UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LUÍZA LANE DE BARROS DANTAS

Caracterização do relógio biológico e seu impacto no metabolismo da cana-de-açúcar

Versão corrigida da tese defendida conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

23/02/2017

LUÍZA LANE DE BARROS DANTAS

Caracterização do relógio biológico e seu impacto no metabolismo da 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: Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Dantas, Luíza Lane de Barros
D192c Caracterização do relógio biológico e seu impacto no metabolismo da cana-de-açúcar / Luíza Lane de Barros Dantas. -- São Paulo, 2017.
201p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador : Hotta, Carlos Takeshi

1. Bioquímica I. T. II. Hotta, Carlos Takeshi, orientador.

574.192 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Caracterização do relógio biológico e seu impacto no metabolismo da cana-de-açúcar"

LUÍZA LANE DE BARROS DANTAS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis
IQ - USP

Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani
IQ – USP

Prof. Dr. Igor Cesarino
IB – USP

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira
IB – UNICAMP

SÃO PAULO
10 de abril de 2017

Para Antônio Vieira de Medeiros

Para Francisco Assis de Medeiros

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas de doutorado pleno no país (processo 2011/08897–4) e de estágio no exterior (processo 2015/10220–3) e por todo o fomento para além disso, essenciais à realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Takeshi Hotta, pelo aceite, pela paciência, pela mentoria, por compartilhar, por advertir, por consolar, por inspirar, por incentivar, por editar, por ensinar. Por estar lá. Por se importar. Por acreditar até quando eu não acreditei. A minha gratidão vai além das palavras.

Ao Prof. John W. S. Brown, da Universidade de Dundee (Escócia), que me acolheu e orientou ao longo do ano de estágio no exterior, pela imensa generosidade, por compartilhar, por ensinar, por transformar e por inspirar. À Dra. Cristiane Calixto, pós-doutora do mesmo laboratório, por acolher, por dividir, por ensinar e pela convivência tão rica.

À Profa. Glaucia Mendes de Souza, pela disposição de recursos, de equipamentos e do laboratório – pela colaboração, enfim. Sem tudo isso, não haveria condições de executar um bom trabalho. À Dra. Carolina Lembke, pela disposição em ensinar e trocar conhecimento, pela amizade e pela inspiração.

À Profa. Monalisa Carneiro Sampaio, do Centro de Ciências Agrárias, UFSCAR, pela concessão de todos os campos de cana-de-açúcar a partir dos quais este trabalho foi feito. À Msc. Isabella Valadão e ao técnico Sandro, pelo apoio nos experimentos de campo.

A todos aqueles que fizeram parte das equipes dos experimentos conduzidos em campo: Carolina Bianchi, Cícero Alves, Daniel Ariano, Daniel Galera, Gustavo Chaves e Natale Cavaçana. Obrigada pela ajuda em condições tão exaustivas e, às vezes, extremas. Minha gratidão é imensa.

A José Carlos A. Pereira Junior (Seu Zé Carlos), Nelson Z. de Cerqueira (Seu Nelson) e Reginaldo J. Silva (Seu Reginaldo), funcionários da Seção de Transportes do IQ-USP, pela disponibilidade para as viagens de campo.

Aos Drs. Savio Ferreira e Milton Yutaka, por toda a generosidade em dividir conhecimento e pelo convívio tão agradável.

A todos os alunos e pós-doutores que passaram pelo Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas ao longo desta fase, pelas mais diversas trocas de conhecimento, convivência e auxílio. Tudo se torna melhor quando é compartilhado.

Às queridas técnicas Alessandra Teixeira e Érica Bandeira, pelo apoio técnico, pela convivência tão agradável e pela amizade.

À minha família, por todos os apoios (muitas vezes às cegas) e por acreditar incondicionalmente que tudo seria possível. Vocês me ensinaram a ser destemida. Vocês me disseram que eu poderia ser o que quisesse. Bem, cá estou.

A todos os meus amigos, tão queridos, pelo estímulo (também às vezes às cegas) pelo conforto e por estarem presentes, de uma forma ou de outra. Em todos os lugares do mundo, onde quer que estejam, meu sincero muito obrigada.

Por seres tão inventivo
E pareceres contínuo
Tempo Tempo Tempo Tempo
És um dos deuses mais lindos
Tempo Tempo Tempo Tempo

Caetano Veloso

Resumo

(Dantas, L.L.B.) **Caracterização do relógio biológico e seu impacto no metabolismo da cana-de-açúcar.** 2017. (201p). Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O relógio biológico é um mecanismo molecular autossustentado gerador de ritmos. Ele integra vias de percepção das condições ambientais com um oscilador central para gerar respostas fisiológicas rítmicas em escalas diária e sazonal. Nas plantas, o relógio biológico está associado a vias metabólicas e fisiológicas importantes, como fotossíntese. Na cana-de-açúcar, uma gramínea de grande interesse econômico, estudos realizados em condições circadianas mostraram que o relógio biológico tem uma influência superior àquela vista em outras plantas. Assim, este trabalho visa a compreender os mecanismos de funcionamento do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar crescida em campo. Para tanto, foram investigados o transcriptoma de diferentes órgãos da cana-de-açúcar; a expressão de isoformas alternativas e de múltiplos alelos dos genes do relógio biológico da cana; e o efeito do sombreamento mútuo das plantas em campo sobre o funcionamento do relógio biológico. Os resultados obtidos sugerem que o relógio biológico é funcional e sincronizado entre os diferentes órgãos da cana-de-açúcar analisados. Os transcritos regulados sinergicamente pelo relógio biológico e pelo ambiente flutuante pertencem a vias metabólicas, fisiológicas e de regulação gênica e epigenéticas – todas essenciais à produtividade da cana-de-açúcar. O sombreamento mútuo observado em campo parece alterar a fase de expressão de genes do relógio biológico da cana-de-açúcar. Além disso, eventos de *splicing* alternativo foram observados nos genes do relógio biológico em condições de baixa temperatura e múltiplos alelos dos genes do relógio biológico são expressos e a regulação de sua expressão parece ser sazonal.

Palavras-chave: relógio biológico, cana-de-açúcar, transcriptoma, sombreamento, *splicing* alternativo, alelos.

Abstract

(Dantas, L.L.B.) **Characterization of the circadian clock and its impact on sugarcane metabolism.** 2017. (201p). PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The circadian clock is a self-sustaining molecular mechanism that generates rhythms. It perceives the environmental conditions and connects this pathway with its central oscillator, generating daily and seasonal rhythms of physiological responses. In plants, the circadian clock is associated with major metabolic and physiological pathways. In sugarcane, an economically important grass, previous studies showed that the circadian clock has the largest influence on plants seen so far under circadian conditions. This work aims to understand how the central oscillator of the circadian clock works in field-grown sugarcane. Thus, the transcriptome from different sugarcane organs; the expression of alternative isoforms and multiple alleles of circadian clock genes; and the effect of mutual shading in the field on the circadian clock function were analyzed. The results suggest that there is a functional and synchronized circadian clock in the different sugarcane organs. The transcripts regulated synergistically by the circadian clock and the variable environment are related to metabolic, physiological, genetic or epigenetic pathways, all important to sugarcane productivity. Mutual shading observed in the field seems to change the phase of expression of the sugarcane circadian clock. Besides, alternative splicing events have been reported for circadian clock genes under low temperature conditions and multiple alleles of circadian clock genes are expressed and their expression is likely to be seasonally regulated.

Keywords: circadian clock, sugarcane, transcriptome, shading, alternative splicing, alleles.

Sumário

1. Introdução Geral 27
1.1. O relógio biológico das plantas 27
1.2. A cana-de-açúcar: caracterização geral e importância econômica 31
1.3. A importância dos experimentos conduzidos sob condições naturais na compreensão do relógio biológico das plantas 38
2. Objetivos Gerais 42
3. Material e Métodos Gerais 43
3.1. Material biológico e condições de campo 43
3.2. Extração de RNA total 47
3.3. Síntese de cDNA 48
3.4. PCR em Tempo Real (qPCR) 48
4. Capítulo 1: Identificação de transcritos rítmicos em cana-de-açúcar cultivada em campo 51
4.1. Introdução 52
4.2. Objetivos 55
4.3. Material e Métodos 56
4.3.1 Experimentos de hibridização com *oligoarrays* 56
4.4. Resultados 58
4.4.1. Perfil geral dos transcritos dos três órgãos de cana-de-açúcar cultivada em campo quanto à expressão e ritmicidade 58
4.4.2 Expressão dos transcritos para os genes do relógio biológico *ScLHY* e *ScTOC1* nos três órgãos de cana-de-açúcar cultivada em campo 62
4.4.3 Análise da expressão de transcritos para importantes vias relacionadas ao relógio biológico 65
4.5. Discussão 78
4.6. Conclusões 85
5. Capítulo 2: Efeitos do sombreamento do campo sobre o relógio biológico da cana-de-açúcar 87
5.1. Introdução 88
5.2. Objetivos 90
5.3. Material e Métodos 91
5.3.1 Condições de campo para experimento com muro 91
5.3.2. Condições de campo para experimento das margens 96
5.4. Resultados 100

5.4.1 Comparação da expressão dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio da cana-de-açúcar crescida em campo, durante diferentes idades da planta 100

5.4.2 Alterações na expressão dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar causadas por sombreamento a partir de muro erguido no campo 105

5.4.3 Alterações na expressão dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar observadas nas margens extremas leste e oeste do campo..... 108

5.5. Discussão 111

5.6. Conclusões 116

6. Capítulo 3: Expressão de isoformas alternativas e múltiplos alelos dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar.....117

6.1. Introdução.....118

6.2. Objetivos.....121

6.3. Material e Métodos 122

6.3.1. Reações de PCR 122

6.3.2. Reações de *High Resolution RT-PCR* (HR RT-PCR) 123

6.3.3. Clonagem e sequenciamento.....125

6.4. Resultados.....127

6.4.1. Anotação e estrutura gênica dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar 127

6.4.2. Identificação de eventos de AS nos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar.....130

6.4.3. Alterações Sazonais e/ou de Desenvolvimento nos Padrões de AS 132

6.4.4. A Expressão de Diferentes Alelos para os Genes do Relógio Biológico da Cana-de-açúcar.....146

6.5. Discussão 165

6.6. Conclusões.....175

7. Discussão Geral 177

7.1. O relógio da cana-de-açúcar cultivada em condições flutuantes é funcional 177

7.2. O papel do AS na atividade do relógio biológico da cana-de-açúcar.....179

7.3. O relógio biológico da cana-de-açúcar possui múltiplos alelos expressos 181

7.4. O sombreamento das plantas no campo leva a alterações no funcionamento do relógio biológico da cana-de-açúcar.....183

8. Conclusões Gerais 187
9. Referências..... 189
A - Súmula Curricular 204

1. Introdução Geral

1.1. O relógio biológico das plantas

Ao longo da evolução, as plantas adaptaram sua fisiologia e seu metabolismo às mudanças ambientais cíclicas diárias (geradas pelo movimento de rotação da Terra) e sazonais (consequência do movimento de translação da Terra), de modo a antecipá-las. O relógio biológico, uma destas adaptações, é um mecanismo de sinalização endógeno, autossustentado e conservado, responsável pela regulação temporal de diversos processos fisiológicos e metabólicos das plantas (McClung, 2006; Harmer, 2009; Hu & Harmer, 2014). O relógio biológico é sensível aos mais diversos aspectos ambientais, principalmente luz e temperatura, através de vias de entrada moleculares, caracterizadas sobretudo por fitocromos e criptocromos. A informação ambiental é incorporada ao oscilador central, que gera os ritmos (Millar, 2004). Os ritmos do relógio biológico são de aproximadamente 24 h, mesmo na ausência dos estímulos ambientais, possuem mecanismos de compensação de temperatura e seu período pode ser reiniciado por diversos estímulos (Gardner *et al.*, 2006; Hotta *et al.*, 2007).

O oscilador central do relógio biológico consiste em múltiplos *feedback loops* negativos de transcrição interconectados, que estão conectados às vias de entrada, as quais entregam informações do ambiente, tais como luz e temperatura, e às vias de saída, que processam a informação gerada pelo oscilador central e coordenam temporalmente importantes eventos metabólicos e fisiológicos (Pokhilko *et al.*, 2012; Hu & Harmer, 2013; Millar, 2016). Em *Arabidopsis thaliana*, o chamado *loop* central do relógio biológico de *Arabidopsis thaliana* consiste em três componentes: AtCCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1) e AtLHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL), abundantes ao amanhecer, e AtTOC1 (TIMING OF CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN EXPRESSION 1) (Harmer *et al.*, 2000; Alabadí *et al.*, 2001), abundante ao

anoitecer (**Figura 1.1**). Estes elementos reprimem mutuamente suas expressões, compondo uma parte do modelo de funcionamento do relógio biológico chamado *repressilator* (Pokhilko *et al.*, 2012). Ainda de acordo com o *repressilator*, AtCCA1 e AtLHY reprimem a expressão de *AtLUX* (*LUX ARHYTHMO*), *AtELF3* (*EARLY FLOWERING 3*) e *AtELF4* (*EARLY FLOWERING 4*) (Dai *et al.*, 2011;Lu *et al.*, 2012**;** Nagel & Kay, 2012; Pokhilko *et al.*, 2012). Associado intimamente a este *loop* central está o *loop* matinal, formado por AtPRR7 e AtPRR9 (PSEUDO RESPONSE REGULATORS 7 e 9), os quais são ativados por AtCCA1 e AtLHY e reprimem sua expressão, também de acordo com o *repressilator* (Locke *et al.*, 2006; Zeilinger *et al.*, 2006; Para *et al.*, 2007; Nakamichi *et al.*, 2010; Pokhilko *et al.*, 2012). No loop noturno, AtTOC1 reprime a expressão de *AtLUX*, *AtELF3* e *AtELF4*, os quais reprimem a expressão de *AtTOC1* e de *AtPRR7* e *AtPRR9* (Dai *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Pokhilko *et al.*, 2012**;** Mizuno *et al.*, 2014).

Sendo um mecanismo conservado, alguns componentes do oscilador central são encontrados em outras plantas. Componentes do *loop* central, as PRRs e componentes do *loop* noturno possuem ortólogos em espécies como milho (Khan *et al.*, 2010), arroz (Murakami *et al.*, 2007; Izawa *et al.*, 2011), cevada (Calixto *et al.*, 2015), trigo (Mizuno *et al.*, 2012; Gawronsk *et al.*, 2014), sorgo (Murphy *et al.*, 2011) e cana-de-açúcar (Hotta *et al.*, 2013).

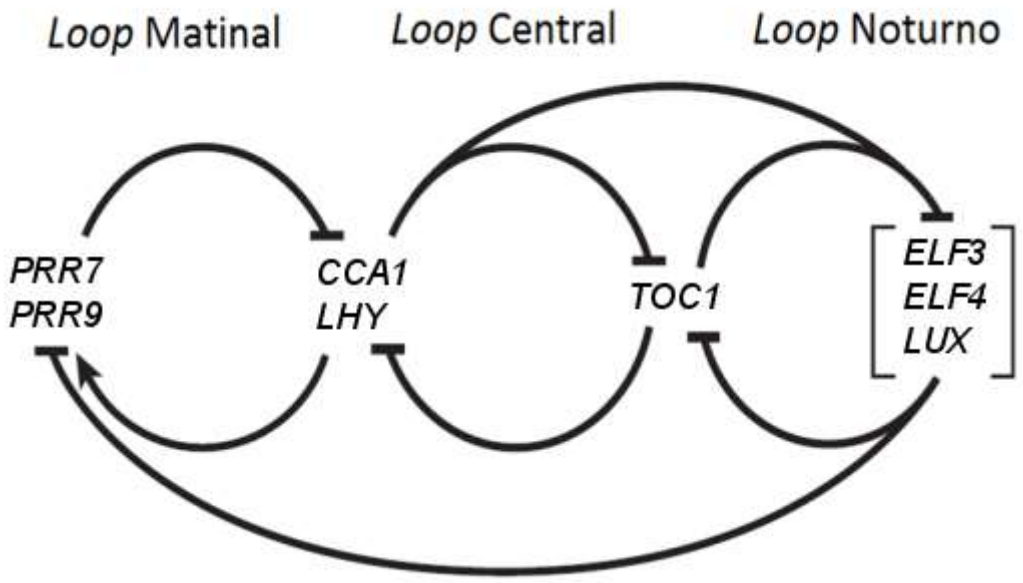


Figura 1.1: Modelo simplificado para o oscilador central relógio biológico de *Arabidopsis thaliana*. Os fatores de transcrição *AtCCA1* e *AtLHY*, abundantes no amanhecer, reprimem a expressão de *AtTOC1*, *AtLUX*, *AtELF3* e *AtELF4*. *AtCCA1* e *AtLHY,* além de *AtLUX*, *AtELF3* e *AtELF4* controlam a ativação de *AtPRR7* e *AtPRR9*. Em contrapartida, eles modulam a expressão de *AtCCA1* e *AtLHY*. *AtTOC1*, abundante ao anoitecer, reprime a expressão de *AtCCA1* e *AtLHY* e de *AtLUX*, *AtELF3* e *AtELF4*. Modelo adaptado de Endo *et al.* (2014).

A importância do relógio biológico está refletida na gama de vias metabólicas e fisiológicas influenciadas por ele: crescimento, atividade enzimática, fotossíntese, acúmulo de biomassa, metabolismo de amido, abertura e fechamento dos estômatos, liberação do aroma floral, movimento das folhas, cotilédones e pétalas, localização subcelular dos cloroplastos, crescimento do hipocótilo e floração (Dodd *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; McClung, 2006; Yakir *et al.*, 2007; Harmer, 2009; Lai *et al.*, 2012; Syed *et al.*, 2012). Ou seja, o metabolismo das plantas responde à regulação rítmica promovida pelo relógio biológico. Em contrapartida, estas vias metabólicas e fisiológicas, organizadas temporalmente pela ação do relógio biológico também exercem influência sobre ele (Haydon *et al.*, 2013; Haydon *et al.*, 2013a). Por exemplo, dados em Arabidopsis sugerem que os açúcares produzidos na fotossíntese entram

no oscilador central do relógio biológico através de regulação de *AtPRR7*, elemento do *loop* matinal do oscilador central do relógio biológico e que, por sua vez, interage com o *loop* central do oscilador (Haydon *et al.*, 2013). Além disso, dados suportam a ideia de que há metabólitos que atuam na sincronização de relógios biológicos de órgãos diferentes nas plantas (James *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2015). Ou seja, os produtos de vias reguladas pelo relógio biológico desempenham um papel importante no funcionamento deste mecanismo nas plantas.

Uma característica importante do relógio biológico das plantas diz respeito à sua sincronização entre diferentes órgãos, de modo a gerar ritmos coordenados na planta. Os primeiros estudos defendiam que cada célula de uma planta teria um relógio biológico e todos estes relógios biológicos seriam sincronizados (Nakamichi *et al.*, 2003). Entretanto, com o passar do tempo esta ideia mudou. Os primeiros estudos a dissecarem o funcionamento dos relógios biológicos de diferentes órgãos das plantas foi realizado em Arabidopsis, comparando o funcionamento dos relógios biológicos da raiz e da parte aérea (James *et al.*, 2008). Os dados sugerem que o relógio biológico da raiz funcionava com um período diferente daquele da parte aérea, a qual era responsável pela sincronização entre órgãos através de um sinal, possivelmente um produto da fotossíntese, que viajaria da parte aérea para a raiz (James *et al.*, 2008). Posteriormente, em Arabidopsis, dados levantados sobre o perfil de expressão de genes do *loop* central do oscilador do relógio biológico sugeriram que havia dominância de expressão de determinados genes em órgãos diferentes (Endo *et al.*, 2014). Ao analisarem a expressão de *AtCCA1*, *AtLHY* e *AtTOC1* em diferentes tecidos encontrados na folha – no caso, mesófilo e vasculatura –, ficou claro que havia dominância de expressão de *AtCCA1* e *AtLHY* no mesófilo, enquanto havia dominância de expressão de *AtTOC1* na vasculatura (Endo *et al.*, 2014). Novos dados

então sugerem uma hierarquia do relógio biológico da parte aérea de Arabidopsis, marcadamente do meristema apical, sobre o relógio de diferentes órgãos, como folha, hipocótilo e raiz, nesta ordem (Takahashi *et al.*, 2015). A novidade neste estudo foi dissecar os diferentes órgãos e detectar em qual estava a dominância de expressão dos genes do oscilador central, especulando sobre a possibilidade de uma sinalização de longa distância sincronizar o funcionamento dos relógios nos órgãos afastados do meristema apical (Takahashi *et al.*, 2015). Embora tenha sido sugerido que o sinal sincronizador entre órgãos seja um metabólito da fotossíntese (James *et al.*, 2008; Haydon *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2015), há evidências de que a luz possa ser percebida pelos órgãos e ser o elemento sincronizador entre os relógios dos órgãos de Arabidopsis (Bordage *et al.*, 2016).

Embora seja uma tendência investigar o estado do relógio biológico em diferentes órgãos nas plantas, a fim de compreender seu funcionamento coordenado, os estudos publicados usam majoritariamente Arabidopsis. É interessante, portanto, expandir estas análises para outras plantas cujo relógio biológico seja marcadamente influente, como no caso da cana-de-açúcar (Hotta *et al.*, 2013). Partindo do pressuposto de que a cana-de-açúcar tem um intenso metabolismo focado em carboidratos devido ao seu acúmulo de sacarose, é possível que o seu relógio biológico, ao ser dissecado em diferentes órgãos, tenha aspectos diferentes do que foi visto até aqui.

1.2. A cana-de-açúcar: caracterização geral e importância econômica

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea da família *Poaceae*. Seu gênero, *Saccharum*, ocorre em zonas tropicais e subtropicais e é caracterizado pela capacidade de acumular açúcares nos seus entrenós maduros. Esta quantidade de sacarose chega a 700 mM (Moore, 1995). Isto corresponde a aproximadamente 50%

do peso seco de seu caule. Além disso, a cana-de-açúcar pertence à tribo *Andropogoneae*, cujos membros realizam fotossíntese C4, assim como milho e sorgo.

A fotossíntese C4, presente na cana-de-açúcar, é uma especialização da fotossíntese C3 que inclui a divisão do processo de fotossíntese em dois teciodos diferentes a fim de se concentrar CO_2 no local da fixação de C pela Rubisco. Este tipo de fotossíntese é caracterizada por uma eficiência aumentada na conversão de energia solar: 6% contra 4,6% da fotossíntese C3 (Zhu *et al.*, 2008). Esta eficiência, que também marca as diferenças entre as fotossínteses C3 e C4, é obtida graças a dois aspectos importantes: 1) a ação conjunta das células do mesófilo e da bainha do feixe vascular (Rhoades & Carvalho, 1944; Ferreira *et al.*, 2013; Furbank, 2017); 2) a enzima Rubisco, responsável pela fixação do CO_2 atmosférico, mas também responsável pela fixação de O_2 no processo de fotorrespiração, funcionar de forma mais eficiente porque a concentração do CO_2 em seu meio é maior, favorecendo a ligação de CO_2 a seu sítio catalítico ao invés de O_2 (Sheen, 1999; Zhu *et al.*, 2008; Heckmann, 2016).

Os açúcares produzidos pela fotossíntese na cana-de-açúcar são armazenados sob forma de sacarose nos entrenós, que são considerados órgãos dreno, pois recebem os açúcares produzidos nos órgãos fotossintetizantes, que são chamados de órgãos fonte, para eles. A partir do entrenó 5 (**Figura 1.2**), a cana-de-açúcar começa a armazenar sacarose. A sacarose é sintetizada no citosol de células dos órgãos fotossintetizantes a partir das trioses fosfatos produzidas pelo ciclo de Calvin. Estas trioses serão convertidas a moléculas de frutose-1,6-bisfosfato, as quais seguirão para desfosforilação (Serrato *et al.*, 2009). A frutose-6-fosfato resultante pode ser convertida a glicose-6-fosfato através da ação da glicose-6-fostato isomerase, ou ser combinada com UDP-glicose para formar sacarose-6-fosfato pela

ação da enzima sacarose fosfato sintase (Stitt & Quick, 1989). A partir daí, a sacarose-6-fostato é desfosforilada, transportada para o floema e encaminhada para os órgãos dreno pela ação de transportadores de sacarose.

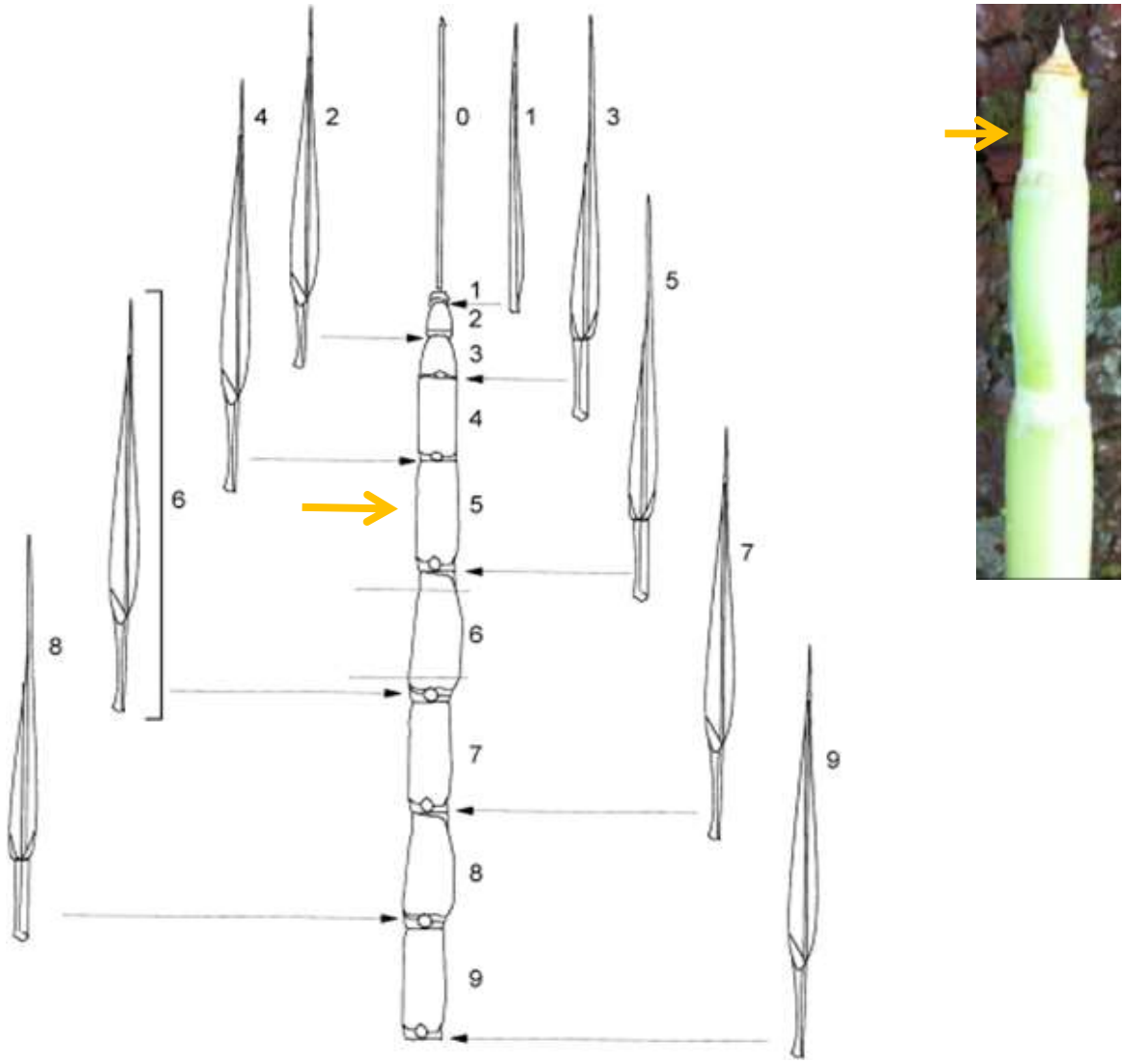


Figura 1.2: Modelo esquemático (esquerda) e imagem (direita) do posicionamento dos órgãos dreno da cana-de-açúcar. Os números no desenho indicam a ordem de posicionamento adotada neste trabalho para determinar os entrenós. A seta laranja indica o entrenó 5, órgão no qual a cana-de-açúcar inicia o acúmulo de sacarose. Modelo adaptado de McCormick *et al.* (2006).

Os cultivares modernos de cana-de-açúcar são progênies híbridas originadas a partir de cruzamentos interespecíficos entre as espécies ancestrais *Saccharum officinarum* (2n = 80, x = 10), espécie caracterizada por elevado acúmulo de sacarose,

e *Saccharum spontaneum* (2n = 64, x = 8), espécie caracterizada pela resistência a estresses abiótico e biótico (Irvine, 1999; Ming *et al.*, 2006). Estes cruzamentos interespecíficos são responsáveis pelas características que definem a complexidade genômica dos cultivares modernos de cana-de-açúcar. Uma delas é o número cromossômico das variedades comerciais, que pode variar de 80 a 160 cromossomos (Ming *et al.*, 1998; Ming *et al.*, 2006). Outra consequência destes cruzamentos nos cultivares comerciais é o perfil de herança cromossômica observado: 70-80% dos cromossomos são herdados de *S. officinarum*, 10-20% dos cromossomos são herdados de *S. spontaneum* e o restante dos cromossomos (cerca de 10%) são recombinantes destas duas espécies (D'Hont *et al.*, 1996; Grivet & Arruda, 2002; Cuadrado *et al.*, 2004; D'Hont, 2005) (**Figura 1.3**). Além disso, o genoma híbrido resultante é extremamente complexo, marcado pela aneuploidia e pela vasta poliploidia, contendo de seis a catorze cópias de cada cromossomo (Garcia *et al.*, 2013). Embora ainda não haja nenhuma versão publicada, é estimado que o tamanho do genoma da cana-de-açúcar gire em torno de 10 Gb (de Setta *et al.*, 2014).

Figura 1.3: Esquema do genoma híbrido dos cultivares comerciais de cana-de-açúcar. Em laranja, os cromossomos herdados do parental *S. officinarum* (70-80% do total); em vermelho, os cromossomos herdados do parental *S. spontaneum* (10-20% do total); os cromossomos bicolores representam aqueles recombinantes (cerca de 10%).

É possível afirmar, portanto, que o número de alelos para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar também pode ser variável. O padrão de herança, isto é, se os genes do relógio biológico herdados por *S. officinarum* ou *S. spontaneum* prevalecem ainda não é claro. Porém, que é sabido sobre o relógio biológico da cana-de-açúcar é que sua influência sobre o transcriptoma é mais abrangente do que em outras plantas investigadas, de acordo com dados retirados a partir de experimentos

sob condições controladas (Hotta *et al.*, 2013). De fato, 32% dos transcritos senso analisados utilizando *oligoarrays* possuem ritmos e estão associados ao relógio biológico em cana-de-açúcar, revelando o quão difundido o relógio biológico é no controle do metabolismo da cana-de-açúcar. Nenhuma outra planta analisada até hoje apresentou tamanha influência do relógio biológico sobre seu transcriptoma (Harmer *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2007; Covington *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010; Filichkin *et al.*, 2011). Os transcritos rítmicos levantados pelos experimentos conduzidos foram agrupados em torno de vias metabólicas e fisiológicas importantes para a cana-de-açúcar: fotossíntese, metabolismo de carboidratos (incluindo síntese de sacarose), regulação de histonas, sinalização por ABA e auxina, metabolismo de ácidos nucleicos – todos processos com potencial de impactar direta ou indiretamente a produtividade da cana-de-açúcar. Todas estas observações fazem da cana-de-açúcar um modelo interessante para o estudo da influência do relógio biológico sobre o funcionamento da planta como um todo. O fato do relógio biológico ter sido investigado principalmente sob condições controladas de laboratório e em um único órgão (foliar, mais especificamente folha +1) levanta questões sobre a situação do relógio biológico em outros órgãos, como os órgãos dreno, por exemplo, e sobre o seu impacto na fisiologia e metabolismo do funcionamento do relógio biológico em cana-de-açúcar crescida sob condições naturais, de campo.

O método tradicional de melhoramento da cana-de-açúcar, voltado para incremento na produção de açúcar e etanol, tem suas dificuldades por ser demorado e trabalhoso. Uma das razões para isso é o extremo grau de variabilidade genética entre os clones do gênero Saccharum (Tai & Miller, 2002). A outra razão é a dificuldade em incorporar genes de interesse para a produtividade de qualquer fonte nos cultivares modernos. É por isso que uma abordagem molecular, voltada para a

produção de plantas transgênicas e identificação de marcadores moleculares e genes associados ao aumento de produtividade revela-se útil para obter mais rapidamente novas variedades (Hotta *et al.*, 2010). Já foi provado que o relógio biológico está relacionado a processos fisiológicos e metabólicos essenciais à produtividade, como crescimento, fotossíntese, fixação de carbono, aumento de biomassa e do *fitness* (Dodd *et al.*, 2005). Os estudos realizados para investigar o relógio biológico da cana-de-açúcar sob condições circadianas indicam que há fortes indícios de que o relógio biológico exerça uma influência semelhante – ou maior, dada a porcentagem do transcriptoma tido como rítmico – sobre os processos fisiológicos e metabólicos que afetam a produtividade da cana-de-açúcar (Hotta *et al.*, 2013). Por isso, é possível afirmar que buscar compreender o mecanismo de funcionamento do relógio biológico na cana-de-açúcar cultivada em seu ambiente natural, o campo, possa ter um impacto real no desenvolvimento de alternativas para o aumento da produtividade desta espécie. Além disso, estudos associando genes do relógio biológico a características associadas à produtividade foram publicados em outras espécies de gramíneas de interesse agroeconômico, caso do trigo (Beales *et al.*, 2007), cevada (Turner *et al.*, 2005; Campoli *et al.*, 2012; Calixto *et al.*, 2015), sorgo (Murphy *et al.*, 2011) e arroz (Izawa *et al.*, 2002; Izawa *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2013).

