expressão gênica observada.

Foi possível observar uma diferença muito grande no perfil de resposta transcricional desses genes, dependendo do horário do ciclo circadiano. Pode-se observar, por exemplo, que no ZT16 a maioria dos genes dessa categoria está ativada, enquanto que no ZT8, a maioria dos genes está reprimida. É interessante notar que, dos 29 genes diferencialmente expressos anotados como relacionados a patógenos, 10 foram considerados diferencialmente expressos em dois pontos temporais distintos. Desses 10, 7 estão com expressão ativada em um momento e reprimida em outro.

5. DISCUSSÃO

O presente projeto de pesquisa tinha por objetivo investigar se o relógio biológico de cana-de-açúcar exerce influência nas respostas a auxinas nesse organismo. Para isso, verificamos se há controle temporal, exercido pelo relógio biológico, sobre as respostas transcricionais a estímulo com auxina no organismo em questão.

A. Avaliação de respostas transcricionais a auxinas em plântulas de cana-de-açúcar

O primeiro objetivo específico concretizado para o desenvolvimento desse estudo foi a padronização de um protocolo robusto, adequado à obtenção de plântulas de cana-de-açúcar em larga escala. As plântulas geradas e usadas nos experimentos relatados ao longo desse estudo foram obtidas a partir de organogênese direta de discos foliares de plantas de cana-de-açúcar adultas, variedade SP80-3280.

O protocolo obtido finalmente estava adequado às nossas necessidades, permitindo a geração eficiente de grandes quantidades de plântulas, em um período de tempo razoavelmente pequeno, com baixa dificuldade manual e baixo custo.

Uma vez padronizado o protocolo para obtenção de plântulas de cana-de-açúcar, iniciamos experimentos visando acessar respostas transcricionais a auxina, no modelo biológico proposto, através de PCR em tempo real precedido de transcrição reversa (RT-qPCR). O objetivo era investigar posteriormente as conexões entre a sinalização por auxinas e o relógio biológico de cana-de-açúcar.

Estabelecido o método de obtenção do material biológico, assim como a forma de processamento dos dados de RT-qPCR, o primeiro experimento proposto visava identificar genes de cana-de-açúcar que poderiam ser marcadores robustos de respostas transcricionais a auxina em plântulas desse organismo. As respostas transcricionais avaliadas nesse projeto de pesquisa foram sempre avaliadas a partir da exposição de plântulas de cana-de-açúcar à auxina sintética ácido 1-naftalenoacético (NAA), a qual apresenta efeito bastante semelhante ao observado para a principal auxina endógena de plantas, o ácido indolacético (IAA) (Hurban et al., 2003; Woodward and Bartel, 2005)

Foi avaliada a expressão diferencial de 30 genes de interesse após a exposição de plântulas de auxina a 20 μ M NAA por diferentes períodos de tempo. Essa concentração foi escolhida por ser considerada uma alta concentração para *Arabidopsis thaliana* (Covington and Harmer, 2007). Apenas após 4 h de exposição pôde-se observar alguma resposta diferencial para 18 genes. Nesse caso, foram considerados diferencialmente expressos os genes cuja expressão normalizada pelos constitutivos no tratamento com auxina, relativamente à expressão normalizada no tratamento controle, foi maior que 1,25 ou menor que 0,75 nas duas réplicas biológicas testadas, ou maior que 2 em pelo menos uma das réplicas biológicas, considerando duas réplicas biológicas (Tabela 7). Os critérios para se considerar os genes diferencialmente expressos foram poucos estridentes porque o protocolo ainda estava em fase de otimização.

Os transcritos avaliados correspondiam a genes putativamente envolvidos no metabolismo e sinalização de auxinas ou a outros aspectos da fisiologia de plantas. A expressão dos 30 genes de interesse foi avaliada a partir de iniciadores disponíveis em nosso grupo de pesquisa assim como por iniciadores

relacionados a genes apontados como indicadores robustos de resposta transcricional a auxina em *A. thaliana* (Nemhauser et al., 2006; Paponov et al., 2008; Wang et al., 2002).

Os genes classificados como diferencialmente expressos nesse experimento, a maioria deles relacionados à homeostase de auxinas ou ao metabolismo de parede celular, (Tabela 7) foram considerados marcadores interessantes para as próximas análises. Na etapa seguinte, 18 genes tiveram seus níveis de expressão avaliados em plântulas de cana-de-açúcar expostas a tratamento controle ou auxina, nesse caso composto de NAA nas seguintes concentrações: 10 μM , 20 μM , 40 μM e 80 μM (Figura 9). As plântulas ficaram expostas ao tratamento por 4 h, com reborrifagem após 2 h da primeira borrifagem do excedente de tratamento acumulado no pote de cultivo das plântulas.

Pôde-se observar que a concentração de 80 μM NAA foi a mais adequada para a observação de uma resposta transcricional evidente, considerada aqui como maior que 2,5x ou menor que 0,5x. De fato, análises de expressão gênica em resposta a diferentes concentrações de auxina em *Arabidopsis thaliana* mostraram que mais genes apresentam expressão diferencial à medida que a concentração de auxina é aumentada, nesse modelo variando entre 0,1 μM e 10 μM (Paponov et al., 2008).

A grande diferença de concentração de auxina aplicada em *Arabidopsis thaliana* e em nosso organismo-modelo é considerada normal. Diversos experimentos realizados com monocotiledôneas, como milho, utilizam concentrações de auxina acima de 200 μM (Battal et al., 2008; Beltran-Pena et al., 2002). As monocotiledôneas e dicotiledôneas têm interações diferentes com

as auxinas, apesar de os mecanismos moleculares de controle da homeostase de auxinas nessas plantas serem mantidos (McSteen, 2010).

Dos quatro genes que apresentaram grande expressão diferencial, três devem estar relacionados ao metabolismo e sinalização de auxinas em cana-de-açúcar: *ScGH3.B*, *ScAux/IAA.A* e *ScPIN1.A*. Os genes *ScGH3b* e *ScAux/IAAa* apresentam grande similaridade a genes que, em outros organismos, são muito sensíveis a tratamento com auxina, respondendo rapidamente a esse hormônio (Paponov et al., 2008; Woodward and Bartel, 2005).

O gene *ScGH3b* deve codificar para uma proteína da família Gretchen Hagen 3, sintetases que promovem a formação de conjugados de auxinas (Staswick et al., 2002). Esses conjugados devem estar associados a armazenamento, liberando hormônio livre a partir de sua hidrólise, transporte e detoxificação do excesso de AIA, pelo direcionamento do hormônio a degradação (Cohen and Bandurski, 1982; Ljung et al., 2001b; Ostin et al., 1998). Os genes que codificam para as proteínas GH3 são estimulados por auxinas (Hagen and Guilfoyle, 1985; Paponov et al., 2008) e, assim como os genes *Aux/IAA*, devem atuar como forma de controle da sinalização resultante da auxina aplicada exogenamente (Ruiz Rosquete et al., 2012; Woodward and Bartel, 2005).

ScPIN1a é um gene de uma família que codifica para transportadores transmembrana, sendo um dos principais componentes a realizar o transporte de auxina para fora da célula. Essas proteínas apresentam grande relevância para a distribuição espaço-temporal desse hormônio, desempenhando papéis fundamentais no desenvolvimento de plantas (Ruiz Rosquete et al., 2012; Strader and Zhao, 2016; Woodward and Bartel, 2005). De fato, o fluxo de auxinas

pelos tecidos está correlacionado à localização dos transportadores PIN1 na membrana plasmática das células (Friml, 2004; Wisniewska, 2006). A expressão de genes que codificam para proteína PIN em resposta ao tratamento com auxina já foi observada, indicando uma provável resposta da planta para promover o fluxo do hormônio pelos tecidos (Paponov et al., 2008; Vieten et al., 2005).

A presença de *ScEXPb* entre os transcritos regulados por auxina é corroborado por dados da literatura. Esse transcrito deve codificar para uma proteína da família das expansinas, envolvidas com afrouxamento da parede celular para crescimento, um processo regulado por auxinas (Hager, 2003; McQueen-Mason et al., 1992). A indução da transcrição de diversos genes dessa família após tratamento com auxina já foi observada em arroz (Ding et al., 2008).

Considerando que algumas variáveis interessantes para a análise de respostas transcricionais a auxinas em plântulas de cana-de-açúcar foram estabelecidas, e que o objetivo principal desse projeto de pesquisa era a análise da modulação do relógio biológico de cana-de-açúcar sobre respostas a auxinas, fizemos um experimento circadiano piloto, em que plântulas de cana-de-açúcar receberam estímulo com auxinas em quatro diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano.

A expressão de 10 genes foi observada (figura 11), sendo que apenas o gene *ScEXPb* não está relacionado à homeostase de auxinas. Os genes *ScAOX3* e *ScTSAb* devem codificar para produtos envolvidos na biossíntese de auxinas (Koshiba et al., 1996; Ouyang et al., 2000; Woodward and Bartel, 2005). Os dados apresentados na figura 11 apontaram para a possibilidade da observação, em cana-de-açúcar, de modulação circadiana, através do fenômeno

de *gating*, sobre as respostas transcricionais a auxinas. Como apresentado acima, no *gating* observa-se respostas diferentes a um mesmo estímulo de acordo com o momento do dia em que o estímulo é ofertado (Hotta et al., 2007).

Antes de montarmos um experimento circadiano definitivo, foi proposto investigar se o tempo de exposição à auxina que estávamos usando era o mais eficiente para verificar respostas transcricionais a auxinas dentro do modelo proposto. Além disso, nos experimentos anteriores as plântulas ficavam expostas ao tratamento por 4 h, com reborrifagem do tratamento excedente na metade do tempo, o que poderia inserir variabilidade no sistema.

Os dados mostrados da figura 14 mostram o perfil de resposta de alguns genes após diferentes períodos de tempo de exposição à auxina. Os resultados obtidos apontam que a resposta transcricional é mais evidente após 1 h de exposição ao tratamento, sendo que tal período de tempo ficou definido para ser utilizado nas análises posteriores.

Os experimentos apresentados até aqui permitiram que fossem definidas um conjunto de medidas experimentais para a observação de respostas transcricionais a auxina robustas em plântulas de cana-de-açúcar: borrifagem de solução tratamento controle ou NAA a 80 μ M. Após 1 h de exposição, as folhas seriam coletadas para as análises. Posto isso, realizamos um experimento circadiano de 44 h em que plântulas de cana-de-açúcar recebiam tratamento controle ou auxina a cada 4 h. O objetivo aqui era observar se as respostas transcricionais variavam ao longo dos dias e noites subjetivos.

Inicialmente, avaliamos a expressão de genes que devem estar relacionados ao relógio biológico de cana-de-açúcar (Hotta et al., 2013). Os genes *ScLHY*, *ScTOC1* e *ScPRR7* foram avaliados por RT-qPCR em todos os

horários dos ciclos circadianos em que as plantas foram coletadas após a exposição ao tratamento (figura 15).

Os três genes apresentados são homólogos de genes componentes do relógio biológico de outros organismos (Matsushika et al., 2000; Nakamichi et al., 2010; Schaffer et al., 1998) e que compõem o oscilador central do relógio biológico de *Arabidopsis thaliana* (Hsu and Harmer, 2014). Esses genes já haviam sido analisados em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, em que o relógio biológico de cana-de-açúcar foi avaliado (Hotta et al., 2013).

Os resultados obtidos mostram que o relógio biológico de plântulas de cana-de-açúcar é funcional, gerando padrões de oscilação robustos de 24 h. Genes avaliados apresentam padrão de expressão dentro do esperado, ou seja, *ScLHY* tem pico de expressão no começo do dia subjetivo, *ScTOC1* tem pico de expressão no começo da noite subjetiva e *ScPRR7* tem pico de expressão no meio do dia subjetivo (Hotta et al., 2013; Hsu and Harmer, 2014).

A aplicação de auxina não causa variações nos níveis de expressão desses genes em relação ao tratamento controle, indicando que, nas condições testadas, a aplicação de auxina não exerce influência sobre a expressão dos genes de relógio biológico estudados. Também não foram observadas diferenças evidentes na fase, período ou amplitude de oscilação dos genes em questão em resposta a auxina. Em experimentos realizados com *A. thaliana*, não foi observada influência de tratamento com auxina sobre os níveis de expressão de genes do relógio biológico desse organismo, mas sim sobre o período e amplitude do relógio quando as plantas estavam expostas continuamente ao tratamento com auxina (Covington and Harmer, 2007).

No trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa (Hotta et al., 2013), foi observada a presença de uma grande quantidade de genes relacionados a homeostase de auxinas que apresentavam oscilação circadiana. A expressão de alguns desses genes também foi avaliada no presente experimento (figura 16). Alguns desses genes aparentaram ter seus níveis celulares oscilando ritmicamente, principalmente no caso de *ScAOX3* e *ScAux/IAAd*. Esses genes apresentaram pico de expressão no mesmo horário do observado no trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (Hotta et al., 2013).

A oscilação rítmica apresentada por tais genes pode ser indicativo de modulação do relógio biológico sobre o metabolismo de auxinas em plantas de cana-de-açúcar. De fato, os genes apresentados estão relacionados a síntese de auxinas (*ScAOX3a*) e a sinalização celular (*ScAux/IAAd*), de forma que seus produtos gênicos podem regular os níveis intracelulares de auxina e a forma como a célula responde a auxina disponível. Interessantemente, esses genes não apresentaram resposta gênica diferencial após aplicação de auxina, o que pode ser significativo sobre o papel dos mesmos para a biologia da planta.

A expressão dos genes *ScGH3b* e *ScPIN1a*, considerados nesse trabalho como marcadores da resposta transcricional investigada, está apresentada nas figuras 17 e 18. Os dados de expressão obtidos para esses genes repetem o que foi observado anteriormente. A expressão observada é controlada pela disponibilidade de auxina, assim como pelo relógio biológico de cana-de-açúcar, uma vez que respostas diferentes são observadas em momentos diferentes do dia. Pode-se usar como exemplo a variação na expressão diferencial do gene *ScPIN1a* nos pontos ZT4 e ZT12. O dado obtido é uma forte evidência de *gating* do relógio biológico de cana-de-açúcar sobre respostas celulares a auxina.

A realização de um experimento circadiano com dois ciclos, ou seja, de 44 h, nos permitiu observar o funcionamento robusto do relógio biológico de cana-de-açúcar, assim como apresentou evidências de que o relógio biológico exerce influência sobre respostas biológicas a auxinas em plântulas de cana-de-açúcar. Para confirmar os resultados obtidos, foi realizado um novo experimento, bastante semelhante ao apresentado, com duas alterações: analisou-se a expressão dos genes ao longo de seis pontos de um ciclo circadiano apenas, e o número de réplicas biológicas foi aumentado para seis. Os dados obtidos para a expressão de alguns genes estão apresentados na figura 19.

Os dados apresentados na figura 19 repetem a forte tendência observada ao longo dos resultados obtidos nesse projeto de pesquisa, de haver regulação diferencial em resposta a auxina, dependendo do momento do dia em que o estímulo é oferecido, confirmando a hipótese de *gating* do relógio biológico sobre essas respostas. Os resultados obtidos apresentam algumas pequenas diferenças em relação ao experimento apresentado anteriormente, demonstrando que há algum nível de variação experimental ou biológica associada às análises, porém a regulação da expressão é mantida.

B. Investigação por oligoarranjos do controle temporal das respostas transcricionais a auxina em cana-de-açúcar

A partir dos dados obtidos, usamos o material biológico referente ao primeiro ciclo circadiano do experimento 5 (ver em Métodos e Abordagens), em que plantas sob condições circadianas foram tratadas com auxina ou controle em diferentes pontos temporais, para realizamos análise de expressão gênica por oligoarranjos. O objetivo era avaliar, em larga escala, quais aspectos da homeostase de auxina poderiam estar sendo influenciados pelo relógio biológico

nesse organismo, ou qual a relevância da modulação observada sobre diferentes aspectos da biologia de cana-de-açúcar.

Foram utilizadas lâminas de oligoarranjos Agilente contendo 43.803 probes relacionadas a transcritos de cana-de-açúcar (Lembke et al., 2012). A comparação entre os níveis de expressão de genes avaliados nos experimentos de RT-qPCR e nos oligoarranjos mostrou que os dados obtidos foram congruentes, dando confiança para o nosso experimento de transcriptômica (figura 20).

Um total de 282 genes foram considerados como diferencialmente expressos, considerando os seis pontos temporais analisados (figura 21). A análise tanto da quantidade de genes diferencialmente expressos em cada ponto temporal, assim como o perfil da regulação da expressão obtidos, ou seja, se os genes foram ativados ou reprimidos a partir do tratamento com auxina, demonstra diversidade na regulação da expressão gênica nos diferentes pontos temporais, reforçando os dados anteriores, confirmando o *gating* do relógio biológico de cana-de-açúcar sobre as respostas transcricionais obtidas nas condições avaliadas. Pode-se observar em alguns casos que a expressão de certos genes apresenta perfil de regulação totalmente oposto dependendo do horário do dia (figura 22).