Além de ser uma espécie interessante para ser estudada devido a suas características genômicas, a cana-de-açúcar também tem uma importância econômica. Ela é uma *commodity* relevante para a economia global, sendo responsável por 80% do açúcar e 40% do etanol mundiais (FAOSTAT, 2015). O Brasil é o líder mundial em produção de cana-de-açúcar, sendo responsável por cerca de 20% da produção mundial (FAOSTAT, 2015). Os dados agroeconômicos brasileiros para a cana-de-açúcar dão uma ideia da importância da cana-de-açúcar para o setor

primário do país. Para a safra mais recente, 2016/2017, a produção é de cerca de 694,54 milhões de toneladas, com crescimento de 4,4% em relação à safra anterior (Conab, 2016). A área cultivada na última safra foi estimada em 9,1 milhões hectares, aumento de 5,3%, se comparada com a safra anterior (Conab, 2016). A partir dos 694,54 milhões de toneladas de cana-de-açúcar produzidos, foram produzidos 39,8 milhões de toneladas de açúcar, representando incremento de 18,9% na produção, e 27,9 bilhões de litros de etanol, apontando para redução de 8,5% em relação ao ano anterior por motivo de preferência pela produção de açúcar (Conab, 2016). Tomados em conjunto, estes números indicam a importância econômica da cana-de-açúcar para o mundo e, mais especificamente, para a economia brasileira. Por isso, é uma preocupação constante encontrar novas alternativas para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar.

1.3. A importância dos experimentos conduzidos sob condições naturais na compreensão do relógio biológico das plantas

Existe uma tendência de realizar estudos sobre o relógio biológico das plantas sob condições controladas de laboratório. Uma razão para esta prática é a reprodutibilidade dos dados, que é alcançada nos experimentos feitos sob condições controladas, mas praticamente impossível de alcançar em experimentos feitos em condições ambientais (Izawa, 2015). A facilidade de lidar com as plantas crescidas sob condições controladas é outra motivação. As câmaras de crescimento conseguem prover total controle ambiental e, portanto, eliminar o estresse abiótico enquanto variável que pode disparar respostas ou expressão gênica, mascarando resultados (Poorter *et al.*, 2016).

É preciso considerar que algumas características fenotípicas importantes são diferentes quando as plantas crescidas sob condições controladas e sob condições de campo são comparadas. O crescimento das plantas é otimizado nas câmaras de crescimento ou nas casas de vegetação, assim como maior área foliar, embora sejam menores em tamanho, já que a duração dos experimentos aos quais são submetidas é reduzida (Poorter *et al.*, 2016). Além disso, a densidade de plantas é reduzida nas planta crescidas em câmaras de crescimento ou casas de vegetação, de modo que efeitos de sombreamento não são observados, muito menos *Shade Avoidance Response* (SAR) (Carriedo *et al.*, 2016); (Poorter *et al.*, 2016); (Roig-Villanova & Martínez-García, 2016).

Além de todos estes motivos, os experimentos conduzidos sob condições controladas foram importantes no estudo do relógio biológico das plantas para mostrar que há, de fato, um mecanismo autossustentado, isto é, que independe de oscilações ambientais para gerar ritmos internos, traduzidos sob forma de respostas fisiológicas e metabólicas organizadas temporalmente (Harmer, 2009; Hu & Harmer, 2014). Estudos importantes conduzidos em condições controladas e constantes, que são as condições ditas circadianas, mostraram evidências sólidas da influência do relógio biológico sobre vias importantes, como fotossíntese, percepção de luz, crescimento e produtividade, o que foi fundamental para delinear o tamanho da influência do relógio biológico enquanto mecanismo interno de geração de ritmicidade sobre o funcionamento de uma planta (Harmer *et al.*, 2000; Dodd *et al.*, 2005; Covington *et al.*, 2008).

Porém, é preciso considerar que os genes do oscilador central do relógio biológico exibem um perfil rítmico que decai ao longo dos dias de análise sob condições circadianas (Izawa *et al.*, 2002; Michael *et al.*, 2008). Além disso, não se pode

esquecer do ambiente que as plantas habitam, o qual é permeado por flutuações em escala diária e sazonal, ambiente este no qual o relógio biológico surgiu e foi selecionado ao longo da evolução. Luz, temperatura, umidade, precipitação são fatores ambientais que podem variar nestas duas escalas e que são percebidos pelas plantas e pelas vias de entrada da rede de regulação do relógio biológico (Millar, 2016). Logo, é plausível concluir que existe um impacto nas respostas fisiológicas e metabólicas associadas ao relógio biológico quando ele atua em plantas crescendo em seu habitat natural (Izawa, 2015).

Quando as análises realizadas em laboratório voltadas para estudar o impacto do relógio biológico sobre o transcriptoma das plantas começaram a considerar e adicionar variações controladas nos ciclos de luz e temperatura, o resultado revelou que porcentagens maiores, de cerca de 60% para arroz e *Poplar* (S. A. Filichkin *et al.*, 2011) contra os 10% para Arabidopsis e milho observados anteriormente em condições controladas (Covington *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010). Estas observações sugerem que o relógio biológico é, de fato, um gerador autônomo de ritmos, mas que percebe alterações ambientais. As respostas fisiológicas e metabólicas ao relógio biológico submetido a alterações ambientais são ainda mais acentuadas, possivelmente pela sinergia entre relógio biológico e estas alterações cíclicas promovidas nas condições controladas de laboratório. Entretanto, ainda não há experimentos realizados em campo, sob as condições chamadas variáveis, para suportar esta ideia de modo mais robusto.

Os experimentos em campo realizados em Arabidopsis mostraram que o transcriptoma, de modo geral, é influenciado pelas variações ambientais, como temperatura e chuva (Richards *et al.*, 2012). Experimentos conduzidos em campo com arroz focados na análise do relógio biológico mostraram que o relógio biológico não

só é ativo, mas atua, de fato, conjuntamente com as variações ambientais (Izawa *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2012). O padrão de expressão dos transcritos de arroz associados às vias reguladas pelo relógio biológico é bastante influenciado por componentes ambientais, como temperatura e luz solar (Nagano *et al.*, 2012). Indo além, os experimentos em campo conduzidos no arroz revelaram que um único ortólogo do relógio biológico, *OsGI*, regula 75% dos transcritos e influencia na adaptação da oscilação do relógio biológico ao ambiente flutuante (Izawa *et al.*, 2011). Estes dados evidenciam a importância de analisar o funcionamento do relógio biológico nas plantas cultivadas em campo, sobretudo naquelas de interesse agronômico, como a cana-de-açúcar. É plausível afirmar que conduzir estes estudos em um ambiente flutuante permite que a ação conjunta destes dois importantes mecanismos – o relógio biológico e o ambiente – seja medida em seu impacto na fisiologia e no metabolismo da cana-de-açúcar. Os resultados destes estudos representam um importante passo na busca por alternativas para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar.

2. Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo caracterizar e analisar o mecanismo de funcionamento do oscilador central do relógio biológico de diferentes órgãos da cana-de-açúcar cultivada em campo, em condições flutuantes. Os órgãos selecionados para investigação neste trabalho possuem perfis metabólicos distintos, a fim de fornecer uma compreensão mais abrangente da relação entre o relógio biológico e o metabolismo da cana-de-açúcar.

Mais especificamente, este trabalho visa:

- Identificar transcritos rítmicos, assim como seu papel dentro das vias fisiológicas ou metabólicas importantes, em diferentes órgãos de plantas de cana-de-açúcar cultivada em campo;
- Analisar possíveis efeitos provocados pelo sombreamento mútuo das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo sobre o relógio biológico da cana-de-açúcar;
- Analisar a expressão de isoformas alternativas dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar, geradas a partir de eventos de *splicing* alternativo;
- Investigar a expressão de múltiplos alelos dos genes do relógio biológico em diferentes órgãos da cana-de-açúcar cultivada em campo.

3. Material e Métodos Gerais

3.1. Material biológico e condições de campo

O cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280 (*Saccharum* spp híbrido) foi selecionada como o material biológico deste trabalho. Todas as plantas cujos órgãos foram utilizados como ponto de partida para extração de RNA foram cultivadas em campo, estes situados na Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras – São Paulo (22°18'41.0"S, 47°23'05.0"W). Dois campos foram cultivados para os experimentos deste trabalho. No primeiro, touceiras de cana foram plantadas em 22 de abril de 2012 (outono).

O desenho do primeiro campo (campo 01) contava com 8 parcelas (**Figura 3.1**). Cada parcela tinha 4 linhas com 20 touceiras cada. Quatro linhas de plantas margeavam o campo e não foram utilizadas nas coletas para evitar efeitos de borda. Para a coleta do material neste campo, as plantas foram aleatoriamente coletadas a partir de duas parcelas diferentes, evitando, assim, os efeitos de variabilidade ambiental e individual.

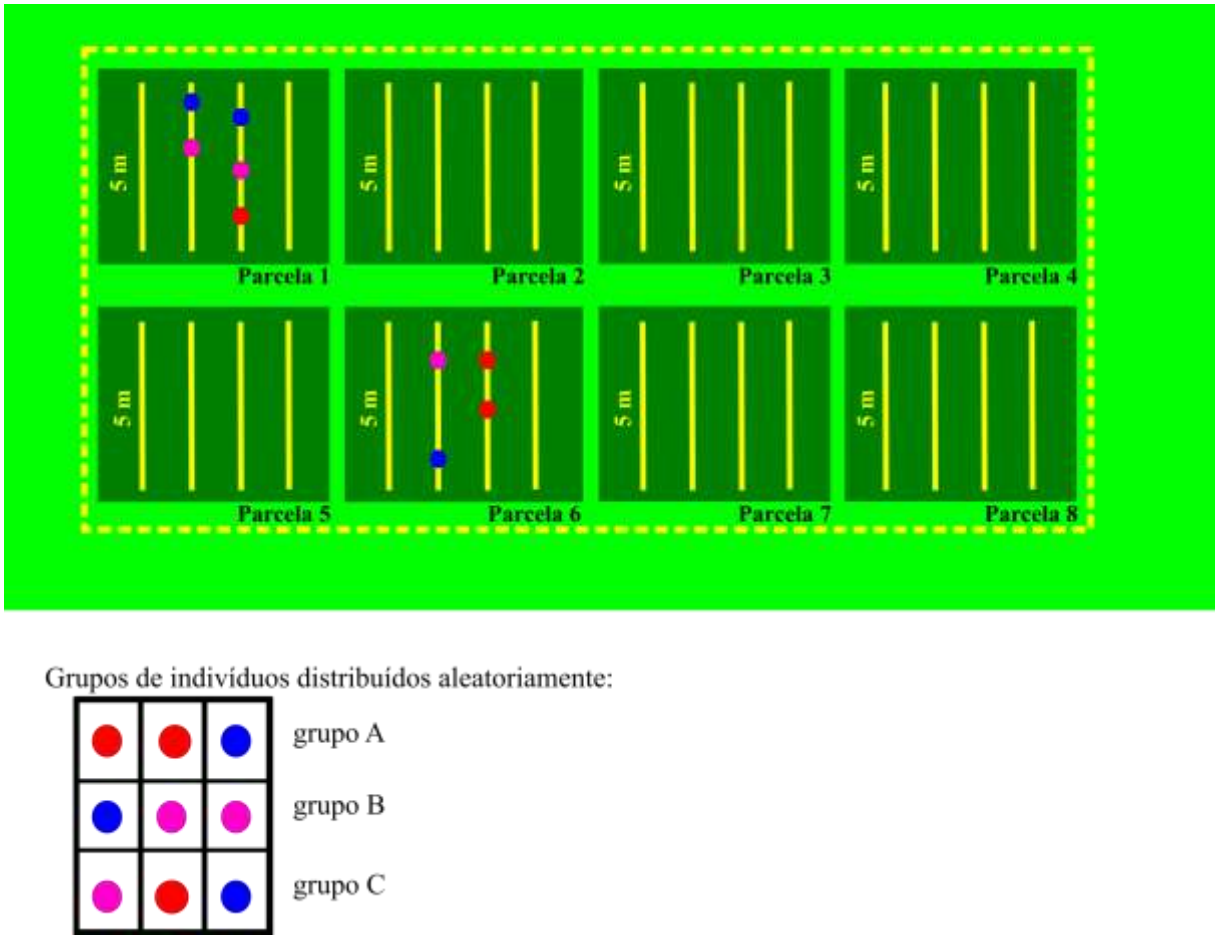
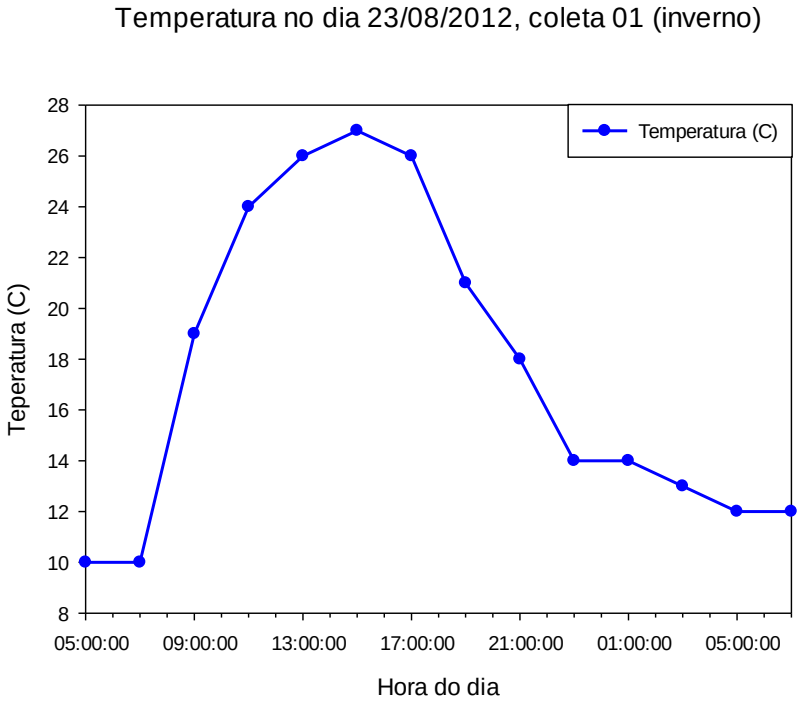


Figura 3.1: Esquema para o campo plantado em 22 de abril de 2012. O campo contava com 8 parcelas. Em cada parcela, havia 4 linhas de 5 m contendo 20 touceiras de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280. As quatro linhas plantadas nas bordas (linhas tracejadas amarelas) não foram utilizadas nos experimentos para evitar efeitos de bordadura. Apenas plantas das linhas centrais (linhas contínuas amarelas) foram coletadas a cada duas horas por 26 h durante um dia no inverno, quando as plantas tinham 4 meses, e durante um dia no verão, quando as plantas tinham 9 meses. Para cada ponto de coleta, 9 indivíduos (pontos em vermelho, azul e rosa) foram aleatoriamente selecionados a partir de parcelas diferentes e aleatoriamente distribuídos para três diferentes grupos de indivíduos. O órgão folha +1 (F1) e os entrenós 1/2 (E1/2) e 5 (E5) (estes apenas na coleta 02) foram coletados e imediatamente conservados em nitrogênio líquido.

Duas coletas diferentes foram conduzidas no campo 01. Na primeira (coleta 01), em 23 de agosto de 2012, durante o inverno, as plantas contavam 4 meses e 3 dias. Na segunda (coleta 02), em 22 de janeiro de 2013, durante o verão, as plantas estavam com 9 meses. Nas duas ocasiões, as plantas foram coletadas a cada 2 h, ao longo de 26 h. O primeiro ponto temporal nas duas coletas foi 1,5 h antes do nascer do Sol. Assim, na coleta 01 o primeiro ponto temporal foi às 5:30 da manhã (nascer

do Sol: 6:32 da manhã) e na coleta 02 ocorreu às 4:00 da manhã (nascer do Sol: 5:31 da manhã). Ao todo, foram utilizados 14 pontos temporais em cada coleta. Os dados de temperatura do campo nas coletas 01 e 02 estão plotados na **Figura 3.2**.



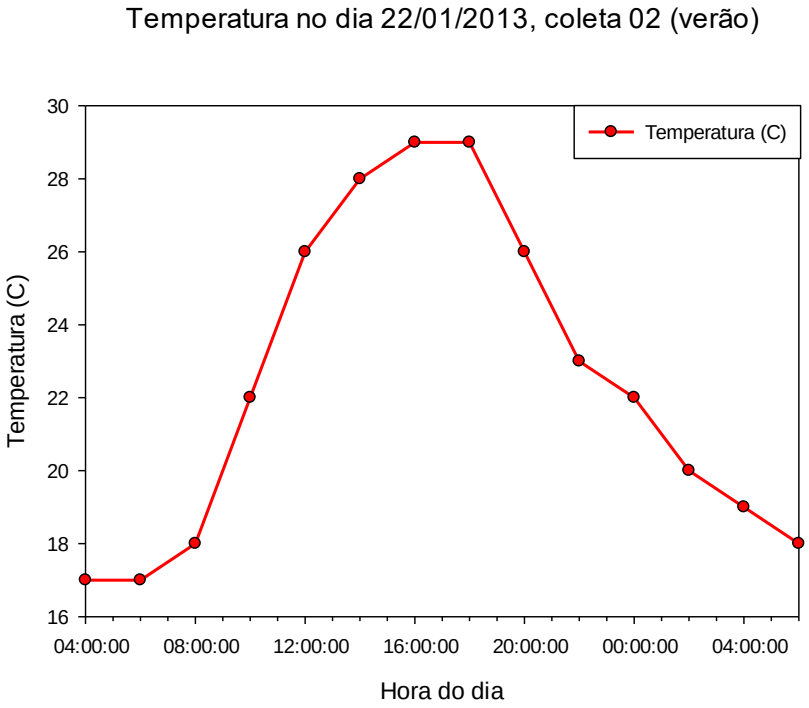


Figura 3.2: Medições das temperaturas dos dois dias de coleta (coleta 01 e coleta 02). Em azul, as temperaturas para a coleta 01, realizada no dia 23/08/2012, durante o inverno, quando as plantas contavam 4 meses; em vermelho, as temperaturas para a coleta 02, realizada em 22/01/2013, durante o verão, quando as plantas tinham 9 meses.

Para todas as coletas deste campo, três grupos de três indivíduos foram aleatoriamente escolhidos para amostragem. Uma vez coletados e agrupados em réplicas biológicas específicas – A, B e C – três órgãos diferentes foram extraídos, quando possível: folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5). Foi definida como F1 a primeira folha do ápice meristemático de cada planta a ter bainha individual. F1 constitui o órgão fonte analisado, por ser um órgão fotossintetizante e, portanto, fonte de carboidratos analisado (**Figura 3.3**). Os entrenós, por sua vez, constituem os órgãos dreno, pois para eles são alocados os açúcares produzidos via fotossíntese. E1 e E2, por serem praticamente indistinguíveis, foram coletados juntos (referidos doravante como E1/2). Constituem os primeiros segmentos de entrenó a serem observados depois de desenroladas as folhas e possuem intensa atividade de divisão celular. Por consequência, os demais entrenós seguiram a ordem de segmentos (**Figuras 3.3a e 3.3b**). E5 é o primeiro entrenó a apresentar acúmulo de sacarose na cana e possui baixa atividade celular. Na coleta 01, quando as plantas eram muito jovens, apenas órgão de F1 foi coletado, pois ainda não havia entrenós para proceder com amostragem. Na coleta 02, com plantas contando 9 meses, foi possível obter amostras dos três órgãos. Imediatamente após cada órgão foi devidamente coletado e processado em pedaços, as amostras foram congeladas e conservadas em nitrogênio líquido.

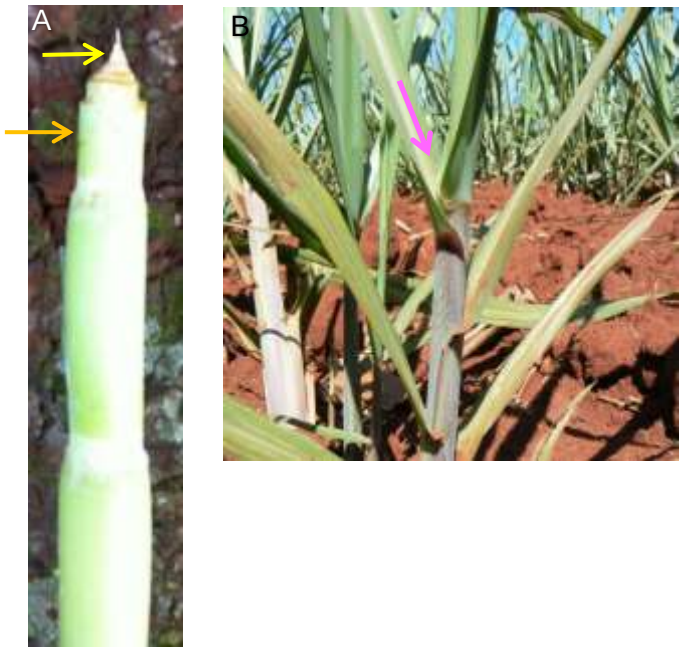


Figura 3.3: Órgãos coletados e sua localização na planta indicada por setas. Os entrenós e folha selecionados para coleta: A) ápice do colmo de cana-de-açúcar após a retirada das folhas. Os entrenós 1/2 (E1/2) estão indicados pela seta amarela e o entrenó 5 (E5) está indicado pela seta laranja. B) ápice do colmo da cana-de-açúcar com as folhas. A folha +1 (F1), coletada, está indicada pela seta rosa.

3.2. Extração de RNA total

Os órgãos coletados a partir das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo que foram previamente conservados em nitrogênio líquido foram pulverizados com auxílio de gelo seco no moedor de grãos *Coffee Grinder* Modelo DCG-20 (Cuisinart, China). 100 mg deste material pulverizado foi utilizado para extração de RNA total utilizando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguida por tratamento com 2 U de DNAse I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 37ºC por 30 min e, finalmente, limpeza com o kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). A qualidade e a quantidade de RNA de cada amostra foram testadas utilizando 1 µL de RNA recém-extraído e limpo no chip Agilent RNA 6000 Nano Kit Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, 171 USA). Após estes passos, as amostras, em volume de 19 µL, foram armazenadas a - 80ºC.

3.3. Síntese de cDNA

O cDNA utilizado nos experimentos deste trabalho foi sintetizado a partir de 5 µg de RNA total. A síntese de cDNA foi feita a partir do kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), segundo o protocolo do fabricante. Em todas as reações, foram utilizados tanto *primers* hexâmeros na concentração de 25 µM, quanto *primers* oligo-(dT) na concentração de 50 µM. O volume final de cDNA obtido, de 20 µL, foi armazenado a - 20ºC.

3.4. PCR em Tempo Real (qPCR)

As PCRs em Tempo Real (qPCR) foram feitas utilizando o FAST SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Todas as reações seguiram o seguinte modelo: 6 µL de FAST SYBR® Green Master Mix; 3 µL de água autoclavada duplamente destilada; 2,4 µL do par de *primers* (sentido 5' (*forward*) e sentido 3' (*reverse*)) (**Tabela 3.1**) específicos de cada região cada de gene a ser amplificada, na concentração de 10 µM; 0,6 µL de cDNA diluído 10x a partir da solução inicial obtida na síntese. Cada reação de qPCR foi feita em duplicata no aparelho Fast 7500/7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Em todas as reações de qPCR, o gene normalizador adotado para controle de ritmicidade foi *ScGAPDH* (Hotta *et al.*, 2013) A especificidade dos pares de *primers*, bem como a temperatura de anelamento, foram previamente checados através de reações de PCR. A eficiência de amplificação dos pares de *primers* foi obtida pela construção de curvas padrões com diferentes diluições de cDNA, a partir das quais chegou-se à diluição de 10x do cDNA.

Tabela 3.1: Lista de primers específicos e suas sequências utilizados nas reações de qPCR. Destacados em amarelo estão os primers para os genes normalizadores; destacados em azul estão os primers para os genes no relógio biológico.

Gene	Nome do Primer	Sequência (5' → 3')
ScGAPDH	GAPDH-FW	CACGGCCACTGGAAGCA
	GAPDH-RV	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC
ScLHY	CTH001_48E10_FWD	CCACCACGGCCTAAAAGAAA
	CTH001_48E10_RVS	TGGTTTTGTTGACTTGTCATTTGG
ScTOC1	CTH002_02H04_FWD	TGCCCCAACCCCACTACTC
	CTH002_02H04_RVS	CTTCGCTGGAGCAGGATATTTT
	CTH003_42B08_FWD	TTCTGCCTGAATTTGGCAAGTG
	CTH003_42B08_RVS	GGCATCGAGCACACCAATGC

4. Capítulo 1: Identificação de transcritos rítmicos em cana-de-açúcar cultivada em campo

4.1. Introdução

A análise de transcriptomas de plantas ao longo de séries temporais circadianas é importante porque examina a influência do relógio biológico sobre a expressão gênica em larga escala. Em Arabidopsis, os primeiros *oligoarrays* realizados sob condições circadianas revelaram que pelo menos 6% do transcriptoma da planta é regulado pelo relógio biológico (Harmer *et al.*, 2000), incluindo genes envolvidos em resposta à luz, fotossíntese e vias importantes para o metabolismo de açúcar, como a via glicolítica, a via das pentoses, e transportadores de hexoses (Harmer *et al.*, 2000). Um estudo posterior em Arabidopsis, com mais pontos temporais e ferramentas de análise atualizadas, revelou uma proporção ainda maior de transcritos regulada pelo relógio: 10,4% (Covington *et al.*, 2008). Uma segunda análise proposta neste mesmo estudo, combinando os *datasets* de Harmer *et al.* (2000) e Covington *et al.* (2008) aponta para a porcentagem de 33% de transcritos regulados pelo relógio biológico (Covington *et al.*, 2008). Além das vias já descritas, vias de respostas a estresse e vias hormonais também foram incluídas entre aquelas reguladas pelo relógio biológico (Covington *et al.*, 2008).

Em monocotiledôneas, como arroz, o transcriptoma também é influenciado em larga escala pelo relógio biológico. Em um conjunto de experimentos sob condições controladas, a porcentagem do transcriptoma com oscilação quando se variou 1) somente luz; 2) somente temperatura; 3) luz e temperatura juntos; ou 4) se mantiveram luz e temperatura constantes foi de, respectivamente, 40,8%; 29,9%; 34,7% e 7,6% (S. A. Filichkin *et al.*, 2011). Já em milho, que além de monocotiledônea é também uma planta com fotossíntese C4, os dados de regulação do relógio sobre o

transcriptoma aponta para influência do relógio sobre o modelo de fotossíntese C4, assim como sobre as vias já examinadas nas plantas C3 (Khan *et al.*, 2010).

No caso da cana-de-açúcar comercial, uma planta com fotossíntese C4, 32% dos transcritos são influenciados pelo relógio biológico, revelando o quão difundido o relógio biológico é no controle do metabolismo da cana-de-açúcar. (Hotta *et al.*, 2013). Tamanha influência do relógio sobre o transcriptoma pode ser devido ao fato de que a cana-de-açúcar possui um genoma híbrido e poliploide e o número de cópias de seus genes é variável, incluindo os genes do relógio biológico (**vide Capítulo C**). De uma forma conservada, transcritos de vias de entrada de luz, fotossíntese e metabolismo de sacarose são influenciados pelo relógio biológico da cana-de-açúcar (Hotta *et al.*, 2013). Nenhuma outra planta analisada até hoje, a partir de um experimento ou *dataset* único, apresentou tamanha influência circadiana sobre seu transcriptoma (Covington *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010; Filichkin *et al.*, 2011).

Entretanto, de modo geral estas análises globais de transcriptomas para influência do relógio biológico não examinaram os ritmos dos transcritos expressos em diferentes órgãos. Isto deveria ser considerado importante, pois muitos estudos sugerem que a expressão de genes do oscilador central varia entre órgãos, de modo que há uma influência maior de alguns órgãos sobre outros na regulação da oscilação circadiana (James *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015). Além disso, as variáveis ambientais, como luz, são percebidas diferentemente pelos relógios dos órgãos de Arabidopsis (Bordage *et al.*, 2016). Estes dados abrem um precedente para hipóteses sobre se a influência do relógio biológico sobre os transcritos é a mesma em todos os órgãos.

Embora as respostas rítmicas geradas pelo relógio biológico sejam autossustentadas, variáveis ambientais como luz e temperatura entram na rede circadiana e são processadas pelo oscilador central, de modo a sincronizar mais precisamente o ambiente, o metabolismo e a fisiologia da planta (Hu & Harmer, 2014; Izawa, 2015; Millar, 2016). De fato, experimentos em arroz conduzidos em campo mostram que o relógio biológico é responsivo a estas mudanças ambientais e responde a elas através de variações no conjunto dos genes cuja expressão rítmica é regulada por ele (Izawa *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2012). Análises globais de transcriptomas de plantas cultivadas em campo sugerem que a expressão gênica responde às variações ambientais em escalas diárias e sazonais (Sato *et al.*, 2011; Richards *et al.*, 2012). Assim, é possível acreditar que, sob condições de campo, a cana-de-açúcar tenha mudanças não só em seu transcriptoma em geral, mas principalmente na parcela rítmica que sofre influência do relógio biológico.

Para compreender, portanto, tanto os ritmos circadianos autossustentados quanto a interação entre relógio biológico e ambiente, é importante promover uma análise global do transcriptoma de plantas em condições de campo, que se aproximam ao máximo de suas condições naturais de cultivo, no caso da cana-de-açúcar.

4.2. Objetivos

O objetivo desta seção é identificar transcritos rítmicos em diferentes órgãos de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo.

Mais especificamente, fazem parte deste capítulo os seguintes objetivos:

- Identificar transcritos que possuem ritmos diurnos em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo;
- Analisar o funcionamento do relógio biológico dos entrenós da cana-de-açúcar, caracterizados como órgãos dreno, comparando com o funcionamento do relógio biológico nas folhas, estas caracterizadas como órgãos fonte;
- Comparar o perfil de expressão dos transcritos dos genes do relógio da cana-de-açúcar entre os três diferentes órgãos analisados: folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e 5 (E5);
- Analisar o padrão rítmico (caso haja) dos transcritos de genes associados às vias metabólicas e fisiológicas de resposta ao relógio biológico nos órgãos folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e 5 (E5) de cana-de-açúcar cultivada em campo.

4.3. Material e Métodos

4.3.1 Experimentos de hibridização com *oligoarrays*

Para os experimentos com *oligoarrays*, foi estabelecida uma colaboração com o laboratório da Dra. Glaucia Mendes Souza. As lâminas utilizadas nas hibridizações dos *oligoarrays* foram customizadas em parceria com a Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, 171 USA) (Lembke *et al.*, 2012). Cada lâmina contava com 45.220 sondas por *subarray*, sendo 1.500 controles Agilent e 43.720 sondas desenvolvidas para cana-de-açúcar, de acordo com os critérios recomendados pela Agilent (Nakaya *et al.*, 2007). Cada sonda possui 60 pb e, das 21.902 sondas únicas (provenientes de 14,521 SAS únicos) dispostas em duplicata, 14.522 hibridizam com cRNA senso (SS) e 7.380 hibridizam com cRNA antissenso (AS).

A coleta 02 do campo 01, realizada em 22/01/2013 (verão), foi selecionada para as hibridizações. As plantas tinham 9 meses. Foram realizadas 84 hibridizações: 28 de folhas +1, 28 de entrenós 1/2 e 28 de entrenó 5, correspondendo a duplicatas biológicas com *dye-swap* de cada um dos pontos temporais da coleta. O RNA de cada ponto temporal foi hibridizado utilizando como referência uma mistura de igual concentração de todos os RNAs de todos os pontos temporais para aquele órgão.

Utilizando-se 5 µg de RNA total, o cRNA foi sintetizado, amplificado e marcado com o sistema de corantes Cy3 ou Cy5, conforme especificações do kit *Low Input Quick Amp Labelin*g, sistema *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, 171 USA). O cRNA de cada ponto temporal, marcado com Cy3 e Cy5, foi hibridizado em duas lâminas separadas junto com a referência de RNA, também marcado com Cy5 ou Cy3, de modo a sempre ter pares

de corantes Cy3-Cy5. As lâminas foram hibridizadas ao longo de 17 h a 65ºC, lavadas e processadas segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. Posteriormente, cada lâmina foi lida em scanner GenePix 4000B (Molecular Devices, Palo Alto, CA, 171 USA) e os dados das imagens foram extraídos com o software *Feature Extraction 9.5.3* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, 171 USA). Uma primeira camada de normalização, para correção de background, foi promovida pelos oligos controle Agilent. Para retirar artefatos dos corantes Cy3 e Cy5 e corrigir sua intensidade derivada. foi aplicada a normalização LOWESS (Berger *et al.*, 2004). Os genes significativamente expressos foram analisados no SUCEST (http://sucest-fun.org/) numa plataforma adaptada à plataforma do Chip Agilent e ao software de extração de imagens *Feature Extraction* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, 171 USA). As sondas expressas foram analisadas para detecção de ritmicidade através dos algoritmos WGCNA e JTK-CYCLE.

Os principais genes do oscilador central do relógio biológico foram selecionados para validação dos experimentos com *oligoarrays* através de reações de qPCR.

4.4. Resultados

4.4.1. Perfil geral dos transcritos dos três órgãos de cana-de-açúcar cultivada em campo quanto à expressão e ritmicidade

As diferenças entre os órgãos F1, E1/2 e E5 se refletiram nos resultados da análise do transcriptoma de cada um (**Figura 4.1**). Para F1, das 9.822 sondas senso (SS) expressas, 60,9% (5.982) são rítmicas. Em E1/2, 36,5% (4.399 SS) das 12.052 sondas expressas são também rítmicas. E5 apresentou, das 11.241 SS expressas, 28,3% (3.181 SS) rítmicas.

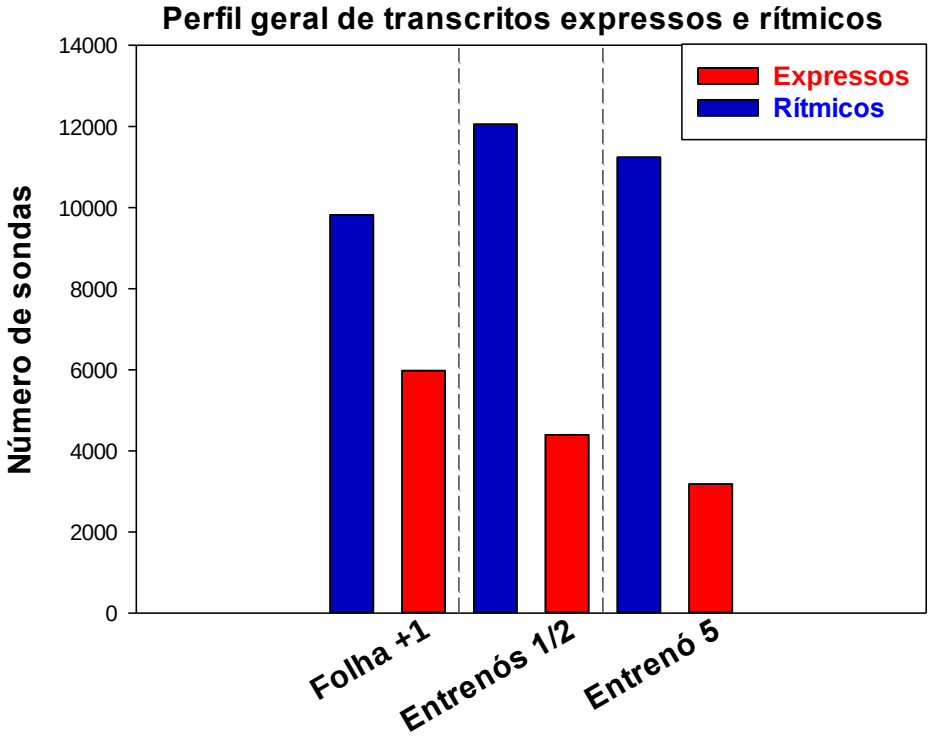


Figura 4.1: Perfil dos transcritos expressos e rítmicos dos órgãos folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5) revelado pelos *oligoarrays*. Embora E1/2 tenha a maioria de sondas senso (SS) expressas (12.052 SS), o órgão F1 apresenta a maior proporção de transcritos expressos rítmicos, com 60,9% de SS expressas e rítmicas.

Embora haja, de fato e como esperado, transcritos expressos específicos a cada órgão, a maior parte dos transcritos expressos é compartilhada, seja por dois ou pelos três órgãos (**Figura 4.2**). E1/2 é o órgão com maior número de transcritos específicos e compartilhados. E1/2 e E/5 compartilham entre si o maior número de transcritos expressos. Ao todo, 9.380 transcritos expressos são comuns aos três órgãos, F1, E1/2 e E5.

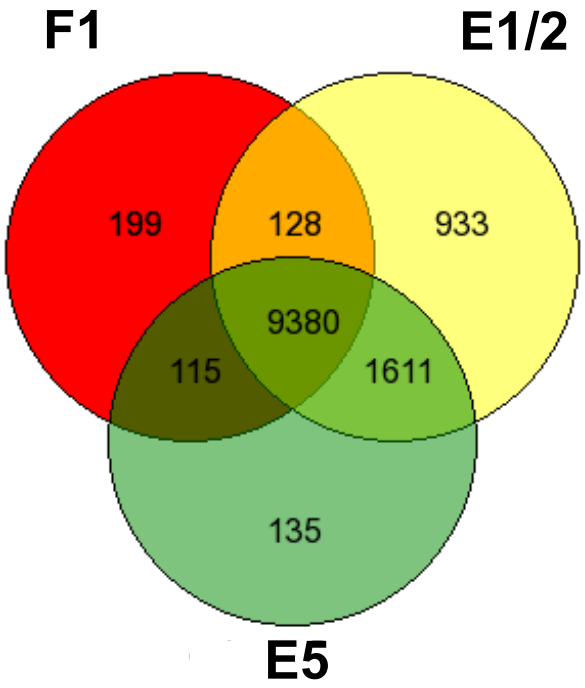


Figura 4.2: Diagrama de Venn para os transcritos expressos nos órgãos de folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam sondas senso (SS) expressas. Os transcritos específicos para cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos em dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Ao analisar a presença de ritmicidade nos 9.380 transcritos expressos comuns aos três órgãos, é possível observar que os transcritos expressos não compartilham o

mesmo padrão de ritmo nos diferentes órgãos (**Figura 4.3**). Por exemplo, observa-se que F1 possui a maior porcentagem de transcritos expressos comuns que somente são rítmicos neste órgão, 26,5%, ou 2.486. A quantidade de transcritos expressos que mantém ritmo nos três órgãos corresponde a 1.183, isto é, 12,61%. E5 apresenta o menor número de transcritos expressos e apenas rítmicos neste órgão: apenas 630 ou 6,70%.

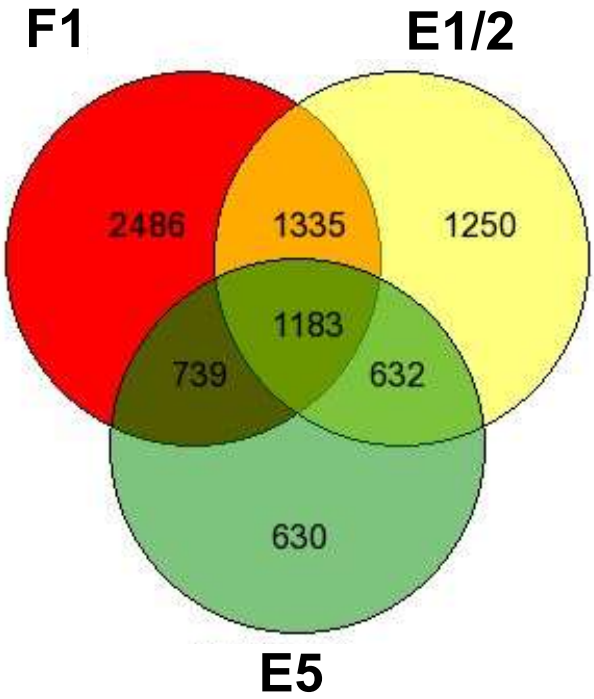


Figura 4.3: Diagrama de Venn mostrando o perfil de ritmicidade dos 9.380 transcritos expressos em comum em folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas rítmicas. Os transcritos expressos rítmicos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Uma análise mais detalhada e comparativa do perfil dos transcritos expressos rítmicos revelou que há mais diferenças do que semelhanças entre os órgãos (**Figura 4.4**). Quando os transcritos expressos rítmicos são comparados quanto à similaridade nos órgãos aos pares, isto é, F1 x E1/2, F1 x E5 e E1/2 e E5, observa-se que a maioria

dos transcritos expressos em comum são rítmicos em apenas um dos órgãos. F1, como já foi demonstrado na **Figura 4.3**, apresenta a maior proporção de transcritos expressos e rítmicos específicos a um órgão. Novamente, a menor proporção fica com E5. Dos transcritos que são expressos e rítmicos nos dois órgãos, foram observadas 3 categorias distintas de transcritos: aqueles que são rítmicos e coexpressos; rítmicos com mesma fase nos dois órgãos; e rítmicos nos dois órgãos, mas com fases diferentes nos dois órgãos (**Figura 4.4**).

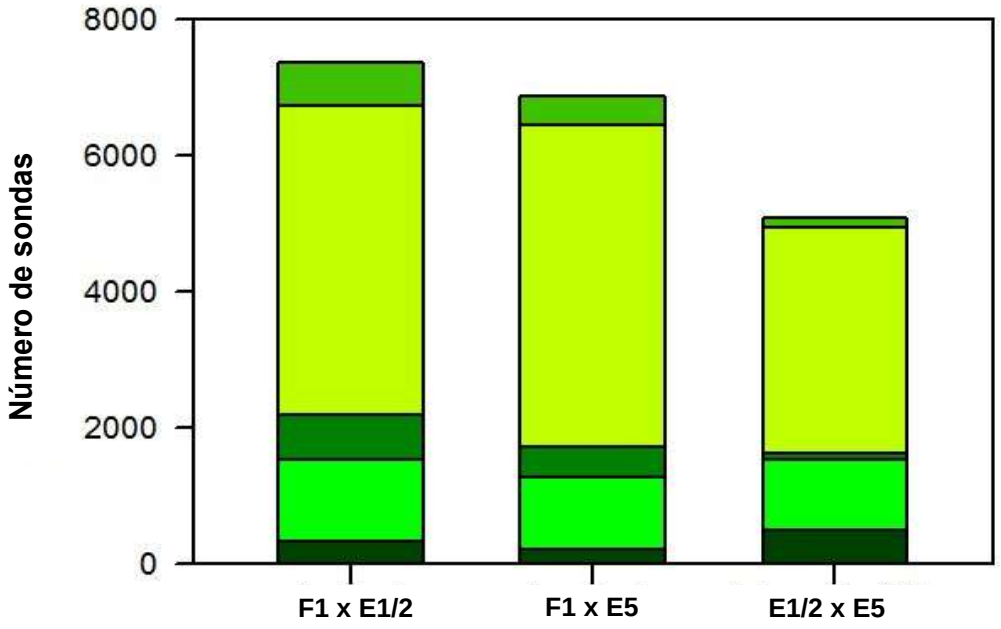


Figura 4.4: Gráfico comparativo dos transcritos rítmicos entre os órgãos F1, E1/2 e E5. Os órgãos foram comparados aos pares para, de cima para baixo: transcritos expressos e rítmicos em um único órgão; expressos em ambos os órgãos, mas rítmicos em apenas um deles; expressos rítmicos nos dois órgãos, mas com fases distintas; rítmicos em ambos os órgãos com a mesma fase; rítmicos e coexpressos.

4.4.2 Expressão dos transcritos para os genes do relógio biológico *ScLHY* e *ScTOC1* nos três órgãos de cana-de-açúcar cultivada em campo

A expressão dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar já havia sido investigada previamente em um experimento circadiano (Hotta *et al.*, 2013). Entretanto, este experimento, pela natureza circadiana, foi executado sob condições controladas e utilizando apenas órgão foliar. Estes dois aspectos foram fundamentais na motivação para investigar a expressão dos genes do relógio biológico em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em seu ambiente natural, o campo, sob condições flutuantes. Ainda, investigar a expressão, caso houvesse, destes genes em diferentes órgãos.

Nas hibridizações destes *oligoarrays*, havia sondas para os seguintes transcritos de genes do relógio biológico: *ScLHY*, *ScTOC1*, *ScPRR73*, *ScPRR59*, *ScPRR95* e *ScGI*. Os transcritos para estes genes foram todos não só expressos, como também apresentaram comportamento rítmico nos três órgãos, F1, E1/2 e E5 (**Figura 4.5**). O número de sondas para cada gene era variável, porém pelo menos uma delas apresentou perfil rítmico.

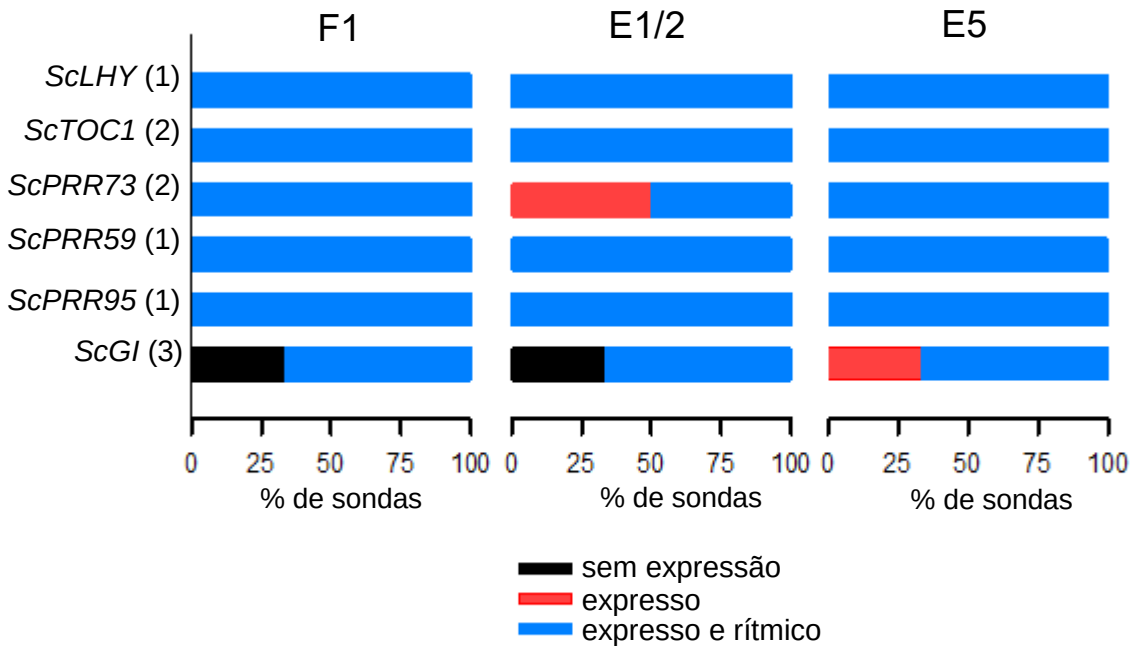
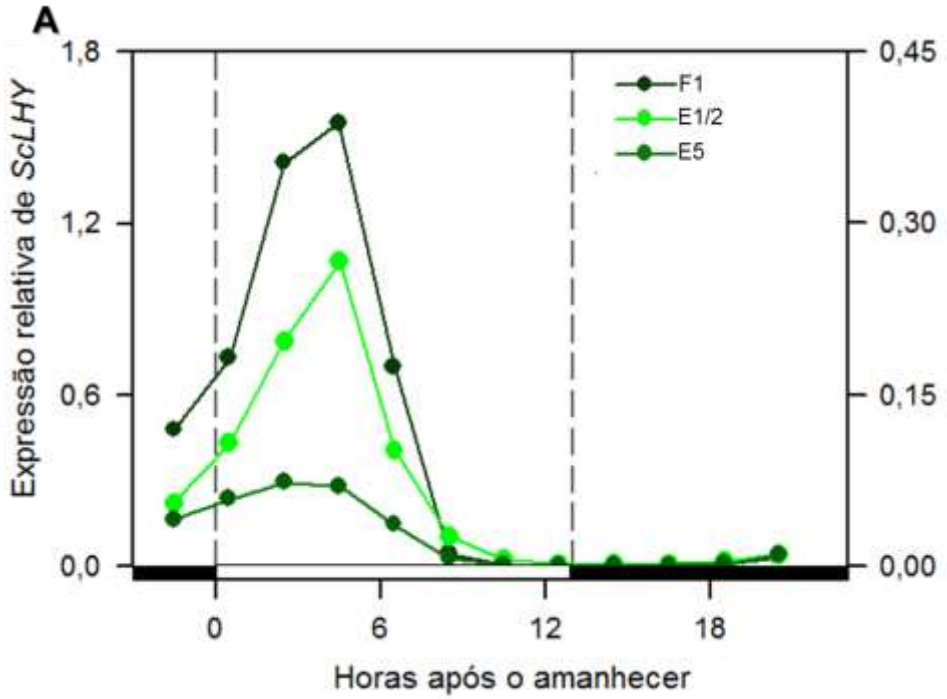


Figura 4.5: Distribuição em porcentagem das sondas para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar entre os órgãos F1, E1/2 e E5. À esquerda, genes e o número de sondas para cada um. Em azul, os transcritos rítmicos; em vermelho, os transcritos expressos; em preto, os transcritos sem expressão.

Os genes *ScLHY* e *ScTOC1* foram selecionados para uma análise detalhada de expressão, envolvendo não só resultados dos *oligoarrays*, como também validação de seu perfil rítmico de expressão através de reações de qPCR. Os resultados apontam para expressão dos genes em todos os órgãos, porém com diferenças no nível de expressão de acordo com o órgão analisado (**Figura 4.6**).



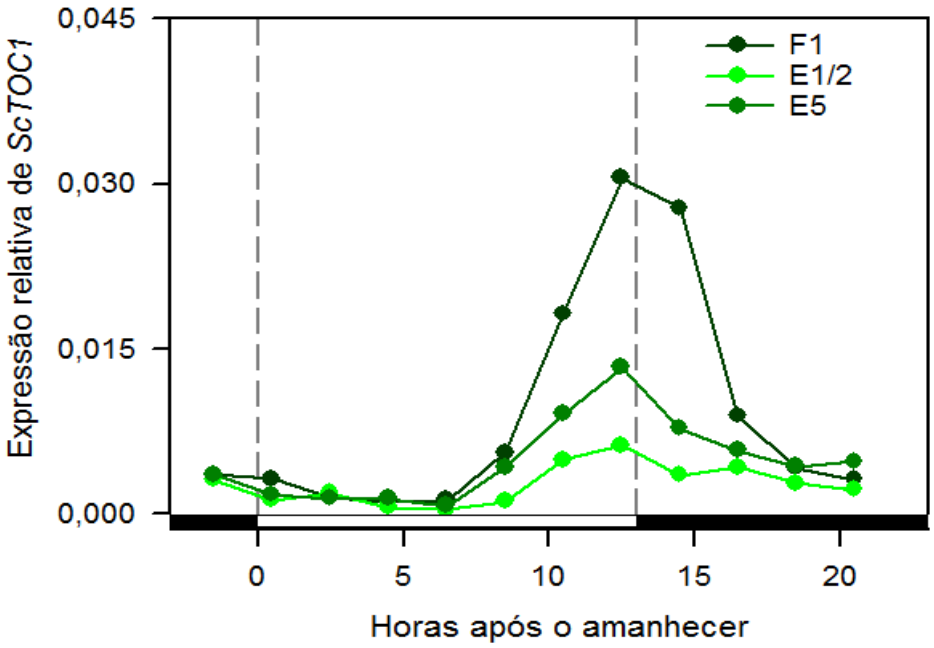


Figura 4.6: Expressão dos transcritos de *ScLHY* (A) e *ScTOC1* (B) de cana-de-açúcar entre os órgãos F1 (dispersão verde-escuro do topo), E1/2 (dispersão verde-neon) e E5 (dispersão verde-bandeira). Barras acima do eixo X indicam noite (barras pretas) e dia (barra branca). As linhas tracejadas em cinza indicam amanhecer e anoitecer.

F1 apresenta o maior nível de expressão dos dois genes. Nos entrenós, é notável que, enquanto *ScLHY* tem maior amplitude em E1/2, *ScTOC1* tem maior amplitude em E5. Em relação à fase, os órgãos dreno acompanham a fase de expressão destes genes no órgão fonte, como é possível observar.

4.4.3 Análise da expressão de transcritos para importantes vias relacionadas ao relógio biológico

O relógio biológico está associado a eventos metabólicos e fisiológicos relevantes, como fotossíntese e o metabolismo do açúcar – este último particularmente importante para os estudos da cana-de-açúcar. Além disso, o relógio comunica-se com as vias de entrada de estímulos ambientais, das quais fazem parte criptocromos e fitocromos. Pela própria natureza de alguns componentes importantes do relógio, é importante considerar o perfil de alguns fatores de transcrição. E ainda há a regulação do relógio sobre histonas. Dada a importância da influência do relógio sobre estes eventos, foram analisados transcritos para genes representativos destes.

A expressão de sondas para fatores de transcrição (FT) foi observada nos 3 órgãos analisados (**Figura 4.7**). Dentre os 441 FT expressos, a maior proporção, 76,19% (336 transcritos), foi compartilhada pelos 3 órgãos. Há poucos FT expressos específicos à F1 (1,1%) e E1/2 possui a maior porcentagem de transcritos expressos específicos, igual a 8,39%.

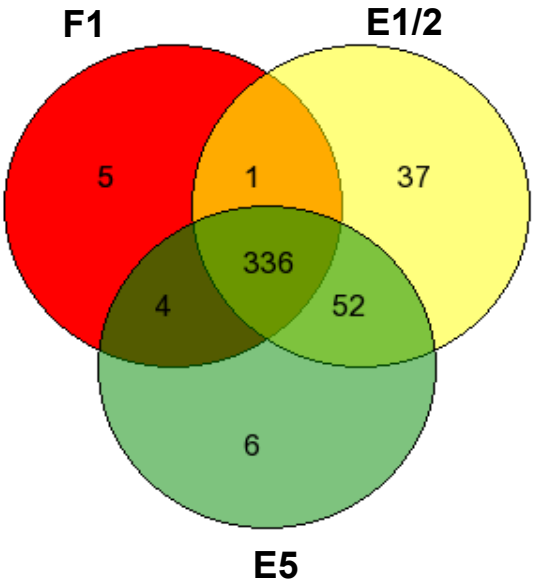


Figura 4.7: Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos transcritos para fatores de transcrição (FT) expressos nos órgãos folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas. Os transcritos expressos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Analisando apenas os 298 transcritos rítmicos para os FT, observa-se que a maior proporção é específica ao órgão F1 (26,17%) (**Figura 4.8**). Os FT rítmicos compartilhados pelos três órgãos somam 62, o que corresponde a 20,80%. No menor número estão os transcritos expressos comuns à F1 e E5, 20 ou, proporcionalmente, 6,71%.

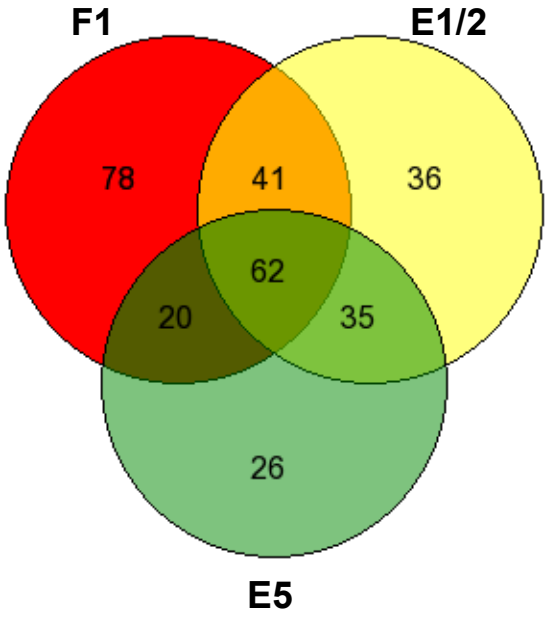


Figura 4.8: Diagrama de Venn mostrando o perfil de ritmicidade dos 298 transcritos expressos e rítmicos para FTs em folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas rítmicas. Os transcritos expressos rítmicos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Algumas sondas para histonas e para proteínas modificadoras de histonas também foram analisadas para expressão e ritmo em F1, E1/2 e E5 (**Figuras 4.9 e 4.10**). Há expressão de transcritos para os genes codificadores destas proteínas nos 3 órgãos e é notável que grande maioria dos transcritos expressos é comum aos três órgãos (**Figura 4.9**): 51 (78,46%).

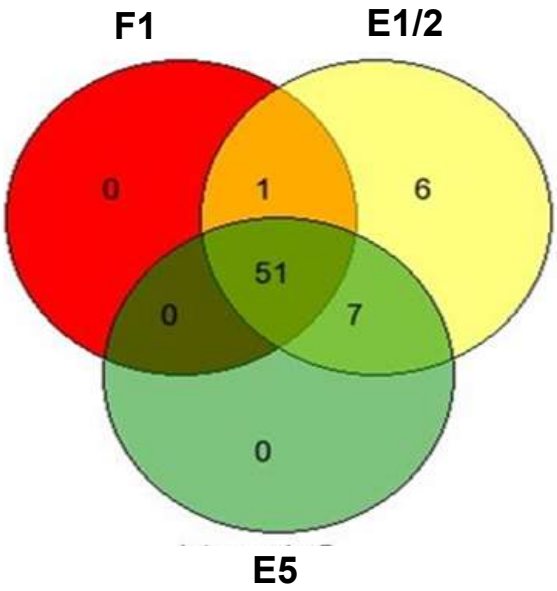


Figura 4.9: Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos 65 transcritos para histonas e proteínas associadas à histonas expressos nos órgãos folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas. Os transcritos expressos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Novamente, entretanto, a análise dos expressos e rítmicos revela que a maioria dos transcritos codificadores rítmicos destas proteínas está em F1 (**Figura 4.10**). Das 40 sondas para histonas e modificadores de histonas, 19 (47,5%) estão apenas em F1 e não há transcritos rítmicos comuns a F1, E1/2 e E5.

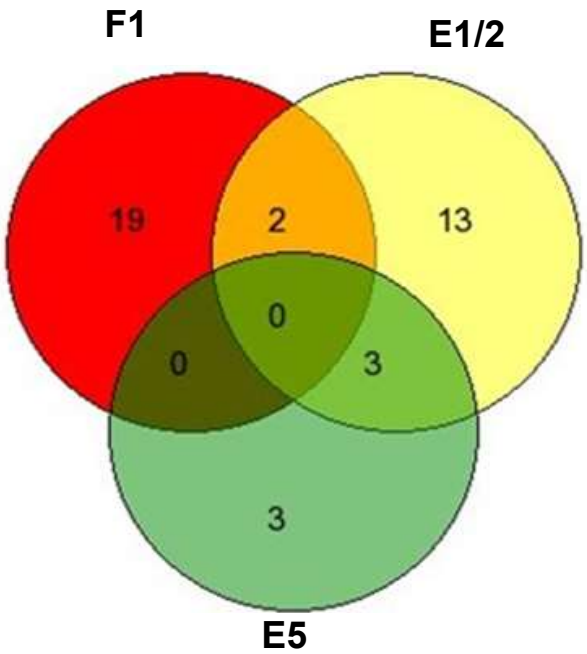


Figura 4.10: Diagrama de Venn mostrando o perfil de ritmicidade dos 40 transcritos expressos e com ritmo para histonas e proteínas associadas à histonas em folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas rítmicas. Os transcritos expressos rítmicos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

A via de entrada de estímulos ambientais para o oscilador central do relógio foi representada nas análises através de sondas para criptocromos, fitocromos e fototropinas (**Figura 4.11**). Das 14 sondas presentes, 10 (71,43%) foram expressas nos três órgãos e apenas 2 (14,28%) foram expressas apenas em E1/2.

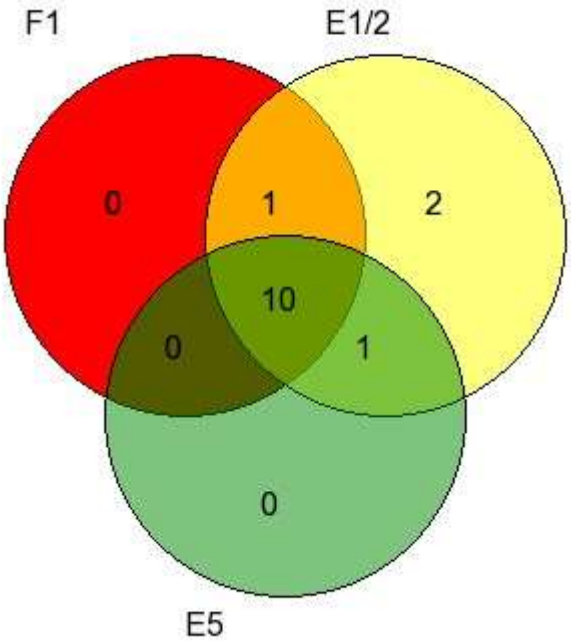


Figura 4.11: Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos 14 transcritos para os genes da via de entrada de luz (fototropinas, fitocromos e criptocromos) expressos nos órgãos folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas. Os transcritos expressos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Embora haja expressão rítmica de transcritos em F1, E1/2 e E5, não foram encontradas sondas rítmicas expressas apenas em E5 (**Figura 4.12**). Porcentagens iguais de sondas rítmicas são encontradas apenas em F1 e E1/2 (30%) e compartilhadas entre estes dois órgãos.

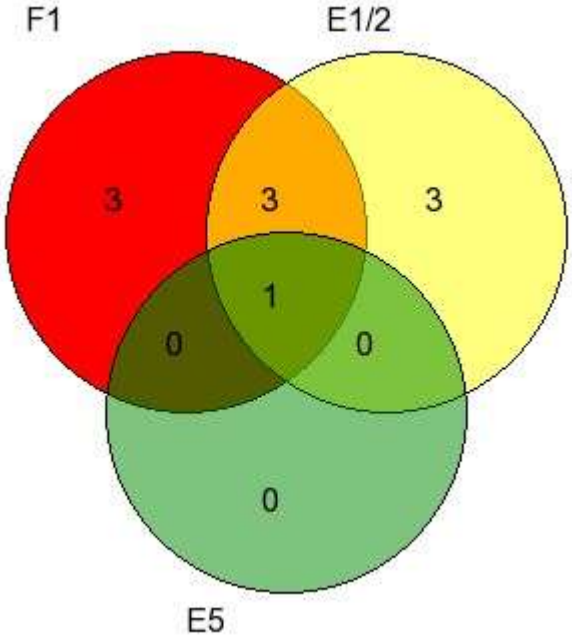


Figura 4.12: Diagrama de Venn mostrando o perfil de ritmicidade dos 10 transcritos expressos e com ritmo para os genes da via de entrada de luz (fototropinas, fitocromos e criptocromos) em folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas rítmicas. Os transcritos expressos rítmicos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Os mesmos 9 modelos enzimáticos para o metabolismo do açúcar investigados por Hotta *et al.* (2013) em seu experimento circadiano foram analisados nestes oligoarrays, nos 3 órgãos (**Figura 4.13**). Havia sondas para glicose-6-fosfato isomerase, fosfoglicomutase, sacarose sintase, hexoquinase, invertase neutral, UPDG pirofosforilase, sacarose fosfatase, sacarose fosfato sintase e frutoquinase e, além disso, para transportadores de sacarose. Todos estes modelos enzimáticos mais os transportadores apresentaram transcritos expressos em F1, E1/2 e E5. Em F1, não foram observados transcritos rítmicos para UPDG pirofosforilase e sacarose fosfatase. Em E1/2, 5 transcritos para os modelos enzimáticos escolhidos para análise foram

expressos, mas sem qualquer transcrito com ritmo. Foram eles: glicose-6-fosfato isomerase, fosfoglicomutase, UPDG pirofosforilase, sacarose fosfato sintase e frutoquinase. Por fim, em E5, semelhante a E1/2, transcritos para glicose-6-fosfato isomerase, fosfoglicomutase, UPDG pirofosforilase e sacarose fosfato sintase foram expressas, mas sem ritmicidade. Além disso, os transcritos para hexoquinase também foram apenas expressos, mas sem ritmos em E5. Os transportadores de sacarose, embora expressos em todos os órgãos, apresentaram em F1 a maior proporção de transcritos rítmicos.

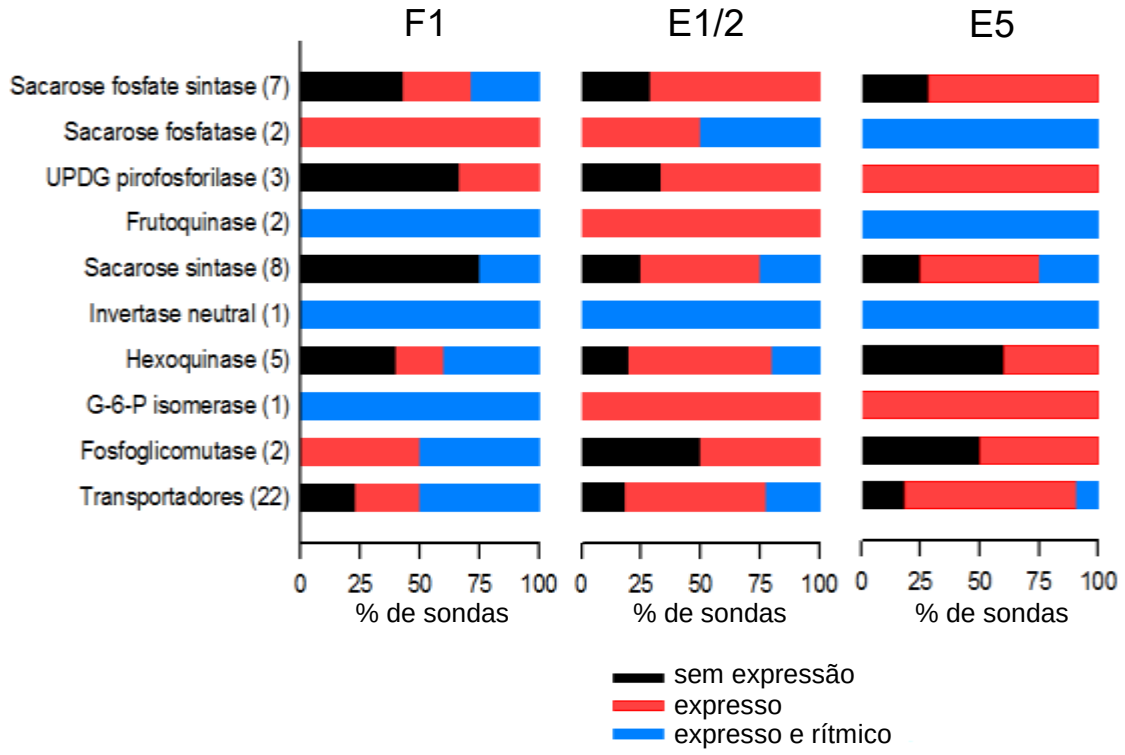


Figura 4.13: Distribuição em porcentagem das sondas para nove modelos enzimáticos do metabolismo de sacarose (glicose-6-fosfato isomerase, fosfoglicomutase, sacarose sintase, hexoquinase, invertase neutral, UPDG pirofosforilase, sacarose fosfatase, sacarose fosfato sintase e frutoquinase) e transportadores de sacarose presentes nos órgãos F1, E1/2 e E5 de cana-de-açúcar. À esquerda, genes e o número de sondas para cada um. Em azul, os transcritos rítmicos; em vermelho, os transcritos expressos; em preto, os transcritos sem expressão.