Para avaliar quais respostas à auxina poderiam estar sendo moduladas pelo relógio biológico de cana-de-açúcar, investigamos o perfil funcional dos genes diferencialmente expressos. Os genes foram divididos em categorias funcionais de acordo com o proposto em (Lembke et al., 2012), mas reanotados a partir de análises de similaridade com os genomas de *Sorghum bicolor*, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*. A classificação funcional dos 282 genes

diferencialmente expressos está descrita na figura 23 (uma tabela contendo os dados referentes a cada transcrito diferencialmente expresso, o perfil de regulação e a anotação gênica é apresentada na sessão Anexos).

Pode-se observar que há um grande enriquecimento de genes em duas classes funcionais: transdução de sinal e resposta a patógenos. Genes pertencentes a esses dois grupos estão entre os principais transcritos diferencialmente expressos em resposta à auxina nos diferentes pontos temporais (figura 24).

A presença de um grande número de genes na primeira categoria é esperada, já que o experimento em questão envolve resposta a um hormônio. De fato, nessa categoria encontram-se genes da família de proteínas Aux/IAA e dois transcritos *SAUR*, envolvidos na sinalização por auxinas (Paponov et al., 2008; Woodward and Bartel, 2005). Esses genes estão com expressão ativada em todos os pontos temporais em que apareceram como diferencialmente expressos, mostrando que a sinalização por auxinas está bastante ativa, como esperado.

Além disso, na categoria “Transdução de sinal” estão presentes transcritos relacionados a proteínas receptoras, proteínas quinases e fosfatases e diversos fatores de transcrição, indicando que o tratamento com auxina deve promover diversos eventos relacionados à sinalização celular e mudança no metabolismo celular (Contreras-Cornejo et al., 2015; DeLong et al., 2002; Enders et al., 2017; Liao et al., 2017; Mishra et al., 2006; Nan et al., 2014; Steinwand et al., 2014).

Entre os transcritos relacionados a fatores de transcrição, a presença de um grande número de elementos putativamente codificadores de proteínas

Aux/IAA aponta o direcionamento do organismo em se adequar ao estímulo ofertado. Essas proteínas representam, juntamente com as proteínas GH3, uma via de retroalimentação negativa importante na homeostase de auxinas, regulando as primeiras respostas transcricionais a auxina (Benjamins and Scheres, 2008; Lavy and Estelle, 2016). Como a presença de auxina tanto aumenta a degradação de proteínas Aux/IAA como induz a expressão de genes *Aux/IAA*, um novo perfil de atuação celular dessas proteínas deve ser estabelecido, permitindo à planta responder adequadamente a variações na concentração de auxina (Paponov et al., 2008).

Três transcritos codificando putativamente para fatores de transcrição da família APETALA 2/ethylene response element binding protein (AP2/EREBP), apresentaram-se diferencialmente expressos no ZT16, dois reprimidos e um ativado. Fatores de transcrição dessa família, originalmente associados a respostas transcricionais a etileno, estão amplamente associados a respostas gênicas a hormônios, açúcar e sinalização redox em contexto de estresse abiótico (Chang and Shockey, 1999; Dietz et al., 2010).

C. Evidências em plântulas de cana-de-açúcar de conexão entre respostas a patógenos e estímulo com auxina em contexto circadiano.

A segunda classe funcional mais representada por genes diferencialmente expressos após tratamento com auxinas foi “Resposta a patógenos”. Dos 29 genes anotados nessa categoria, 21 devem codificar para um grupo de proteínas relacionadas à patogênese, também chamadas proteínas PR (do inglês *Pathogenesis Related*). Essas proteínas são amplamente encontradas em plantas, inclusive cana-de-açúcar, e sua principal característica

é a de serem expressas em resposta a patógenos, estando praticamente ausentes em outras condições (Rutherford, 2013; Sels et al., 2008; van Loon et al., 2006). Essas proteínas PR têm sua síntese estimulada como parte de um conjunto de defesas celulares induzidas em resposta a efetores liberados por patógenos durante o processo de patogênese (Durrant and Dong, 2004; Slusarenko et al., 2000; van Loon et al., 2006).

As proteínas PR já foram identificadas em resposta a infecção por fungos, oomicetos, bactérias e vírus, e a ataques de insetos e nematódeos (Cornelis van Loon, 1999; Souza et al., 2017; van Loon et al., 2006). Essas proteínas também foram detectadas em plantas após aplicação de substâncias que mimetizassem o efeito de ataque por um patógeno ou em resposta a injúrias que produzissem proteínas que se acumulam durante uma infecção (Sels et al., 2008).

Entre os transcritos diferencialmente expressos nos nossos arranjos e que estão relacionados a proteínas PR, podemos encontrar cinco genes que devem codificar para quitinases assim como um gene que deve codificar para uma proteína envolvida na percepção de quitina. Quitinases são enzimas que hidrolisam ligações β -1,4 entre resíduos de N-acetilglicosaminas que compõem o polissacarídeo quitina. Esse polissacarídeo é o principal componente da parede celular de fungos e do exoesqueleto de invertebrados (Datta et al., 1999; Minic, 2008). As quitinases hidrolisam a quitina e dessa forma inibem o crescimento de fungos (Schlumbaum et al., 1986). Nesse processo, os oligossacarídeos gerados também podem ser usados pelas plantas como sinalizadores de infecção por patógenos (Ferreira et al., 2007).

Em cana-de-açúcar, as quitinases estão associadas a estresses bióticos e abióticos (Su et al., 2015). Nesse organismo, foi observada a ação dessas

enzimas contra o fungo *Fusarium solani* var. *coeruleum* e em resposta a ataque pela mariposa *Diatraea saccharalis* (Medeiros et al., 2012; Que et al., 2014). Além disso, também foi observado expressão diferencial de transcritos codificando para quitinases após inoculação com diferentes fungos (Lin et al., 2010; Rahul et al., 2015; Ramesh Sundar et al., 2008).

Outro grupo de proteínas PR encontradas como diferencialmente expressas em nossos arranjos são β -1,3-endoglucanases; foram identificados quatro transcritos que devem codificar para essas proteínas. Essas enzimas catalisam a clivagem hidrolítica de ligações glicosídicas do tipo β -1,3 (Leubner-Metzger and Meins, 1999). Os produtos liberados de sua ação enzimática, assim como no caso das quitinases, tem capacidade de induzir respostas de defesa em plantas (Ferreira et al., 2007; Minic, 2008; Okinaka et al., 1995; Sharp et al., 1984). Em cana-de-açúcar, já foi observada expressão diferencial de genes codificando para β -1,3-glucanases após inoculação com diferentes fungos (Prathima et al., 2013; Su et al., 2013).

É interessante observar que a atuação conjunta de quitinases e β -1,3-glucanases apresenta atividade antifúngica *in vitro*, podendo ser relevante para efetividade dessas enzimas *in vivo* (Schlumbaum et al., 1986; Theis and Stahl, 2004).

Entre os transcritos anotados como relacionados a resposta a patógenos, encontramos quatro transcritos que devem codificar para proteínas semelhantes a taumatina, ou proteínas TLP (do inglês, *Thaumatococcus*-*Like Protein*) (van der Wel and Loeve, 1972). Essas proteínas são induzidas por estresses bióticos e abióticos (Rajam et al., 2007), e devem ter atuação antifúngica a partir do rompimento da membrana plasmática desses patógenos ou de quebras de

ligações β -1,3 da parede celular (Ferreira et al., 2007; Grenier et al., 1999; Roberts and Selitrennikoff, 1990). Proteínas TLP foram induzidas em cana-de-açúcar após tratamento com uma glicoproteína extraída de fungo e por ataque de *D. saccharalis* (Ramesh Sundar et al., 2008; Rocha et al., 2007).

Um transcrito relativo a inibidores de peptidases e dois transcritos a germinas, ambos relacionados a resposta contra patógenos, também foram identificados. Inibidores de peptidases do grupo PR-6 de proteínas PR são serina proteases relacionadas a uma proteína de tomate (Glazebrook, 2005). São importantes para o controle da atividade de peptidases endógenas e exógenas, sendo que seu papel de defesa é o de inibir peptidases secretadas por fungos e organismos patogênicos (Christeller and Laing, 2005; Haq et al., 2004). Inibidores de peptidases apresentam indução transcricional após inoculação com microrganismos, ataque de inseto e injúria. Também foi observada atividade antifúngica, *in vitro*, para uma proteína desse grupo, assim como aumento da resistência a patógeno de uma linhagem transgênica de *A. thaliana* que apresentava expressão aumentada de um gene PR6 endógeno (Chassot et al., 2007; Sels et al., 2008; Souza et al., 2017).

Germinas são proteínas típicas de monocotiledôneas, pertencentes a famílias de oxalato oxidases com atividade de superóxido dismutases que devem estar envolvidas em reações de defesa (Bernier and Berna, 2001; Dunwell et al., 2008; van Loon et al., 2006). Transcritos relacionados à germinas já foram apontados como induzidos, em plantas, por interação com bactérias endofíticas ou patogênicas, além de contribuírem para a resistência a patogênese em trigo e cevada (Christensen et al., 2004; Dunwell et al., 2008).

Também foram observados três transcritos de genes R, responsáveis por imunidade induzida por efetores. Esses genes codificam para proteínas que reconhecem direta ou indiretamente efetores de patógenos e promovem resposta de defesa (Dalio et al., 2017; Win et al., 2012).

Os outros transcritos relacionados a patogênese encontrados como diferencialmente expressos em resposta a auxina nos nossos arranjos devem codificar para proteínas induzidas por injúria, uma peroxidase, uma proteína rica em prolina e receptores celulares, entre outros.

A figura 26 mostra o perfil de expressão, ao longo dos pontos temporais analisados, dos genes anotados como relacionados a resposta a patógenos. Chama atenção como há uma grande variação no perfil de expressão desses dependendo do momento do dia: durante o dia subjetivo, observa-se uma maior tendência a repressão desses genes, enquanto que, durante a noite subjetiva, além de se observar a presença maior de um número de genes diferencialmente expressos, a maior parte dos genes estão induzidos. Dos 29 genes diferencialmente expressos anotados como relacionados a patógenos, 10 foram considerados diferencialmente expressos em dois pontos temporais distintos. Desses 10, 7 estão com expressão ativada em um momento e reprimida em outro, deixando bastante claro como o relógio biológico de cana-de-açúcar, através do estímulo por auxinas, exerce um controle intenso e preciso sobre genes relacionados a estresse biótico.

Os outros grupos funcionais mais representados nos nossos arranjos foram, respectivamente, metabolismo de carboidratos, transporte e metabolismo de parede celular (figura 23). É interessante notar que, entre os genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, genes como 6-fosfofrutoquinase

e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase estão com expressão ativada no ZT16, ponto temporal em que o maior número de genes relacionados à resistência a patógenos estão ativados. Esses genes codificam para proteínas da via glicolítica, via central de obtenção de energia. Dados da literatura apontam que, plantas que estão sobre algum tipo de estresse biótico apresentam genes de fotossíntese reprimidos e metabolismo primário ativado (Amrine et al., 2015; Bilgin et al., 2010; Bolton, 2009; Pechanova and Pechan, 2015; Voll, 2011). De fato, três genes relacionados à captação de luz apresentaram expressão diferencial nos nossos arranjos, os três reprimidos, sendo dois deles no ponto temporal ZT16.

Um gene codificando para uma galactoquinase, responsável por converter galactose em glicose-1-fosfato (Frey, 1996), e um para uma fosfoenolpiruvato carboxilase, responsável pela conversão de fosfoenolpiruvato em oxaloacetato nos processos de respiração CAM e C4 (Kai et al., 2003; Keeley and Rundel, 2003) também apresentam expressão ativada nesse ponto temporal, indicando que a planta deve estar direcionando seu metabolismo para o metabolismo primário; até mesmo um gene codificando para uma fosfoenolpiruvato carboxilase quinase, responsável por ativar a atividade de sua enzima alvo (Izui et al., 2004), também se encontra ativado em ZT16. Acredita-se que o combate à infecção demanda energia e por isso observa-se aumento de atividade, por exemplo, de enzimas relacionadas à respiração celular (Kangasjarvi et al., 2012). Também encontramos um gene reprimido em ZT16 codificando para uma β -amilase, o que pode indicar que a planta está reprimindo o uso de seus estoques energéticos.

Entre os genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, vários podem estar relacionados ao metabolismo de parede celular. A parede celular é uma estrutura que recobre a parede celular de todas as células vegetais, apresentando uma estrutura complexa composta de diversos carboidratos e glicoproteínas, dando estrutura ao corpo vegetal e servindo de barreira contra estresses bióticos e abióticos (Carpita and Gibeaut, 1993; Malinovsky et al., 2014; Nafisi et al., 2015). No grupo de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos encontramos vários transcritos relacionados às glicosil transferases e glicosil hidrolases, as quais devem estar relacionadas, respectivamente, à síntese e à quebra de carboidratos (Minic, 2008). Respostas relacionadas à alterações na parede celular devem ser esperadas já que as auxinas influenciam a expressão e atividade de enzimas modificadoras de parede celular (Nafisi et al., 2015). Sabe-se, por exemplo, que auxinas podem promover a acidificação do apoplasto a partir da ativação de enzimas bombeadoras de prótons, e esse processo ativa expansinas, as quais promovem o relaxamento da parede celular, permitindo a expansão celular (McQueen-Mason et al., 1992; Nafisi et al., 2015; Rayle and Cleland, 1992).

Nos nossos arranjos, entre os transcritos relacionados a metabolismo de parede celular, estão presentes três expansinas, todas ativadas; duas delas, com expressão diferencial no ZT16. Também foram encontrados dois transcritos de celulose sintase, ambos reprimidos, e dois transcritos de xiloglicano endrotransglicosilase/hidrolase, ambos ativados, indicando que a resposta à auxina envolve alterações na parede da estrutura celular.

Além desses genes, no grupo de transcritos relacionados ao metabolismo de parede celular, também foram observados genes relacionados à via de

biossíntese de fenilpropanóides. Fenilpropanóides são compostos produzidos a partir de fenilalanina e tirosina em plantas e que podem gerar compostos com funções variadas, como proteção contra UV, fortalecimento estrutural e produção de pigmentos, fitoalexinas e moléculas sinalizadoras (Gray et al., 2012; Liu et al., 2015; Vogt, 2010). Os transcritos dessa via que apresentaram expressão diferencial após tratamento com auxina parecem estar relacionados a fortalecimento estrutural a partir da síntese de lignina, um polímero fenólico depositado na parede celular e que provê fortalecimento pra parede celular, além de impermeabilização (Malinovsky et al., 2014). Interessantemente, em resposta a estresse biótico, as plantas produzem lignina para fortificação da parede celular, impedindo a invasão de microrganismos. Além disso, compostos fenólicos que atuam contra microrganismos também são produzidos a partir da via de biossíntese de fenilpropanóides (Chassot et al., 2007; Hüchelhoven, 2007; Malinovsky et al., 2014; Nafisi et al., 2015; Sels et al., 2008; Voll, 2011).

Outra evidência também pode ser apontada como potencialmente relacionada ao efeito da auxina sobre a resposta a patógeno da forma como estamos observando. Ao longo da anotação dos genes diferencialmente expressos, alguns dos genes com maior similaridade/identidade em milho e em *Arabidopsis* foram analisados no servidor Uniprot. Duas ferramentas usadas por esse servidor, chamadas ExpressionAtlas e GeneVisible, apontam experimentos de microarranjos em que dado gene de milho ou *Arabidopsis* foi identificado como diferencialmente expresso. Esses experimentos de microarranjos puderam ser classificados, de forma simplista, nas seguintes classes: resposta a estresse biótico, resposta a estresse abiótico, homeostase hormonal e mutantes de desenvolvimento. Transcritos de cana-de-açúcar cujo gene correspondente em

milho ou *Arabidopsis* apareceram em arranjos foram citados 61 vezes em experimento relacionados a estresse biótico, 47 vezes em experimentos relacionados a estresse abiótico, 27 vezes em experimentos de resposta hormonal e 25 vezes em experimentos com mutantes de desenvolvimento. É importante frisar que os dados de microarranjos disponíveis nessas ferramentas de internet são apenas indicativos e precisariam ser validados experimentalmente antes de uma conclusão definitiva.

O fato do padrão de resposta observado variar de acordo com o momento do dia em que o estímulo com auxina é ofertado, é evidência definitiva de *gating*, ou seja, o relógio biológico de cana-de-açúcar exerce influência concreta sobre as respostas biológicas a auxina. Além disso, o conjunto de dados obtidos nas análises por oligoarranjos de resposta transcricional a auxina em plântulas de cana-de-açúcar aponta para uma interação entre o relógio biológico e a sinalização por auxinas atuando sobre respostas a patógenos.