Analisando o perfil de expressão destes nove modelos enzimáticos distribuídos entre os órgãos F1, E1/2 e E5, é possível identificar, de modo geral, 35 sondas expressas para estas enzimas, das quais 20 (57,14%) são expressas nos três órgãos. A segunda maior proporção de sondas expressas é compartilhada pelos entrenós: 7 (20%) (**Figura 4.14**). Nenhuma sonda é expressa apenas em E1/2.

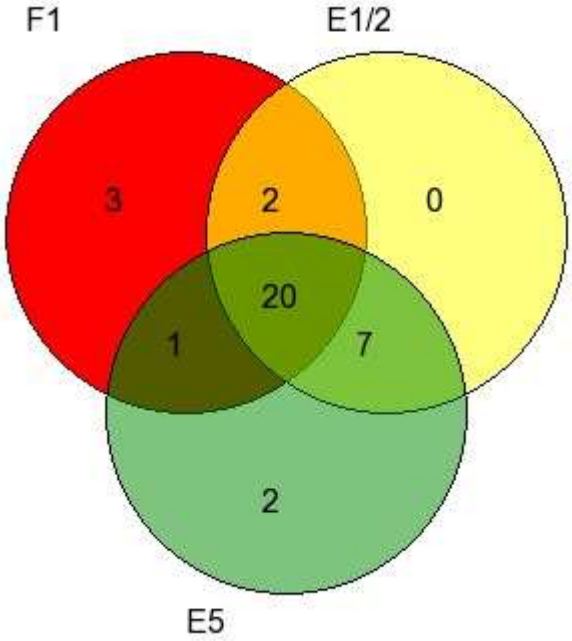


Figura 4.14: Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos 35 transcritos para os modelos enzimáticos de metabolismo do açúcar e transportadores (glicose-6-fosfato isomerase, fosfoglicomutase, sacarose sintase, hexoquinase, invertase neutral, UPDG pirofosforilase, sacarose fosfatase, sacarose fosfato sintase e frutoquinase) expressos nos órgãos folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas. Os transcritos expressos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

A distribuição dos 21 transcritos expressos rítmicos revelou que a maior parte deles está concentrado em F1, com 8 (38,1%). Ainda assim, a tendência de grande proporção de compartilhamento de transcritos entre os três órgãos é mantida. 4 transcritos, o que corresponde a 19,05% dos transcritos expressos rítmicos é comum a F1, E1/2 e E5 (**Figura 4.15**).

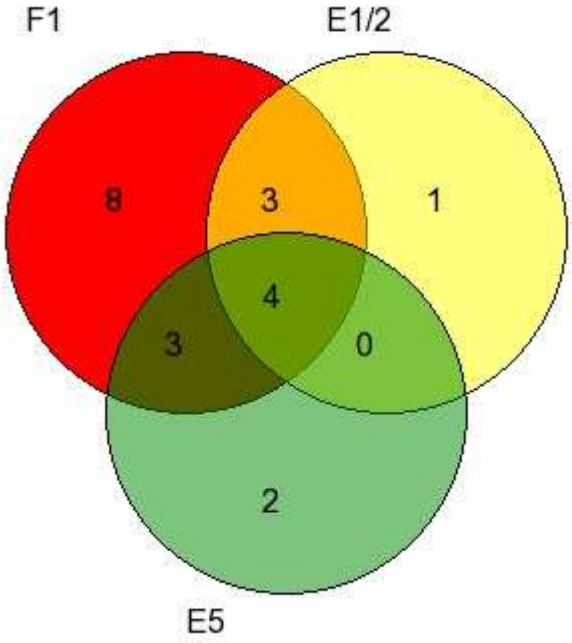


Figura 4.15: Diagrama de Venn mostrando o perfil de ritmicidade dos 21 transcritos expressos rítmicos para os modelos enzimáticos de metabolismo do açúcar e transportadores (glicose-6-fosfato isomerase, fosfoglicomutase, sacarose sintase, hexoquinase, invertase neutral, UPDG pirofosforilase, sacarose fosfatase, sacarose fosfato sintase e frutoquinase) em folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas rítmicas. Os transcritos expressos rítmicos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

A última via dissecada nos *oligoarrays* dos órgãos F1, E1/2 e E5 da cana-de-açúcar foi a fotossíntese. Para esta via tão complexa e importante, havia sondas para hibridização para via dos carotenoides e clorofila, fotossistemas I e II, complexo antena e ATPase. Surpreendentemente, as sondas para a categoria fotossíntese apresentou transcritos expressos nos três órgãos (**Figura 4.16**). Dos 109 transcritos expressos, a grande maioria, 87 (79,81%), têm sua expressão comum a F1, E1/2 e E5.

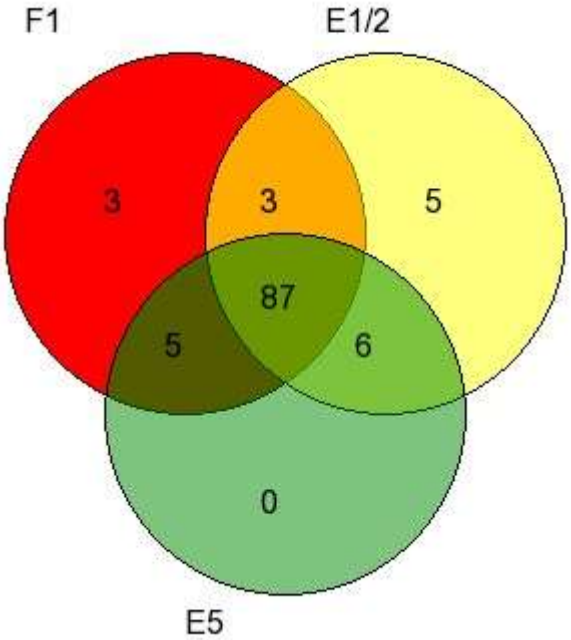


Figura 4.16: Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos 109 transcritos para a fotossíntese (via dos carotenoides e clorofila, fotossistemas I e II, complexo antena e ATPase) expressos nos órgãos folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas. Os transcritos expressos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Dentro dos 109 transcritos expressos, a distribuição dos 74 transcritos rítmicos (67,89% dos transcritos expressos) mostra uma surpreendente proporção equilibrada entre os transcritos para fotossíntese rítmicos comuns aos três órgãos, rítmicos apenas em F1, rítmicos em E5 e rítmicos compartilhados entre os dois órgãos dreno analisados (**Figura 4.17**).

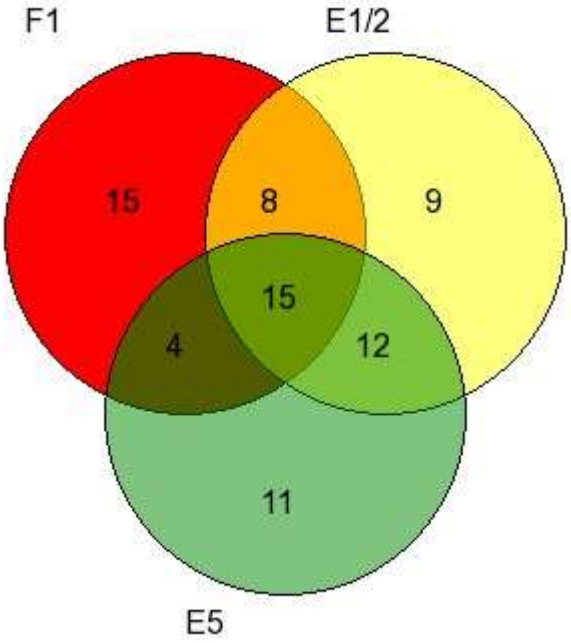


Figura 4.17: Diagrama de Venn mostrando o perfil de ritmicidade dos 74 transcritos expressos rítmicos para a fotossíntese (via dos carotenoides e clorofila, fotossistemas I e II, complexo antena e ATPase) em folha +1 (F1) (círculo vermelho), entrenós 1/2 (E1/2) (círculo amarelo) e entrenó 5 (E5) (círculo verde) de cana-de-açúcar. Os números indicam as sondas senso (SS) expressas rítmicas. Os transcritos expressos rítmicos específicos a cada órgão estão apresentados dentro de cada círculo. Os transcritos expressos cujo padrão de ritmo é compartilhado por dois ou mais órgãos estão indicados nas áreas de intersecção.

Ao dissecar o perfil de expressão dos transcritos específicos para os processos analisados dentro da categoria fotossíntese (via dos carotenoides e clorofila, fotossistemas I e II, complexo antena e ATPase), é possível observar que para cada um dos processos há transcritos expressos nos três órgãos e pelo menos um transcrito rítmico. Por exemplo, há uma grande proporção dos transcritos para o complexo Antenna e para os fotossistemas I e II rítmicos em F1, E1/2 e E5 (**Figura 4.18**).

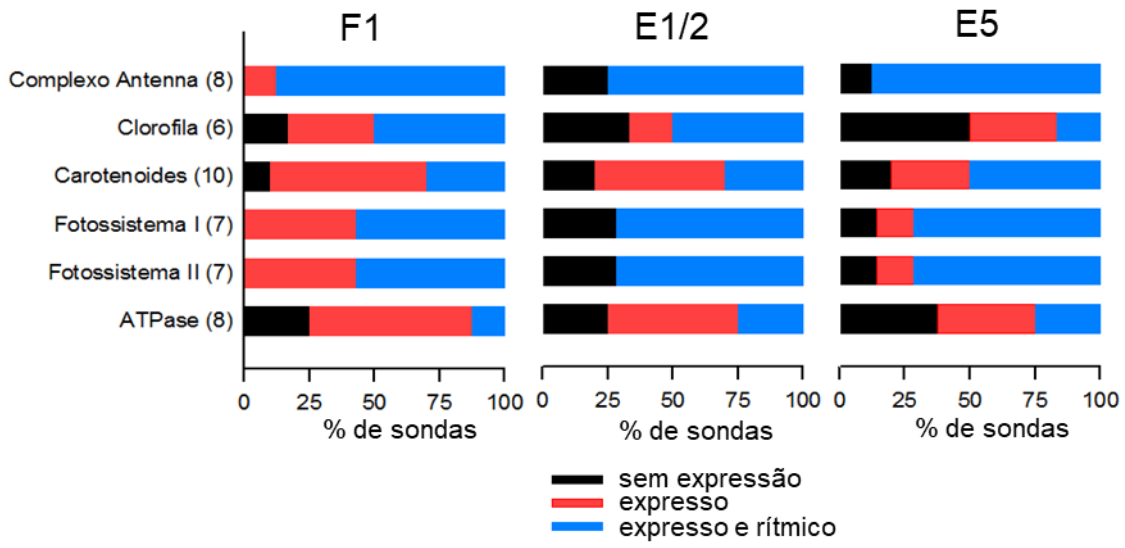


Figura 4.18: Distribuição em porcentagem das sondas para a fotossíntese (via dos carotenoides e clorofila, fotossistemas I e II, complexo antena e ATPase) presentes nos órgãos F1, E1/2 e E5 de cana-de-açúcar. À esquerda, genes e o número de sondas para cada um. Em azul, os transcritos rítmicos; em vermelho, os transcritos expressos; em preto; os transcritos sem expressão.

4.5. Discussão

Este capítulo descreveu o funcionamento do relógio em múltiplos órgãos da cana-de-açúcar cultivada em campo, sob condições flutuantes. Os experimentos com *oligoarrays* partiram do RNA extraído a partir 3 órgãos com perfis metabólicos e fisiológicos bastante distintos: folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5). F1 é o órgão com perfil fonte, uma vez que é a primeira folha a ter atividade fotossintética total e, portanto, ser fonte de carboidratos. E1/2 e E5 são órgãos dreno para os quais são alocados os carboidratos excedentes produzidos pelas folhas durante a fotossíntese. Porém, mesmo ambos sendo órgãos dreno, seus perfis são distintos entre si: enquanto E1/2, em termos práticos inseparáveis, são caracterizados por intensa atividade celular, E5 é o primeiro entrenó a marcadamente acumular sacarose.

Além disso, este capítulo analisou a expressão em larga escala de transcritos que apresentam ritmos em plantas de cana-de-açúcar crescidas em campo sob condições flutuantes através de hibridizações em *oligoarrays*. Para tanto, foram analisados órgãos metabolicamente diferentes: F1, um órgão fonte, e E1/2 e E5, ambos órgãos dreno. Os transcritos rítmicos foram agrupados dentro de vias metabólicas e fisiológicas importantes, como fotossíntese, metabolismo de sacarose e dinâmica de cromatina.

Uma análise anterior da expressão rítmica de genes de cana-de-açúcar sob condições circadianas revelou a maior proporção de genes regulados pelo relógio até então vista: 32% (Hotta *et al.*, 2013). Neste experimento de hibridização a partir de RNA de plantas crescidas em campo, os dados apontaram para uma porcentagem

ainda maior de transcritos rítmicos: 60,9%, considerando apenas órgão foliar, o mesmo utilizado no estudo circadiano por Hotta *et al.* (2013). Ao examinar os órgãos novos analisados, E1/2 e E5, ainda assim as proporções de transcritos rítmicos são consideráveis: 36,5% e 28,3%, respectivamente (**Figura 4.1**). Tamanha ritmicidade nos transcriptomas pode ser um reflexo não só dos ritmos autossustentados promovidos pelo relógio biológico, mas também do ambiente de campo e suas condições flutuantes – luz, temperatura, umidade. É possível que estes dois elementos ajam em sinergia para promover uma ritmicidade ainda maior na expressão gênica. De fato, esta hipótese encontra respaldo nos experimentos controlados executados em arroz e *Populus ssp.* (Filichkin *et al.*, 2011). Nestes experimentos, variaram-se luz, temperatura, ambos ou nenhum e as maiores proporções de transcritos rítmicos foram observadas nos grupos com variação de algum componente do ambiente fechado no qual as plantas se encontravam. Partindo do pressuposto de que o relógio biológico antecipa as flutuações ambientais diárias e sazonais, promovendo uma organização temporal de eventos importantes, como o metabolismo de carboidratos, é possível sugerir que tamanha porcentagem de genes rítmicos traga para a planta em ambiente natural vantagens – no caso da cana-de-açúcar, maior acúmulo de sacarose.

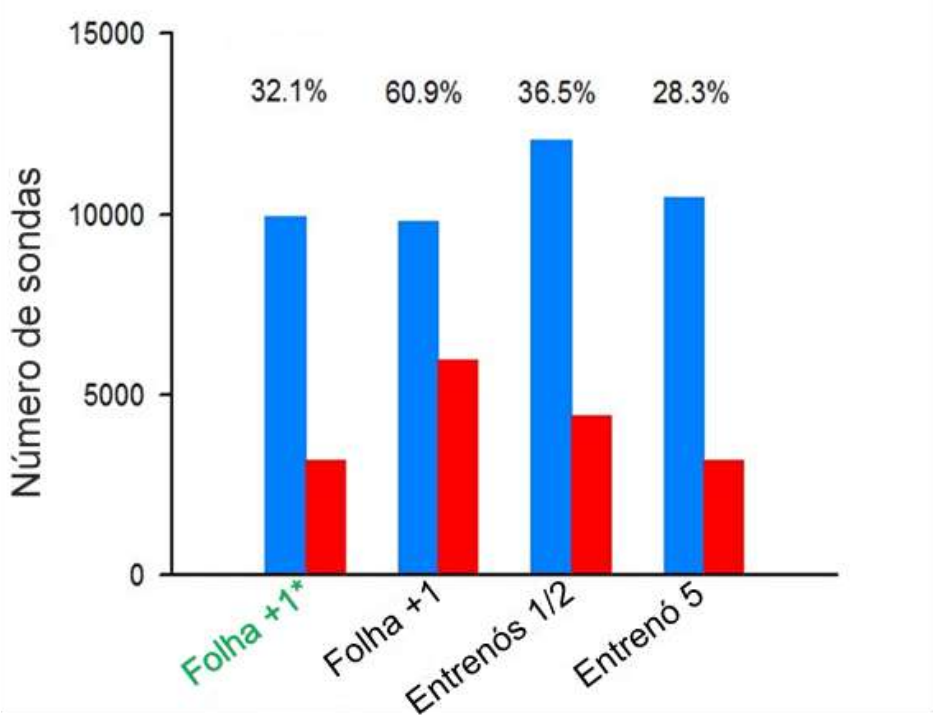


Figura 4.19: Comparação do número de sondas para transcritos expressos e rítmicos entre o experimento circadiano, que analisou o órgão folha +1 (identificado pelo nome em verde), e o experimento em campo, que analisou os órgãos folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5). Ambos experimentos foram feitos utilizando *oligoarrays*. Comparando o mesmo órgão analisado nos dois experimentos, F1, há uma maior porcentagem de transcritos rítmicos nas plantas cultivadas em campo.

O perfil dos genes rítmicos encontrados nos três órgãos também revela o quão ampla é a influência do relógio no metabolismo, fisiologia, regulação da expressão gênica e epigenética. Em todos os 3 órgãos analisados, os transcritos rítmicos estão agrupados em torno de vias metabólicas importantes, como fotossíntese, metabolismo de sacarose, vias clássicas hormonais, resposta à luz, além de vias de regulação da expressão gênica e epigenética, estas exemplificadas pelos fatores de transcrição e histonas expressos com rimos. Estas vias também apresentaram transcritos rítmicos em resposta ao relógio em outras plantas como Arabidopsis (Harmer *et al.*, 2000), arroz (Filichkin *et al.*, 2011) e milho (Khan *et al.*, 2010). É importante notar que a fotossíntese de plantas C4 também é regulada pelo relógio biológico. O grande reflexo desta influência pode ser a produtividade, sobretudo em um ambiente como elevada

concentração de CO_2. Os dados sugerem perfis de expressão de genes bastante distintos para dia e noite. Durante o dia, os transcritos relacionados à fotossíntese são expressos, enquanto à noite são mais expressos transcritos relacionados à regulação de histonas e transporte de sacarose. Isto também foi observado no experimento circadiano conduzido em cana-de-açúcar durante a noite e o dia subjetivos (Carlos Takeshi Hotta *et al.*, 2013).

Ao comparar expressão e fase dos transcritos rítmicos nos diferentes órgãos, há tendências distintas: transcritos expressos e rítmicos em um único órgão; transcritos expressos em ambos os órgãos, mas rítmicos em apenas um deles; expressos rítmicos nos dois órgãos, mas com fases distintas; rítmicos em ambos os órgãos com a mesma fase; rítmicos e coexpressos (**Figura 4.4**). Há uma semelhança maior entre os órgãos F1 e E5 quanto aos transcritos expressos nos dois órgãos e rítmicos em apenas um deles do que entre os entrenós entre si (**Figura 4.4**). É provável que, embora um órgão seja fonte e o outro seja dreno, a presença de açúcares, produzidos num órgão e armazenado por outro, seja um elemento de sincronização neste perfil de expressão (Haydon *et al.*, 2013). Os órgãos F1 e E1/2 apresentam o maior grau de semelhança entre si quanto aos transcritos expressos e rítmicos possivelmente porque ambos são órgãos com intensa atividade celular, sendo E1/2 um órgão meristemático e ambos órgãos que ficam sobre o solo. Nestes órgãos, a regulação do relógio pode atuar de modo semelhante e dominante em relação a outros órgãos (James *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2015).

É interessante também notar a expressão rítmica de genes relacionados à fotossíntese nos entrenós, órgãos que estão completamente encobertos na cana-de-açúcar. Por exemplo, transcritos do complexo antena, dos fotossistemas I e II e até de fotorrespiração são expressos e rítmicos nos órgãos dreno. Uma hipótese

interessante para explicar este fenômeno seria a presença de alguma molécula que sinalize e sincronize esta expressão. Já foi sugerido em estudos anteriores a influência do açúcar na regulação do relógio biológico (Haydon *et al.*, 2013), o que poderia dar suporte a ideia de que o açúcar tão presente na cana-de-açúcar pode ter um efeito sincronizador da regulação do relógio entre diferentes órgãos. Ou talvez a luz possa ser o fator de sinalização neste caso. Um estudo recente mostrou que em Arabidopsis, a raiz exposta à luz de baixa intensidade é percebida pelo oscilador deste órgão, regulando-o de forma semelhante à exposição a açúcar (Takahashi *et al.*, 2015; Bordage *et al.*, 2016).

A importância de analisar órgãos diferentes ao examinar o oscilador central do relógio biológico de plantas se tornou mais evidente nos últimos anos (James *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015; Bordage *et al.*, 2016). Em um destes recentes estudos, os dados revelaram que alguns componentes do oscilador central são mais expressos em alguns tecidos do que outros (Endo *et al.*, 2014). Em Arabidopsis, quando a expressão dos genes do oscilador central *AtCCA1*, *AtLHY* e *AtTOC1* foi analisada em folhas, observou-se que *AtCCA1* e *AtLHY* eram mais expressos no mesófilo, enquanto *AtTOC1* era dominantemente expresso na vasculatura (Endo *et al.*, 2014). O que acontece nos entrenós de cana-de-açúcar é algo bem semelhante: enquanto *ScLHY*, expresso por volta do amanhecer, é mais expresso em E1/2, *ScTOC1*, expresso em antecipação ao anoitecer, é mais expresso em E5. Coincidentemente, estes órgãos possuem perfis fisiológicos bastante distintos: E1/2 está no meristema do caule da cana-de-açúcar, portanto tem intensa atividade celular e de diferenciação, o que demanda açúcar como combustível para sustentar tais eventos. Por outro lado, em E5 começa o acúmulo de sacarose característico da cana-de-açúcar. Talvez haja uma relação entre os genes do oscilador mais expressos

num dado órgão e o perfil fisiológico deste, considerando que o relógio processa informação ambiental e responde organizando temporalmente as respostas fisiológicas.

Ainda com este aspecto de dominância de expressão de *ScLHY* e *ScTOC1*, genes do oscilador central do relógio, em diferentes entrenós, é inegável que a expressão dos genes do relógio F1 é ainda maior em termos de amplitude de ritmos. Também é o órgão com maior porcentagem de transcritos rítmicos, o que sugere o órgão com maior influência do relógio e das variações ambientais. Ora, este órgão reúne características que podem ajudar a entender melhor o porquê destes fenômenos. Primeiro, F1 é o órgão marcadamente fotossintético analisado, sendo fonte de carboidratos sintetizados a partir da energia de fótons e CO_2. Segundo, F1 é o órgão, entre os 3 analisados, mais externo e, portanto, em contato direto com o ambiente, o que facilita a sinalização local de pistas ambientais, como luz e temperatura.

Entretanto, dados em Arabidopsis revelaram que o oscilador central do relógio do meristema é dominante sobre o relógio dos demais órgãos (James *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2015). No caso dos dados para F1 deste trabalho, é preciso destacar que este não é o mais meristemático de todos os três órgãos. Mais do que dominância, o relógio do meristema de Arabidopsis parece ter o papel de sincronizar os relógios dos demais órgãos e ditar o ritmo da planta como um todo (Takahashi *et al.*, 2015), possivelmente com o sinal passando pela vasculatura, órgão que em si já tem expressão diferencial de genes do relógio biológico (Endo *et al.*, 2016). Ao observar o que acontece com a expressão dos transcritos para os genes do relógio biológico em cana-de-açúcar em F1, E1/2 e E5, é possível que folha seja o órgão a ditar a fase e a amplitude geral do relógio e dos genes a ele associados, com os entrenós seguindo a

tendência. A sinalização que parte da folha e vai para os entrenós, coordenando ritmicidade, poderia passar, como hipotetizado anteriormente, pelo açúcar (Haydon *et al.*, 2013) e/ou pela ação de luz de baixa intensidade (Bordage *et al.*, 2016). Experimentos voltados para investigar a natureza desta sinalização envolvendo plantas de cana-de-açúcar em diferentes condições de luz e oferta de açúcar em determinados órgãos poderiam dar pistas sobre esta hipótese.

4.6. Conclusões

A análise global de transcriptoma dos três órgãos analisados, folha +1 (F1), entrenó 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5), de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo revelou que o relógio biológico não só existe em diferentes órgãos, como é capaz de gerar e manter ritmos, embora oscile com amplitude menor nos órgãos dreno. As altas porcentagens de transcritos rítmicos nos três órgãos analisados reflete não só a influência do relógio biológico, mas possivelmente a resposta à influência conjunta do relógio biológico (ritmicidade interna) e condições ambientais flutuantes (ritmos ambientais). Os transcritos rítmicos agruparam-se em torno de vias metabólicas, fisiológicas e de regulação gênica e epigenética. Esta variedade de vias reguladas pelo relógio e pelas flutuações ambientais possivelmente atua promovendo uma melhor adaptação da cana-de-açúcar ao campo. Em última instância, isto pode levar a um maior acúmulo de sacarose. Para seguir investigando a influência do relógio biológico no metabolismo e na fisiologia da cana-de-açúcar, as perguntas futuras compreendem checar se há ritmos também nos metabólitos principais desta planta e investigar o perfil do relógio biológico e dos transcritos rítmicos (em larga escala) de cana-de-açúcar cultivada em campo ao longo de diferentes estações.

5. Capítulo 2: Efeitos do sombreamento do campo sobre o relógio biológico da cana-de-açúcar

5.1. Introdução

O relógio biológico é um mecanismo interno autossustentado que produz ritmos, estes transmitidos a respostas fisiológicas e metabólicas. Pela natureza de sua evolução, o relógio biológico é bastante influenciado pelo ambiente. Variáveis ambientais como luz e temperatura são percebidas por vias de entrada que se comunicam com o oscilador central do relógio biológico, criando, assim, uma sincronia entre o ambiente e este mecanismo interno. Partido desse pressuposto, estudos feitos baseados em condições controladas em salas e câmaras de crescimento nem sempre capturam todas as nuances do relógio biológico. Por isso, é importante que haja estudos sobre o relógio biológico das plantas executados em campo, nas condições mais próximas possíveis de seu habitat natural (Izawa, 2015).

Pensando no impacto do relógio biológico sobre as respostas metabólicas e fisiológicas de plantas cultivadas em campo, análises da fotossíntese, evento importante por produzir os carboidratos que fomentam a planta de energia e está atrelada, em última análise, à produtividade das plantas agricultáveis, sugerem que, sob condições naturais, flutuantes, a luz pode atuar em sinergia com o relógio biológico na regulação não só da fotossíntese, mas do metabolismo primário em si das plantas (Izawa, 2012).

O número de estudos publicados com plantas em condições naturais ainda é pequeno se comparado ao número de trabalhos realizados com plantas em condições controladas de laboratório. Embora haja trabalhos realizados em laboratório com condições bastante próximas às naturais (Filichkin *et al.*, 2011), os estudos realizados com Arabidopsis (Richards *et al.*, 2012) e arroz (Izawa *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2012) em campo revelaram que é fundamental buscar condições

naturais para compreender como o relógio biológico funciona e interage com o ambiente, assim como os eventos fisiológicos e metabólicos por ele influenciados acontecem nestas condições.

De fato, em arroz, uma gramínea C3, os dados de transcriptoma de folhas de plantas crescidas em campo cruzados com dados meteorológicos sugerem que o padrão de expressão de transcritos rítmicos é fruto da interação entre ritmos endógenos gerados pelo relógio biológico, temperatura ambiente, idade da planta e radiação solar (Nagano *et al.*, 2012). Outro experimento de campo conduzido com mutantes de arroz para um ortólogos do relógio biológico, *OsGI*, evidenciou que, mesmo com as condições flutuantes do campo, é o relógio biológico que promove o ajuste dos ritmos diurnos na fisiologia e no metabolismo da planta, de modo a sincronizá-los temporalmente com o ambiente (Izawa *et al.*, 2011).

Eventos importantes relacionados ao relógio biológico em experimentos circadianos, como fotossíntese, também demonstraram ter ritmicidade influenciada pela interação relógio biológico e ambiente em condições de campo para o arroz (Izawa *et al.*, 2011). Em experimentos de campo conduzidos em sorgo, a fotossíntese mostrou-se ser bastante influenciada por condições locais do campo, isto é, pelo sombreamento mútuo das plantas (Li *et al.*, 2014). Em variedades comerciais de cana-de-açúcar, a condição de sombreamento também parece influenciar a fotossíntese (Marchiori *et al.*, 2014). A variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 quando madura apresenta elevado grau de sombreamento em campo, de modo que seria plausível pensar em possíveis efeitos desta variação local sobre o relógio biológico e sobre as respostas fisiológicas e metabólicas rítmicas. Vale salientar, porém, que não há dados sobre a influência do sombreamento no funcionamento do relógio biológico da cana-de-açúcar ou de outras plantas.

5.2. Objetivos

O objetivo deste capítulo é analisar possíveis efeitos do sombreamento de plantas sobre o relógio biológico da cana-de-açúcar crescida em campo.

Mais especificamente, esta seção pretende:

- Analisar o funcionamento dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar crescida no mesmo campo, ao longo de diferentes fases de desenvolvimento;
- Verificar se os genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio da cana-de-açúcar de órgãos de órgãos diferentes caracterizados como órgãos dreno, seguem a mesma tendência de funcionamento do oscilador central das folhas (órgão fonte);
- Analisar o efeito do sombreamento sobre a expressão dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio biológico da cana em condições de campo que promovam sombreamento a partir 1) do uso de barreira em campo e 2) da própria rotação terrestre.

5.3. Material e Métodos

5.3.1. Condições de campo para experimento com muro

Um novo campo (campo 02) da mesma variedade de cana-de-açúcar, SP80-3280, (*Saccharum* spp híbrido) foi plantado por meio de touceiras em 18 de dezembro de 2015 (verão). Assim como os demais, este campo estava situado na Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras – São Paulo (22°18'41.0"S, 47°23'05.0"W).

O campo 02 contava com uma parcela única. Nesta parcela, foram plantadas 8 linhas com 60 plantas por linha. O campo foi margeado por uma linha única de plantas circulando o campo, as quais foram descartadas para evitar efeitos de borda. Neste campo, os mesmos órgãos analisados até aqui foram escolhidos para análise: folha +1 (F1) nos dois experimentos e entrenós 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5) apenas no último experimento, quando estavam desenvolvidos (**Figura 3.3**).

Para o primeiro experimento conduzido neste campo, um muro de madeira medindo 2,20 m de altura e 10 m de comprimento foi erguido após a terceira linha de plantas (**Figura 5.1**). À parte da fileira de plantas imediatamente próxima ao lado leste do muro, as demais linhas de plantas ao longo do comprimento do muro foram descartadas. As duas fileiras anteriores foram retiradas 5 dias antes do experimento, assim como as plantas da bordadura. No dia 26 de março de 2015, durante os primeiros dias de outono, o experimento foi conduzido com as plantas contando 3 meses e 7 dias. Os dados de temperatura do campo durante este experimento estão na **Figura 5.2**.

Figura 5.1: Imagens do muro de madeira erguido no campo 02, quando as plantas contavam 3 meses de idade. O muro media 2,20 m de altura e 10 m de comprimento. Todas as linhas de plantas à leste da linha imediatamente antes do muro foram eliminadas 5 dias antes do experimento. A) plano geral do perfil do campo com o muro; B) imagem em close do muro, mais elevado do que as plantas.