A observação do perfil funcional dos transcritos diferencialmente expressos em resposta a auxina nas plântulas de cana-de-açúcar aponta claramente como o estímulo com auxina está diretamente relacionado ao controle das respostas a patógeno em diferentes momentos do dia. A presença de um grande número de transcritos da família PR, ou seja, que codificam para proteínas induzidas especificamente em situações de resposta a patógenos ou situações relacionadas (Rutherford, 2013), é um forte indicativo do controle exercido. Apesar de algumas dessas proteínas terem sido observada em situações não-patológicas (van Loon et al., 2006), a presença de vários transcritos codificando para quitinases, proteínas as quais estão diretamente relacionadas a interação com organismos envolvidos em estresse biótico, em

conjunto com vários outros transcritos relacionados ao combate a patógenos nos diz que a resposta a auxina que estamos observando está relacionada ao controle da interação com patógenos. Além disso, muitos dos transcritos relacionados a metabolismo de carboidratos e de parede celular, assim como a receptores ou genes R, todos com dados na literatura apontando grande conexão com respostas de defesa a patógenos, também se apresentaram diferencialmente expressos após estímulo com auxinas.

As plantas estão constantemente expostas a diversos patógenos, os quais podem gerar grandes prejuízos econômicos, além do impacto ecológico (Kangasjarvi et al., 2012). Logo após a percepção de invasão por patógenos, os tecidos vegetais apresentam uma extensa reprogramação transcricional de genes envolvidos com sinalização hormonal, apontando o papel essencial dessas moléculas na resposta de defesa (De Vos et al., 2005).

A literatura científica aponta o controle hormonal sobre respostas a patógenos como estando majoritariamente ligado aos hormônios jasmonato, salicilato e etileno (Bari and Jones, 2009; Pieterse et al., 2012). Linhagens mutantes de *Arabidopsis thaliana* afetadas na produção ou sinalização dos três hormônios citados apresentaram-se suscetíveis a infecção por patógenos específicos (Kunkel and Brooks, 2002; Thomma et al., 2001). Além disso, esses hormônios também apresentam relevância para resistência contra patógenos de outros hospedeiros e na resistência mediada por genes R (Ezekowitz and Hoffman, 2003; Thordal-Christensen, 2003).

Os patógenos, por sua vez, podem se utilizar da sinalização hormonal das plantas como forma de contornar a resposta de defesa das plantas. Dessa forma, organismos patogênicos podem, por exemplo, suprimir as respostas de defesa

induzidas por alguns hormônios, ou podem se utilizar das vias de desenvolvimento e alocação de nutrientes, também controladas por alguns hormônios, para facilitar seu estabelecimento e disseminação na planta (Ludwig-Müller, 2015; Ma and Ma, 2016). Também foi observado que patógenos com diferentes estratégias de infecção podem direcionar seus esforços para o controle da sinalização de uma mesma via hormonal (Kangasjarvi et al., 2012; Ma and Ma, 2016; Tsuda et al., 2009).

De modo geral, pode-se dizer que as respostas de defesa a patógenos biotróficos é regulada pelo hormônio ácido salicílico, enquanto que as respostas de defesa a patógenos necrotróficos são realizadas pela sinalização por hormônios jasmonato e etileno (Atamian and Harmer, 2016; Glazebrook, 2005; Pieterse et al., 2012). Apesar de esse ser o padrão, tem sido observado que esses hormônios devem atuar em sinergia, com um hormônio tendo apenas mais influência do que outros.

Apesar de ser um hormônio com grande atuação sobre a biologia de plantas, as auxinas são majoritariamente consideradas como hormônios relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas. Entretanto, mais recentemente, dados da literatura já trazem auxina como relevante também na resistência a patógenos, tanto biotróficos como necrotróficos (Llorente et al., 2008; Mutka et al., 2013; Navarro et al., 2006; Qi et al., 2012; Robert-Seilaniantz et al., 2011). A resposta de defesa relacionada a auxina pode se dar através das vias de crescimento reguladas por esse hormônio de crescimento, ou devido ao grande nível de intercomunicação entre as auxinas e as diferentes vias de sinalização hormonal (Ma and Ma, 2016). Mais especificamente, a sinalização por auxinas pode favorecer a infecção devido seu efeito de afrouxamento da

parede celular, ou pela abertura de estômatos, ambos facilitando a penetração de patógenos, ou pela inibição da sinalização de defesa por salicilato (Fu et al., 2015).

O que se observa é que a auxina deve atuar como um regulador negativo de resistência a patógenos biotróficos, mas como um regulador positivo de resistência a patógenos necrotróficos (Fu and Wang, 2011; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Altas concentrações de auxinas suprimem as defesas mediados por ácido salicílico, favorecendo a infecção por patógenos biotróficos (Fu and Wang, 2011; Kazan and Manners, 2009). De fato, a inibição da via de sinalização de auxinas é parte da sinalização por salicilato induzida no hospedeiro por patógenos biotróficos (Qi et al., 2012). No caso de *A. thaliana* infectada pelo fungo necrotrófico *Alternaria brassicicola*, observa-se que a planta aumenta a produção de auxina, o que leva à indução de genes de defesa da via de jasmonato (Qi et al., 2012). Além disso, nesse estudo, linhagens de *Arabidopsis* mutantes para diversos aspectos da homeostase de auxina apresentaram-se mais suscetíveis à infecção pelo fungo (Qi et al., 2012). Entretanto, em alguns casos, como na infecção de *A. thaliana* com Cucumber Mosaic Virus (CMV), a atuação de auxina e de ácido salicílico é sinérgica (Likić et al., 2014).

No trabalho publicado por Robert-Seilaniantz et al. (2011), foi observado que o efeito da sinalização de auxina na interação planta-patógeno não é unicamente baseado no balanço entre as concentrações de jasmonato e ácido salicílico. Foi observado que altas ou baixas concentrações de auxina não causavam um grande efeito constitutivo nos níveis de jasmonato ou salicilato. A importância da auxina para a interação planta-patógeno ocorrendo por um meio independente de salicilato também foi observada em (Mutka et al., 2013).

Alguns patógenos promovem uma alteração da sinalização por auxinas no hospedeiro como forma de conseguir estabelecer uma interação (Naseem et al., 2015). Em casos de super-expressão do receptor de auxina AFB1 em *A. thaliana*, observou-se diminuição da concentração de ácido salicílico nos tecidos e um aumento da suscetibilidade a patógeno biotrófico (Robert-Seilanianz et al., 2011). Nesse mesmo trabalho, verificou-se que um microRNA, responsável pela degradação do mRNA que codifica para um receptor de auxina, é um regulador positivo da defesa contra o patógeno biotrófico *Hyaloperonospora arabidopsidis*, mas um regulador negativo da defesa contra o patógeno necrotrófico *Alternaria brassicicola*. Em alguns casos, efetores produzidos pelos patógenos promovem a diminuição da sinalização por auxinas. Em (Navarro et al., 2008), observou-se o controle sobre um microRNA, o qual contribui com a resposta de defesa inibindo a expressão de um receptor de auxina. Outro efector, produzido por *P. syringae*, promove aumento da síntese de auxina, dessa forma promovendo a degradação das proteínas Aux/IAA e a consequente indução da expressão gênica em resposta a auxina (Chen et al., 2007; Cui et al., 2013).

No trabalho publicado por Cui et al. (2013), uma linhagem mutante de *A. thaliana* que apresentava uma forma mutante da proteína IAA7, mais estável, tinha maior resistência a infecção por *P. syringae*. O efector HopM1, também produzido por *P. syringae* deve promover uma desorganização do transporte polar de auxina, aumentando a suscetibilidade da planta a infecção (Nomura, 2006). Alteração na homeostase de auxina através de comprometimento do transporte desse hormônio também é observado pela atuação do efector PSE1 de *Phytophthora parasítica* (Evangelisti et al., 2013).

Outro aspecto da relação entre auxinas e patogênese está baseado na capacidade de diversos microrganismos de produzir auxina, sendo que as vias de biossíntese nesses organismos são bastante similares às vias de biossíntese observadas em plantas (Fu et al., 2015). Alguns patógenos são capazes de produzir auxinas e se utilizam disso, liberando grandes concentrações de auxina em seus hospedeiros para torna-los mais suscetíveis a infecção (Naseem et al., 2015). Por exemplo, *Pseudomonas syringae* e bactérias tumorigênicas sintetizam e liberam auxinas como parte da estratégia de desenvolvimento das galhas (Kazan and Lyons, 2014). No caso da infecção de brassicaceas pelo protista biotrófico *Plasmodiophora brassicae*, observa-se um aumento na concentração de auxina na planta, mas esse hormônio é produzido pela própria planta (Ludwig-Müller, 2015).

Por outro lado, o papel do relógio biológico sobre as respostas de defesas a patógenos em plantas já havia sido proposto a partir da observação de que vários genes relacionados à defesa apresentavam-se regulados pelo relógio biológico (Roden and Ingle, 2009; Sauerbrunn and Schlaich, 2004; G.-Y. Wang et al., 2011; Wang et al., 2001; Weyman, 2005). Evidências têm se acumulado colocando o relógio biológico como atuante integral dos mecanismos de defesa contra patógenos e pestes (Lu et al., 2017). O relógio biológico deve coordenar respostas imunes, pois indivíduos com relógios biológicos não-funcionais apresentam problemas nas respostas a patógenos. Isso indica que o relógio biológico é importante para controle do desenvolvimento e do uso de recursos, assim como para uma resposta adequada a estresses bióticos em determinados momentos do dia ou noite (Lu et al., 2017).

Como as plantas podem ser expostas a patógenos e pestes em diferentes horários do dia, faz sentido que tenham sido selecionados mecanismos que antecipem um estresse biótico e dessa forma controlem quando uma resposta de defesa deve ser expressa, aos moldes do mecanismo de *gating* (Lu et al., 2017). De fato, alguns trabalhos mostram que a ativação de respostas de defesa em horários inadequados tem efeitos negativos, e que a expressão constitutiva de mecanismos de defesa pode levar a redução do ciclo de vida da planta ou a redução de sua biomassa (Banday and Nandi, 2015; Lorrain, 2003; G. F. Wang et al., 2011).

Vários trabalhos mostram a inter-relação entre o relógio biológico e respostas de defesa. No trabalho publicado por Wang et al. (2011), observou-se que a expressão de diversos genes de defesa apresentava pico de expressão coincidindo com o momento de esporulação e disseminação de esporos de fungos. Estudos de microarray, por exemplo, mostram que genes relacionados à resposta a flg22, uma substância que representa um padrão molecular reconhecido por plantas como relacionado a um patógeno, apresentam expressão controlada pelo relógio biológico (Lu et al., 2017). Em outro trabalho, uma linhagem mutante para o gene *lux*, componente do relógio biológico de *A. thaliana*, apresentou resposta temporal a flg22 alterada (Korneli et al., 2014).

A resistência de *A. thaliana* ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* também é dependente do horário do dia, necessitando de diversos genes do relógio e da sinalização por jasmonato (Hevia et al., 2015; Roden and Ingle, 2009). Também foi observado que genes do relógio, como *CCA1*, *LHY* e *PRR7* são induzidos por NPR1, um fator de transcrição diretamente relacionado a respostas de defesa a

patógenos, devendo estar envolvidos em *gating* de respostas imunes em condições de estresse (Zhou et al., 2015).

No trabalho publicado por Zhang et al. (2013), observou-se que a aplicação de *P. syringae* em diferentes momentos do dia resultava em crescimento diferencial da população de bactérias dentro da planta. Além disso, linhagens mutantes para a expressão dos genes *CCA1* e *LHY* tinham resistência comprometida ao patógeno em questão, apontando uma relação direta do relógio biológico de *Arabidopsis* na regulação das respostas de defesa. Além disso, reforçando a conexão entre o relógio biológico e as respostas de defesa, o tratamento com flg22 podia afetar a atuação do relógio biológico, o que não foi observado para o hormônio salicilato, responsável por várias respostas de defesa (Zhang et al., 2013).

Os dados obtidos no presente projeto de pesquisa apresentam evidências de que o relógio biológico de cana-de-açúcar está modulando as respostas a auxinas e, dessa forma, pode exercer controle sobre a resposta a patógenos. Dados apresentados na literatura apontam que tanto o relógio biológico como a sinalização por auxinas são relevantes para a resistência à patógenos em *Arabidopsis* (Llorente et al., 2008; Mutka et al., 2013; Navarro et al., 2006; Qi et al., 2012; Robert-Seilantantz et al., 2011; W. Wang et al., 2011; Zhang et al., 2013), porém a interação dessas duas vias influenciando a resposta a estresse biótico nunca foi documentada. Evidências apontam que, tanto o ataque de patógenos, como vias hormonais relacionadas às respostas de defesa podem modular a atividade do relógio biológico de plantas, de forma que o controle que os patógenos exercem sobre uma dada via hormonal pode afetar o relógio

biológico; a via de sinalização por jasmonato, por exemplo, é regulada pelo relógio biológico. (Lu et al., 2017).

O padrão de modulação observado nos resultados obtidos levanta questionamentos interessantes. Por exemplo, observou-se que uma proporção razoável dos transcritos relacionados à resposta a patógenos tiveram expressão modulada principalmente no ZT8 e no ZT16, os quais correspondem respectivamente ao final do dia subjetivo e ao meio da noite subjetivo, considerando que as plantas estavam em condições de luz e temperatura constantes. Muitos desses genes apresentaram-se reprimidos no ZT8, mas ativados no ZT16 (figura 26). Mais estudos são necessários para se compreender a natureza dessa resposta, mas alguns dados da biologia de cana-de-açúcar podem estar associados à resposta observada. Como exemplo, temos que uma das principais pragas que atacam as plantações de cana-de-açúcar é representada por mariposas da espécie *Diathraea saccharalis*. Parte do dano causado por essa mariposa está relacionado à herbivoria, que gera buracos nos colmos das plantas. Diversos fungos oportunistas, como *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, se aproveitam desses buracos para invadir os tecidos das plantas, dessa forma causando grandes prejuízos econômicos (Ogunwolu et al., 1991). Parte da resposta de defesa à herbivoria por *Diatraea saccharalis* envolve a indução da expressão de um transcrito com domínio Barwin, o qual apresenta atividade antifúngica (Franco et al., 2014; Medeiros et al., 2012), mas não apresenta atividade inseticida (Medeiros et al., 2012). Entre os transcritos relacionados a defesa a patógeno que foram encontrados como diferencialmente expressos nos nossos arranjos, encontramos um transcrito que deve codificar para uma proteína com domínio Barwin. Esse transcrito encontra-se com

expressão ativada no ZT16, ou seja, durante a noite subjetiva. Sabe-se que mariposas da espécie *D. saccharalis* apresentam comportamento noturno (Joyce et al., 2014), de forma que podemos estar observando um controle do relógio biológico para prevenção de ataques oportunistas de fungos a partir da atividade de herbivoria de uma mariposa.

Ainda reforçando a conexão entre a resposta de auxina que observamos em nosso projeto de pesquisa, outros trabalhos mostraram que auxina modula os níveis de expressão de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) (Kazan and Manners, 2009). Por outro lado, plantas superexpressando o gene *GH3.1*, pertencente à mesma família do gene *ScGH3b*, um dos que mais respondem a auxina em nossos experimentos, apresentam aumento de resistência contra o fungo *Magnaporthe oryzae*, sendo que esse aumento de resistência deve estar associado a ativação da expressão de genes de defesa (Domingo et al., 2009). Nesse mesmo trabalho, a ativação da expressão de outros genes da família GH3 promoveu a diminuição da concentração de auxina livre e aumento da concentração de auxina ligada a glutamato, o qual deve ser um complexo destinado a degradação de auxina (Woodward and Bartel, 2005). Em consequência, foi observado aumento de resistência a três diferentes patógenos, provavelmente a partir da diminuição dos efeitos das expansinas sobre a parede celular (Domingo et al., 2009; Fu and Wang, 2011). Já foi discutido que, provavelmente, as plantas devem responder a altas concentrações de auxina como uma estratégia de combate a infecções (Navarro et al., 2006).

Além disso, um estudo recente realizou análises transcriptômicas por RNA-seq em amostras de cana-de-açúcar infectadas com a bactéria patogênica

Acidovorax avenue (Santa Brígida et al., 2016). Nesse trabalho, foram observados que os genes mais induzidos em resposta a infecção foram uma taumatina e um inibidor de protease, transcritos que devem codificar para proteínas PR e cujos genes homólogos em nossa variedade de cana-de-açúcar apresentaram-se ativados em resposta a auxina durante a noite subjetiva (ZT16).

Mais estudos são necessários para discutir precisamente o controle exercido pelo relógio biológico de cana-de-açúcar sobre as respostas a auxina, assim como o efeito desse controle sobre respostas a patógenos, porém os resultados obtidos no presente estudo trazem evidências desse controle, levantando questões interessantes a serem avaliadas posteriormente.

A análise transcriptômica de resposta a auxina dentro de um ciclo circadiano não foi realizada por nenhum grupo de pesquisa, até onde sabemos, de forma que apresentamos um conjunto de dados novos e relevantes. O efeito sobre a resposta a patógenos que pode estar sendo exercido pelo relógio biológico de cana-de-açúcar, através do metabolismo de auxinas, é extremamente relevante e pode trazer perspectivas interessantes para a biologia de cana-de-açúcar.

6. CONCLUSÃO

O presente projeto de pesquisa visou avaliar as respostas transcricionais de auxinas, assim como a interação dessas respostas com o relógio biológico desse organismo. Foi montando um sistema de resposta transcricional a auxina usando RT-qPCR de material plântulas de cana-de-açúcar sendo estimuladas pela borrifagem de auxina sintética NAA.

Em um experimento circadiano abrangente foi verificado a modulação das respostas a auxinas pelo relógio biológico de cana-de-açúcar. Esse fenômeno é chamado de *gating*, sendo uma das formas através das quais o relógio biológico aumenta a adaptabilidade dos organismos. Investigamos o perfil de expressão global, usando oligoarrays, no experimento circadiano citado. Observa-se grande modulação na expressão de genes relacionados a sinalização celular e a resposta contra patógenos.

A quantidade de genes de resposta a patógenos, os perfis de expressão observados, assim com a presença de outros genes diferencialmente expressos, indicam que estamos observando um controle do relógio biológico sobre as respostas de auxinas que deve afetar diretamente as respostas a patógenos no organismo em questão. Será necessário investigar mais profundamente o controle transcricional observado, assim como as variações às quais ele pode estar sujeito. Em último caso, seria interessante avaliar, *in vivo*, a interação entre cana-de-açúcar, auxina e patógenos.

Esperamos que os dados obtidos possam ser relevantes para a compreensão mais aprofundada desse organismo e contribuam para o desenvolvimento de melhorias e novas técnicas de produção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, S., Oeller, P.W., Theologis, A., 1994. Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 326–330.
- Abel, S., Theologis, A., 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111, 9–17.
- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Más, P., Kay, S.A., 2001. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* 293, 880–883. <https://doi.org/10.1126/science.1061320>
- Ali, A., Naz, S., Siddiqui, F.A., Iqbal, J., 2008. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. *Pakistan Journal of Botany* 40, 139–149.
- Amalraj, V.A., Balasundaram, N., 2006. On the Taxonomy of the Members of 'Saccharum Complex.' *Genetic Resources and Crop Evolution* 53, 35–41. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-0581-1>
- Amorim, H.V., Lopes, M.L., de Castro Oliveira, J.V., Buckeridge, M.S., Goldman, G.H., 2011. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 1267–1275. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>
- Amrine, K.C.H., Blanco-Ulate, B., Cantu, D., 2015. Discovery of Core Biotic Stress Responsive Genes in Arabidopsis by Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. *PLOS ONE* 10, e0118731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118731>
- Anderson-Bernadas, C., Cornelissen, G., Turner, C.M., Koukkari, W.L., 1997. Rhythmic nature of thigmomorphogenesis and thermal stress of *Phaseolus vulgaris* L. shoots. *Journal of Plant Physiology* 151, 575–580. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(97\)80233-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(97)80233-7)
- Arana, M.V., Marin-de la Rosa, N., Maloof, J.N., Blazquez, M.A., Alabadi, D., 2011. Circadian oscillation of gibberellin signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 9292–9297. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101050108>
- Atamian, H.S., Harmer, S.L., 2016. Circadian regulation of hormone signaling and plant physiology. *Plant Molecular Biology* 91, 691–702. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0477-4>
- Banday, Z.Z., Nandi, A.K., 2015. Interconnection between flowering time control and activation of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00174>
- Bari, R., Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69, 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Bartel, B., Fink, G.R., 1995. ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* 268, 1745–1748.
- Battal, P., Erez, M.E., Turker, M., Berber, I., 2008. Molecular and Physiological Changes in Maize (*Zea mays*) Induced by Exogenous NAA, ABA and MeJa during Cold Stress. *Annales Botanici Fennici* 45, 173–185. <https://doi.org/10.5735/085.045.0302>
- Baudry, A., Ito, S., Song, Y.H., Strait, A.A., Kiba, T., Lu, S., Henriques, R., Pruneda-Paz, J.L., Chua, N.H., Tobin, E.M., Kay, S.A., Imaizumi, T., 2010. F-Box Proteins FKF1 and LKP2 Act in Concert with ZEITLUPE to Control Arabidopsis Clock Progression. *The Plant Cell* 22, 606–622. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072843>
- Beckwith, E.J., Yanovsky, M.J., 2014. Circadian regulation of gene expression: at the crossroads of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks. *Current Opinion in Genetics & Development* 27, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.007>
- Beltran-Pena, E., Aguilar, R., Ortiz-Lopez, A., Dinkova, T.D., de Jimenez, E.S., 2002. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiologia Plantarum* 115, 291–297. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150216.x>
- Bendix, C., Marshall, C.M., Harmon, F.G., 2015. Circadian Clock Genes Universally Control Key Agricultural Traits. *Molecular Plant* 8, 1135–1152. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.003>

- Benjamins, R., Scheres, B., 2008. Auxin: The Looping Star in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* 59, 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103805>
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., Feldmann, K.A., 1996. Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948–950.
- Bernier, F., Bernal, A., 2001. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 545–554. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01285-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01285-2)
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R., DeLucia, E.H., 2010. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* 33, 1597–1613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02167.x>
- Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Lee, O.R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S.N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W.A., Murphy, A.S., 2007. Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein Auxin Transporters in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* 19, 131–147. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040782>
- Boer, D.R., Freire-Rios, A., van den Berg, W.A.M., Saaki, T., Manfield, I.W., Kepinski, S., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., de Vries, S.C., Solano, R., Weijers, D., Coll, M., 2014. Structural Basis for DNA Binding Specificity by the Auxin-Dependent ARF Transcription Factors. *Cell* 156, 577–589. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.027>
- Bolton, M.D., 2009. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 487–497. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0487>
- Bordage, S., Sullivan, S., Laird, J., Millar, A.J., Nimmo, H.G., 2016. Organ specificity in the plant circadian system is explained by different light inputs to the shoot and root clocks. *New Phytologist* 212, 136–149. <https://doi.org/10.1111/nph.14024>
- Borowski, J.M., Galli, V., da Silva Messias, R., Perin, E.C., Buss, J.H., dos Anjos e Silva, S.D., Rombaldi, C.V., 2014. Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2041-2>
- Braun, N., Wyrzykowska, J., Muller, P., David, K., Couch, D., Perrot-Rechenmann, C., Fleming, A.J., 2008. Conditional Repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 Reveals That It Coordinates Cell Division and Cell Expansion during Postembryonic Shoot Development in Arabidopsis and Tobacco. *THE PLANT CELL ONLINE* 20, 2746–2762. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059048>
- Bull, T., Glasziou, K., 1963. The Evolutionary Significance of Sugar Accumulation in *Saccharum*. *Australian Journal of Biological Sciences* 16, 737. <https://doi.org/10.1071/B19630737>
- Calderón Villalobos, L.I.A., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L.B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., Estelle, M., 2012. A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology* 8, 477–485. <https://doi.org/10.1038/nchembio.926>
- Campanella, J.J., Smith, S.M., Leib, D., Wexler, S., Ludwig-Müller, J., 2008. The Auxin Conjugate Hydrolase Family of *Medicago truncatula* and Their Expression During the Interaction with Two Symbionts. *Journal of Plant Growth Regulation* 27, 26–38. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9027-2>
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J., 2003. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8, 165–171. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00051-7)
- Chae, K., Isaacs, C.G., Reeves, P.H., Maloney, G.S., Muday, G.K., Nagpal, P., Reed, J.W., 2012. Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament

- elongation: Biological role of a SAUR protein. *The Plant Journal* 71, 684–697. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2012.05024.x>
- Chang, C., Shockey, J.A., 1999. The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 352–358.
- Chapman, E.J., Estelle, M., 2009. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.* 43, 265–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134148>
- Chassot, C., Nawrath, C., Métraux, J.-P., 2007. Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen: Cuticle and immunity. *The Plant Journal* 49, 972–980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.03017.x>
- Cheavegatti-Gianotto, A., de Abreu, H.M.C., Arruda, P., Besspalhok Filho, J.C., Burnquist, W.L., Creste, S., di Ciero, L., Ferro, J.A., de Oliveira Figueira, A.V., de Sousa Filgueiras, T., Grossi-de-Sá, M. de F., Guzzo, E.C., Hoffmann, H.P., de Andrade Landell, M.G., Macedo, N., Matsuoka, S., de Castro Reinach, F., Romano, E., da Silva, W.J., de Castro Silva Filho, M., César Ulian, E., 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology* 4, 62–89. <https://doi.org/10.1007/s12042-011-9068-3>
- Chen, J.G., Ullah, H., Sussman, M.R., Jones, A.M., 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes & Development* 15, 902–911. <https://doi.org/10.1101/gad.866201>
- Chen, X., Grandont, L., Li, H., Hauschild, R., Paque, S., Abuzeineh, A., Rakusová, H., Benkova, E., Perrot-Rechenmann, C., Friml, J., 2014. Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature* 516, 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature13889>
- Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Löffke, C., Lin, D., Yang, Z., Friml, J., 2012. ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in *Arabidopsis* Roots. *Current Biology* 22, 1326–1332. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.020>
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J., Kunkel, B.N., 2007. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20131–20136. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704901104>
- Choudhary, M.K., Nomura, Y., Wang, L., Nakagami, H., Somers, D.E., 2015. Quantitative Circadian Phosphoproteomic Analysis of *Arabidopsis* Reveals Extensive Clock Control of Key Components in Physiological, Metabolic, and Signaling Pathways. *Molecular & Cellular Proteomics* 14, 2243–2260. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.047183>
- Chow, B.Y., Sanchez, S.E., Breton, G., Pruneda-Paz, J.L., Krogan, N.T., Kay, S.A., 2014. Transcriptional Regulation of LUX by CBF1 Mediates Cold Input to the Circadian Clock in *Arabidopsis*. *Current Biology* 24, 1518–1524. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.029>
- Christeller, J., Laing, W., 2005. Plant serine proteinase inhibitors. *Protein Pept. Lett.* 12, 439–447.
- Christensen, A.B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjær, M.F., Dudler, R., Schweizer, P., 2004. The Germinlike Protein GLP4 Exhibits Superoxide Dismutase Activity and Is an Important Component of Quantitative Resistance in Wheat and Barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 109–117. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.109>
- Ciesielski, T., 1872. Untersuchungen über die Abwärtskrümmung der Wurzel. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 1, 1–30.
- Cohen, J.D., Bandurski, R.S., 1982. Chemistry and Physiology of the Bound Auxins. *Annual Review of Plant Physiology* 33, 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.002155>
- Contreras-Cornejo, H.A., López-Bucio, J.S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, Á.A., López-Bucio, J., 2015. Mitogen-Activated Protein Kinase

- 6 and Ethylene and Auxin Signaling Pathways Are Involved in *Arabidopsis* Root-System Architecture Alterations by *Trichoderma atroviride*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28, 701–710. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0005-R>
- Cornelis van Loon, L., 1999. Occurrence and Properties of Plant Pathogenesis-Related Proteins, in: Datta, S., Muthukrishnan, S. (Eds.), *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420049299.ch1>
- Covington, M.F., Harmer, S.L., 2007. The Circadian Clock Regulates Auxin Signaling and Responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 5, e222. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050222>
- Covington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S.A., Harmer, S.L., 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biology* 9, R130. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r130>
- Cui, F., Wu, S., Sun, W., Coaker, G., Kunkel, B., He, P., Shan, L., 2013. The *Pseudomonas syringae* Type III Effector AvrRpt2 Promotes Pathogen Virulence via Stimulating *Arabidopsis* Auxin/Indole Acetic Acid Protein Turnover. *PLANT PHYSIOLOGY* 162, 1018–1029. <https://doi.org/10.1104/pp.113.219659>
- Czechowski, T., 2005. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* 139, 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
- Dal-Bianco, M., Carneiro, M.S., Hotta, C.T., Chapola, R.G., Hoffmann, H.P., Garcia, A.A.F., Souza, G.M., 2012. Sugarcane improvement: how far can we go? *Current Opinion in Biotechnology* 23, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.002>
- Dalio, R.J.D., Magalhães, D.M., Rodrigues, C.M., Arena, G.D., Oliveira, T.S., Souza-Neto, R.R., Picchi, S.C., Martins, P.M.M., Santos, P.J.C., Maximo, H.J., Pacheco, I.S., De Souza, A.A., Machado, M.A., 2017. PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus–pathogen interactions. *Annals of Botany* mcw238. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw238>
- Daniel, X., Sugano, S., Tobin, E.M., 2004. CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 3292–3297. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400163101>
- Darwin, C., Darwin, F., 1880. *The power of movement in plants*. John Murray, Londres.
- Datta, K., Velazhahan, R., Oliva, N., Ona, I., Mew, T., Khush, G.S., Muthukrishnan, S., Datta, S.K., 1999. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98, 1138–1145. <https://doi.org/10.1007/s001220051178>
- de Mairan, J.-J., 1729. *Observation botanique. Histoire de l'Académie royale des sciences avec les mémoires de mathématique et de physique tirés des registres de cette Académie*.
- de Souza, A.P., Grandis, A., Leite, D.C.C., Buckeridge, M.S., 2014. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. *BioEnergy Research* 7, 24–35. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9366-8>
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Van Loon, L.C., Dicke, M., Pieterse, C.M.J., 2005. Signal Signature and Transcriptome Changes of *Arabidopsis* During Pathogen and Insect Attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 923–937. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0923>
- del Pozo, J.C., 2006. The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCFSKP2A Pathway in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* 18, 2224–2235. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039651>

- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., Gutierrez, C., 2002. Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* 14, 3057–3071.
- DeLong, A., Mockaitis, K., Christensen, S., 2002. Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals. *Plant Mol. Biol.* 49, 285–303.
- D'Hont, A., 2005. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenetic and Genome Research* 109, 27–33. <https://doi.org/10.1159/000082378>
- D'Hont, A., Glaszmann, J.C., 2001. Sugarcane genome analysis with molecular markers: A first decade of research. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol* 24, 556–559.
- D'Hont, A., Grivet, L., Feldmann, P., Rao, S., Berding, N., Glaszmann, J.C., 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 250, 405–413.
- D'Hont, A., Souza, G.M., Menossi, M., Vincentz, M., Van-Sluys, M.-A., Glaszmann, J.C., Ulian, E., 2008. Sugarcane: A Major Source of Sweetness, Alcohol, and Bio-energy, in: Moore, P.H., Ming, R. (Eds.), *Genomics of Tropical Crop Plants*. Springer New York, New York, NY, pp. 483–513. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71219-2_21
- Di Mambro, R., De Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P.N., Busch, W., Novak, O., Ljung, K., Di Paola, L., Marée, A.F.M., Costantino, P., Grieneisen, V.A., Sabatini, S., 2017. Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the Arabidopsis root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E7641–E7649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705833114>
- Dietz, K.-J., Vogel, M.O., Viehhauser, A., 2010. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* 245, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0142-8>
- Dillon, S.L., Shapter, F.M., Henry, R.J., Cordeiro, G., Izquierdo, L., Lee, L.S., 2007. Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and Saccharum (*Andropogoneae*). *Annals of Botany* 100, 975–989. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm192>
- Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X., Wang, S., 2008. Activation of the Indole-3-Acetic Acid-Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *THE PLANT CELL ONLINE* 20, 228–240. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055657>
- Dodd, A.N., 2005. Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. *Science* 309, 630–633. <https://doi.org/10.1126/science.1115581>
- Domingo, C., Andrés, F., Tharreau, D., Iglesias, D.J., Talón, M., 2009. Constitutive Expression of *OsGH3.1* Reduces Auxin Content and Enhances Defense Response and Resistance to a Fungal Pathogen in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 201–210. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0201>
- dos Santos Maraschin, F., Memelink, J., Offringa, R., 2009. Auxin-induced, SCF^{TIR1}-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *The Plant Journal* 59, 100–109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03854.x>
- Dunwell, J.M., Gibbings, J.G., Mahmood, T., Saqlan Naqvi, S.M., 2008. Germin and Germin-like Proteins: Evolution, Structure, and Function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27, 342–375. <https://doi.org/10.1080/07352680802333938>
- Durrant, W.E., Dong, X., 2004. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Edwards, K.D., Anderson, P.E., Hall, A., Salathia, N.S., Locke, J.C., Lynn, J.R., Straume, M., Smith, J.Q., Millar, A.J., 2006. FLOWERING LOCUS C Mediates Natural Variation in the High-