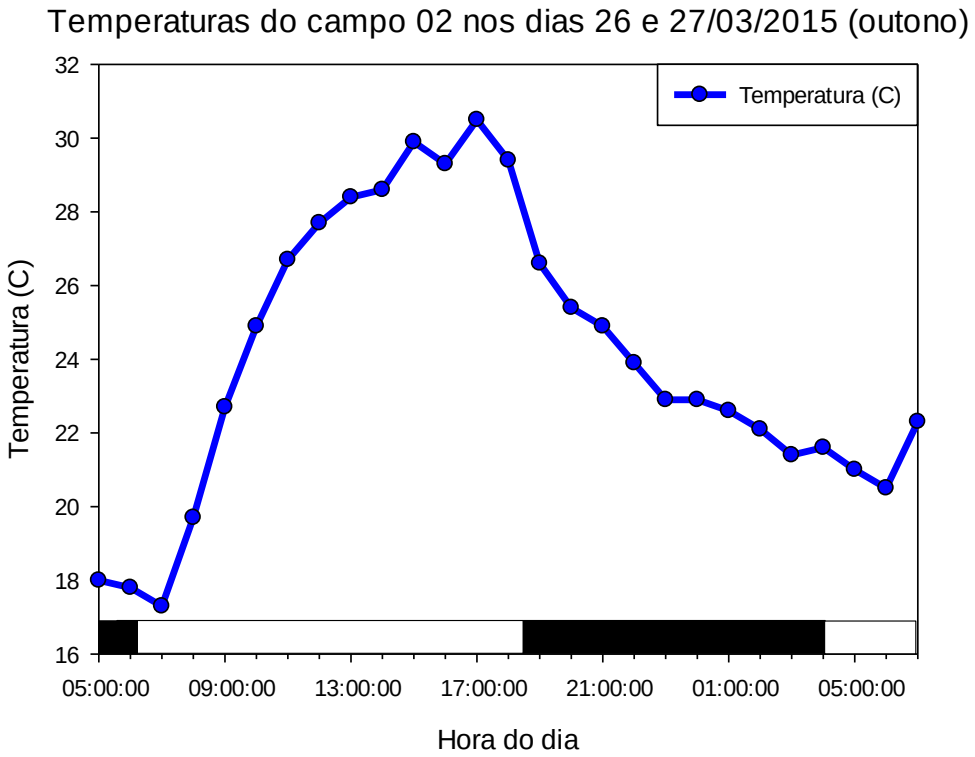


Figura 5.2: Curva de temperaturas para o experimento de 26/03/2015 (outono) do campo 02. As temperaturas foram medidas na Estação Meteorológica da UFSCar, campus Araras, ao longo de 28 h, começando às 5 h da manhã do dia 26/03/2015 e finalizando às 9 h da manhã de 27/03/2015. As barras inferiores representam noite (barras pretas) e dia (barras brancas).

Nas coletas deste experimento, quatro grupos de três indivíduos foram aleatoriamente escolhidos para amostragem a partir das linhas de planta próximas ao muro (**Figura 5.3**). Uma vez coletados e agrupados em réplicas biológicas específicas – A e B (grupos a leste, antes do muro) e C e D (grupos a oeste, depois do muro) –, o órgão folha +1 (F1) foi coletado. O experimento começou com a primeira coleta 1h15min antes do amanhecer (nascer do Sol: 6:15 da manhã), seguindo com coletas a cada 2 h até a coleta pós-anoitecer, realizada 45 min após o anoitecer (pôr-do-Sol: 18:15 da tarde), posteriormente a cada 4 h até 3h16min antes do próximo amanhecer (nascer do Sol: 6:16 da manhã), depois a cada 2h até o final do experimento. Ao todo, foram 12 pontos de coleta ao longo de 26 h. Imediatamente após cada amostra de órgão F1 ter sido processada em pedaços, as amostras foram congeladas e

conservadas em nitrogênio líquido. Em laboratório, o órgão F1 coletado no experimento foi submetido a extração de RNA para análise de expressão gênica através de qPCR (**vide Material e Métodos Gerais, seções 3.2 a 3.4**).

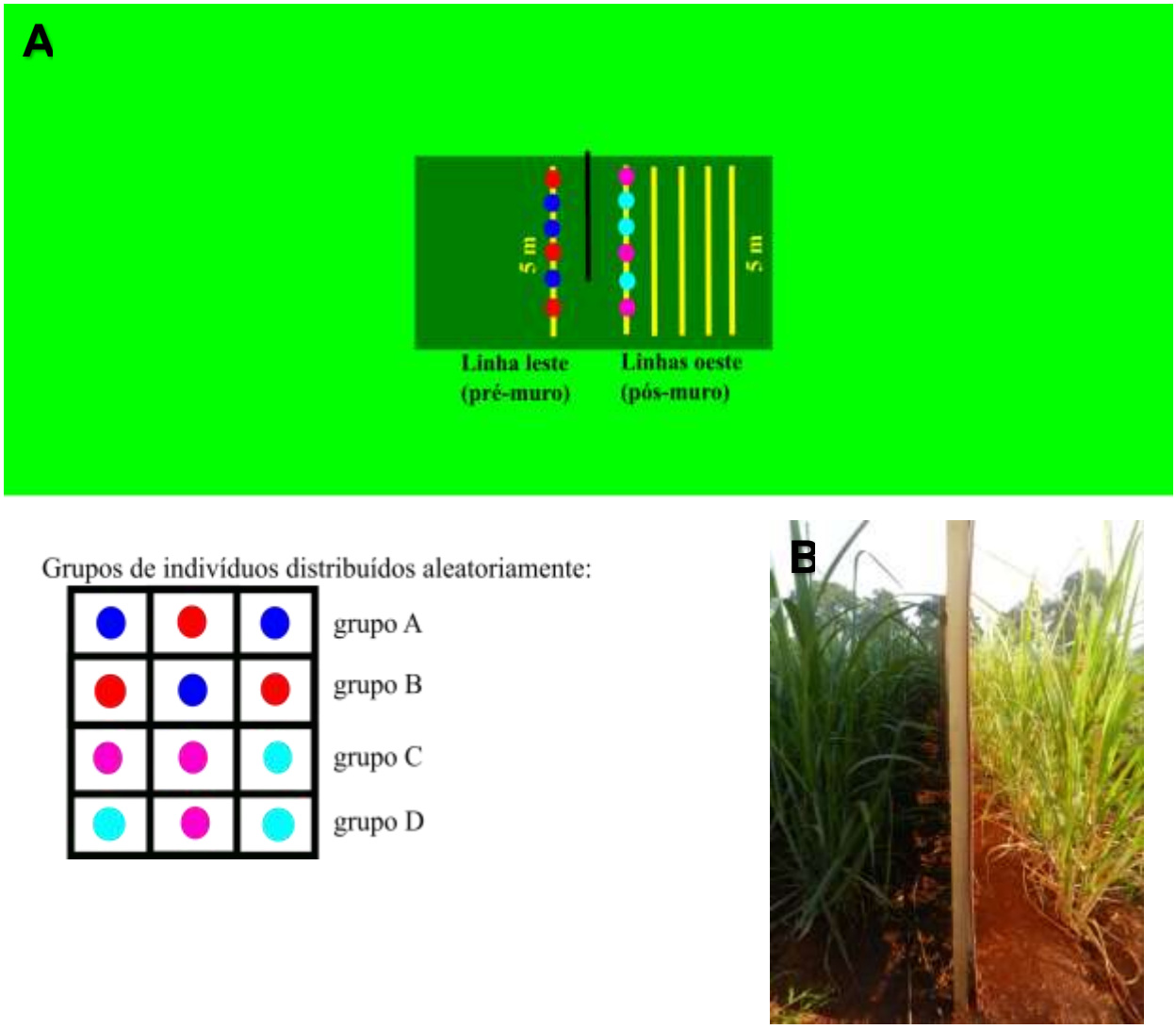


Figura 5.3 (página anterior): Esquema para o campo 02, plantado em 18 de dezembro de 2015, no dia do experimento do dia 26 de março de 2015. A) O campo 02 contava com 1 parcela dividida em 8 linhas (linhas contínuas amarelas). Em cada linha de 5 m havia 60 plantas de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280. 5 dias antes do experimento, o muro de madeira foi montado no campo medindo 2,20 m de altura e 10 m de comprimento. Após o muro, a disposição das linhas ficou sendo: a leste, 03 linhas de plantas; a oeste, 5 linhas de plantas. As duas linhas de plantas a leste anteriores à linha mais próxima foram eliminadas no mesmo dia do erguimento do muro, assim como as plantas da borda. Apenas plantas das linhas justapostas ao muro foram utilizadas na coletada. O experimento durou 26 h, com pontos de coleta a cada 2 h até a coleta pós-anoitecer, posteriormente a cada 4 h até 2 pontos antes do próximo amanhecer, depois 2 h até o final do experimento. Ao todo, foram 12 pontos de coleta. Para cada ponto de coleta, 12 indivíduos, sendo 2 grupos de 3 indivíduos da linha antes do muro (pontos em vermelho e azul marinho) e 2 grupos de 3 indivíduos da linha após o muro (pontos em turquesa e rosa) foram aleatoriamente selecionados para coleta a partir das linhas justapostas ao muro. O órgão folha +1 (F1) foi coletado e imediatamente conservado em nitrogênio líquido. B) Fotografia do campo 2 h após o amanhecer demonstrando que as plantas da após o muro continuam sombreadas.

5.3.2. Condições de campo para experimento das margens

No segundo experimento conduzido com o campo 02, as plantas contavam 4 meses e 11 dias. O experimento ocorreu em 29 de abril de 2015 (outono) e foi executado a partir das 4 linhas restantes da parcela única do campo. O experimento consistiu em coleta de plantas localizadas aleatoriamente e pontos ao longo das margens leste e oeste do campo (**Figura 5.4**). Os dados de temperatura do campo durante este experimento estão plotados na **Figura 5.5**.

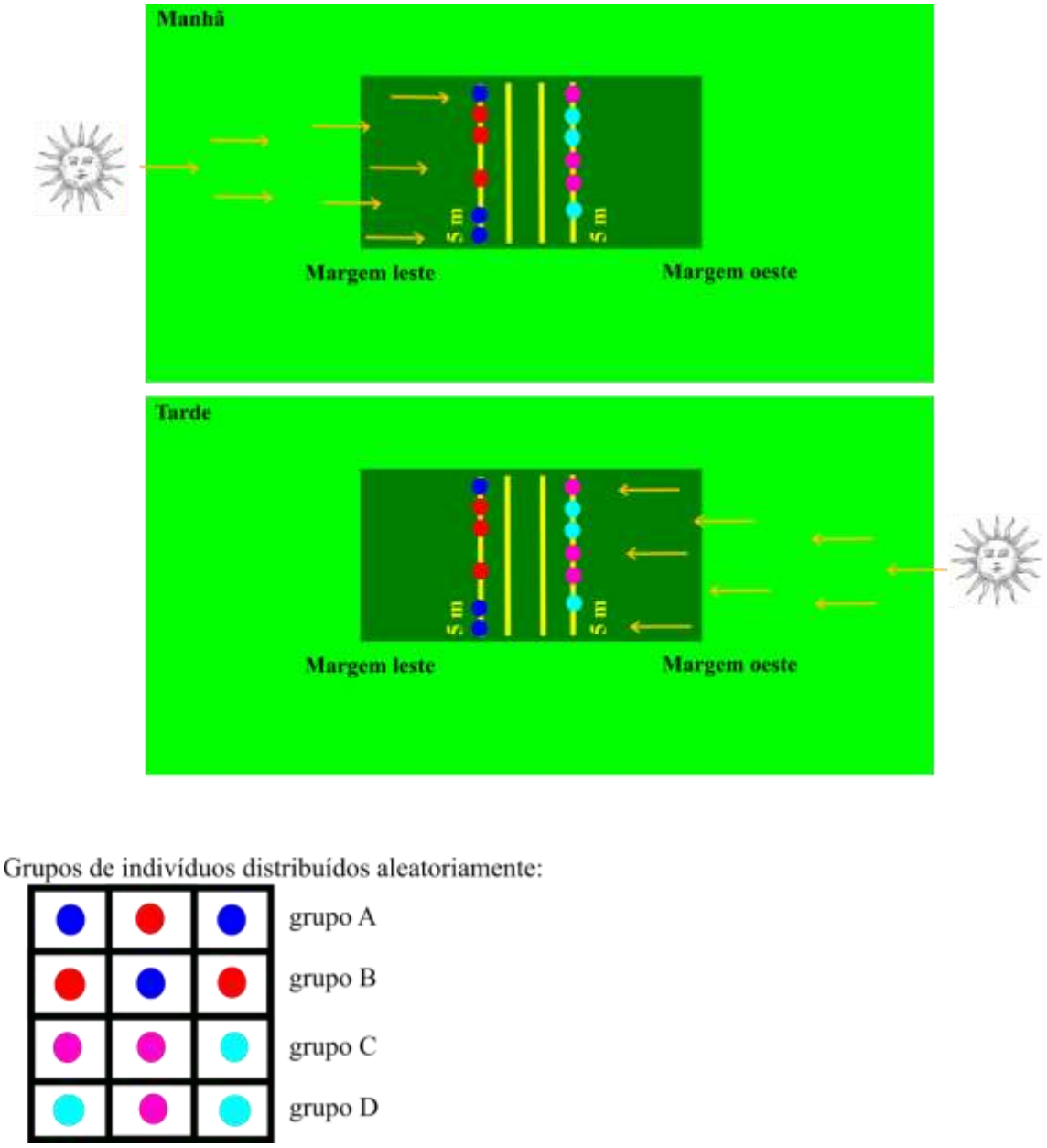


Figura 5.4: Esquema para o campo 02, plantado em 18 de dezembro de 2015, no dia do experimento do dia 29 de abril de 2015. O campo 02 contava com 1 parcela dividida em 8 linhas (linhas contínuas amarelas). Em cada linha de 5 m havia 60 plantas de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280. Ao longo do experimento, apenas plantas das linhas extremas a leste e oeste foram coletadas. O experimento durou 26 h, com pontos de coleta a cada 2 h até a coleta pós-anoitecer, posteriormente a cada 4 h até 2 pontos antes do próximo amanhecer, depois 2 h até o final do experimento. Ao todo, foram 12 pontos de coleta. Para cada ponto de coleta, 12 indivíduos, sendo 2 grupos de 3 indivíduos da linha leste (pontos em vermelho e azul marinho) e 2 grupos de 3 indivíduos da linha oeste (pontos em turquesa e rosa) foram aleatoriamente selecionados para coleta a partir das linhas justapostas ao muro. Os órgãos folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e entrenó 5 foram coletados e imediatamente conservados em nitrogênio líquido.

Neste experimento, quatro grupos de três indivíduos foram aleatoriamente escolhidos para amostragem a partir das linhas de plantas localizadas nas extremidades leste e oeste (**Figuras 5.4**). Os indivíduos foram coletados e agrupados em réplicas biológicas específicas – A e B (grupos da margem leste) e C e D (grupos da margem oeste). Com todos os órgãos plenamente desenvolvidos, foi possível coletar amostras de folha +1 (F1), entrenós 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5). O experimento começou com a primeira coleta a 1h27min antes do amanhecer (nascer do Sol: 6:27 da manhã), seguindo com coletas a cada 2 h até a coleta pós-anoitecer, realizada 1h14min após o anoitecer (pôr-do-Sol: 17:46 da tarde), posteriormente a cada 4 h até 3h16min antes do próximo amanhecer (nascer do Sol: 6:27 da manhã) e, por fim, a cada 2 h até o final do experimento. Neste experimento também foram coletados 12 pontos ao longo de 26 h. Imediatamente após cada ponto de coleta, os órgãos foram processados em pedaços, congeladas e conservados em nitrogênio líquido. Em laboratório, todos órgãos coletados neste experimento foram submetidos a extração de RNA para análise de expressão gênica através de qPCR (**vide Material e Métodos Gerais, seções 3.2 a 3.4**).

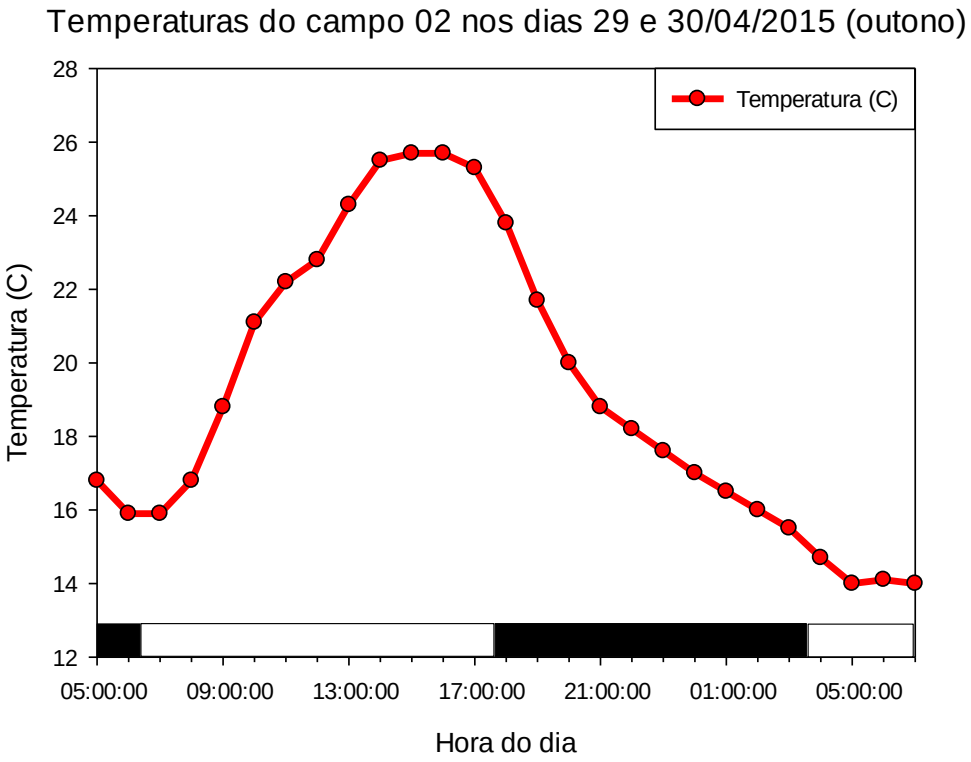


Figura 5.5: Curva de temperaturas para o experimento de 29/04/2015 (outono) do campo 02. As temperaturas foram medidas na Estação Meteorológica da UFSCar, campus Araras, ao longo de 28 h, começando às 5 h da manhã do dia 29/04/2015 e finalizando às 9 h da manhã de 30/04/2015. As barras inferiores representam noite (barras pretas) e dia (barras brancas).

5.4. Resultados

5.4.1 Comparação da expressão dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio da cana-de-açúcar crescida em campo, durante diferentes idades da planta

Os 2 experimentos no campo 01 foram executados em duas datas distintas, quando as plantas estavam em fases de desenvolvimento bastante diferentes (**Figura 5.6**). No primeiro experimento, executado em 23 de agosto de 2012, durante o inverno (estação seca), as plantas contavam 4 meses e 3 dias. No segundo experimento, realizado em 22 de janeiro de 2013, durante o verão (estação chuvosa), as plantas estavam com 9 meses. As plantas com 9 meses estavam visivelmente maiores, e, portanto, mais expandidas, sombreando-se entre si dentro do campo.

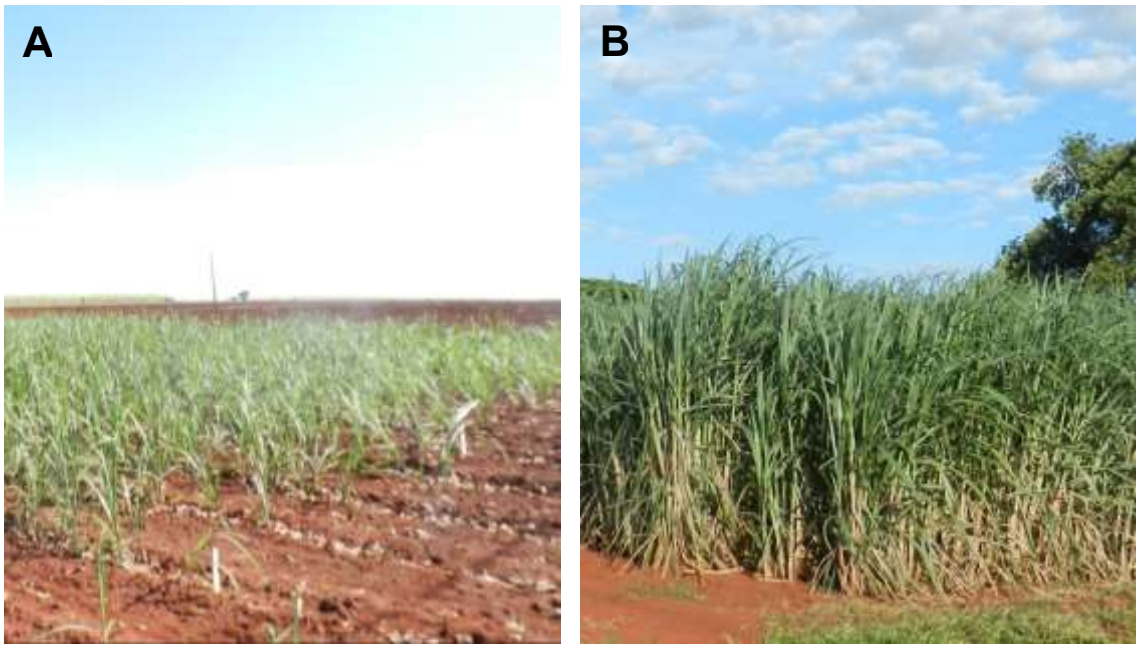


Figura 5.6: Imagens do campo 01 nos dias dos experimentos 01 (A) e 02 (B). No primeiro experimento, de 23/08/2012, durante o inverno, as plantas contavam 4 meses e 3 dias e, por serem ainda jovens, ainda estavam bem espaçadas dentro e entre as linhas. No segundo experimento, de 22/01/2013, durante o verão, as plantas estavam com 9 meses e, maiores, sombreavam-se entre si na mesma linha e entre as linhas das parcelas.

A priori, era necessário investigar se o relógio biológico da cana estava funcionando nas condições flutuantes de campo. Para tanto, foram escolhidos inicialmente dois genes principais do oscilador central do relógio da cana, *ScLHY* e *ScTOC1*, para serem analisados através de reações de qPCR. Estas reações foram executadas nos dois experimentos de campo para os órgãos folha +1 (F1) e entrenós 1/2 (E1/2) e 5 (E5), quando possível. Isso porque quando as plantas tinham 4 meses e 3 dias, no primeiro experimento, os entrenós ainda não estavam desenvolvidos, possivelmente porque o campo foi plantado em 22/04/2012, em pleno outono, após a estação chuvosa. Logo, nesta fase as plantas não contavam com a chuva abundante para se desenvolverem plenamente. Apenas no segundo experimento, quando as plantas tinham 9 meses, foi possível coletar amostras de entrenós.

Os resultados da análise comparativa dos genes *ScLHY* (**Figura 5.7a**) e *ScTOC1* (**Figura 5.7b**) por qPCR no órgão F1, que foi o único coletado nos dois experimentos

do campo 01, revelou, inicialmente, que estes genes estavam expressos com seus padrões rítmicos característicos, sugerindo que o relógio biológico da cana-de-açúcar estava, de fato, ativo. Esta observação foi validada nos ensaios de *oligoarrays* realizados a partir do experimento 02, do dia 22 de janeiro de 2013 (**vide Capítulo 1**). A segunda observação relevante desta análise comparativa foi a alteração de fase de 2 h a mais de pico de expressão para o gene *ScLHY* na coleta 02, quando as plantas contavam 9 meses. Na coleta 01 (realizada no inverno com as plantas contando cerca de 4 meses), *ScLHY* teve seu pico de expressão 3 h após o amanhecer. Por sua vez, *ScTOC1* teve seu pico de expressão 11 h após o amanhecer e a 1 h do anoitecer. Já na coleta 02 (realizada no verão, com as plantas com 9 meses), ScLHY teve seu pico de expressão 5 h após o amanhecer, enquanto ScTOC1 teve seu pico de expressão 13 h após o amanhecer e a 1 h do anoitecer.

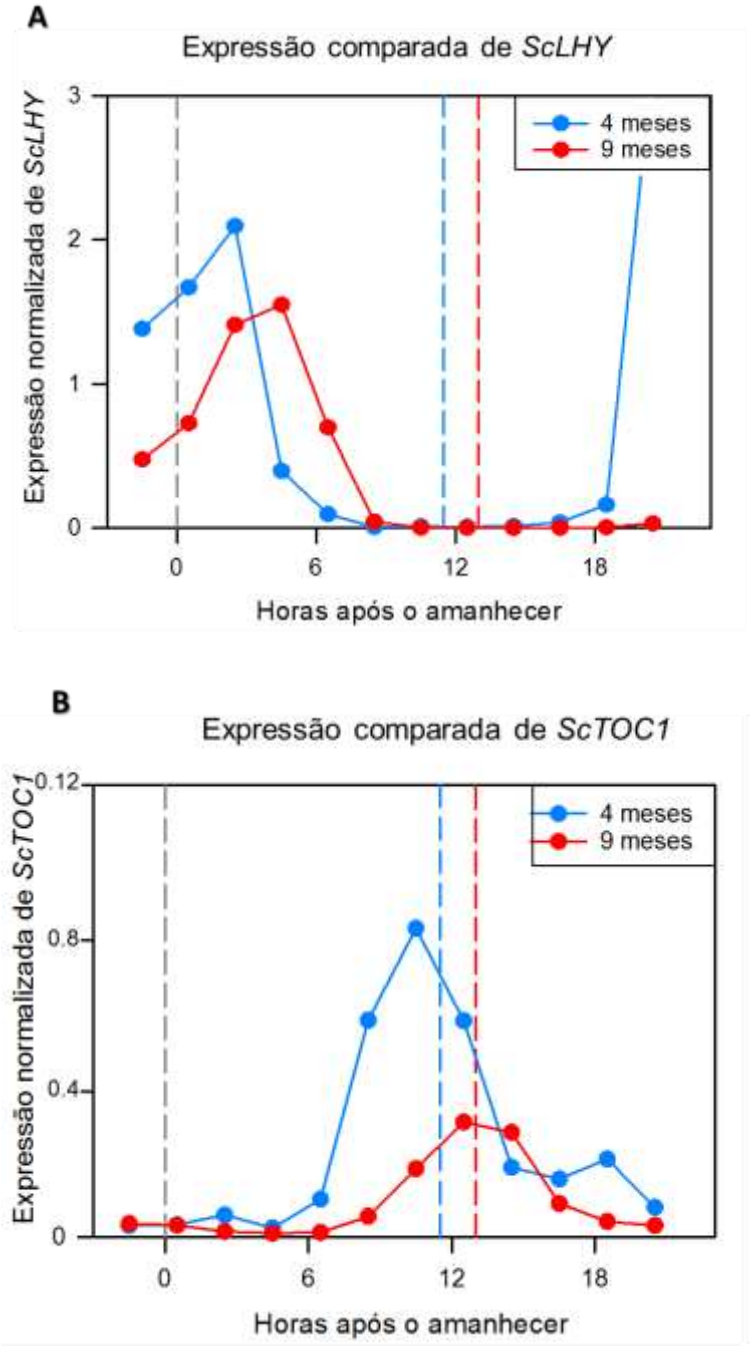


Figura 5.7: Expressão comparativa dos genes *ScLHY* (A) e *ScTOC1* (B) de cana-de-açúcar no órgão F1 obtida em experimentos de qPCR. As curvas comparam amostras de F1 das plantas no primeiro experimento, com plantas de 4 meses e 7 dias (curva azul), e do segundo experimento, com plantas com 9 meses (curva vermelha). As linhas tracejadas em cinza indicam amanhecer e as linhas tracejadas em azul e vermelho indicam o anoitecer no primeiro e no segundo experimento, respectivamente.

Entretanto, é notável que mudança de fase não seja observada em *ScTOC1*. Este gene acompanha a transição claro para escuro do anoitecer, que acontece mais tarde durante o verão, estação em que se encontravam as plantas com 9 meses. *ScLHY*, por outro lado, embora seja um gene fortemente influenciado pela luz, não apresenta um vínculo entre sua expressão no segundo experimento e o amanhecer, isto é, seu pico de expressão acontece ainda depois do amanhecer, precisamente 5 h depois. Interessantemente, esta alteração na fase de *ScLHY* e *ScTOC1* de 2h foi observada também nos órgãos dreno, isto é, nos entrenós E1/2 e E5 (**Figura 5.8**).

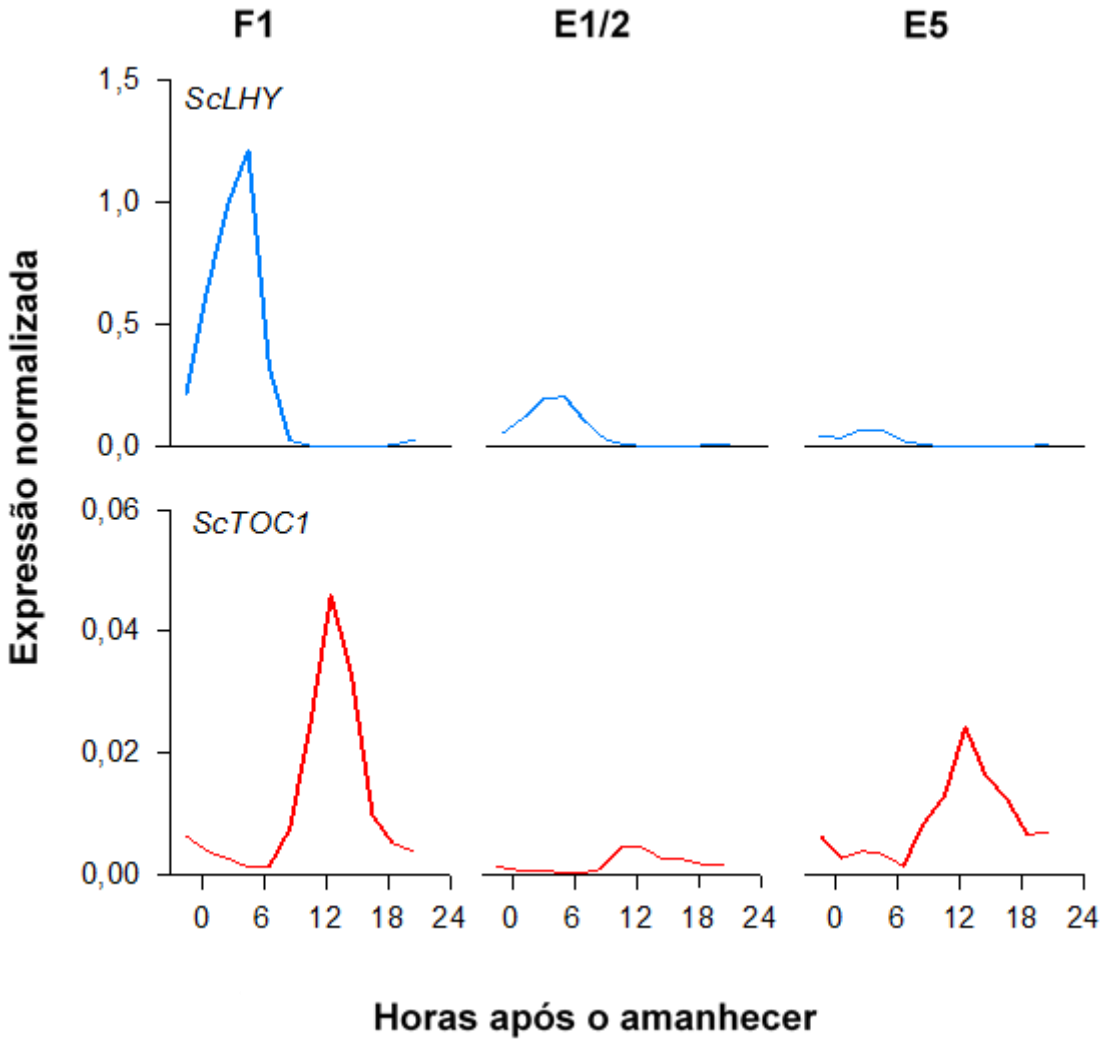


Figura 5.8: Expressão de *ScLHY* e *ScTOC1* de cana nos órgãos F1, E1/2 e E5 obtida em ensaios de qPCR. Embora a amplitude varie entre os órgãos, a fase segue a mesma tendência. A expressão de *ScLHY* e *ScTOC1* também está representada graficamente na figura A6 do Capítulo A.

5.4.2 Alterações na expressão dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar causadas por sombreamento a partir de muro erguido no campo

A partir dos resultados obtidos na análise comparativa da expressão normalizada de *ScLHY* e *ScTOC1* nos dois experimentos do campo 01, foi levantada a hipótese de que esta mudança de fase poderia ser causada pelo efeito do sombreamento das

plantas suficientemente crescidas para sombrearem umas às outras no campo. Para testar esta hipótese, um novo campo (campo 02) foi plantado para novos experimentos. Um dos experimentos propostos consistiu em erguer um muro no campo e analisar a expressão de *ScLHY* e *ScTOC1* apenas nas plantas das linhas imediatamente próximas ao muro (**Figura 5.3**). O muro foi construído com altura suficiente para que as plantas além dele recebessem luz direta apenas 2 h depois do amanhecer, ao passo que as plantas antes dele percebem a luz simultaneamente ao surgimento do Sol no horizonte. Desta forma, foi possível criar um sombreamento artificial no campo para testar a hipótese.

Foram feitas qPCRs comparando os dados para *ScLHY* e *ScTOC1* das linhas de plantas antes e depois do muro (**Figura 5.9**). As plantas contavam 3 meses e 7 dias e neste experimento foi coletado apenas o órgão F1, uma vez que os entrenós ainda não estavam completamente desenvolvidos. Os dados revelaram a mesma tendência observada nos experimentos do campo 01. A fase de *ScLHY* estava atrasada em 2 h nas plantas localizadas depois do muro em relação às plantas da linha pré-muro. *ScTOC1* seguiu a tendência de fase imediatamente antes do anoitecer percebido pelas plantas antes e depois do muro, de modo que também foi observada a mudança de fase de 2 h das plantas localizadas antes do muro, onde o anoitecer acontece posteriormente em relação às plantas localizadas depois do muro.