- Temperature Response of the Arabidopsis Circadian Clock. *THE PLANT CELL ONLINE* 18, 639–650. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038315>
- Elowitz, M.B., Leibler, S., 2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403, 335–338. <https://doi.org/10.1038/35002125>
- Enders, T.A., Frick, E.M., Strader, L.C., 2017. An Arabidopsis kinase cascade influences auxin-responsive cell expansion. *The Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.13635>
- Enders, T.A., Strader, L.C., 2015. Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany* 102, 180–196. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400285>
- Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M.A., Araki, T., Kay, S.A., 2014. Tissue-specific clocks in Arabidopsis show asymmetric coupling. *Nature* 515, 419–422. <https://doi.org/10.1038/nature13919>
- Esmon, C.A., Tinsley, A.G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L.B., Liscum, E., 2006. A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 236–241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507127103>
- Evangelisti, E., Govetto, B., Minet-Kebdani, N., Kuhn, M.-L., Attard, A., Ponchet, M., Panabières, F., Gourgues, M., 2013. The *Phytophthora parasitica* RXLR effector Penetration-Specific Effector 1 favours *Arabidopsis thaliana* infection by interfering with auxin physiology. *New Phytologist* 199, 476–489. <https://doi.org/10.1111/nph.12270>
- Ezekowitz, R.A.B., Hoffman, J.A. (Eds.), 2003. Innate immunity, Infectious disease. Humana, Totowa, NJ.
- Farinas, B., Mas, P., 2011. Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation: Role of RVE8/LCL5 in the circadian clock. *The Plant Journal* 66, 318–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04484.x>
- Fendrych, M., Leung, J., Friml, J., 2016. TIR1/AFB-Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of Arabidopsis hypocotyls. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19048>
- Ferreira, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A., Teixeira, A.R., 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 8, 677–700. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00419.x>
- Filichkin, S.A., Breton, G., Priest, H.D., Dharmawardhana, P., Jaiswal, P., Fox, S.E., Michael, T.P., Chory, J., Kay, S.A., Mockler, T.C., 2011. Global Profiling of Rice and Poplar Transcriptomes Highlights Key Conserved Circadian-Controlled Pathways and cis-Regulatory Modules. *PLoS ONE* 6, e16907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016907>
- Filichkin, S.A., Mockler, T.C., 2012. Unproductive alternative splicing and nonsense mRNAs: A widespread phenomenon among plant circadian clock genes. *Biology Direct* 7, 20. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-20>
- Fleming, A.J., 2005. Formation of primordia and phyllotaxy. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.11.013>
- Franco, F.P., Santiago, A.C., Henrique-Silva, F., de Castro, P.A., Goldman, G.H., Moura, D.S., Silva-Filho, M.C., 2014. The Sugarcane Defense Protein SUGARWIN2 Causes Cell Death in *Colletotrichum falcatum* but Not in Non-Pathogenic Fungi. *PLoS ONE* 9, e91159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091159>
- Frey, P.A., 1996. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10, 461–470.
- Friml, J., 2004. A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux. *Science* 306, 862–865. <https://doi.org/10.1126/science.1100618>
- Fu, J., Wang, S., 2011. Insights into Auxin Signaling in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science* 2. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00074>

- Fu, S.-F., Wei, J.-Y., Chen, H.-W., Liu, Y.-Y., Lu, H.-Y., Chou, J.-Y., 2015. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior* 10, e1048052. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, D., Dai, X., Estelle, M., Zhao, Y., 2015. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 2275–2280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500365112>
- Gendron, J.M., Pruneda-Paz, J.L., Doherty, C.J., Gross, A.M., Kang, S.E., Kay, S.A., 2012. *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3167–3172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200355109>
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Goldemberg, J., 2007. Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science* 315, 808–810. <https://doi.org/10.1126/science.1137013>
- Goodspeed, D., Chehab, E.W., Min-Venditti, A., Braam, J., Covington, M.F., 2012. *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 4674–4677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116368109>
- Gould, P.D., Ugarte, N., Domijan, M., Costa, M., Foreman, J., MacGregor, D., Rose, K., Griffiths, J., Millar, A.J., Finkenshtadt, B., Penfield, S., Rand, D.A., Halliday, K.J., Hall, A.J.W., 2014. Network balance via CRY signalling controls the *Arabidopsis* circadian clock over ambient temperatures. *Molecular Systems Biology* 9, 650–650. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.7>
- Gray, J., Caparrós-Ruiz, D., Grotewold, E., 2012. Grass phenylpropanoids: Regulate before using! *Plant Science* 184, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.008>
- Green, R.M., 2002. Circadian Rhythms Confer a Higher Level of Fitness to *Arabidopsis* Plants. *PLANT PHYSIOLOGY* 129, 576–584. <https://doi.org/10.1104/pp.004374>
- Greenham, K., McClung, C.R., 2015. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics* 16, 598–610. <https://doi.org/10.1038/nrg3976>
- Grenier, J., Potvin, C., Trudel, J., Asselin, A., 1999. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1,3-glucans. *Plant J.* 19, 473–480.
- Grossmann, K., 2009. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ps.1860>
- Guilfoyle, T.J., 2015. The PB1 Domain in Auxin Response Factor and Aux/IAA Proteins: A Versatile Protein Interaction Module in the Auxin Response. *The Plant Cell Online* 27, 33–43. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132753>
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Gunin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J.-F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerineau, F., Bellini, C., Van Wuytswinkel, O., 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal* 6, 609–618. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00346.x>
- Hagen, G., Guilfoyle, T.J., 1985. Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1197–1203.
- Hager, A., 2003. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research* 116, 483–505. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0110-x>
- Haq, S.K., Atif, S.M., Khan, R.H., 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431, 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.022>

- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A., 2000. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290, 2110–2113.
- Harmer, S.L., Kay, S.A., 2005. Positive and Negative Factors Confer Phase-Specific Circadian Regulation of Transcription in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* 17, 1926–1940. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033035>
- Hayashi, K. -i., 2012. The Interaction and Integration of Auxin Signaling Components. *Plant and Cell Physiology* 53, 965–975. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs035>
- Hernando, C.E., Romanowski, A., Yanovsky, M.J., 2017. Transcriptional and post-transcriptional control of the plant circadian gene regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1860, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.07.001>
- Hevia, M.A., Canessa, P., Müller-Esparza, H., Larrondo, L.F., 2015. A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 8744–8749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508432112>
- Hotta, C.T., Gardner, M.J., Hubbard, K.E., Baek, S.J., Dalchau, N., Suhita, D., Dodd, A.N., Webb, A.A.R., 2007. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks: Circadian modulation of plant environmental responses. *Plant, Cell & Environment* 30, 333–349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01627.x>
- Hotta, C.T., Lembke, C.G., Domingues, D.S., Ochoa, E.A., Cruz, G.M.Q., Melotto-Passarin, D.M., Marconi, T.G., Santos, M.O., Mollinari, M., Margarido, G.R.A., Crivellari, A.C., dos Santos, W.D., de Souza, A.P., Hoshino, A.A., Carrer, H., Souza, A.P., Garcia, A.A.F., Buckeridge, M.S., Menossi, M., Van Sluys, M.-A., Souza, G.M., 2010. The Biotechnology Roadmap for Sugarcane Improvement. *Tropical Plant Biology* 3, 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12042-010-9050-5>
- Hotta, C.T., Nishiyama, M.Y., Souza, G.M., 2013. Circadian Rhythms of Sense and Antisense Transcription in Sugarcane, a Highly Polyploid Crop. *PLoS ONE* 8, e71847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071847>
- Hsu, P.Y., Harmer, S.L., 2014. Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends in Plant Science* 19, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.007>
- Huang, W., Perez-Garcia, P., Pokhilko, A., Millar, A.J., Antoshechkin, I., Riechmann, J.L., Mas, P., 2012. Mapping the Core of the Arabidopsis Circadian Clock Defines the Network Structure of the Oscillator. *Science* 336, 75–79. <https://doi.org/10.1126/science.1219075>
- Hückelhoven, R., 2007. Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45, 101–127. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094325>
- Hurban, P., Jones, A.M., Pufky, J., Qiu, Y., Rao, M.V., 2003. The auxin-induced transcriptome for etiolated Arabidopsis seedlings using a structure/function approach. *Functional & Integrative Genomics* 3, 135–143. <https://doi.org/10.1007/s10142-003-0093-7>
- Ito, S., Song, Y.H., Imaizumi, T., 2012. LOV Domain-Containing F-Box Proteins: Light-Dependent Protein Degradation Modules in Arabidopsis. *Molecular Plant* 5, 573–582. <https://doi.org/10.1093/mp/sss013>
- Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T., Kai, Y., 2004. PHOSPHO ENOL PYRUVATE CARBOXYLASE: A New Era of Structural Biology. *Annual Review of Plant Biology* 55, 69–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141619>
- Jackson, R.G., Lim, E.-K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D.A., Bowles, D.J., 2001. Identification and Biochemical Characterization of an *Arabidopsis* Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4350–4356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006185200>

- Jenik, P.D., 2005. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132, 3577–3585. <https://doi.org/10.1242/dev.01952>
- Jones, A.M., Herman, E.M., 1993. KDEL-Containing Auxin-Binding Protein Is Secreted to the Plasma Membrane and Cell Wall. *Plant Physiol.* 101, 595–606.
- Jones, M.A., 2009. Entrainment of the Arabidopsis Circadian Clock. *Journal of Plant Biology* 52, 202–209. <https://doi.org/10.1007/s12374-009-9030-1>
- Joyce, A.L., White, W.H., Nuessly, G.S., Solis, M.A., Scheffer, S.J., Lewis, M.L., Medina, R.F., 2014. Geographic Population Structure of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), in the Southern United States. *PLoS ONE* 9, e110036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110036>
- Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C., López-Torrejón, G., Pacios, L.F., Del Pozo, J.C., 2010. The *Arabidopsis* Cell Cycle F-Box Protein SKP2A Binds to Auxin. *The Plant Cell* 22, 3891–3904. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078972>
- Jurado, S., Díaz-Triviño, S., Abraham, Z., Manzano, C., Gutierrez, C., del Pozo, C., 2008. SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant J.* 53, 828–841. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03378.x>
- Kai, Y., Matsumura, H., Izui, K., 2003. Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 170–179. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00170-X)
- Kamimoto, Y., Terasaka, K., Hamamoto, M., Takanashi, K., Fukuda, S., Shitan, N., Sugiyama, A., Suzuki, H., Shibata, D., Wang, B., Pollmann, S., Geisler, M., Yazaki, K., 2012. Arabidopsis ABCB21 is a Facultative Auxin Importer/Exporter Regulated by Cytoplasmic Auxin Concentration. *Plant and Cell Physiology* 53, 2090–2100. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs149>
- Kangasjarvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E.-M., Noctor, G., 2012. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany* 63, 1619–1636. <https://doi.org/10.1093/jxb/err402>
- Kazan, K., Lyons, R., 2014. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *The Plant Cell* 26, 2285–2309. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125419>
- Kazan, K., Manners, J.M., 2009. Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 14, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.005>
- Keeley, J.E., Rundel, P.W., 2003. Evolution of CAM and C₄ Carbon-Concentrating Mechanisms. *International Journal of Plant Sciences* 164, S55–S77. <https://doi.org/10.1086/374192>
- Khan, S., Rowe, S.C., Harmon, F.G., 2010. Coordination of the maize transcriptome by a conserved circadian clock. *BMC Plant Biology* 10, 126. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-126>
- Khan, S.A., Rashid, H., Chaudhary, M.F., Chaudhry, Z., Afroz, A., 2008. Rapid micropropagation of three elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology* 7, 2174–2180.
- Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H., Chua, N.-H., 2007. Targeted Degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL Complex Regulates Clock Function and Photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *THE PLANT CELL ONLINE* 19, 2516–2530. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053033>
- Ko, D.K., Rohozinski, D., Song, Q., Taylor, S.H., Juenger, T.E., Harmon, F.G., Chen, Z.J., 2016. Temporal Shift of Circadian-Mediated Gene Expression and Carbon Fixation Contributes to Biomass Heterosis in Maize Hybrids. *PLOS Genetics* 12, e1006197. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006197>
- Kolmos, E., Chow, B.Y., Pruneda-Paz, J.L., Kay, S.A., 2014. HsfB2b-mediated repression of *PRR7* directs abiotic stress responses of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 16172–16177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418483111>

- Korasick, D.A., Enders, T.A., Strader, L.C., 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* 64, 2541–2555. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert080>
- Korasick, D.A., Westfall, C.S., Lee, S.G., Nanao, M.H., Dumas, R., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Jez, J.M., Strader, L.C., 2014. Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 5427–5432. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400074111>
- Korneli, C., Danisman, S., Staiger, D., 2014. Differential Control of Pre-Invasive and Post-Invasive Antibacterial Defense by the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant and Cell Physiology* 55, 1613–1622. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu092>
- Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N., Sato, M., 1996. Purification and Properties of Flavin- and Molybdenum-Containing Aldehyde Oxidase from Coleoptiles of Maize. *Plant Physiol.* 110, 781–789.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., Gojon, A., 2010. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* 18, 927–937. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008>
- Kubeš, M., Yang, H., Richter, G.L., Cheng, Y., Młodzieńska, E., Wang, X., Blakeslee, J.J., Carraro, N., Petrášek, J., Zažímalová, E., Hoyerová, K., Peer, W.A., Murphy, A.S., 2012. The Arabidopsis concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis: ABCB4 is a substrate-activated auxin transporter. *The Plant Journal* 69, 640–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04818.x>
- Kunkel, B.N., Brooks, D.M., 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 325–331.
- Kusakina, J., Dodd, A.N., 2012. Phosphorylation in the plant circadian system. *Trends Plant Sci.* 17, 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.008>
- Kutschera, U., 1994. The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytologist* 126, 549–569. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02951.x>
- Larkin, P.J., Scowcroft, W.R., 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60, 197–214. <https://doi.org/10.1007/BF02342540>
- Lavy, M., Estelle, M., 2016. Mechanisms of auxin signaling. *Development* 143, 3226–3229. <https://doi.org/10.1242/dev.131870>
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R.A., Matsuda, S.P.T., Bartel, B., 2002. Characterization of a Family of IAA-Amino Acid Conjugate Hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 20446–20452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111955200>
- Lembke, C.G., Nishiyama, M.Y., Sato, P.M., de Andrade, R.F., Souza, G.M., 2012. Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. *Plant Molecular Biology* 79, 461–477. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9922-1>
- Leubner-Metzger, G., Meins, F., 1999. Functions and Regulation of Plant Beta-1,3-Glucanases (PR-2), in: Datta, S., Muthukrishnan, S. (Eds.), *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420049299.ch3>
- Leyser, O., 2017. Auxin Signaling. *Plant Physiology* pp.00765.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
- Li, L., Hou, X., Tsuge, T., Ding, M., Aoyama, T., Oka, A., Gu, H., Zhao, Y., Qu, L.-J., 2008. The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 27, 575–584. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0458-9>
- Liao, H., Tang, R., Zhang, X., Luan, S., Yu, F., 2017. FERONIA Receptor Kinase at the Crossroads of Hormone Signaling and Stress Responses. *Plant and Cell Physiology* 58, 1143–1150. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx048>

- Likić, S., Šola, I., Ludwig-Müller, J., Rusak, G., 2014. Involvement of kaempferol in the defence response of virus infected *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology* 138, 257–271. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0326-0>
- Lin, S., Zhou, Y., Chen, G., Zhang, Y., Zhang, Y., Ning, W., Pan, D., 2010. Molecular responses to the fungal pathogen *Gibberella fujikuroi* in the leaves of chewing cane (*Saccharum officinarum* L.). *Sugar Tech* 12, 36–46. <https://doi.org/10.1007/s12355-010-0008-6>
- Liscum, E., Reed, J.W., 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 49, 387–400.
- Liu, J., Osbourn, A., Ma, P., 2015. MYB Transcription Factors as Regulators of Phenylpropanoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant* 8, 689–708. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.012>
- Liu, T., Carlsson, J., Takeuchi, T., Newton, L., Farré, E.M., 2013. Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7. *The Plant Journal* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/tpj.12276>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., 2001a. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28, 465–474.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G., 2005. Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Roots. *THE PLANT CELL ONLINE* 17, 1090–1104. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029272>
- Ljung, K., Ostin, A., Lioussanne, L., Sandberg, G., 2001b. Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant Physiol.* 125, 464–475.
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., Jordá, L., Parker, J., Molina, A., 2008. Repression of the Auxin Response Pathway Increases *Arabidopsis* Susceptibility to Necrotrophic Fungi. *Molecular Plant* 1, 496–509. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn025>
- Löbner, M., Klämbt, D., 1985. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). I. Purification by immunological methods and characterization. *J. Biol. Chem.* 260, 9848–9853.
- Lorrain, S., 2003. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science* 8, 263–271. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00108-0)
- Lu, H., McClung, C.R., Zhang, C., 2017. Tick Tock: Circadian Regulation of Plant Innate Immunity. *Annual Review of Phytopathology* 55. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035451>
- Lu, Y., Gehan, J.P., Sharkey, T.D., 2005. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* 138, 2280–2291. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061903>
- Ludwig-Müller, J., 2015. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. *Journal of Plant Physiology* 172, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.01.002>
- Ludwig-Müller, J., 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* 62, 1757–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>
- Ludwig-Müller, J., Sass, S., Sutter, E.G., Wodner, M., Epstein, E., 1993. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*: I. Identification and quantification. *Plant Growth Regulation* 13, 179–187. <https://doi.org/10.1007/BF00024260>
- Ma, K.-W., Ma, W., 2016. Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Molecular Biology* 91, 713–725. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0452-0>
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., Willats, W.G.T., 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00178>

- Malone, J.H., Oliver, B., 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology* 9, 34. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-34>
- Manoli, A., Sturaro, A., Trevisan, S., Quaggiotti, S., Nonis, A., 2012. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology* 169, 807–815. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.019>
- Más, P., Alabadí, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., Kay, S.A., 2003a. Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 223–236.
- Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D.E., Kay, S.A., 2003b. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426, 567–570. <https://doi.org/10.1038/nature02163>
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., Kasahara, H., 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18512–18517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108434108>
- Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M., Mizuno, T., 2000. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.* 41, 1002–1012.
- McClung, C.R., 2006. Plant Circadian Rhythms. *THE PLANT CELL ONLINE* 18, 792–803. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4, 1425–1433.
- McSteen, P., 2010. Auxin and Monocot Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001479–a001479. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001479>
- Medeiros, A.H., Franco, F.P., Matos, J.L., de Castro, P.A., Santos-Silva, L.K., Henrique-Silva, F., Goldman, G.H., Moura, D.S., Silva-Filho, M.C., 2012. *Sugarwin*: A Sugarcane Insect-Induced Gene with Antipathogenic Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 613–624. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0254>
- Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., Priest, H.D., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S.A., Chory, J., 2008. Network Discovery Pipeline Elucidates Conserved Time-of-Day-Specific cis-Regulatory Modules. *PLoS Genetics* 4, e14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040014>
- Michalko, J., Dravecká, M., Bollenbach, T., Friml, J., 2015. Embryo-lethal phenotypes in early *abp1* mutants are due to disruption of the neighboring BSM gene. *F1000Research* 4, 1104. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7143.1>
- Millar, A.J., 2016. The Intracellular Dynamics of Circadian Clocks Reach for the Light of Ecology and Evolution. *Annual Review of Plant Biology* 67, 595–618. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115619>
- Millar, A.J., Carré, I.A., Strayer, C.A., Chua, N.H., Kay, S.A., 1995. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267, 1161–1163.
- Miller, C.O., 1970. Plant Hormones, in: *Biochemical Actions of Hormones*. Elsevier, pp. 503–518. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-452801-7.50017-1>
- Minic, Z., 2008. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* 227, 723–740. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0668-y>
- Mishra, N.S., Tuteja, R., Tuteja, N., 2006. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 452, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.05.001>
- Mizuno, T., Takeuchi, A., Nomoto, Y., Nakamichi, N., Yamashino, T., 2014. The *LNK1* night light-inducible and clock-regulated gene is induced also in response to warm-night through the circadian clock nighttime repressor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 9, e28505. <https://doi.org/10.4161/psb.28505>

- Mockaitis, K., Estelle, M., 2008. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 55–80. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123214>
- Monshausen, G.B., Miller, N.D., Murphy, A.S., Gilroy, S., 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis: Calcium and auxin signaling. *The Plant Journal* 65, 309–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04423.x>
- Moura, J.C.M.S., Araújo, P., Brito, M. dos, Souza, U., Viana, J.O.F., Mazzafera, P., 2012. Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. *BMC Research Notes* 5, 634. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-634>
- Müller, N.A., Wijnen, C.L., Srinivasan, A., Ryngajllo, M., Ofner, I., Lin, T., Ranjan, A., West, D., Maloof, J.N., Sinha, N.R., Huang, S., Zamir, D., Jiménez-Gómez, J.M., 2015. Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. *Nature Genetics* 48, 89–93. <https://doi.org/10.1038/ng.3447>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mutka, A.M., Fawley, S., Tsao, T., Kunkel, B.N., 2013. Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. *The Plant Journal* 74, 746–754. <https://doi.org/10.1111/tpj.12157>
- Nafisi, M., Fimognari, L., Sakuragi, Y., 2015. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry* 112, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.008>
- Nagel, D.H., Doherty, C.J., Pruneda-Paz, J.L., Schmitz, R.J., Ecker, J.R., Kay, S.A., 2015. Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E4802–E4810. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513609112>
- Nagel, D.H., Kay, S.A., 2012. Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Curr. Biol.* 22, R648–657. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.025>
- Nagel, D.H., Pruneda-Paz, J.L., Kay, S.A., 2014. FBH1 affects warm temperature responses in the *Arabidopsis* circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 14595–14600. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416666111>
- Nakamichi, N., 2011. Molecular mechanisms underlying the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell Physiol.* 52, 1709–1718. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr118>
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N.-H., Sakakibara, H., 2010. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 22, 594–605. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072892>
- Nan, W., Wang, X., Yang, L., Hu, Y., Wei, Y., Liang, X., Mao, L., Bi, Y., 2014. Cyclic GMP is involved in auxin signalling during *Arabidopsis* root growth and development. *Journal of Experimental Botany* 65, 1571–1583. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru019>
- Napier, R.M., 1997. Trafficking of the auxin-binding protein. *Trends in Plant Science* 2, 251–255. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)86346-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)86346-7)
- Napier, R.M., 1995. Towards an understanding of ABP1. *Journal of Experimental Botany* 46, 1787–1795. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.12.1787>
- Naseem, M., Srivastava, M., Tehseen, M., Ahmed, N., 2015. Auxin crosstalk to plant immune networks: a plant-pathogen interaction perspective. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 389–394.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J.D.G., 2006. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* 312, 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.1126088>

- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S.Y., Voinnet, O., 2008. Suppression of the MicroRNA Pathway by Bacterial Effector Proteins. *Science* 321, 964–967. <https://doi.org/10.1126/science.1159505>
- Nemhauser, J.L., Hong, F., Chory, J., 2006. Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell* 126, 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.050>
- Ni, Z., Kim, E.-D., Ha, M., Lackey, E., Liu, J., Zhang, Y., Sun, Q., Chen, Z.J., 2009. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 457, 327–331. <https://doi.org/10.1038/nature07523>
- Nohales, M.A., Kay, S.A., 2016. Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 1061–1069. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3327>
- Nolte, C., Staiger, D., 2015. RNA around the clock – regulation at the RNA level in biological timing. *Frontiers in Plant Science* 06. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00311>
- Nomura, K., 2006. A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science* 313, 220–223. <https://doi.org/10.1126/science.1129523>
- Nusinow, D.A., Helfer, A., Hamilton, E.E., King, J.J., Imaizumi, T., Schultz, T.F., Farré, E.M., Kay, S.A., 2011. The ELF4–ELF3–LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475, 398–402. <https://doi.org/10.1038/nature10182>
- Ogunwolu, E.O., Reagan, T.E., Flynn, J.L., Hensley, S.D., 1991. Effects of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) damage and stalk rot fungi on sugarcane yield in Louisiana. *Crop Protection* 10, 57–61. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(91\)90027-O](https://doi.org/10.1016/0261-2194(91)90027-O)
- Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Yamaoka, N., Yoshikawa, M., 1995. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant beta-1,3-endoglucanase. *Plant Physiol.* 109, 839–845.
- Ostin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 285–296.
- Ouyang, J., Shao, X., Li, J., 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 24, 327–333.
- Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S., Johnson, C.H., 1998. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8660–8664.
- Pandey, R.N., Rastogi, J., Sharma, M.L., Singh, R.K., 2011. Technologies for cost reduction in sugarcane micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 10, 7814–7819.
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A.H., Palme, K., 2008. Comprehensive Transcriptome Analysis of Auxin Responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 1, 321–337. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm021>
- Paponov, I.A., Teale, W., Lang, D., Paponov, M., Reski, R., Rensing, S.A., Palme, K., 2009. The evolution of nuclear auxin signalling. *BMC Evolutionary Biology* 9, 126. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-126>
- Paque, S., Weijers, D., 2016. Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC Biology* 14. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0291-0>
- Patel, A.I., 2011. In vitro regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar CoN 05072 of *Saccharum* spp. hybrid. *Reserach on Crops* 12, 465–470.
- Paterson, A.H., Moore, P.H., Tew, T.L., 2013. The Gene Pool of *Saccharum* Species and Their Improvement, in: Paterson, A.H. (Ed.), *Genomics of the Saccharinae*. Springer New York, New York, NY, pp. 43–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5947-8_3
- Pechanova, O., Pechan, T., 2015. Maize-Pathogen Interactions: An Ongoing Combat from a Proteomics Perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 28429–28448. <https://doi.org/10.3390/ijms161226106>
- Peer, W.A., Blakeslee, J.J., Yang, H., Murphy, A.S., 2011. Seven Things We Think We Know about Auxin Transport. *Molecular Plant* 4, 487–504. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr034>

- Perales, M., Mas, P., 2007. A Functional Link between Rhythmic Changes in Chromatin Structure and the Arabidopsis Biological Clock. *THE PLANT CELL ONLINE* 19, 2111–2123. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050807>
- Pérez-García, P., Ma, Y., Yanovsky, M.J., Mas, P., 2015. Time-dependent sequestration of RVE8 by LNK proteins shapes the diurnal oscillation of anthocyanin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 5249–5253. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420792112>
- Perrot-Rechenmann, C., 2010. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001446–a001446. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001446>
- Petrásek, J., Friml, J., 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675–2688. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>
- Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benkova, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zazimalova, E., Friml, J., 2006. PIN Proteins Perform a Rate-Limiting Function in Cellular Auxin Efflux. *Science* 312, 914–918. <https://doi.org/10.1126/science.1123542>
- Pierre-Jerome, E., Moss, B.L., Lanctot, A., Hageman, A., Nemhauser, J.L., 2016. Functional analysis of molecular interactions in synthetic auxin response circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 11354–11359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604379113>
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pokhilko, A., Fernández, A.P., Edwards, K.D., Southern, M.M., Halliday, K.J., Millar, A.J., 2012. The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular Systems Biology* 8. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.6>
- Portolés, S., Más, P., 2010. The Functional Interplay between Protein Kinase CK2 and CCA1 Transcriptional Activity Is Essential for Clock Temperature Compensation in Arabidopsis. *PLoS Genetics* 6, e1001201. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001201>
- Powers, S.K., Strader, L.C., 2016. Up in the air: Untethered Factors of Auxin Response. *F1000Research*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7492.1>
- Prathima, P.T., Raveendran, M., Kumar, K.K., Rahul, P.R., Kumar, V.G., Viswanathan, R., Sundar, A.R., Malathi, P., Sudhakar, D., Balasubramaniam, P., 2013. Differential Regulation of Defense-Related Gene Expression in Response to Red Rot Pathogen *Colletotrichum falcatum* Infection in Sugarcane. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171, 488–503. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0346-4>
- Pruneda-Paz, J.L., Kay, S.A., 2010. An expanding universe of circadian networks in higher plants. *Trends in Plant Science* 15, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.003>
- Qi, L., Yan, J., Li, Y., Jiang, H., Sun, J., Chen, Q., Li, H., Chu, J., Yan, C., Sun, X., Yu, Y., Li, C., Li, C., 2012. *Arabidopsis thaliana* plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. *New Phytologist* 195, 872–882. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04208.x>
- Que, Y., Su, Y., Guo, J., Wu, Q., Xu, L., 2014. A Global View of Transcriptome Dynamics during *Sporisorium scitamineum* Challenge in Sugarcane by RNA-seq. *PLoS ONE* 9, e106476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106476>
- Rahul, P.R., Kumar, V.G., Sathyabhama, M., Viswanathan, R., Sundar, A.R., Malathi, P., 2015. Characterization and 3D structure prediction of chitinase induced in sugarcane during pathogenesis of *Colletotrichum falcatum*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 24, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0226-6>

- Rajam, M.V., Chandola, N., Saiprasad Goud, P., Singh, D., Kashyap, V., Choudhary, M.L., Sihachakr, D., 2007. Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Biologia Plantarum* 51, 135–141. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0026-8>
- Ramesh Sundar, A., Velazhahan, R., Nagarathinam, S., Vidhyasekaran, P., 2008. Induction of pathogenesis-related proteins in sugarcane leaves and cell-cultures by a glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum*. *Biologia Plantarum* 52, 321–328. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0066-8>
- Rampey, R.A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G., Bartel, B., 2004. A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol.* 135, 978–988. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039677>
- Rawat, R., Schwartz, J., Jones, M.A., Sairanen, I., Cheng, Y., Andersson, C.R., Zhao, Y., Ljung, K., Harmer, S.L., 2009. REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 16883–16888. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813035106>
- Rayle, D.L., Cleland, R.E., 1992. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99, 1271–1274.
- Reinhardt, D., 2003. Vascular patterning: more than just auxin? *Curr. Biol.* 13, R485–487.
- Ren, H., Gray, W.M., 2015. SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth. *Molecular Plant* 8, 1153–1164. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.003>
- Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Čovanová, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S.Y., Jones, A.M., Luschnig, C., Aniento, F., Zažímalová, E., Friml, J., 2010. ABP1 Mediates Auxin Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.027>
- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P., 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* 136, 1771–1778. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-9-1771>
- Robert-Seilantantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Jones, J.D.G., 2011. The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates: miR393 promotes glucosinolate biosynthesis. *The Plant Journal* 67, 218–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04591.x>
- Rocha, F.R., Papini-Terzi, F.S., Nishiyama, M.Y., Vêncio, R.Z., Vicentini, R., Duarte, R.D., de Rosa, V.E., Vinagre, F., Barsalobres, C., Medeiros, A.H., Rodrigues, F.A., Ulian, E.C., Zingaretti, S.M., Galbiatti, J.A., Almeida, R.S., Figueira, A.V., Hemerly, A.S., Silva-Filho, M.C., Menossi, M., Souza, G.M., 2007. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* 8, 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-71>
- Roden, L.C., Ingle, R.A., 2009. Lights, Rhythms, Infection: The Role of Light and the Circadian Clock in Determining the Outcome of Plant-Pathogen Interactions. *THE PLANT CELL ONLINE* 21, 2546–2552. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069922>
- Romanowski, A., Yanovsky, M.J., 2015. Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants. *Front Plant Sci* 6, 437. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00437>
- Ruiz Rosquete, M., Barbez, E., Kleine-Vehn, J., 2012. Cellular Auxin Homeostasis: Gatekeeping Is Housekeeping. *Molecular Plant* 5, 772–786. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr109>
- Rutherford, R.S., 2013. Mechanisms of Resistance to Pests and Pathogens in Sugarcane and Related Crop Species, in: Moore, P.H., Botha, F.C. (Eds.), *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 435–482. <https://doi.org/10.1002/9781118771280.ch17>

- Salome, P.A., McClung, C.R., 2005. What makes the Arabidopsis clock tick on time? A review on entrainment. *Plant, Cell and Environment* 28, 21–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01261.x>
- Salome, P.A., Weigel, D., McClung, C.R., 2010. The Role of the Arabidopsis Morning Loop Components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in Temperature Compensation. *THE PLANT CELL ONLINE* 22, 3650–3661. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079087>
- Santa Brigida, A.B., Rojas, C.A., Grativol, C., de Armas, E.M., Entenza, J.O.P., Thiebaut, F., Lima, M. de F., Farrinelli, L., Hemerly, A.S., Lifschitz, S., Ferreira, P.C.G., 2016. Sugarcane transcriptome analysis in response to infection caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. *PLOS ONE* 11, e0166473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166473>
- Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Düchtig, P., Mancuso, S., Martinoia, E., Geisler, M., 2005. MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Letters* 579, 5399–5406. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.061>
- Sauer, M., Kleine-Vehn, J., 2011. AUXIN BINDING PROTEIN1: The Outsider. *The Plant Cell* 23, 2033–2043. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087064>
- Sauerbrunn, N., Schlaich, N.L., 2004. PCC1 : a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. *Planta* 218, 552–561. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1143-z>
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I.A., Coupland, G., 1998. The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93, 1219–1229.
- Schlumberg, A., Mauch, F., Vögeli, U., Boller, T., 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324, 365–367. <https://doi.org/10.1038/324365a0>
- Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I., 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* 9, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.007>
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011>
- Seo, P.J., Park, M.-J., Lim, M.-H., Kim, S.-G., Lee, M., Baldwin, I.T., Park, C.-M., 2012. A Self-Regulatory Circuit of CIRCADIANT CLOCK-ASSOCIATED1 Underlies the Circadian Clock Regulation of Temperature Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24, 2427–2442. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098723>
- Shani, E., Salehin, M., Zhang, Y., Sanchez, S.E., Doherty, C., Wang, R., Mangado, C.C., Song, L., Tal, I., Pisanty, O., Ecker, J.R., Kay, S.A., Pruneda-Paz, J., Estelle, M., 2017. Plant Stress Tolerance Requires Auxin-Sensitive Aux/IAA Transcriptional Repressors. *Current Biology* 27, 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.016>
- Shao, A., Ma, W., Zhao, X., Hu, M., He, X., Teng, W., Li, H., Tong, Y., 2017. The Auxin Biosynthetic TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED TaTAR2.1-3A Increases Grain Yield of Wheat. *Plant Physiology* 174, 2274–2288. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00094>
- Sharp, J.K., Valent, B., Albersheim, P., 1984. Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259, 11312–11320.
- Simon, S., Petrášek, J., 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* 180, 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.007>
- Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., van Loon, L.C. (Eds.), 2000. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3937-3>
- Smalle, J., Vierstra, R.D., 2004. THE UBIQUITIN 26S PROTEASOME PROTEOLYTIC PATHWAY. *Annual Review of Plant Biology* 55, 555–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801>