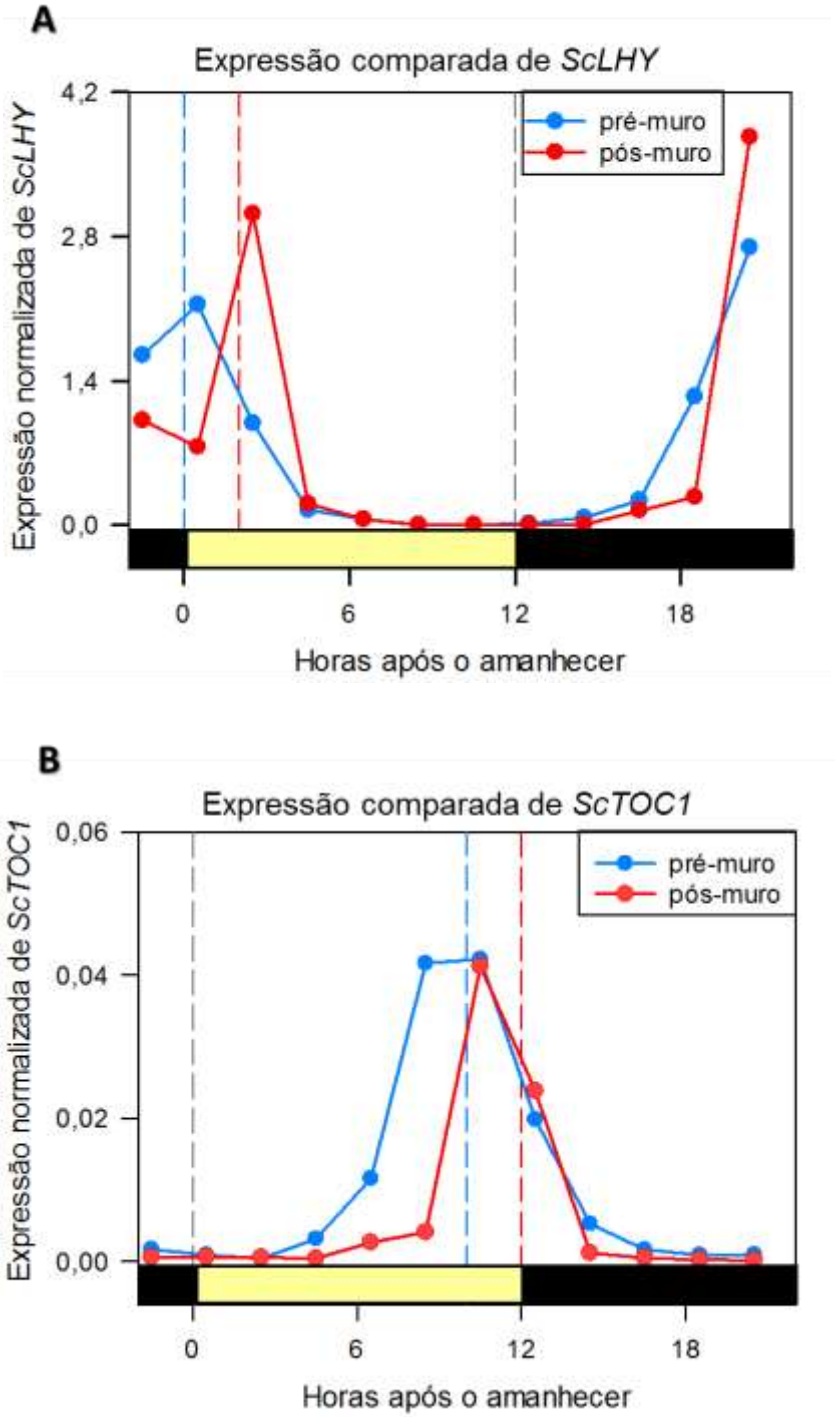


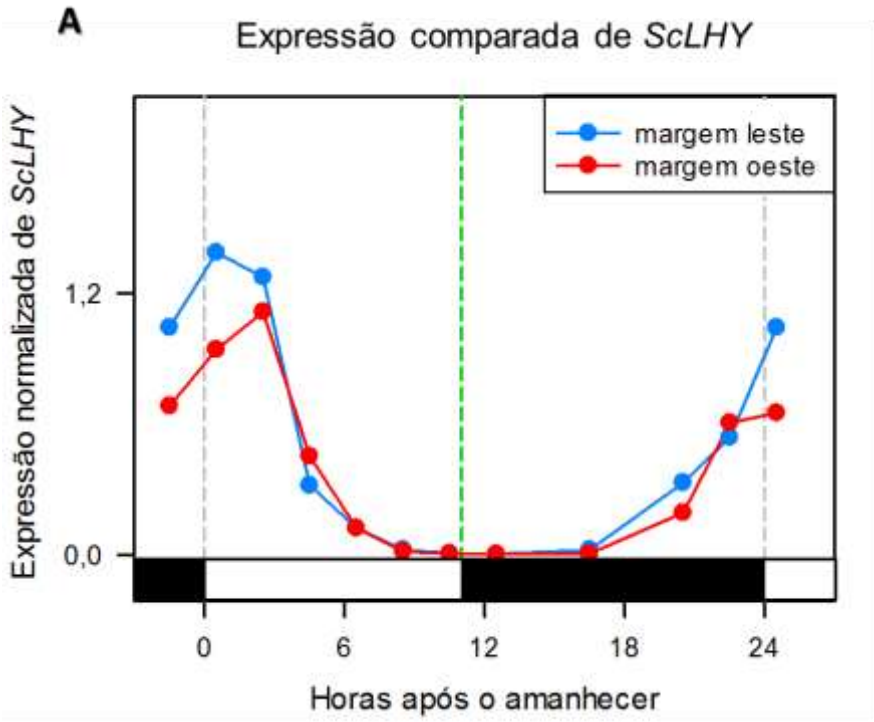
Figura 5.9: Expressão comparativa dos genes *ScLHY* (A) e *ScTOC1* (B) de cana-de-açúcar no órgão F1 de plantas coletadas no campo 02, durante o experimento baseado em sombreamento artificial das plantas através de um muro de madeira. Resultados obtidos a partir de ensaios de qPCR. As plantas contavam 3 meses e 7 dias. As plantas coletadas a partir da fila de plantas pré-muro estão representadas pelas curvas em azul e as plantas coletadas a partir da fila de plantas pós-muro estão representadas pelas curvas em vermelho. A) As linhas tracejadas em azul e vermelho indicam o amanhecer percebido pelas plantas antes e depois do muro, respectivamente, e a linha tracejada em cinza indica o anoitecer. B) A linha tracejada em cinza indica o amanhecer e as linhas tracejadas em azul e vermelho indicam o anoitecer percebido pelas plantas antes e depois do muro, respectivamente. Barras pretas indicam noite; barras claras indicam dia.

5.4.3 Alterações na expressão dos genes *ScTOC1* e *ScLHY* do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar observadas nas margens extremas leste e oeste do campo

Um novo experimento para o campo 02 foi proposto a fim de dar maior suporte experimental aos dados demonstrando que o sombreamento das plantas crescidas no campo poderia ser o responsável pela mudança de fase de *ScLHY* no oscilador do relógio da cana. Este novo experimento, também conduzido em campo, consistiu na simples coleta ao longo de uma série temporal de plantas pertencentes às margens extremas leste e oeste do campo (**Figura 5.4**). As plantas contavam 4 meses e 11 dias, porém já estavam desenvolvidas o suficiente para sombrearem-se entre si, pois o campo 02 foi plantado na estação chuvosa, em 18 de dezembro de 2015. Como havia o sombreamento das fileiras de plantas internas, seria possível testar novamente a hipótese do sombreamento influenciando a fase de oscilação do relógio biológico da cana sem artefatos.

Novamente, reações de qPCR foram conduzidas e os dados comparados entre as margens leste e oeste para *ScLHY* e *ScTOC1* (**Figura 5.10**). Mais uma vez, os dados sugeriram que o sombreamento das plantas no campo pode estar por trás da mudança de fase de *ScLHY*. Nas plantas localizadas na linha extrema a leste, que percebem primeiro o amanhecer, este gene foi expresso seguindo a tendência da transição escuro – claro. Entretanto, o mesmo não foi observado nas plantas da margem oposta, a extrema a oeste. Nestas plantas, *ScLHY* foi novamente expresso com 2 h de atraso, isto é, a fase de *ScLHY* estava alterada em 2 h adiante. O experimento também confirmou a tendência de *ScTOC1*, cuja expressão segue a transição claro-escuro. Sendo assim, desta vez foi observada mudança de fase de *ScTOC1*, uma vez que as

plantas da margem oeste perceberam o anoitecer primeiro do que as plantas da margem leste.



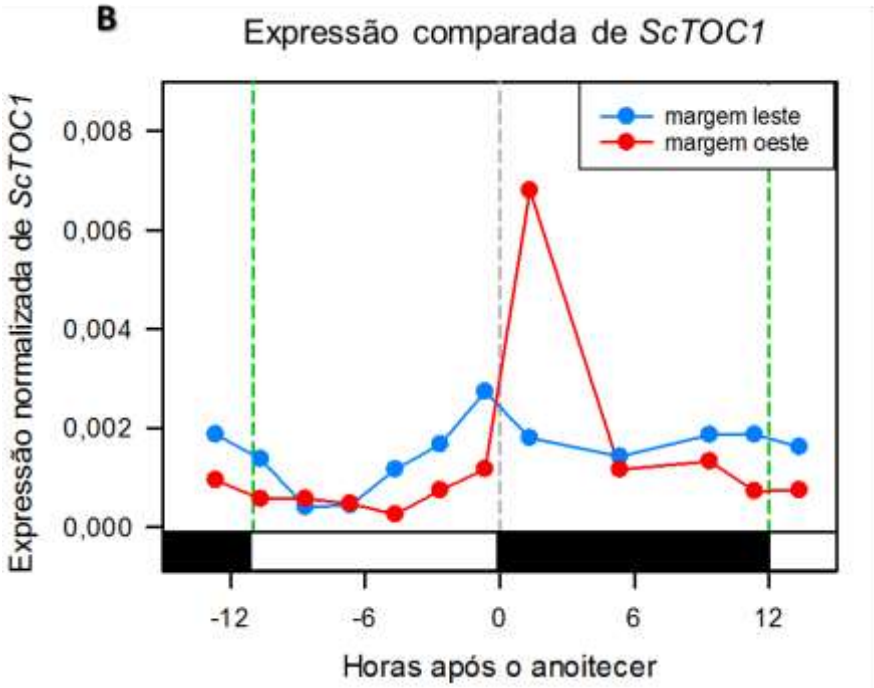


Figura 5.10: Expressão comparativa dos genes ScLHY (A) e ScTOC1 (B) de cana-de-açúcar no órgão F1 de plantas coletadas no campo 02, durante o experimento baseado em coletas de plantas das margens extremas leste e oeste do campo, obtida a partir de ensaios de qPCR. As plantas contavam 4 meses e 11 dias. As plantas coletadas a partir da margem leste estão destacadas pelas curvas em azul e as plantas coletadas a partir da margem oeste estão destacadas pelas curvas em vermelho. As linhas tracejadas em cinza indicam amanhecer e as linhas tracejadas em verde indicam o anoitecer. Barras inferiores pretas indicam noite; barras inferiores brancas indicam dia.

5.5. **Discussão**

Todos os experimentos deste trabalho estão baseados numa premissa em comum: analisar o relógio biológico e os ritmos de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo, isto é, em condições naturais e flutuantes. Com o andamento dos experimentos, foi necessário lidar com uma nova hipótese: a influência de uma planta sobre o funcionamento do relógio biológico das outras (e de si própria) no campo, sob forma de sombreamento, originando uma espécie de fuso horário próprio para esta população de plantas. Esta ideia ganha suporte no consenso de que o relógio biológico é flexível o suficiente para ressincronizar-se, de modo a se ajustar a mudanças nas condições ambientais. Em Arabidopsis, num experimento conduzido sob condições controladas, foi simulado o efeito de *jet lag* (ou um outro fuso horário) em diferentes órgãos da planta (Takahashi *et al.*, 2015). O ritmo para *TOC1::LUC* foi medido na planta inteira, mostrando sincronização ao novo fuso (Takahashi *et al.*, 2015).

Porém, é preciso voltar à pergunta inicial: qual seria o perfil do relógio biológico de plantas em idades diferentes, submetidas à sazonalidade do ambiente natural. Experimentos anteriores com cana-de-açúcar conduzidos sob condições circadianas com plantas crescidas em laboratório já haviam mostrado que o relógio biológico era funcional em cana-de-açúcar jovem, com apenas 3 meses de idade (Hotta *et al.*, 2013). Entretanto, este experimento analisou apenas órgão foliar, de modo que não havia pistas de se ou como o relógio biológico dos entrenós da cana funcionaria. Os dados deste trabalho revelaram que o relógio da cana cultivada em campo está ativo quando ela conta cerca de 4 meses e permanece ativo ao longo de seu desenvolvimento. É preciso ser considerada a grande influência do ambiente no qual

as plantas estão inseridas sobre o relógio biológico e sobre a geração de ritmos. Esta observação é esperada, posto que embora o relógio biológico seja um mecanismo que gera ritmicidade internamente, é influenciado pelo ambiente através das vias de entrada da rede circadiana. Em arroz, outra espécie de gramínea com fotossíntese C3, foram conduzidos experimentos em campo para analisar o comportamento do relógio biológico sob condições variáveis e seu impacto na ritmicidade de transcritos expressos (Izawa *et al.*, 2011). Os resultados dos estudos em campo em arroz evidenciaram a necessidade de aproximar o estudo do relógio biológico das plantas das condições naturais, variáveis e flutuantes, o mais próximo possível das condições enfrentadas pelas plantas em seu ambiente (Izawa, 2012; Izawa, 2015). Esta seria uma maneira altamente eficiente de avaliar o impacto do relógio biológico sobre respostas fisiológicas e sobre o metabolismo das plantas. No caso de espécies agricultáveis, o reflexo direto disso seria encontrar pistas para aumento de produtividade.

Com os resultados do primeiro experimento do campo 01, quando as plantas contavam cerca de 4 meses, revelando que o relógio do órgão F1 estava funcional, a próxima questão dizia respeito ao relógio biológico nos órgãos dreno E1/2 e E5, se seria funcional. Dado que aos 4 meses as plantas ainda não tinham entrenós desenvolvidos, só foi possível analisá-los no experimento seguinte do campo 01, com as plantas contando 9 meses. Os resultados dos ensaios de qPCR não só mostraram que os órgãos dreno possuem um relógio funcional, mas que este é sincronizado com o relógio do órgão fonte, F1. Como já foi discutido no **Capítulo 1**, o estudo do relógio biológico em plantas tem se voltado cada vez mais para analisar o funcionamento dos relógios de tecidos diferentes e entender como ocorre a sincronização entre eles, muitas vezes baseada na expressão de diferentes componentes do relógio em

diferentes tecidos ou na geração de ritmos por um determinado órgão que hierarquiza o funcionamento do relógio dos demais órgãos – tudo isso, em última análise, gerando o ritmo da planta como um todo (James *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015; Bordage *et al.*, 2016). Nos dados de expressão de *ScLHY* e *ScTOC1* levantados para os entrenós de cana, *ScLHY* tem um nível normalizado de expressão maior em E1/2, enquanto *ScTOC1* é mais expresso em E5. Ou seja, órgãos diferentes estão enriquecidos por transcritos diferentes. Semelhantemente, em Arabidopsis observou-se que o gene do relógio *LHY* é mais expressos no mesófilo, enquanto o gene *TOC1* é dominantemente expresso na vasculatura (Endo *et al.*, 2014). A especulação para esta diferença de nível de expressão de *ScLHY* e *ScTOC1* poderia ser uma possível relação entre o perfil fisiológico de cada órgão e a expressão preferencial de genes do relógio biológico.

Sabe-se que o sombreamento mútuo de plantas no campo tem efeitos sobre as plantas. Em sorgo, uma gramínea com fotossíntese C4 e filogeneticamente próxima à cana, o sombreamento mútuo e a consequente queda de intensidade de luz influenciam diretamente a queda na taxa de fotossíntese observada no campo de sorgo (T. Li *et al.*, 2014). Os dados deste trabalho sugerem que o sombreamento mútuo provoca uma mudança de fase em dois genes importantes do oscilador central do relógio biológico da cana, *ScLHY* e *ScTOC1*. É amplamente difundido que o relógio biológico tem influência sobre a fotossíntese (Dodd *et al.*, 2005). Talvez seja possível levantar a hipótese de que uma alteração de fase de 2 h para mais no funcionamento do relógio (um fator interno) aliada a uma menor intensidade de luz (este um fator externo) tenham uma influência negativa sobre a fotossíntese, isto é, cause uma diminuição na atividade fotossintética. As consequências fisiológicas e metabólicas diretas disso seriam 1) uma menor produção de açúcares; 2) um acúmulo menor de

açúcar pelos entrenós. Essencialmente, segundo esta hipótese, é possível que o sombreamento mútuo observado no campo e a consequente mudança de fase observada no relógio biológico da cana-de-açúcar tenham um efeito sobre a produtividade das plantas no campo.

Por outro lado, dados para diferentes cultivares de cana-de-açúcar comercial (IACSP93-3028 e IACSP93-2060) revelaram que, embora IACSP93-3028 não apresentasse um grau elevado de autossombreamento, houve influência na fotossíntese, com redução de capacidade fotossintética no extrato inferior da planta (Marchiori *et al.*, 2014). Embora estes dados suportem a hipótese de que o sombreamento influencie negativamente a fotossíntese, o cultivar IACSP93-2060, com maior autossombreamento, não apresentou redução na taxa fotossintética em suas folhas sombreadas, possivelmente por causa de aclimatação destas às condições de luz (Marchiori *et al.*, 2014). No caso do cultivar utilizado nos experimentos do presente trabalho, SP80-3280, é possível afirmar que o autossombreamento das folhas do extrato inferior é bastante pronunciado. Sendo assim, e tomando como base o que foi observado nos cultivares IACSP93-3028 e IACSP93-2060, é possível hipotetizar que o sombreamento (tanto o auto quanto o mútuo) influencia o comportamento do relógio biológico, alterando sua fase. Entretanto, as folhas sombreadas das plantas do cultivar SP80-3280 podem passar pela mesma aclimatação às condições de menor densidade de luz observada no cultivar IACSP93-2060, de modo que a fotossíntese não seja afetada nos diferentes extratos foliares da planta. Neste cenário, a produtividade da cana não sofreria prejuízos.

Um primeiro passo na direção de testar as duas hipóteses propostas seria uma série de experimentos em campo. Nela, as plantas do mesmo cultivar seriam

analisadas em duas fases de desenvolvimento, com as mesmas idades das plantas analisadas aqui – 4 meses e 9 meses. A expressão dos genes do relógio *ScLHY* e *ScTOC1* nas fases sem sombreamento (plantas com 4 meses) e sombreadas (plantas com 9 meses) seria novamente analisada paralelo com medições feitas por IRGA, avaliando trocas gasosas, e medição de clorofila, a fim de montar um panorama da atividade fotossintética. Nas plantas com 9 meses, folhas de diferentes extratos – sombreado e não sombreado – também passariam pelas mesmas análises. Embora este conjunto de experimentos não pudesse estabelecer uma relação direta de causa e efeito, poderia apontar direções e correlações entre sombreamento, alteração de fase do relógio biológico e consequências fisiológicas e metabólicas para a cana-de-açúcar.

5.6. Conclusões

A análise de expressão de genes importantes do oscilador central do relógio biológico da cana, *ScLHY* e *ScTOC1* nas plantas com cerca de 4 meses, quando a estação no campo era inverno, e 9 meses, durante o verão, revelou que o relógio biológico é, de fato, ativo, com estes genes apresentando a ritmicidade que lhes é característica nos dois experimentos. Esta ritmicidade é compartilhada e sincronizada entre os órgãos analisados folha +1 (F1), entrenó 1/2 (E1/2) e entrenó 5 (E5), mostrando que os órgãos com perfil dreno da cana possuem um relógio ativo e, portanto, sua fisiologia e metabolismo podem passar por uma regulação em escala temporal. Uma comparação entre os perfis de expressão de *ScLHY* e *ScTOC1* nas plantas coletadas com 4 meses (inverno) e 9 meses (verão) revelou uma mudança de fase do relógio. A hipótese levantada para explicar estes dados foi o efeito do sombreamento do campo sobre o relógio biológico, assumindo que o relógio biológico da cana é influenciado pelo ambiente. Tanto o experimento baseado em sombreamento artificial alcançado a partir de um muro quanto o experimento no qual foram coletadas plantas apenas das linhas marginais leste e oeste do campo revelaram a mesma alteração de fase observada inicialmente no primeiro campo. Como passos seguintes, seria interessante comparar o perfil de expressão rítmico (amplitude e fase) de outros genes do oscilador central do relógio biológico da cana das mesmas amostras de plantas utilizadas nos experimentos executados para *ScLHY* e *ScTOC1*, detalhando em maior escala a alteração de fase do relógio da cana. Outra questão relevante seria avaliar o impacto fisiológico e metabólico do sombreamento e alteração de fase do relógio da cana-de-açúcar.

6. Capítulo 3: Expressão de isoformas alternativas e múltiplos alelos dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar

6.1. Introdução

O *splicing* alternativo (*alternative splicing*, AS) é um mecanismo que produz múltiplos transcritos a partir de um único gene, seja por retenção de regiões intrônicas ou por diferentes arranjos dos éxons. Algumas destas isoformas alternativas produzidas possuem códons de terminação prematura (*premature termination condon*, PTC) inseridos na sequência codificante, os quais direcionam este mRNA resultante para degradação via *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (Filichkin & Mockler, 2012; Kalyna *et al.*, 2012; Márquez et al, 2012). Estes transcritos portadores de PTCs também podem produzir polipeptídios truncados, sem domínios funcionais ou motivos proteicos importantes, que competem com sua contraparte proteica inteiramente funcional (Seo *et al.*, 2011; Mastrangelo *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2013). Em plantas, eventos de AS foram observados em cerca de 60% dos genes que contêm íntrons em *Arabidopsis thaliana*, 30% em arroz (*Oriza sativa*) e 38% em milho (*Zea mays*) (Márquez *et al.*, 2012; Staiger & Brown, 2013; Filichkin *et al.*, 2015; Min *et al.*, 2015).

Assim como o relógio biológico, a influência do AS sobre a fisiologia e o metabolismo da plantas é marcante em diversos eventos: no desenvolvimento das plantas, na especificação gamética celular inicial até a maturação da semente (Moll *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Sugliani *et al.*, 2010; Fouquet *et al.*, 2011) e até no tempo de floração e no desenvolvimento da inflorescência (Zhang *et al.*, 2011; Severing *et al.*, 2012; Rosloski *et al.*, 2013). Tanto o estresse biótico quanto o abiótico estão intimamente relacionados ao AS. Plantas sob condições de estresse mudam acentuadamente seus padrões de AS (Palusa *et al.*, 2007; Staiger & Brown, 2013; Ding *et al.*, 2014; Filichkin *et al.*, 2014). Além disso, muitos genes do relógio biológico produzem formas alternativas de seus transcritos, que podem conter PTCs (Filichkin

et al., 2010; James *et al.*, 2012; James *et al.*, 2012a; Jones *et al.*, 2012; Filichkin *et al.*, 2014; Calixto *et al.*, 2016). Este fenômeno é bastante conservado entre plantas, como *Arabidopsis*, *Populus*, arroz, *Brachypodium distachyon* e cevada – todas plantas de fotossíntese C3 (Filichkin *et al.*, 2010; Calixto *et al.*, 2016). Pouco se sabe sobre como o AS influencia o relógio biológico de plantas com fotossíntese C4, como a cana-de-açúcar.

Os cultivares modernos de cana-de-açúcar, de caráter híbrido interespecífico, apresentam aneuploidia e uma maciça poliploidia, contendo de 6 a 14 cópias de cada cromossomo (Garcia *et al.*, 2013). A montagem *de novo* e análise do transcriptoma de algumas variedades de cana-de-açúcar, incluindo a SP80-3280, utilizada neste trabalho, feita por RNA-seq revelou a presença de 708.125 SNPs (Cardoso-Silva *et al.*, 2014), dado que sugere que há a expressão de haplótipos diferentes ao longo do genoma. Por exemplo, uma análise na família gênica da sacarose sintase (*SuSy*) realizada nas espécies ancestrais de cana-de-açúcar *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum* revelou a presença de diferentes haplótipos para a família gênica *SuSy*, sendo estes expressos e traduzidos (Zhang *et al.*, 2013). O estudo de outra família gênica relacionada ao metabolismo da sacarose nos mesmos ancestrais de cana-de-açúcar, dos transportadores de sacarose, demonstrou não só um padrão de conservação de éxons e íntrons, mas também a presença de múltiplos alelos (Zhang *et al.*, 2016), reforçando a idéia de que algo semelhante poderia acontecer nos genes do relógio biológico dos cultivares híbridos da cana-de-açúcar.

Embora muito se saiba separadamente sobre o relógio biológico de plantas, cana-de-açúcar e AS, não há estudos integrados sobre os três temas. A importância de estudar as relações destes três elementos em condições naturais e, portanto, sujeitas à flutuação e à interação complexa entre componentes bióticos e abióticos é entender

melhor e de forma mais detalhada o impacto do relógio biológico e do AS sobre a fisiologia e o metabolismo das espécies agricultáveis. Enquanto AS ainda não foi estudado em plantas cultivadas em ambiente natural, há trabalhos descrevendo o funcionamento do relógio biológico das plantas sob condições de campo, sobretudo em arroz (Izawa *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2012). Nestes estudos, é demonstrado que o relógio biológico está ativo e sofre grande influência do ambiente flutuante, sobretudo da variável ambiental luz. Em tomate, há experimentos realizados em casas de vegetação do tipo *sunlight-type plant factory*, que se aproximam bastante de condições ambientais (Higashi *et al.*, 2016). Em Arabidopsis também já foram conduzidos experimentos em campo para analisar marcadores fisiológicos (Richards *et al.*, 2012). Todos estes experimentos executados a partir de plantas crescidas em campo, em seu ambiente natural, são importantes por representarem o próximo passo para um entendimento mais completo de como as variações ambientais são percebidas, processadas pelo relógio biológico e traduzidas sob forma de respostas fisiológicas e metabólicas pelas plantas. De fato, pistas da influência do ambiente sobre a expressão das isoformas dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar foram deixadas por um estudo realizado em condições circadianas controladas envolvendo AS no gene *AtCCA1* de Arabidopsis, demostrando que alterações na intensidade da luz controlada alteraram a expressão de isoformas alternativas deste gene (Filichkin *et al.*, 2010). Até o presente, não há estudos publicados que tenham explorado a relação entre o relógio biológico e eventos de AS em plantas cultivadas em ambiente natural.

6.2. Objetivos

Esta parte do trabalho visa investigar a expressão de isoformas alternativas, geradas por AS, e múltiplos alelos de alguns genes do relógio biológico da cana-de-açúcar.

Fazem parte deste capítulo os seguintes objetivos específicos:

- Identificar a presença de eventos de *splicing* alternativo (AS) nos genes do relógio biológico de cana-de-açúcar: *ScLHY*; *ScPRR37*; *ScPRR73*; *ScPRR95*; *ScTOC1* a partir de amostras de cana-de-açúcar cultivada em campo;
- Analisar a dinâmica das isoformas alternativas para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar analisados ao longo de duas séries temporais de 26 h;
- Comparar as isoformas alternativas para os genes do relógio biológico encontradas em três órgãos fisiologicamente distintos;
- Identificar múltiplos alelos para genes do relógio biológico da cana-de-açúcar selecionados para estas análises;
- Identificar se há a expressão de isoformas alternativas e principais para um mesmo alelo dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar cultivada em campo.

6.3. Material e Métodos

6.3.1. Reações de PCR

Todos os pares de primers utilizados nas reações de PCR foram desenhados utilizando o programa disponível online PrimerQuest Tool (IDT) (http://www.idtdna.com/primerquest/home/index). Cada par de primers foi desenhado considerando a especificidade para a região a ser amplificada em cada gene analisado. Os fragmentos gerados tinham entre 242 e 805 pares de base (Tabela 6.1). Todas as reações de PCR foram conduzidas utilizando a enzima Go Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, as reações de PCR tinham volume final de 20 µL, contendo 2 µL de cDNA diluído 3x, 10 µL de cada primer, 4 µL do tampão 5x Green Go Taq Buffer, 0.15 µL da enzima Go Taq DNA Polymerase, 2mM de dNTPs. As condições de reação foram: ciclo único inicial a 94ºC por 2 mins; 20 - 30 ciclos divididos em: 94ºC for 15 s, 50ºC por 15 s, 72ºC por 30 s; extensão final a 72ºC por 5 minutos. As reações de PCR voltadas para amplificação dos genes normalizadores ScGAPDH e ScPP2AA2 foram executadas para todas as amostras de cDNA. Para controle negativo, as reações de PCR foram executadas utilizando RNA como molde e para controle positivo, as reações de PCR contavam com DNA genômico como molde. Todos os fragmentos amplificados pelas reações de PCR foram analisados tomando-se 10 µL de reação de PCR e submetendo a eletroforese em gel de agarose 1.5% (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e TBE concentrado 1x (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM Boric Acid, 1mM EDTA)

Tabela 6.1: Lista dos pares de primers gene-específicos para cana-de-açúcar com suas respectivas sequências. Destacados em amarelo estão os primers para genes normalizadores; destacados em azul estão os primers utilizados para amplificar os genes do relógio biológico analisados.

Gene	Nome do Primer	Sequência (5' → 3')
ScGAPDH	GAPDH-FW	CACGGCCACTGGAAGCA
	GAPDH-RV	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC
ScPP2AA2	PP2AA2-FW	GCGCCTTAACTCCATCAGAA
	PP2AA2-RV	GCTCTACACCTCCAACATAAGG
ScLHY	ScLHY-Ex1-FW	CTGTTGCACATTTCCCTTCTG
	ScLHY-Ex3-RV	TTTGAGCGTGACTTCTGATCT
	ScLHY-Ex5-FW	ACCTACCACAGGAGCTGATA
	ScLHY-Ex6-RV	GATAAATGCTTGTGGCGTTCTT
ScTOC1	ScTOC1-Ex1-FW	ATTCTTCTCTGCGACGGCGA
	ScTOC1-Ex4-RV	TAGGCCTATCGTCTGTCTCGT
*Sc*PRR37	ScPRR37-Ex1-FW	GGAATGACAATCTGAGGAGCAG
	ScPRR37-Ex3-RV	AGTTCATTCTTACGTATAGGCTTGG
	ScPRR37-Ex5-FW	TGTGGAGATGGTGCCAATAC
	ScPRR37-Ex7-RV-new	GCAACATCACCCTGTCCTTAT
	ScPRR37-Ex7-FW-new	GAGCAACTCAGGCAGTAACA
	ScPRR37-Ex7-RV	GCATAGCTTGCTTTACGAACTG
ScPRR73	ScPRR73-Ex1-FW	GAGAGGTTCCTACCTGTGAAGA
	ScPRR73-Ex4-RV	CTGTGTCTGGATGCCACTTT
	ScPRR73-Ex4-FW	GTGACGAGTATGAGAACGACAG
	ScPRR37-Ex6-RV	GAGTTCCTAGGAGCACCTATTTC
	ScPRR73-Ex6-FW	CAAGATGCCCGATGGAAATG
	ScPRR73-Ex7-RV	GACGTTACTCTCTCCCTGTTAG
	ScPRR73-Ex7-FW	GGGTGTCTCAGTTGGTCATAAT
	ScPRR73-Ex8-RV	TGAACCTTGCGCTGCTT
*Sc*PRR95	ScPRR59-Ex3-FW	AGTGGACTTCCTTGTGAAACC
	ScPRR59-Ex5-RV	GAACCAGCCACTTCATCTCTAC
	ScPRR59-Ex7-FW	ATTCTTCGGGAATCAGGAGAAC
	ScPRR59-Ex8-RV	CAGTTTCTGCTTCTGTTGTTGTAG

6.3.2. Reações de *High Resolution RT-PCR* (HR RT-PCR)

As reações de HR RT-PCR foram conduzidas de acordo com o protocolo proposto por Simpson *et al.*, 2007 (**Figura 6.1**) e executadas utilizando, quando possível, os três órgãos analisados, folha +1 (F1), entrenós 1 e 2 (E1/2) e entrenó (E5), pois na coleta 01 (realizada em 23/08/2013, no inverno) as plantas contavam com apenas 4

meses e ainda não tinham entrenós desenvolvidos, daí a coleta restringir-se aí apenas ao órgão F1. As reações de HR RT-PCR foram todas feitas a partir de 3 réplicas biológicas, exceto para as reações envolvendo órgão F1 das plantas da coleta de 23/08/2016 (a primeira coleta ou coleta 01), nas quais apenas 2 réplicas biológicas tiveram qualidade suficiente para serem utilizadas. Em todas as reações, o *primer forward* de cada par foi marcado com 6-carboxiflouresceína (FAM) e a polimerase utilizada foi a Taq DNA Polymerase (Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA). As reações foram executadas em placas de 96 poços de 0,2 mL (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA). Cada reação de HR RT-PCR contava com um volume final de 20 µL, dos quais 2 µL de cDNA diluído 3x, 10 µM de cada *primer*, 2 µL de tampão contendo MgCl2 10x PCR Reaction Buffer, 0,15 µL de Taq DNA Polimerase, 2mM de dNTPs. As condições de reação foram padronizadas em: ciclo único inicial a 94ºC por 2 min; 22 – 26 ciclos divididos em três passos: 94ºC por 15 s, 50ºC por 15 s, 70ºC por 30 s; extensão final a 70ºC por 5 min. Uma vez que cada reação em placa estava finalizada, 1 µL de cada reação era adicionado a um mix contendo 9 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 0,5 µL de 500 LIZ Standard (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Estas reações seguiram para genotipagem em sequencidador modelo ABI 3730 Automatic DNA Sequencer(Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os resultados foram extraídos com o auxílio do programa GeneMapper (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

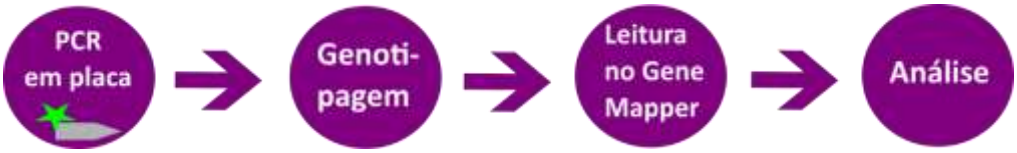


Figura 6.1: Esquema simplificado para a reação de HR RT-PCR. Um lote de reações de PCR é realizado em placas de 96 poços com o *primer forward* de cada par utilizado marcado com 6-carboxiflouresceína (FAM). Estas reações seguem para preparação para genotipagem utilizando Hi-Di Formamide e LIZ Standard. As reações de genotipagem vão para sequencidador modelo ABI 3730 Automatic DNA Sequencer e os resultados são extraídos com o auxílio do programa GeneMapper.