- Somers, D.E., Devlin, P.F., Kay, S.A., 1998. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282, 1488–1490.
- Souza, T.P., Dias, R.O., Silva-Filho, M.C., 2017. Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. *Genetics and Molecular Biology* 40, 360–372. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0057>
- Soy, J., Leivar, P., González-Schain, N., Martín, G., Díaz, C., Sentandreu, M., Al-Sady, B., Quail, P.H., Monte, E., 2016. Molecular convergence of clock and photosensory pathways through PIF3–TOC1 interaction and co-occupancy of target promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 4870–4875. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603745113>
- Spartz, A.K., Lee, S.H., Wenger, J.P., Gonzalez, N., Itoh, H., Inzé, D., Peer, W.A., Murphy, A.S., Overvoorde, P.J., Gray, W.M., 2012. The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion: SAUR fusion proteins promote cell expansion. *The Plant Journal* 70, 978–990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2012.04946.x>
- Spartz, A.K., Ren, H., Park, M.Y., Grandt, K.N., Lee, S.H., Murphy, A.S., Sussman, M.R., Overvoorde, P.J., Gray, W.M., 2014. SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺-ATPases to Promote Cell Expansion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26, 2129–2142. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126037>
- Staiger, D., Green, R., 2011. RNA-based regulation in the plant circadian clock. *Trends in Plant Science* 16, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.002>
- Staswick, P.E., 2009. The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *PLANT PHYSIOLOGY* 150, 1310–1321. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138529>
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., Rowe, M.L., 2002. Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14, 1405–1415.
- Steinwand, B.J., Xu, S., Polko, J.K., Doctor, S.M., Westafer, M., Kieber, J.J., 2014. Alterations in Auxin Homeostasis Suppress Defects in Cell Wall Function. *PLoS ONE* 9, e98193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098193>
- Strader, L.C., Zhao, Y., 2016. Auxin perception and downstream events. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.04.004>
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Más, P., Panda, S., Kreps, J.A., Kay, S.A., 2000. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289, 768–771.
- Su, Y., Xu, L., Wang, S., Wang, Z., Yang, Y., Chen, Y., Que, Y., 2015. Identification, Phylogeny, and Transcript of Chitinase Family Genes in Sugarcane. *Scientific Reports* 5. <https://doi.org/10.1038/srep10708>
- Su, Y., Xu, L., Xue, B., Wu, Q., Guo, J., Wu, L., Que, Y., 2013. Molecular cloning and characterization of two pathogenesis-related β -1,3-glucanase genes ScGluA1 and ScGluD1 from sugarcane infected by *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports* 32, 1503–1519. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1463-9>
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., Kasahara, H., 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5430–5435. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811226106>
- Szemenyei, H., Hannon, M., Long, J.A., 2008. TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During *Arabidopsis* Embryogenesis. *Science* 319, 1384–1386. <https://doi.org/10.1126/science.1151461>
- Szerszen, J.B., Szczyglowski, K., Bandurski, R.S., 1994. iaglu, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* 265, 1699–1701.

- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., Zheng, N., 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature05731>
- Taylor, P.W.J., 1997. Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid), in: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *High-Tech and Micropropagation V*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 256–271. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07774-0_17
- Taylor, P.W.J., Ko, H.-L., Adkins, S.W., Carl Rathus, Birch, R.G., 1992. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28, 69–78. <https://doi.org/10.1007/BF00039917>
- Thain, S.C., Hall, A., Millar, A.J., 2000. Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr. Biol.* 10, 951–956.
- Theis, T., Stahl, U., 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61, 437–455. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3231-4>
- Thines, B., Harmon, F.G., 2010. Ambient temperature response establishes ELF3 as a required component of the core Arabidopsis circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3257–3262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911006107>
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P., 2001. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 63–68.
- Thordal-Christensen, H., 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 351–357.
- Tivendale, N.D., Ross, J.J., Cohen, J.D., 2014. The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* 19, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.09.012>
- Tiwari, S.B., Hagen, G., Guilfoyle, T., 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15, 533–543.
- Troein, C., Locke, J.C.W., Turner, M.S., Millar, A.J., 2009. Weather and Seasons Together Demand Complex Biological Clocks. *Current Biology* 19, 1961–1964. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.024>
- Tromas, A., Braun, N., Muller, P., Khodus, T., Paponov, I.A., Palme, K., Ljung, K., Lee, J.-Y., Benfey, P., Murray, J.A.H., Scheres, B., Perrot-Rechenmann, C., 2009. The AUXIN BINDING PROTEIN 1 Is Required for Differential Auxin Responses Mediating Root Growth. *PLoS ONE* 4, e6648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006648>
- Troncoso-Ponce, M.A., Mas, P., 2012. Newly Described Components and Regulatory Mechanisms of Circadian Clock Function in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant* 5, 545–553. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr117>
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., Katagiri, F., 2009. Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLoS Genetics* 5, e1000772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>
- Udvardi, M.K., Czechowski, T., Scheible, W.-R., 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *THE PLANT CELL ONLINE* 20, 1736–1737. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061143>
- Ulmasov, T., 1997. Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *THE PLANT CELL ONLINE* 9, 1963–1971. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>
- van der Wel, H., Loeve, K., 1972. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur. J. Biochem.* 31, 221–225.
- Van Gaal, T., Erwin, J.E., 2005. Diurnal variation in thigmotropic inhibition of stem elongation. *HortTechnology* 15, 291–294.
- van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Vêncio, R.Z.N., Koide, T., 2005. HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. *DNA Res.* 12, 211–214. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi007>
- Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., Guedon, Y., Armitage, L., Picard, F., Guyomarc'h, S., Cellier, C., Parry, G., Koumproglou, R., Doonan, J.H., Estelle, M., Godin, C., Kepinski, S., Bennett, M., De Veylder, L., Traas, J., 2011. The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular Systems Biology* 7, 508–508. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.39>
- Vettore, A.L., 2003. Analysis and Functional Annotation of an Expressed Sequence Tag Collection for Tropical Crop Sugarcane. *Genome Research* 13, 2725–2735. <https://doi.org/10.1101/gr.1532103>
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benkova, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., Friml, J., 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132, 4521–4531. <https://doi.org/10.1242/dev.02027>
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 3, 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Voll, L., 2011. Common motifs in the response of cereal primary metabolism to fungal pathogens are not based on similar transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science* 2. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00039>
- Waclawovsky, A.J., Sato, P.M., Lembke, C.G., Moore, P.H., Souza, G.M., 2010. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnology Journal* 8, 263–276. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00491.x>
- Wang, G.F., Seabolt, S., Hamdoun, S., Ng, G., Park, J., Lu, H., 2011. Multiple Roles of WIN3 in Regulating Disease Resistance, Cell Death, and Flowering Time in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* 156, 1508–1519. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176776>
- Wang, G.-Y., Shi, J.-L., Ng, G., Battle, S.L., Zhang, C., Lu, H., 2011. Circadian Clock-Regulated Phosphate Transporter PHT4;1 Plays an Important Role in Arabidopsis Defense. *Molecular Plant* 4, 516–526. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr016>
- Wang, K.L.-C., Li, H., Ecker, J.R., 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14 Suppl, S131–151.
- Wang, W., Barnaby, J.Y., Tada, Y., Li, H., Tör, M., Caldelari, D., Lee, D., Fu, X.-D., Dong, X., 2011. Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* 470, 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature09766>
- Wang, Z.X., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Sasaki, T., Yano, M., 2001. Expression of the Pib rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defences. *Plant Mol. Biol.* 47, 653–661.
- Wang, Z.Y., Tobin, E.M., 1998. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93, 1207–1217.
- Westfall, C.S., Herrmann, J., Chen, Q., Wang, S., Jez, J.M., 2010. Modulating plant hormones by enzyme action: the GH3 family of acyl acid amido synthetases. *Plant Signal Behav* 5, 1607–1612.
- Weyman, P.D., 2005. A Circadian Rhythm-Regulated Tomato Gene Is Induced by Arachidonic Acid and Phythophthora infestans Infection. *PLANT PHYSIOLOGY* 140, 235–248. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068874>
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D.G.O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A., Kamoun, S., 2012. Effector Biology of Plant-

- Associated Organisms: Concepts and Perspectives. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 77, 235–247. <https://doi.org/10.1101/sqb.2012.77.015933>
- Wisniewska, J., 2006. Polar PIN Localization Directs Auxin Flow in Plants. *Science* 312, 883–883. <https://doi.org/10.1126/science.1121356>
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., Zhao, Y., 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18518–18523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108436108>
- Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95, 707–735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- Xu, Y.-X., Xiao, M.-Z., Liu, Y., Fu, J.-L., He, Y., Jiang, D.-A., 2017. The small auxin-up RNA OsSAUR45 affects auxin synthesis and transport in rice. *Plant Molecular Biology* 94, 97–107. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0595-7>
- Yang, H., Murphy, A.S., 2009. Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Journal* 59, 179–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03856.x>
- Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., Nielsen, E., 2006. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr. Biol.* 16, 1123–1127. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.029>
- Yang, Y., Xu, R., Ma, C.-j., Vlot, A.C., Klessig, D.F., Pichersky, E., 2008. Inactive Methyl Indole-3-Acetic Acid Ester Can Be Hydrolyzed and Activated by Several Esterases Belonging to the AtMES Esterase Family of Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* 147, 1034–1045. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118224>
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., Speed, T.P., 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 30, e15.
- Yerushalmi, S., Green, R.M., 2009. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol. Lett.* 12, 970–981. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x>
- Zazimalová, E., Murphy, A.S., Yang, H., Hoyerová, K., Hosek, P., 2010. Auxin transporters--why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001552. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001552>
- Zhang, C., Xie, Q., Anderson, R.G., Ng, G., Seitz, N.C., Peterson, T., McClung, C.R., McDowell, J.M., Kong, D., Kwak, J.M., Lu, H., 2013. Crosstalk between the circadian clock and innate immunity in Arabidopsis. *PLoS Pathog.* 9, e1003370. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003370>
- Zhang, E.E., Kay, S.A., 2010. Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 764–776. <https://doi.org/10.1038/nrm2995>
- Zhao, Y., 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 61, 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>
- Zhou, M., Wang, W., Karapetyan, S., Mwimba, M., Marqués, J., Buchler, N.E., Dong, X., 2015. Redox rhythm reinforces the circadian clock to gate immune response. *Nature* 523, 472–476. <https://doi.org/10.1038/nature14449>

8. ANEXOS

A - Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Gustavo Antônio Teixeira Chaves

Nascimento: Anápolis (GO), 13/06/1988.

EDUCAÇÃO

1) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. 2012.
Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

2) Universidade de Brasília, Brasília - DF. 2010
Graduação - Bacharelado em Ciências Biológicas

3) Colégio Delta, Anápolis – GO. 2005.
Ensino Médio.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Tools for Plant Synthetic Biology. Carga horária: 40h.
University of Warwick, WARWICK, Inglaterra. 2014.

PUBLICAÇÕES

Artigos Publicados

- 1) ALVES-LIMA, CICERO ; CAVAÇANA, NATALE ; CHAVES, GUSTAVO ANTONIO TEIXEIRA ; DE LIMA, NATALIA OLIVEIRA ; STEFANELLO, ELIEZER ; COLEPICOLA, PIO ; HOTTA, CARLOS TAKESHI . Reference genes for transcript quantification in *Gracilaria tenuistipitata* under drought stress. *Journal of Applied Phycology*, v. 28, p. 1-10, 2016.

Capítulos de livros publicados

- 1) CHAVES, G. A. T.; Zaini, Paulo A ; da Silva, Aline M . Iron as a regulator of virulence in plant pathogenic bacteria.. In: Nian Wang; Jeffrey B. Jones; George W. Sundin; Frank White; Saskia Hogenhout; Caroline Roper;Leonardo De La Fuente; Jong Hyun Ham. (Org.). *Virulence mechanisms of plant pathogenic bacteria..* 1ed.St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press, 2015, v. 1, p. 263-283.

Resumos Publicados Em Anais De Congressos

CHAVES, GAT ; ALVES, CL; HOTTA, CT. The Circadian Clock of Sugarcane Influences Auxin Transcriptional Responses. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Natal, RN. 2016.

ALVES, CL; CHAVES, GAT; Hotta, CT. Circadian transcriptional and physiological changes of osmotically induced drought in sugarcane. In: 11th International Congress of Plant Molecular Biology. Foz do Iguaçu, RS. 2015;

CHAVES, GAT; ALVES, CL; Hotta, CT. Auxin signaling networks and their interaction with the circadian clock of sugarcane. In: 11th International Congress of Plant Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. 11th International Congress of Plant Molecular Biology, 2015.

DANTAS, LLB; SORTICA, D; ALVES, CL; CHAVES, GAT ; CARNEIRO, MS; SOUZA, GM; HOTTA, CT. Circadian and diurnal rhythms regulate the commercial sugarcane metabolism. In: 2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference. Campos de Jordão, SP. 2014

HOTTA, CT; DANTAS, LLB; SORTICA, D; ALVES, CL; CHAVES, GAT. Circadian and diurnal rhythms regulate the commercial sugarcane metabolism. In: SEB Annual Meeting. Manchester, Inglaterra. 2014.

CHAVES, GAT; ZAINI, PA; da SILVA, AM. Iron Uptake and Siderophore Utilization in *Xylella fastidiosa*. In: XLI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Natal, RN. 2012.

SIQUEIRA, E. M. A. ; BEAL, F. L. R. ; CHAVES, G. A. T. ; OLIVEIRA, L. F. ; VALENCIA, F. F. ; ARRUDA, S. F. . Vitamin A Deficiency Promotes Spleen Iron Overload by Increasing Hepatic Hpcidin and Decreasing Spleen Ferroportin and DMT-1 mRNA Levels. In: IV Congress of the International Society for Nutrigenetics / Nutrigenomics ISNN, 2010, Pamplona. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 2010. v. 3. p. 73-73.

CHAVES, GAT; ARRUDA, SF; SIQUEIRA EMA. Efeito da Vitamina A na Expressão da Proteína Ferroportina no Baço de Ratos. In: 62ª Reunião Anual da SBPC. Natal, RN. 2010.

CHAVES, GAT; ARRUDA, SF; SIQUEIRA EMA. Vitamin A Deficiency Effect in the Expression of Spleen Ferroportin gene in Rats. In: XXXIX Annul Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Foz do Iguaçu, RS. 2010.

CHAVES, GAT; ARRUDA, SF; SIQUEIRA EMA. Efeito da Vitamina A na Expressão da Proteína Ferroportina no Baço de Ratos. In: XV Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília e 5º Congresso de Iniciação Científica do DF. Brasília, DF, 2009.

CHAVES, GAT; ARRUDA, SF; SIQUEIRA EMA. Efeito do consumo da amêndoa de barú na atividade específica de enzimas antioxidantes do coração de ratos. In: XIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília e 4º Congresso de Iniciação Científica do DF. Brasília, DF. 2008.