6.3.3. Clonagem e sequenciamento

Para identificar as formas de *splicing* alternativo e completamente processadas, assim como todos os alelos expressos, reações de RT-PCR seguidas pela clonagem das formas alternativas e completas de cada transcrito de cada gene foram realizadas. A escolha dos *primers* e as definições do que seriam as formas alternativas e completas para cada transcrito de gene do relógio biológico foram definidas a partir da anotação manual de todas as sequências para todos os genes analisados para o relógio biológico. As clonagens dos produtos das reações de RT-PCR foram conduzidas usando os fragmentos de PCR purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Cada fragmento purificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Resumidamente, cada reação continha 3 µL de produto de PCR purificado, 5 µL de tampão Rapid Ligation Buffer, 1 µL do vetor pGEM-T Easy Vector (50 ng) e 1 µL da ligase T4 DNA Ligase (3 unidades Weiss/µL). As reações de ligação foram incubadas *overnight* a 4ºC. 2 µL de cada reação de ligação foram usadas nas transformações por choque térmico da linhagem JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega, Madison, WI, USA), seguindo o protocolo do fabricante. As células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo LB/ampicilina/IPTG/X-gal e incubadas *overnight* a 37ºC. Algumas colônias positivas foram aleatoriamente

selecionadas para extração plasmidial usando QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Os plasmídios extraídos foram confirmados via reações de PCR utilizando *primers* específicos para cada fragmento clonado, reações de digestão com as enzimas de restrição PstI and Nco1 (Promega, Madison, WI, USA) e sequenciamento de Sanger, realizado no serviço de sequenciamento do *James Hutton Institute* (Dundee, UK). Os eventos de *splicing* alternativo e os SNPs foram identificados comparando os resultados de cada sequenciamento com as sequências genômicas de cana-de-açúcar manualmente anotados utilizando a ferramenta disponível online Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). A ferramenta disponível online ExPaSy (http://web.expasy.org/translate/) foi utilizada para verificação de ORF de cada sequência obtida nos sequenciamentos.

6.4. Resultados

6.4.1. Anotação e estrutura gênica dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar

Em Arabidopsis, eventos de AS nos genes do relógio biológico são bastante conhecidos (James *et al.*, 2012). Para investigar a presença de eventos de AS na cana-de-açúcar, foram selecionados para investigação os homólogos *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73*, *ScPRR95* e *ScTOC1* (Hotta *et al.*, 2013). Estes homólogos haviam sido inicialmente identificados a partir de alinhamentos entre sequências de DNA codificantes (CDS) de genes do relógio biológico de Arabidopsis e arroz e a coleção de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) de cana-de-açúcar disponível no banco de dados SUCEST (http://sucest-fun.org/) (Hotta *et al.*, 2013).

Esta abordagem foi a mais viável até então, dado que o genoma completo da cana-de-açúcar ainda não foi publicado, havendo apenas algumas sequências disponíveis (Vettore *et al.*, 2001; de Setta *et al.*, 2014). Para este trabalho, sequências genômicas ainda não publicadas do genoma da cana-de-açúcar (*Sugarcane Genome Project*, ainda não publicado) foram utilizadas para identificar os contigs genômicos para *ScLHY* (anteriormente identificado como *ScCCA1*), *ScTOC1*, *ScPRR73* (anteriormente identificado *ScPRR3*) e *ScPRR95* (anteriormente identificado como *ScPRR59*) (**Tabela 6.2**). Um novo homólogo, *ScPRR37*, foi identificado pela primeira vez nestas anotações de sequência (**Figura 6.2**). Estes genes foram reclassificados após novas árvores filogenéticas terem sido construídas a partir das sequências genômicas de cana-de-açúcar e novas sequências de gramíneas (Hotta *et al.*, 2013; Calixto *et al.*, 2015).

Tabela 6.2: Lista dos contigs genômicos de cana-de-açúcar utilizados neste trabalho para identificar as estruturas gênicas. As sequências de *Sugarcane Assembled Sequences* (SAS) obtidas no banco de dados SUCEST para cada gene também estão disponíveis. Todos os SAS representam alelos expressos diferentes daquelas identificados nos contigs genômicos, ou seja, não há correspondência entre contigs e SAS.

Gene	Contig Genômico	SAS (Sugarcane Assembled sequence)
ScLHY	scga7_uti_cns_0113118, scga7_uti_cns_0132185, scga7_uti_cns_0106856, scga7_uti_cns_0252442, scga7_uti_cns_0342123	SCCCLR1048E10.g SCCCLR1C08G10.g
ScPRR37	scga7_uti_cns_0091208	
ScPRR73	scga7_uti_cns_0008685	SCACLR1057C07.g
ScPRR95	scga7_uti_cns_0218008	SCCCLR1077F09.g
ScTOC1	scga7_uti_cns_0300183	SCCCSB1002H04.g SCEPLB1042B08.g

A identificação dos motivos intrônicos foi conduzida a partir do alinhamento com os ortólogos de gramíneas identificados e considerando os pares flanqueadores GT...AG, também observados em sorgo e cevada. A sequência codificadora de DNA (*coding DNA sequence*, CDS) de cada homólogo do relógio biológico de cana-de-açúcar manualmente anotada neste trabalho foi submetida à tradução *in silico* a fim de se checar a janela de leitura das sequências. Entretanto, vale salientar que, devido ao fato de algumas sequências gênicas, como aquela para *ScLHY*, estarem distribuídas em diferentes contigs gênicos, a estrutura gênica para os genes do relógio da cana-de-açúcar pode não estar completa. Então, para *ScLHY*, a estrutura gênica aqui proposta está baseada na sequência dos seus contigs e na homologia entre cana, cevada e sorgo.

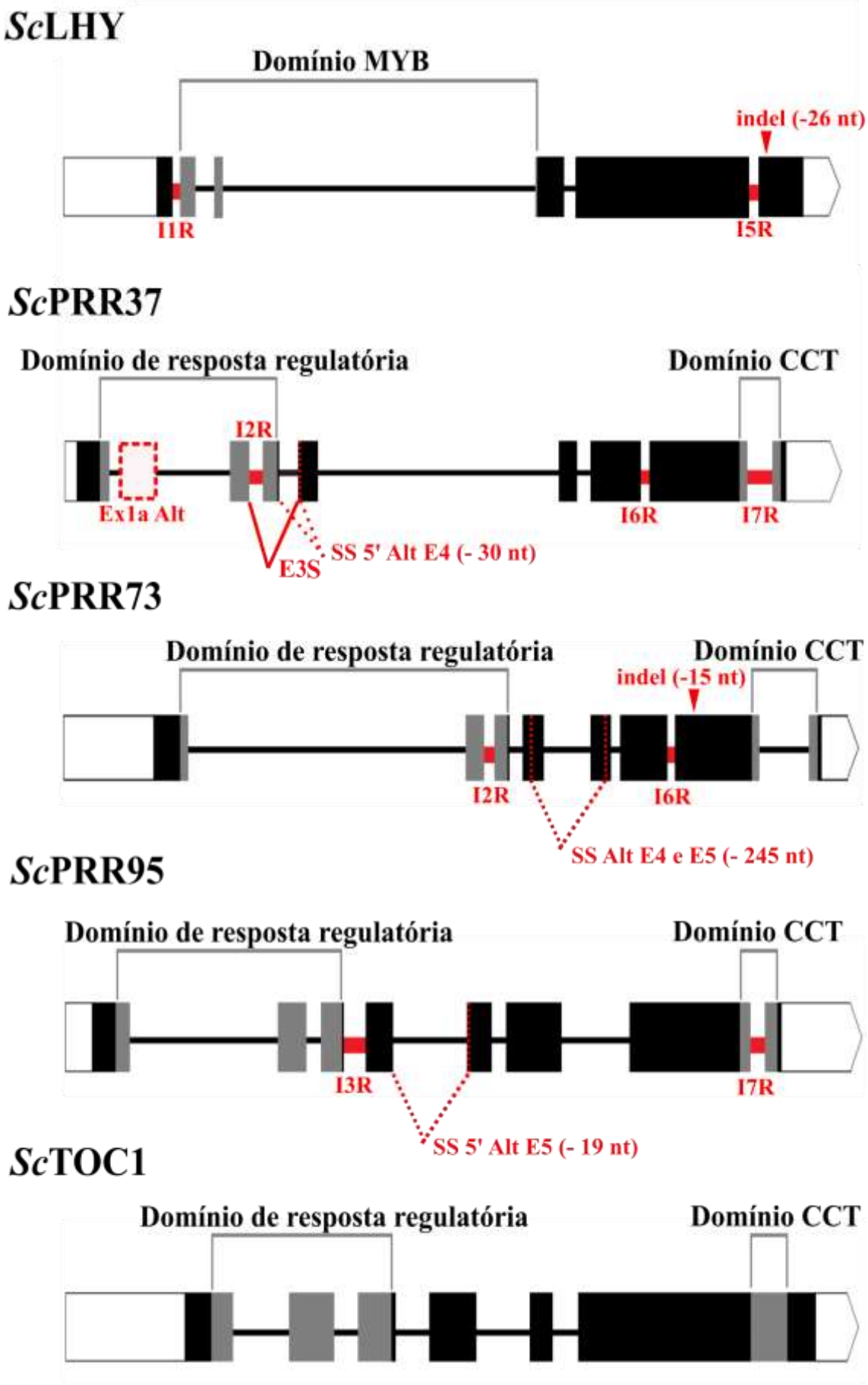

ScLHY
Domínio MYB
indel (-26 nt)
I1R
I5R
ScPRR37
Domínio de resposta regulatória
Domínio CCT
I2R
Ex1a Alt
I6R
I7R
SS 5' Alt E4 (- 30 nt)
E3S
ScPRR73
Domínio de resposta regulatória
Domínio CCT
indel (-15 nt)
I2R
I6R
SS Alt E4 e E5 (- 245 nt)
ScPRR95
Domínio de resposta regulatória
Domínio CCT
I3R
I7R
SS 5' Alt E5 (- 19 nt)
ScTOC1
Domínio de resposta regulatória
Domínio CCT

Figura 6.2 (página anterior): Estruturas gênicas para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73*, *ScPRR95* e *ScTOC1*. Em branco, as regiões 5' e 3' UTR; os retângulos em preto mostram os éxons; as linhas em preto mostram os íntrons; o retângulo branco contornado em tracejo vermelho representa o éxon alternativo; linhas tracejadas e contínuas em vermelho mostram os eventos de AS, devidamente identificados. A localização dos principais domínios proteicos está destacada em cinza e identificada. As setas vermelhas apontam para regiões de ocorrência de *indels*.

6.4.2. Identificação de eventos de AS nos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar

Reações de RT-PCR foram conduzidas para procurar tanto por transcritos completamente processados quanto pelos transcritos alternativos para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar selecionados para análise – *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73*, *ScPRR95* e *ScTOC1*. As RT-PCRs foram executadas utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA de F1, órgão coletado de plantas de cana-de-açúcar crescidas em campo a cada 2 h ao longo de 26 h, com ponto de coleta inicial cerca de 1 hora antes do amanhecer. Houve dois ciclos de coleta: o primeiro durante o inverno, quando as plantas contavam cerca de 4 meses (coleta 01), e o segundo durante o verão, quando as plantas contavam 9 meses (coleta 02) (**vide Material e Métodos Gerais, seção 3.1**). Da coleta 01, o RNA de F1 obtido a partir de 6 pontos temporais distintos foi utilizado nas reações de RT-PCR, baseando-se no pico de expressão de cada gene (Hotta *et al.*, 2013) (**vide Capítulo 1**) (ZT1 e ZT1 para *ScLHY*; ZT3 e ZT11 para *ScPRR37* e *ScPRR73*; ZT3 e ZT9 para *ScPRR95*; ZT9 e ZT13 para *ScTOC1*). Da coleta 02, o RNA F1 obtido a partir de 8 pontos temporais foi utilizado (ZT1, ZT3 e ZT+5 para *ScLHY*; ZT7 e ZT11 para *ScPRR37* e *ScPRR73*; ZT5 e ZT11 para *ScPRR95*; ZT11, ZT13 e ZT15 para *ScTOC1*). Os pontos temporais considerados para as reações de RT-PCR foram específicos para o pico de expressão de cada gene, de acordo com os resultados obtidos nas reações de qPCR feitas com estas mesmas plantas (**vide Capítulo 2 e Hotta *et al.*, 2013**). A confirmação das diferentes isoformas obtidas nestas RT-PCRs foi feita a partir de duas abordagens

combinadas: análise do tamanho do fragmento obtido nas reações de RT-PCR e clonagem e sequenciamento destes fragmentos.

Os resultados destas abordagens revelaram a presença de eventos de AS em 4 dos 5 genes analisados: *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73* and *ScPRR95* (**Tabela 6.3**). A retenção de intron (*intron retention*, IR) foi o evento mais frequente, sendo identificado nos quatro genes. Em todos os casos de IR, houve inserção de PTCs nas sequências (**Figura 6.2**). Além de IR, em *ScPRR37* foi observado um éxon alternativo no meio do intron 2 (Ex1a) (**Figura 6.2**). Nesta isoforma, um PTC foi inserido no transcrito. No mesmo homólogo, foi encontrada uma isoforma na qual o éxon 3 foi removido na transcrição da sequência (E3S) (**Figura 6.2**), evento que também inseriu um PTC no transcrito. Um sítio alternativo de *splicing* foi observado em outra isoforma de *ScPRR37*, localizado na extremidade 5' do éxon 3 (Alt 5' ss E3) (**Figura 6.2**). A proteína resultante desta isoforma mantém janela de leitura com 10 aminoácidos a menos do que na isoforma completamente processada. Em *ScPRR73*, há um sítio de *splicing* que remove 245 nucleotídeos do meio dos éxons 4 e 5 (**Figura 6.2**), resultando em uma proteína traduzida contendo janela de leitura sem danos aos domínios de Resposta Regulatória e CCT, que são domínios considerados importantes nesta classe de fatores de transcrição. No homólogo *ScPRR95* há um sítio alternativo de *splicing* na extremidade 5' do éxon 5 (Alt 5' ss E5) que adiciona um PTC no final do éxon 5.

Tabela 6.3: Eventos de AS encontrados nos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar.

*Todos os eventos foram confirmados por sequenciamento de Sanger.

Gene	Evento de AS*	Efeito no transcrito
ScLHY	Íntron 1 retido (I1R)	Insere PTC no transcrito
	Íntron 5 retido (I5R)	Cria PTC no Éxon 6
ScPRR37	Éxon Alternativo 1 (Ex1a)	Insere PTCs no transcrito
	Éxon 3 *skipping* (E3S)	Insere PTCs no Éxon 4
	Íntron 3 retido (I3R)	Cria PTC no Éxon 3
	Íntron 6 retido (I6R)	Insere PTC no transcrito
	Íntron 7 retido (I7R)	Cria PTCs no Éxon 8
	Sítio Alternativo de *Splicing* na extremidade 5' do éxon 3 (SS 5' Alt E3)	Proteína mantém janela de leitura; remove 30 nucleotídeos da região do domínio PRR
ScPRR73	Íntron 2 retido (I2R)	Insere PTC no transcrito
	Sítio Alternativo de *Splicing* entre éxons 4 e 5	Proteína mantém janela de leitura; remove 245 nucleotídeos do transcrito
	Íntron 6 retido (I6R)	Insere PTC no transcrito
ScPRR95	Sítio Alternativo de *Splicing* na extremidade 5' do éxon 5 (SS 5' Alt E5)	Insere PTC no Éxon 5
	Íntron 7 retido (I7R)	Insere PTC no transcrito

6.4.3. Alterações Sazonais e/ou de Desenvolvimento nos Padrões de AS

Uma vez identificadas e confirmadas as formas alternativas e completamente processadas (*fully spliced*, FS) para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar, (**vide seção 6.3.2**), a dinâmica de expressão das formas FS e AS de cada gene ao longo da série temporal de 26 h foi examinada para as plantas dos dois ciclos de coleta (4 meses/inverno e 9 meses/verão). A metodologia de HR RT-PCR foi escolhida para explorar os níveis de expressão das formas FS e AS (Simpson *et al.*, 2007). Esta técnica é baseada na marcação fluorescente de um dos primers de cada par utilizado numa reação de PCR para amplificar uma dada região de um gene. Esta reação de PCR subsequente é submetida a uma reação de genotipagem e um painel é gerado

com o *software* ABI 3730. Esta reação permite a separação dos fragmentos aplificados por PCR pelo tamanho, indicando diferentes formas de AS e a sua quantificação. Os pares de *primers* utilizados nas reações de HR RT-PCR tinham a mesma sequência daqueles utilizados para amplificar as regiões analisadas dos genes do relógio nos ensaios de RT-PCR (**Tabela 6.1**). O cDNA utilizado nestes ensaios foi o mesmo utilizado nas reações de RT-PCR, sintetizado a partir de RNA extraído de órgãos F1, E1/2 e E5 de plantas de cana-de-açúcar crescidas em campo. As amostras das duas coletas disponíveis foram utilizadas também nas HR RT-PCRs: a coleta 01 (realizada no inverno e quando as plantas contavam cerca de 4 meses) e a coleta 02 (realizada no verão, quando as plantas contavam 9 meses). Os genes normalizadores selecionados para estes experimentos foram *ScGAPDH*, como controle para ritmicidade, e *ScPP2AA2*, como controle para AS, visto que este gene não possui múltiplas isoformas. Inicialmente, os genes *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73 ScPRR95* e *ScTOC1* foram examinados em F1 (**Figuras 6.3 a 6.9**). Posteriormente, os homólogos *ScLHY* e *ScPRR37* foram analisados também nos órgãos E1/2 e E5 (**Figuras 6.10 a 6.12**).

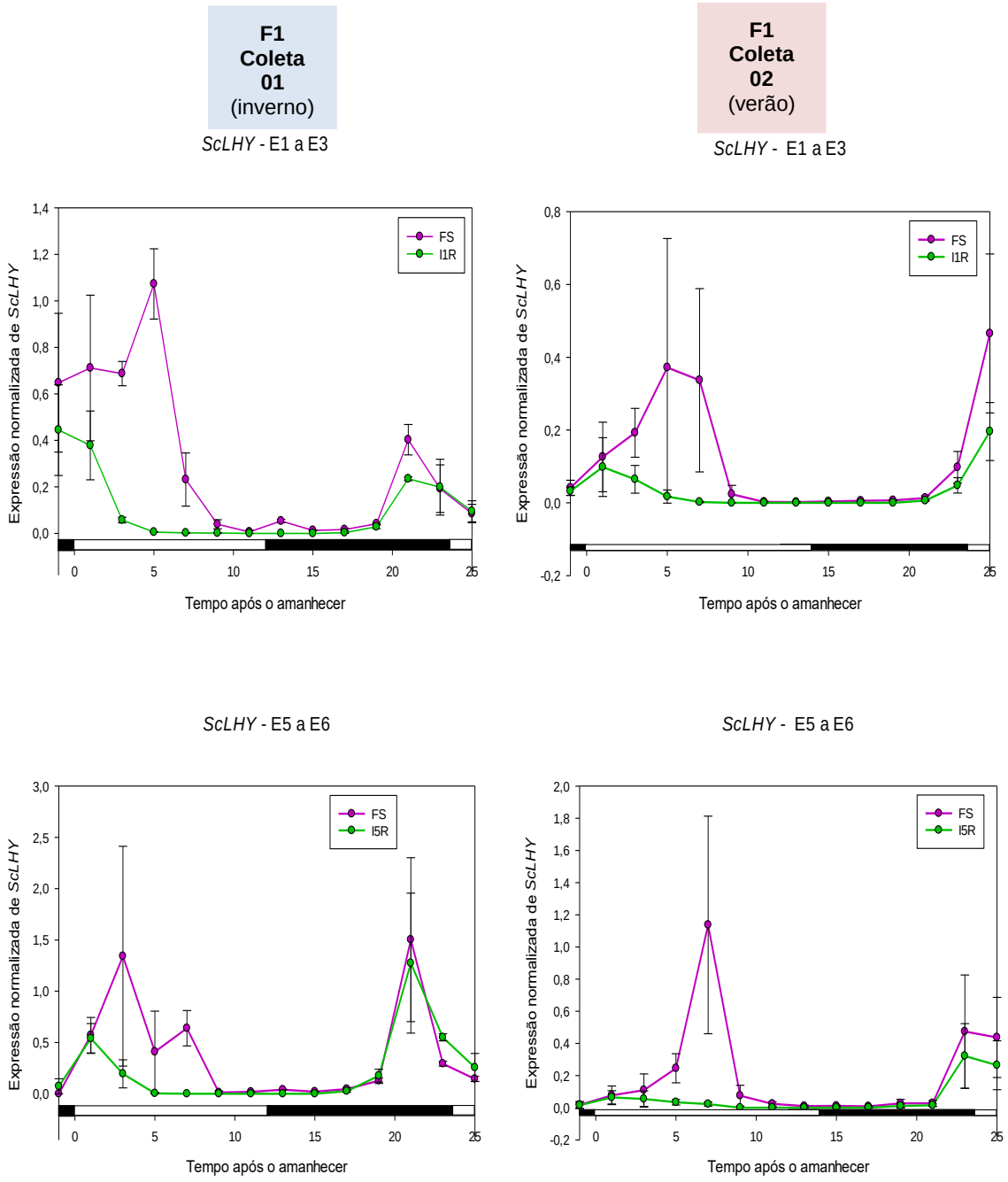


Figura 6.3: Perfil de expressão de todas as isoformas para o gene do relógio biológico *ScLHY* do órgão F1 da cana-de-açúcar. As isoformas principais completamente processadas estão representadas pelas curvas em roxo (FS) e as isoformas alternativas correspondem às curvas verdes. À esquerda estão sempre as séries temporais originadas de plantas coletadas no inverno, quando tinham 4 meses. Sempre à direita estão as séries temporais de verão, quando as plantas tinham 9 meses.

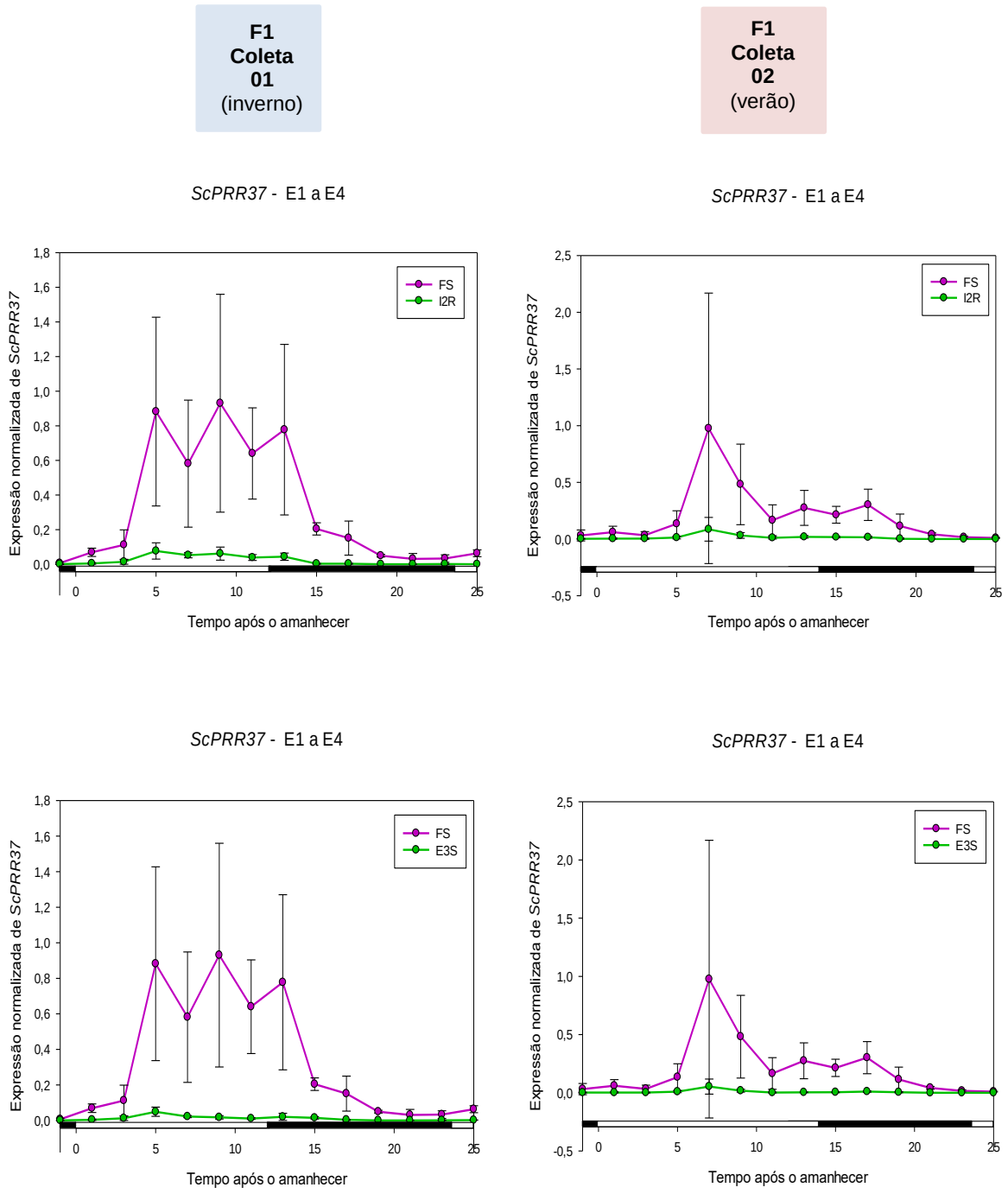


Figura 6.4: Perfil de expressão de todas as isoformas para o gene do relógio biológico *ScPRR37* do órgão F1 da cana-de-açúcar. Aqui estão os resultados para os eventos compreendidos entre os éxons E1 a E4. As isoformas principais completamente processadas estão representadas pelas curvas em roxo (FS) e as isoformas alternativas correspondem às curvas verdes. À esquerda estão sempre as séries temporais originadas de plantas coletadas no inverno, quando tinham 4 meses. Sempre à direita estão as séries temporais de verão, quando as plantas tinham 9 meses.

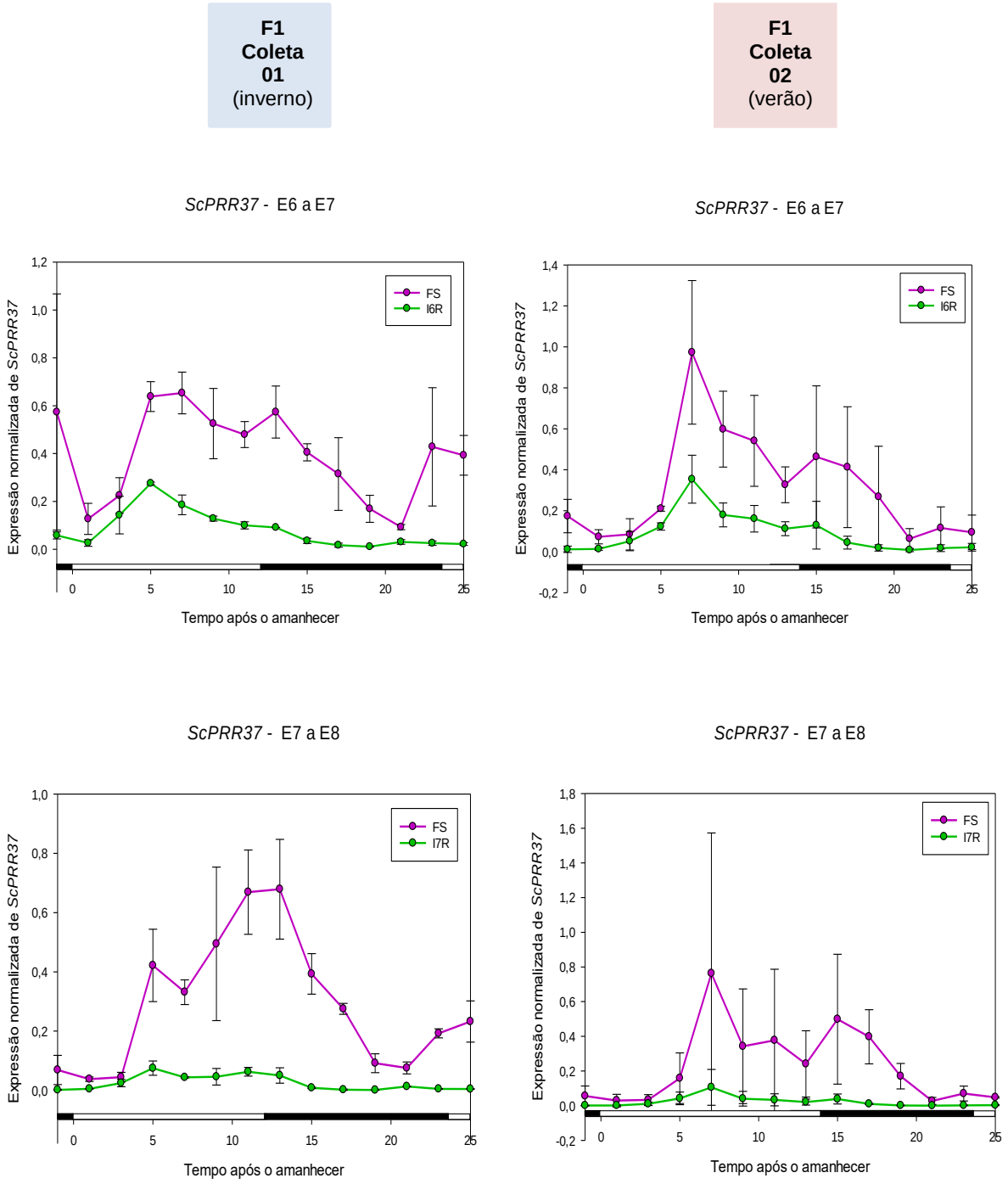
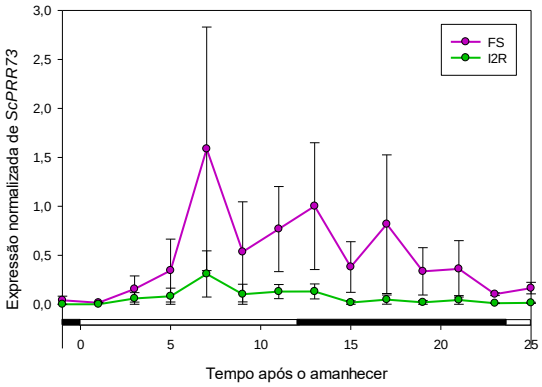


Figura 6.5: Perfil de expressão de todas as isoformas para o gene do relógio biológico *ScPRR37* do órgão F1 da cana-de-açúcar. Aqui estão os resultados para os eventos compreendidos entre os éxons E6 a E7 e E7 a E8. As isoformas principais completamente processadas estão representadas pelas curvas em roxo (FS) e as isoformas alternativas correspondem às curvas verdes. À esquerda estão sempre as séries temporais originadas de plantas coletadas no inverno, quando tinham 4 meses. Sempre à direita estão as séries temporais de verão, quando as plantas tinham 9 meses.