B – Lista de primers usados no projeto de pesquisa

SAS	Anotação	Iniciador direto	Iniciador reverso
SCCART1C01F08.g	<i>ScSAURa</i>	GACTGCAGGAGGATCCAGATT	ACAACGAAACGGGACAAGAG
SCRST1041C05.g	<i>ScGH3a</i>	GAGGGGAAAGCCATGTATCTT	TGCAAGAACTGAGGGCTCTT
SCCCAM2004G02.g	<i>ScPIN1a</i>	GCAAAAGCCTTGGGATGAC	AGCCCTCCACATGATTAACAAC
SCVPRZ2041G12.g	<i>ScGH3b</i>	TCCTCCGACTAAGGTAGACGAC	TGACACGACCAGAAAACCAA
SCCCCL6003D08.g	<i>ScTIR1a</i>	GCTTGATAGTGTCCGCCTCT	CCAGAGACTGAAAGCCTGGT
SCEQRT2093D08.g	<i>ScAux/IAAa</i>	ATCTTCATTGCCTCGCTGAT	TTCGAGATGTTCACTAGCACTTG
SCCCLR1001A11.g	<i>ScTSAa</i>	TGCCCCATTGTTCTTTTCAC	AGCTTTTGCGATTTCTTCA
SCCCSB1002H04.g	<i>ScTOC1</i>	TGCCCCAACCCCACTACTC	CTTCGCTGGAGCAGGATATTTT
SCCCLR2C02A05.g	<i>ScEXPa</i>	GGCAGCTGACGGAATAGCAA	AAAGAGCACCGGCAATGG
SCAGLR1064F05.g	<i>ScCESa</i>	GCCATATGCGGCGAGATC	CAACCTTCCTGTGCAACCAA
SCAGLR1043E04.g	<i>ScCYPa</i>	TGAAGCGGACGAATTTGAGTAG	AGCTCGCCATAGAGACTTGGAT
SCCCLR2C01F06.g	<i>Hipotético</i>	CACCAACCAGAGCGCAAAT	GCGGCCATCTATGTATCTGCTT
SCEPRZ1010E06.g	<i>ScPP2C</i>	CGTCTTCTAGCCTCTGAAACAC	AGACAGCAGAGGTGGACATGAA
SCUTST3086G11.g	<i>ScCAB2</i>	TGATACATGCATCTGTGCTGCTT	TGGTAGGCCGCGGTGTAG
SCVPRZ3029B05.g	<i>ScAux/IAAb</i>	AGCACAACAAGACCCTCTGGAT	TCGCCACATCTTCTGTGAA
SCCART2001H11.g	<i>ScARFa</i>	GCAGAAACGGAGCCATGGT	GCCAAATTTACGCAAAACGA
SCJLLR1033E07.g	<i>ScEXPb</i>	GGTCTGCGGCAACCA	CCTGCACCGAATCTTGTAGCA
SCEPAM2015F01.g	<i>ScARFb</i>	TGAGGTTGCGGCATTTGT	TCCCACCTGACCACCTACAC
SCEPLR1008A10.g	<i>ScAux/IAAc</i>	TGGGTATGTATGGGCATGTG	CTCCATGTCGTCTTTGGTTTG
SCCCLR1024F10.g	<i>ScARFc</i>	GCAACAATCACACCAGGAAAT	CAGACTCGGACACACCAGAA
SCCCCL3005F04.g	<i>ScARFd</i>	TCAAAAGTGACGGGGAGTCTA	CCGCATTAGCACCATACCT
SCJFAM1068H09.g	<i>ScAOX3a</i>	TTCCTGGTCCTTCTGTTCTT	ATGTCCAAGTCCCGTCAGAG
SCCCCL4002F06.g	<i>ScTSAb</i>	GCAGCCTCACTCCTCAAAAC	CTAGCAAAGGGCACCACATT
SCCCCL6003A11.g	<i>ScAux/IAAd</i>	AAGGGGCTCACAGACCTACA	GGGCTGCTGTTACGTGGTAT
SCEQLB1063H10.g	<i>ScAux/IAAe</i>	CATAAAATGGCACTGAGCTTG	TGAACATTCTCCACGGAACA
SCVPRZ2036F01.g	<i>ScAux/IAAf</i>	GGTGGACCTCAAGACCTATTCA	TGTCTTGCGTGAAGTGTCTT
SCJFRZ2009F04.g	<i>ScAux/IAAg</i>	GGTCTGCGTCATCGTCTCTT	CACCATCTTTGTTACGGTGTGT
SCJLRT1006C06.g	<i>ScACSa</i>	GTCAAGCGACAGTTGGTTCTC	GTGGAAGGCCTACGAAATGA
SCJLRT1023B12.g	<i>ScPIN1b</i>	GCTGGAGAAATCCCATGGAC	ACGGCAAGATACACGTCACC
SCEPRZ3129G07.g	<i>ScGH3c</i>	GAGCTACTTCGGCATCAACC	TGTGGCAAGGGGAGAAACT
SCCCLR1048E10.g	<i>ScCCA1</i>	CCACCACGGCCTAAAAGAAA	TGGTTTTGTTGACTTGTCTTTGG
SCACLR1057C07.g	<i>ScPRR7</i>	CAAGTAATTCACCCCAAATCAGAGATA	TCCCATAGATTCATCTTTATTCTCCTTAT
SCQGS2047F01.g	<i>Hipotético</i>	GGATGAGGTGCTGACAGATG	AAGCGAGACGACTATGAACGA
SCCCAM1002G07.g	<i>Hipotético</i>	TGTTGATGAGGAGTGGTGATG	CGTACCGTCACCAACAGAAC
SCCCLR1072A03.g	<i>ScATP</i>	GGGCAGAAGGTGTTGATATGTC	ATCCAAAAGGCTGTTAGAATTCAAG
SCCCRZ1002H03.g	<i>ScTUB</i>	CGACATTGAGAGGCCCAACT	GGGAAGCAGTAAGTGATGAGATCA
SCJFRZ2009G01.g	<i>Sc60S</i>	GCGAGTGCCTCACCTTTGAC	TCTTAGGTCCCCTCAGCAGAAC
SCSBRZ3119G01.g	<i>ScLR1</i>	GCAGCATGTCCACCTTTACCA	CTAGGCCAGGACCCTTTGC

C - Genes apontados como diferencialmente expressos em experimentos de oligoarranjos com amostras de plântulas de cana-de-açúcar estimuladas com auxina em diferentes pontos temporais de um ciclo circadiano.

Nome da SAS	Categoria funcional	Produto gênico putativo	Expressão observada					
			ZT0	ZT4	ZT8	ZT12	ZT16	ZT20
SCMCLR1123H12.g	Metabolismo de nitrogênio e aminoácidos	Proteinase aspártica	↑				↓	
SCMCST1049H08.g		Nicotianamina sintase			↓		↓	
SCSBSB1051H05.g		Tirosina aminotransferase				↑		
SCBGST3111B12.g		Aspartato quinase					↓	
SCEQRT2025E11.g	Biossíntese de metabólitos secundários	Terpeno sintase					↑	
SCEZAM2035H08.g	Metabolismo de carboidratos	Glicosil transferase					↓	
SCSGLR1025F04.g		Galactoquinase					↑	
SCVPRZ2037A02.g		B-galactosidase	↑					
SCEQHR1082B01.g		Glicosil hidrolase	↑					
SCRURT2008D11.g		Glicosil hidrolase	↑					
SCSFRT2067F07.g		Transportador de carboidrato	↓		↑	↓		
SCCCLB1021E06.g		Amido sintase	↓					
SCJLFL3014G04.g		B-galactosidase			↑			
SCUTRZ3071D05.g		Glicerol-3-fosfato desidrogenase			↓			
SCEPLR1051A07.g		Trealose fosfatase				↓		
SCCCCL3001F10.b		Fosfoenolpiruvato carboxilase					↑	
SCCCLR2C01D10.g		6-Fosfofrutoquinase					↑	

SCJFRZ2007A03.g	Metabolismo de carboidratos	Fosfoenolpiruvato carboxilase quinase					↑	
SCPIRT3021H05.g		Glicosil transferase					↓	
SCCCLR1072D05.g		Transportador SWEET					↓	
SCCCLR1001E06.g		Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase					↑	
SCUTAM2089E05.g		B-amilase					↓	
SCSFRT2067F07.g		Transportador	↓		↑	↓		
SCQSLR1090F02.g		Glicosil transferase			↓			
SCCCCL4015C03.g	Ciclo celular	Fator de transcrição com domínio MADS				↓		
SCJLLR1106H06.g	Metabolismo de parede celular	Celulose sintase		↓				↓
SCCCCL4006H09.g		Expansina				↑		
SCCCCL6024F07.g		Cinamoil-CoA redutase			↓		↓	
SCEQSB1C06D05.g		Cinamoil-CoA redutase			↑			
SCEQRT2028G01.g		Redutase envolvida na síntese de fenilpropanoide				↑		
SCCCCL5072C04.g		Expansina				↑	↑	
SCCCRT1002F03.g		Xiloglucana endotransglicosilase/hidrolase				↑	↑	
SCSBAD1054A07.g		Cinamil álcool desidrogrenase					↑	
SCEQRT2026A06.g		Expansina					↑	
SCEZHR1087F06.g		5-ferulato hidroxilase					↑	
SCCCLR2C02H01.g		Celulose sintase						↓
SCRFLB1055E11.g		Xiloglucana endotransglicosilase/hidrolase						↑
SCBFLR1026E06.g	Desenvolvimento	E3 ubiquitina ligase			↓			
SCCCCL6005A05.g		Fator de transcrição					↓	

SCACSD2018E08.g	Desenvolvimento	Precursor de glicoproteína						↓
SCSBFL5014D03.g	Metabolismo de DNA	DNA topoisomerase		↑		↑		
SCMCRT2104F02.g		DNA glicosidase		↑		↑		
SCCCLR2001D10.g		Envolvido na formação do nucleossomo	↑					
SCVPRZ2041G12.g	Biossíntese de hormônios	Sintetase da família GH3.8	↑	↑	↑	↑	↑	↑
SCCCCL3002B05.b		Sintetase da família GH3.8	↑			↑	↑	
SCJLLR1054A06.g		ACC Oxidase				↓		
SCJFRZ2011C11.g		Receptor Ser/Thr quinase			↑		↑	
SCRFHR1006G03.g	Captação de luz	Precursor de pigmento			↑			
SCJLST1022G06.g		Proteína ligante de clorofila (CAB)				↓		
SCSFLR2031F07.g		Proteína do fotossistema II				↓		
SCEQRT2095G03.g	Metabolismo de lipídeos	Glicerofosfodiéster fosfodiesterase					↑	
SCSGLR1084F11.g		Lipase de classe 3		↓				
SCJFAD1011C01.g		Semelhante a lisofosfolipase			↑			
SCBGLR1097B08.g		Relacionada a síntese de ergosterol			↑	↓		
SCEPSB1136F09.g		Glicerol-3-fosfato aciltransferase			↓			
SCCCLR1C07E01.g		Sulfolípido sintase				↑	↑	
SCSBAM1085B06.g		Dessaturase de ômega 3					↓	
SCJFRT2054F10.b		3-cetoacil-CoA sintase					↑	
SCJFSB1010E03.g		Hidroxilase de ácidos graxos					↑	
SCVPLR1006E03.g	Metabolismo de nucleotídeos	Guanilato quinase					↓	
SCCCLB1001B05.g	Resposta a patógeno	Relacionado a percepção de quitina					↓	

SCEZHR1047F05.g	Resposta a patógeno	Quitinase				↓	
SCQSRT2031D12.g		b-1,3-glucanase	↑	↓			
SCRLRZ3042H12.g		b-1,3-glucanase				↓	
SCJLRT1023E06.g		b-1,3-glucanase				↑	
SCEQRT1025C10.g		b-1,3-glucanase				↑	
SCEPSD2071B08.g		Inibidor de proteinase				↑	
SCEQRT1026F09.g		Peroxidase		↓			
SCAGCL6013C08.g		Proteína com domínio Barwin			↑		
SCBGRT1047G10.g		Germina		↓			
SCUTLR1037C05.g		Germina	↓				
SCCCST2004G03.g		Relacionada a resposta de injúria			↑		
SCJLLR1108B01.g		Relacionada a resposta de injúria			↑		
SCBFRT3095E07.g		Semelhante a Flg22				↓	
SCCCRT2002D03.g		Gene R			↑	↑	
SCCCSD1003E06.g		Taumatina		↓		↑	
SCCCLR1065C05.g		Quitinase	↓				
SCQSRT1035D12.g		Taumatina	↑	↓			
SCJLLB2076C12.g		Quitinase	↑				
SCCCCL3003E07.b		Quitinase	↑				
SCCCRT3001A02.g		Quitinase		↓		↑	
SCJLRT2051G07.g		Taumatina		↓		↑	
SCEQRT1024H10.g		Taumatina		↓		↑	

SCRFSD2023E07.g	Resposta a patógeno	Gene R			↓		↑	
SCUTFL3074E04.g		Relacionada a resposta a patógenos				↓		
SCEPSD1007C11.g		Gene R					↑	↑
SCEQRT2027C06.g		Relacionada a resposta de injúria				↑		
SCCCLR2C01F06.g		Relacionada a resposta de injúria				↑	↑	
SCSGRT2063H08.g		Relacionada a resposta a patógenos					↑	
SCCCCL3120A12.g	Metabolismo de proteínas	Ulp1 protease			↑		↓	
SCVPRT2073F12.g		Clp protease			↓			
SCSFCL6068E04.g		Cisteína protease					↓	
SCEZHR1048C09.g		Cisteína protease						↑
SCSFSD1066G06.g		E3 ubiquitina ligase				↑		
SCCCCL3120G07.g		Hsp70				↑		
SCJFRZ2009E12.g		S8 protease				↓		
SCRFLB2060E04.g		Tiorredoxina				↓	↓	
SCJFRT1060E10.g		Proteína com domínio F-box				↓		
SCEPRZ3132A06.g		Ubiquitina transferase	↓				↓	
SCUTAM2007G01.g		Proteína da subunidade ribossomal 50S				↓		
SCEZRZ3098F04.g	Metabolismo redox	Glutationa S-transferase	↓					
SCQGLR2025B01.g		Lacase	↓	↓			↑	↓
SCRFRZ3058E03.b		ABA 8-hidroxilase		↓		↓	↓	
SCBGLR1096C09.g		Tiorredoxina redutase					↓	
SCCCCL5002F03.g		Citocromo P450					↓	
SCUTST3084C11.g		Lacase						↓

SCEZHR1085B11.g	Metabolismo de RNA	Proteína ligante de RNA					↓	
SCJFRT1059F04.g		CAF-1 ribonuclease			↓			
SCMCCL6051F09.g		PRPF18 (pre-rRNA-splicing factor)				↑		
SCCCLR1024E02.g		Proteína ligante de ácido nucleico				↑		
SCAGLR2026C04.g		Inibidor de atividade de ribonuclease	↑					
SCQSST1037F06.g		EICBP4 (Ethylene-induced calmodulin-binding protein 4)					↓	
SCBFRT1071B01.g	Sinalização celular	Receptor Ser/Thr quinase		↑				
SCMCCL6053A05.g		Proteína GRAS				↑		
SCRFAD1022A03.g		Ser/Thr/Tyr quinase					↓	
SCEPLR1008A10.g		Aux/IAA	↑				↑	↑
SCCCRZ2C04D05.g		Aux/IAA	↑	↑	↑		↑	
SCVPLR2019D04.g		Aux/IAA	↑		↑	↑	↑	
SCCCAM2004G02.g		PIN1		↑	↑		↑	
SCEQRT2093D08.g		Aux/IAA		↑		↑		
SCACLR2014A01.g		Proteína SAUR		↑			↑	
SCCCST3006E12.g		Proteína responsiva a auxina			↑			
SCCCCL3003H02.b		Aux/IAA			↑	↑	↑	
SCEQLR1029C10.g		Proteína semelhante a calmodulina					↓	
SCJLRT1021D08.g		Proteína induzida por auxina (5NG4)					↓	
SCSGHR1069F02.g		Quinase associada a parede celular					↑	
SCVPFL3046C06.b		PP2C					↓	
SCJLRT1014G05.g		Tirosina fosfatase					↑	

SCAGLR2018F09.g	Sinalização celular	Fator de transcrição com domínio MYB					↑	
SCEQRT2101A04.g		Proteína com domínio SPX					↑	
SCQSHR1023B08.g		AP2/EREBP					↓	
SCJFRT2060G04.g		Proteína com domínio ZF-HD					↑	
SCJLRT1016A09.g		Proteína com domínio ZF-HD					↑	
SCCCLR2C03D06.g		Receptor Ser/Thr quinase					↑	
SCJLLR2013H07.g		AP2/EREBP					↓	
SCCCCL4005C09.g		CPRF2					↓	
SCCCRZ2C04F05.g		MAP quinase					↓	
SCVPLR2005H03.g		Aux/IAA					↑	
SCRUSB1078B08.g		Glutaminase					↓	
SCEZHR1049E02.g		Receptor Ser/Thr quinase					↓	
SCRFST3145H11.g		GID1L2					↓	
SCCCLR1067B06.g		Fator de transcrição com domínio bZIP				↑	↑	
SCJFRZ2028F06.g		Proteína SAUR				↑	↑	
SCRUFL3060E12.g	Resposta a estresse	Proteína Hsp		↓				
SCEQAM2038H01.g		Proteína de resistência ao frio				↑		
SCQGLR1085F11.g		Deidrina		↑			↓	
SCUTLR2030B11.g		Fator de transcrição de choque térmico				↑		
SCSBST3096H04.g		Inositol-1,4,5-trifosfato 5-fosfatase					↓	
SCQSRT2031H06.g		Proteína LEA (Late embryogenesis abundant)					↓	
SCRLFL1004E03.g		Inositol-1,4,5-trifosfato 5-fosfatase					↓	

SCUTCL6035F07.g		Proteína LEA (Late embryogenesis abundant)		↑		↓	
SCRURT2011D06.g	Transporte	Ureido permease				↑	
SCEZRZ1017H11.g		Transportador de Zn/Fe/Cd					↑
SCRLFL4028D02.g		Trocador de Na e H ⁺					↓
SCCART2002G08.g		Transportador SWEET	↓				
SCEQRT2028C04.g		Aquaporina	↓				
SCMCCL6053C09.g		Transportador de peptídeo		↑		↑	
SCEQRT1024B11.g		Aquaporina		↑		↑	
SCCCLR2C01C10.g		Proteína semelhante a WAT1			↑		
SCRLAM1008F10.g		Transportador de oligopeptídeo				↑	
SCJLRT1013E08.g		Aquaporina					↑
SCEQRT3C03F06.g		Transportador de carboidrato					↑
SCEPRZ1008D05.g		Aquaporina					↓
SCCCLR1C03C11.g		ATPase transportadora de glicerol-3-fosfato					↑
SCEZRZ1014G02.g		Transportador de proteína					↓
SCCCLR1C04G11.g		Transportador de proteína					↓
SCRLLR1059A03.g		Transportador de GDP-manose					↑
SCEZRZ3019H07.g		Transportador não-caracterizado					↓
SCSFAM1076F04.g		Transportador de potássio				↓	