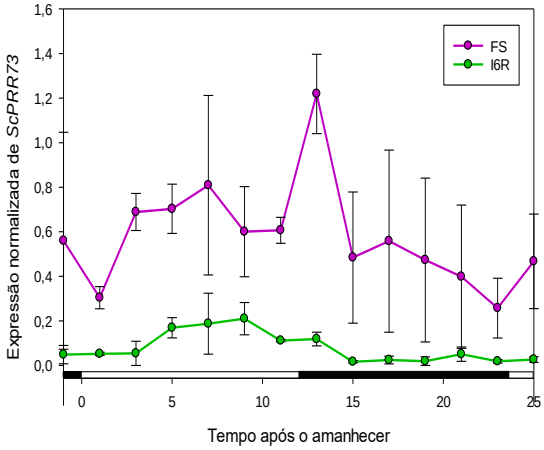
F1 Coleta 01 (inverno)

F1 Coleta 02 (verão)

ScPRR73 - E1 a E4



ScPRR73 - E6 a E7



ScPRR73 - E6 a E7

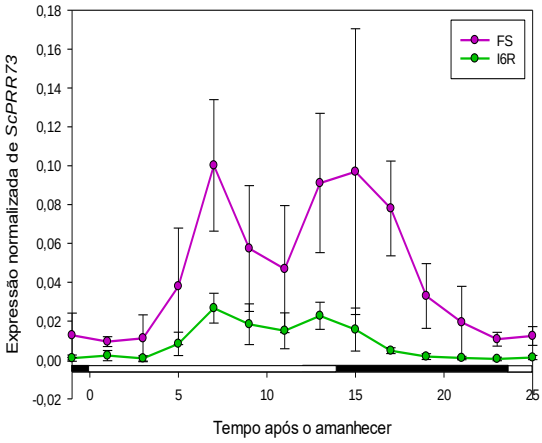


Figura 6.6: Perfil de expressão de todas as isoformas para o gene do relógio biológico *ScPRR73* do órgão F1 da cana-de-açúcar. As isoformas principais completamente processadas estão representadas pelas curvas em roxo (FS) e as isoformas alternativas correspondem às curvas verdes. À esquerda estão sempre as séries temporais originadas de plantas coletadas no inverno, quando tinham 4 meses. Sempre à direita estão as séries temporais de verão, quando as plantas tinham 9 meses.

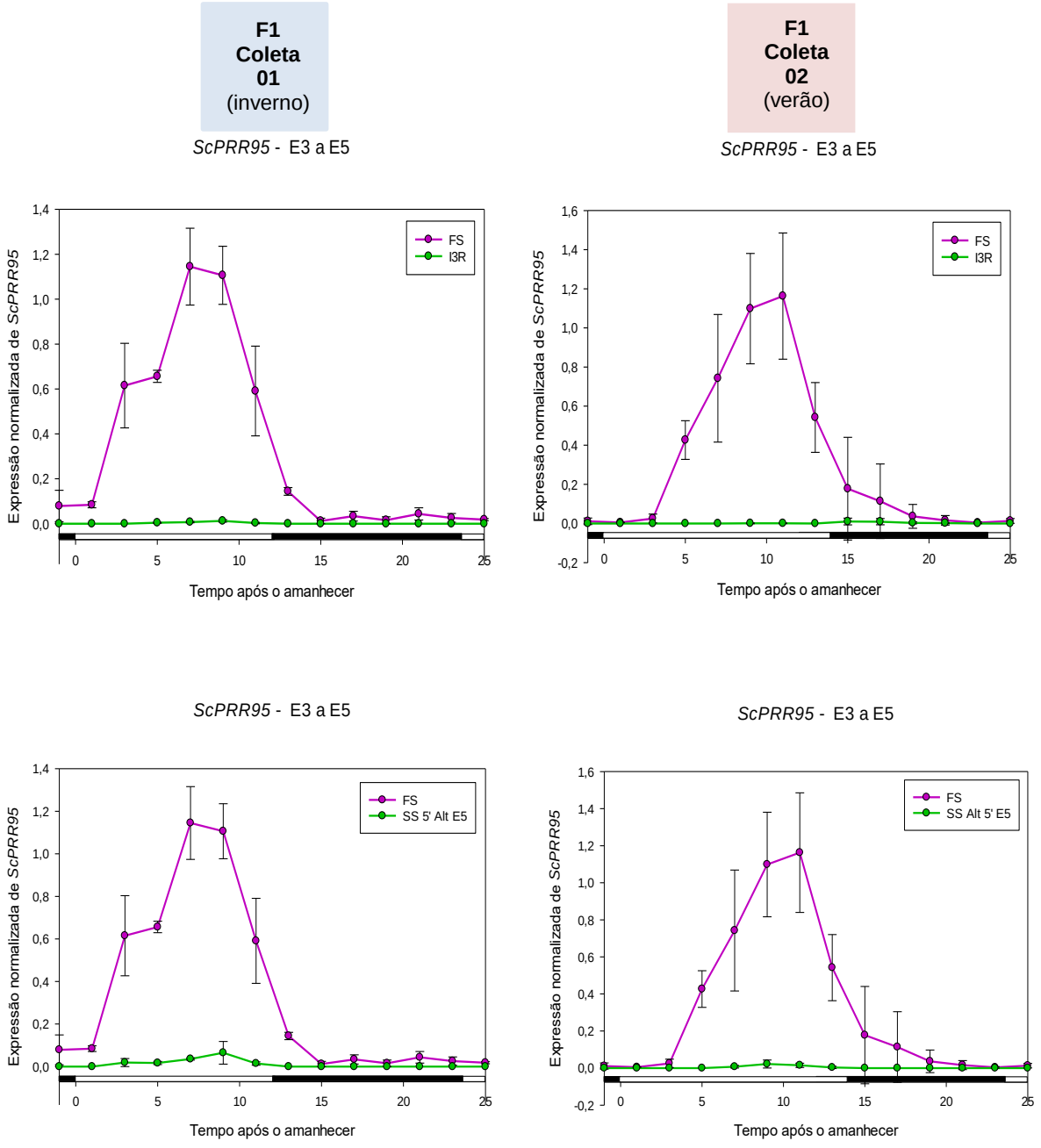
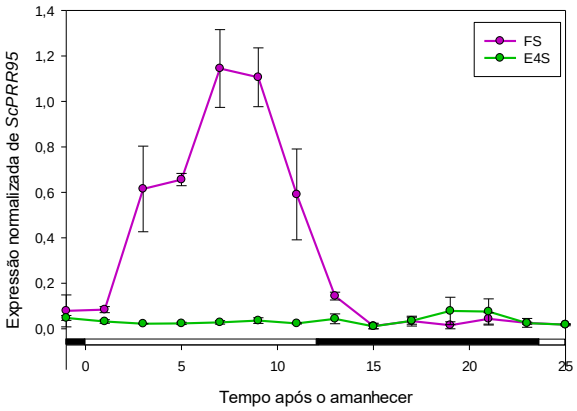


Figura 6.7: Perfil de expressão de todas as isoformas para o gene do relógio biológico *ScPRR95* do órgão F1 da cana-de-açúcar. Na figura estão os resultados para os eventos compreendidos entre os éxons E3 a E5. As isoformas principais completamente processadas estão representadas pelas curvas em roxo (FS) e as isoformas alternativas correspondem às curvas verdes. À esquerda estão sempre as séries temporais originadas de plantas coletadas no inverno, quando tinham 4 meses. Sempre à direita estão as séries temporais de verão, quando as plantas tinham 9 meses.

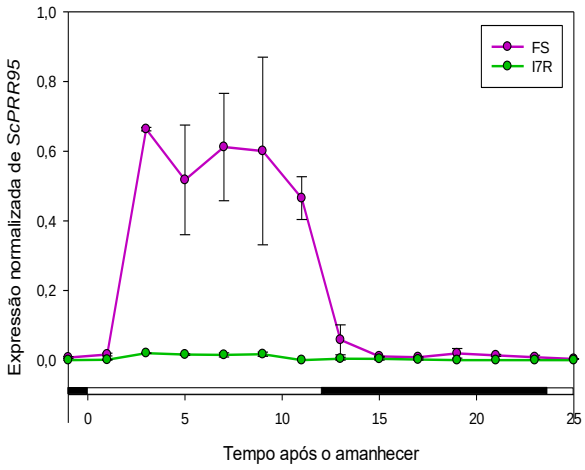
F1 Coleta 01 (inverno)

F1 Coleta 02 (verão)

ScPRR95 - E3 a E5



ScPRR95 - E7 a E8



ScPRR95 - E7 a E8

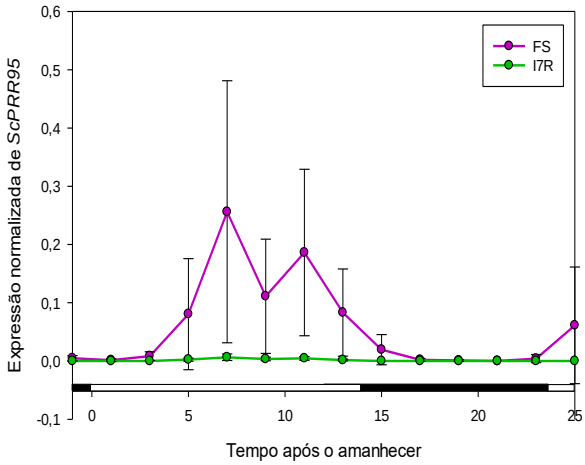


Figura 6.8: Perfil de expressão de todas as isoformas para o gene do relógio biológico *ScPRR95* do órgão F1 da cana-de-açúcar. Na figura estão os resultados para os eventos compreendidos entre os éxons E3 a E5 e entre os éxons E7 a E8. As isoformas principais completamente processadas estão representadas pelas curvas em roxo (FS) e as isoformas alternativas correspondem às curvas verdes. À esquerda estão sempre as séries temporais originadas de plantas coletadas no inverno, quando tinham 4 meses. Sempre à direita estão as séries temporais de verão, quando as plantas tinham 9 meses.

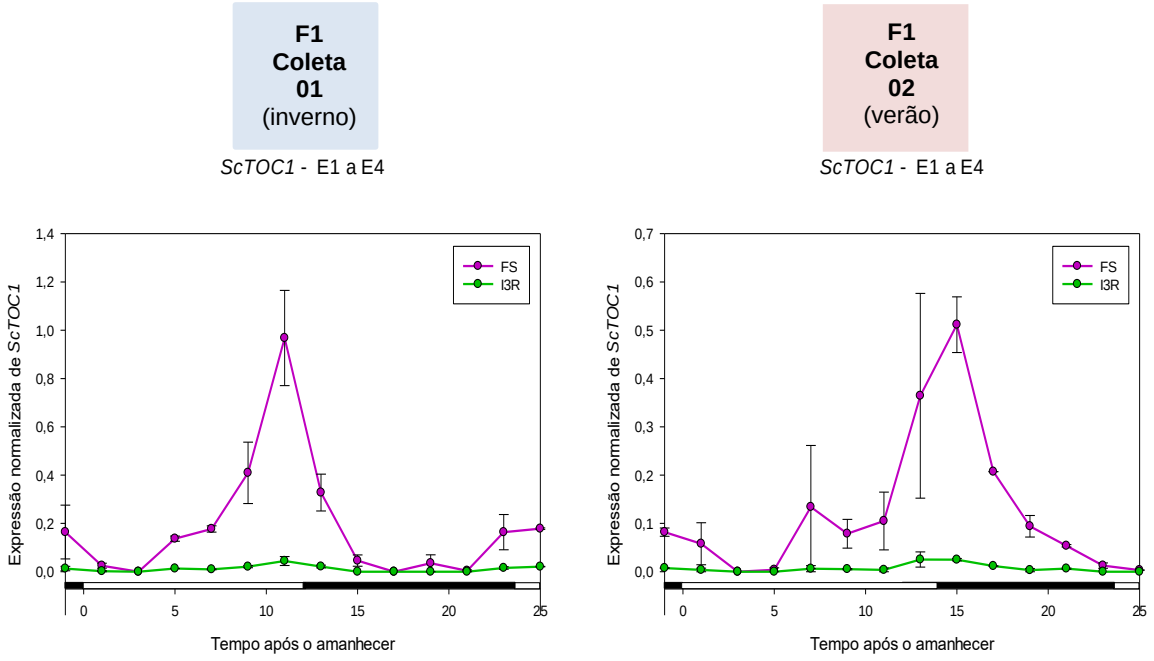


Figura 6.9: Perfil de expressão de todas as isoformas para os genes do relógio biológico *ScTOC1* do órgão F1 da cana-de-açúcar. As isoformas principais completamente processadas estão representadas pelas curvas em roxo (FS) e as isoformas alternativas correspondem às curvas verdes. À esquerda estão sempre as séries temporais originadas de plantas coletadas no inverno, quando tinham 4 meses. Sempre à direita estão as séries temporais de verão, quando as plantas tinham 9 meses.

Dos cinco genes do relógio da cana-de-açúcar selecionados para investigação neste trabalho, *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73 ScPRR95* e *ScTOC1*, os experimentos de HR RT-PCR revelaram a dinâmica do evento de IR nos genes *ScLHY*, *ScPRR37* and *ScPRR73* (**Figuras 6.3 a 6.9**). Os eventos de IR para os íntrons 1 (I1R) e 6 (I6R) de *ScLHY* foram observados ao longo do tempo nos dois ciclos de coleta, incluindo nos entrenós das plantas coletadas no verão, quando contavam 9 meses (**Figura 6.10**). O pico de expressão das formas alternativas, entretanto, não coincide com o pico de expressão de FS. I1R de *ScLHY*, que atinge o pico de expressão menos de 1 h depois do amanhecer nos dois ciclos de coleta (**Figura 6.3**), enquanto a forma FS para esta região atinge seu pico de expressão cerca de 5 h depois do amanhecer para plantas coletadas no inverno e 7 h após o amanhecer para as plantas coletadas no verão. I6R de *ScLHY* tem expressão máxima em torno do amanhecer para as plantas coletadas no inverno, enquanto é praticamente não detectado na coleta de verão. A

forma FS para esta região atinge expressão máxima cerca de 5 h após o amanhecer na coleta de inverno e 7 h após o amanhecer na coleta de verão (**Figura 6.3**).

Para o gene *ScPRR37*, os resultados das HR RT-PCRs apontam para a expressão do evento de AS retenção dos íntrons 2(I2R), 6 (I6R) e 7 (I7R) e do evento de processamento do éxon 3 (E3S) nos dois ciclos de coleta (**Figuras 6.4 e 6.5**). O pico de expressão das isoformas principais (FS) nas plantas coletadas no inverno ocorreu cerca de 5 h depois do amanhecer, o que aconteceu 2 h antes do pico da forma FS desta região. Já a o pico de expressão das formas alternativas variou conforme o evento. Entretanto, os picos das isoformas FS ocorrem com atraso de 2 h nas plantas da coleta de verão, o que é observado também nos entrenós (**Figuras 6.11 a 6.12**).

O gene *ScPRR73* revelou a retenção dos íntrons 2 (I2R) 6 (I6R) nos seus transcritos (**Figura 6.6**), sendo I2R apenas observada nas plantas coletadas no inverno, quando contavam 4 meses. A I6R foi observada nos dois ciclos de coleta, com dois picos de expressão nas plantas da coleta de inverno: o primeiro cerca de 5 h depois do amanhecer (ZT5) e o segundo 9 h depois do amanhecer. Nas plantas da coleta de verão, os picos foram observados cerca de 7 h após o amanhecer e 15 h após o amanhecer. A forma FS desta região também apresentou dois picos de expressão. Nas plantas coletadas no inverno, estes picos ocorreram no ZT5 e no ZT13. Os picos de expressão da forma FS coincidiram com os horários dos picos da forma FS das plantas da coleta de inverno.

ScPRR95, além da forma FS, também apresentou 3 formas alternativas expressas: as retenções intrônicas para os íntrons 3 (I3R) e 7 (I7R), o sítio alternativo de *splicing* na extremidade 5’ do éxon 5 (SS 5’ Alt E5) – estas todas clonadas e sequenciadas – e apenas na série temporal de inverno, uma isoforma correspondente pelo processamento ou excisão do éxon 4 (E4S). Este evento, porém, não foi

detectado em nenhum dos clones obtidos. É perceptível a tendência de mudança de fase observada nas formas FS amplificadas pelos ensaios de HR RT-PCR na série temporal de verão em relação àquela de inverno, seguindo o padrão dos demais genes do relógio. As formas alternativas, de modo geral, apresentaram baixa expressão em todas as séries temporais (**Figuras 6.7 e 6.8**).

ScTOC1, como foi mencionado, não teve eventos de AS encontrados nos experimentos de busca por isoformas alternativas, isto é, os experimentos de clonagem não detectaram a presença de transcritos alternativos para este gene. Entretanto, as reações de HR RT-PCR apontaram para a expressão não só da forma FS, a qual também sofre uma mudança de fase na coleta de verão em relação à de inverno, mas também a expressão de uma isoformas alternativa de retenção do íntron 3 (I3R). A expressão das isoformas FS de *ScTOC1* ocorrem em antecipação ao anoitecer, conforme é visto na mudança de fase de 4 h para mais nas plantas coletadas no verão (**Figura 6.9**).

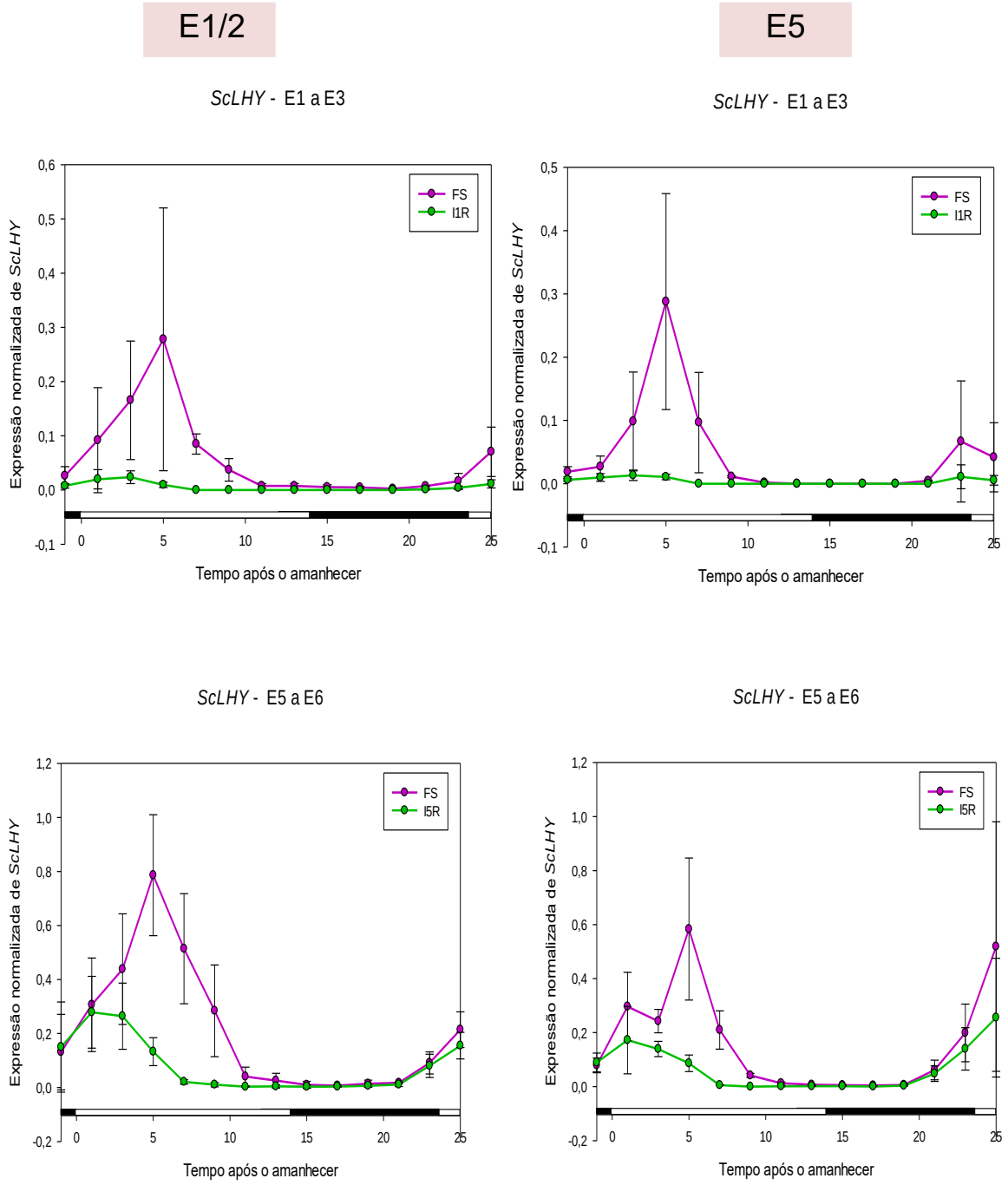


Figura 6.10: Expressão das isoformas principais completamente processadas (FS) e alternativas para *ScLHY* nos entrenós 1/2 (E1/2) (à esquerda) e entrenó 5 (E5) (à direita) coletados ao longo da coleta 02, realizada durante o verão e quando as plantas contavam 9 meses. Em roxo, as formas FS e em verde as formas alternativas, que neste caso são retenções intrônicas (IR) e éxons processados ou que sofreram excisão (*skipped*) (ES).

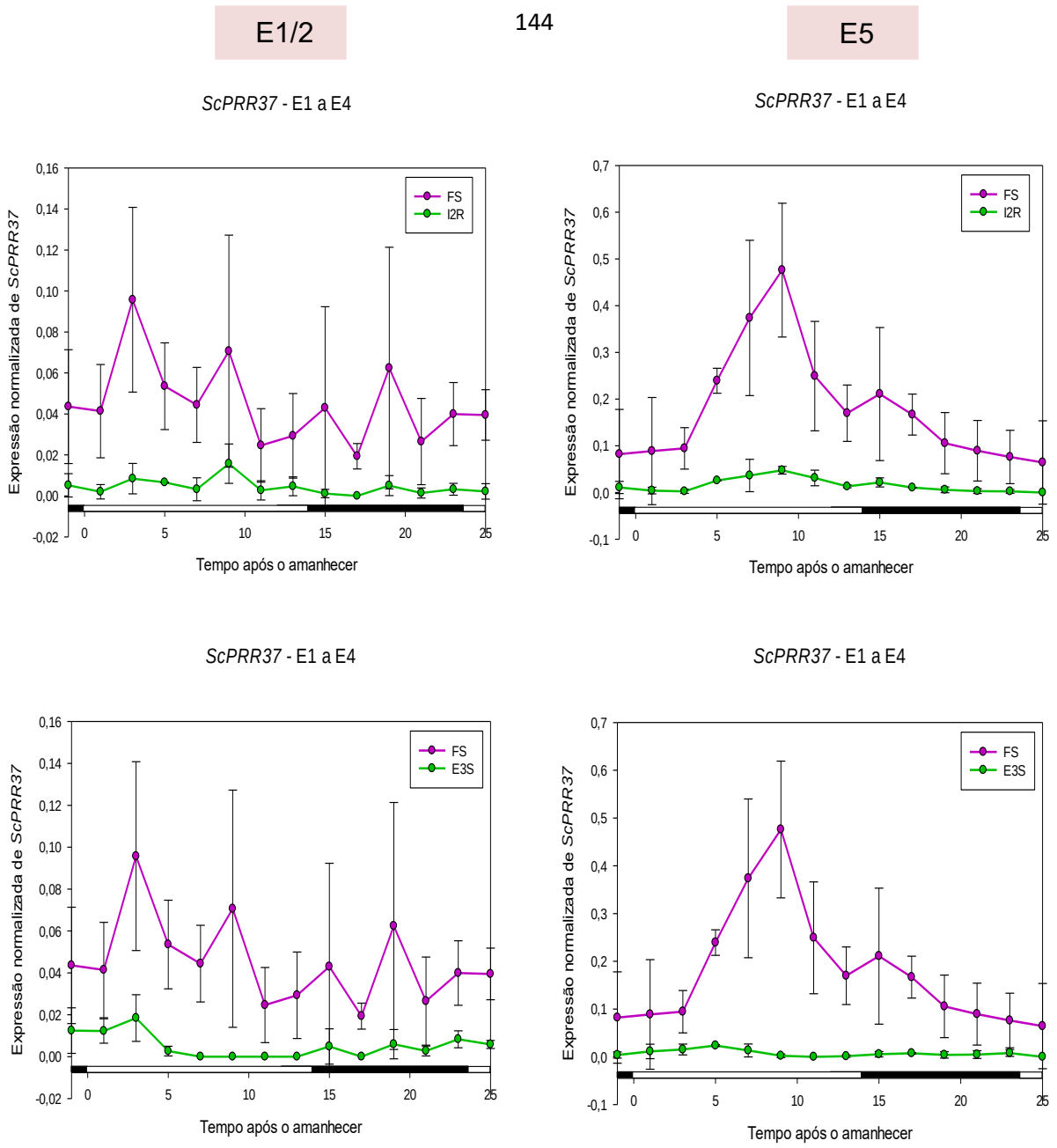


Figura 6.11: Expressão das isoformas principais completamente processadas (FS) e alternativas para *ScPRR37* (eventos observados entre os éxons E1 a E4) nos entrenós 1/2 (E1/2) (à esquerda) e entrenó 5 (E5) (à direita) coletados ao longo da coleta 02, realizada durante o verão e quando as plantas contavam 9 meses. Em roxo, as formas FS e em verde as formas alternativas, que neste caso são retenções intrônicas (IR) e éxons processados ou que sofreram excisão (*skipped*) (ES).

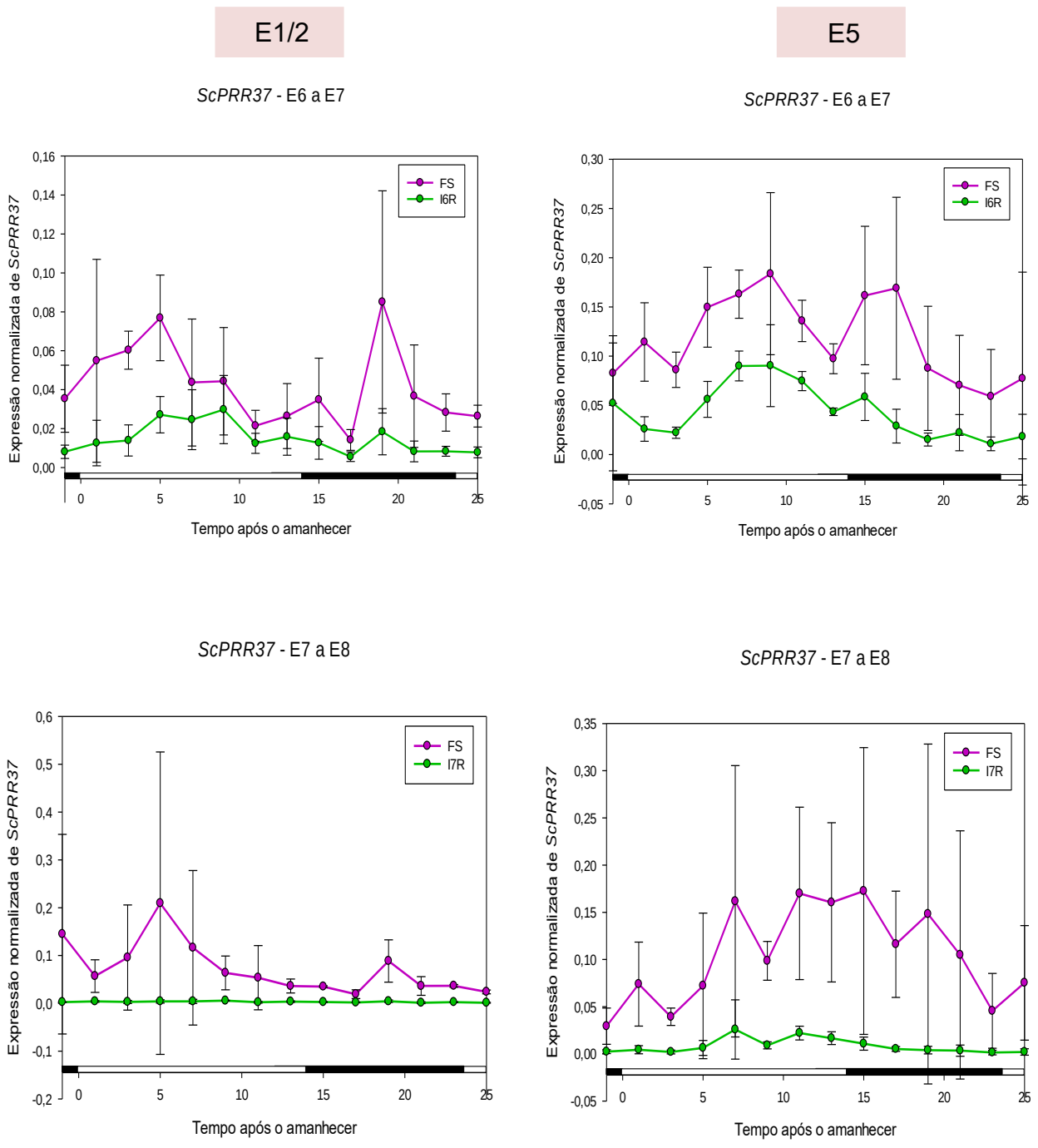


Figura 6.12: Expressão das isoformas principais completamente processadas (FS) e alternativas para *ScPRR37* (eventos observados entre os éxons E6 a E7 e E7 a E8) nos entrenós 1/2 (E1/2) (à direita) e entrenó 5 (E5) (à esquerda) coletados ao longo da coleta 02, realizada durante o verão e quando as plantas contavam 9 meses. Em roxo, as formas FS e em verde as formas alternativas, que neste caso são retenções intrônicas (IR) e éxons processados ou que sofreram excisão (*skipped*) (ES).

6.4.4. A Expressão de Diferentes Alelos para os Genes do Relógio Biológico da Cana-de-açúcar

A expressão de diferentes alelos para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar foi investigada, inicialmente, de forma exploratória. A abordagem selecionada compreendeu a clonagem de fragmentos amplificados a partir dos mesmos cDNAs obtidos a partir de RNA de amostras de órgão F1 e pelos mesmos pares de *primers* utilizados nos experimentos anteriores (**vide seções 6.4.2 e 6.4.3**) (**Tabela 6.1**). Os diferentes clones obtidos foram analisados através de sequenciamento.

Para cada gene, pelo menos um SNP foi observado em um dos clones obtidos, baseando-se na sequência dos contigs genômicos, adotada como padrão para comparações (**Tabelas 6.4 – 6.6 e Figura 6.13**).

Tabela 6.4: Todos os SNPs encontrados na CDS dos genes do relógio biológico da cana analisados neste trabalho – parte 1. * SNPs pertencentes a um mesmo códon; [1] SNP encontrado em diferentes clones: num deles num par com o SNP anterior e no outro encontrado individualmente.

Gene	SNP	Contig genômico de referência	Posição do nucleotídeo no contig	Nucleotídeo de referência (ref)	Nucleotídeo alterado (alt)	Localização no gene	Substituição de aminoácido (refalt)	Domínios
ScLHY	1	scga7_uti_cns_0113118	2303	A	T	Exon 2	Q > L	MYB
	2	scga7_uti_cns_0113118	2313	A	T	Exon 2	E > D	MYB
	3	scga7_uti_cns_0342123	1342	C	A	Exon 5	A > E	.
	4	scga7_uti_cns_0342123	1343	A	G	Exon 5	.	.
	5	scga7_uti_cns_0342123	1392	C	T	Exon 5	P > S	.
	6	scga7_uti_cns_0342123	1397	A	G	Exon 5	.	.
	7	scga7_uti_cns_0342123	1398	A	G	Exon 5	S > G	.
	8	scga7_uti_cns_0342123	1405	A	G	Exon 5	D > G	.
	9	scga7_uti_cns_0342123	1414	C	T	Exon 5	A > V	.
	10	scga7_uti_cns_0342123	1423	T	C	Exon 5	V > A	.
	11	scga7_uti_cns_0342123	1428	G	A	Exon 5	E > K	.
	12	scga7_uti_cns_0342123	1444	C	A	Exon 5	A > D	.
	13	scga7_uti_cns_0342123	1472	C	T	Exon 5	.	.
	14	scga7_uti_cns_0342123	1478	C	T	Exon 5	.	.
	15	scga7_uti_cns_0342123	1526	A	G	Exon 5	.	.
	16	scga7_uti_cns_0342123	1659	T	C	Exon 5	L > P	.
	17	scga7_uti_cns_0342123	1667	G	C	Exon 5	D > H	.
	18	scga7_uti_cns_0342123	1688	A	G	Exon 5	K > E	.
	19	scga7_uti_cns_0342123	1696	G	A	Exon 6	.	.
	20	scga7_uti_cns_0342123	1712*	C	T	Exon 6	P > C*	.
	21	scga7_uti_cns_0342123	1713*	C	G	Exon 6	P > C*	.
	22	scga7_uti_cns_0342123	1714*	A	C	Exon 6	P > C*	.
	23	scga7_uti_cns_0342123	1725	A	C	Exon 6	D > A	.

24	scga7_uti_cns_0342123	1730	A	G	Exon 6	K > E	.
25	scga7_uti_cns_0342123	1758*	G	A	Exon 6	V > K*	.
26	scga7_uti_cns_0342123	1749* [1]	T	A	Exon 6	V > K*[1]	.
27	scga7_uti_cns_0342123	1749	T	A	Exon 6	V > E	.
28	scga7_uti_cns_0342123	1761	C	T	Exon 6	A > V	.
29	scga7_uti_cns_0342123	1774	A	G	Exon 6	.	.

Tabela 6.5: Todos os SNPs encontrados na CDS dos genes do relógio biológico da cana analisados neste trabalho – parte 2. * SNPs pertencentes a um mesmo códon; [1] SNP encontrado em diferentes clones: num deles num par com o SNP anterior e no outro encontrado individualmente.

Gene	SNP	Contig genômico de referência	Posição do nucleotídeo no contig	Nucleotídeo de referência (ref)	Nucleotídeo alterado (alt)	Localização no gene	Substituição de aminoácido (refalt)	Domínios
ScPRR37	1	scga7_uti_cns_0091208	4713	C	T	Exon 2	.	PRR
	2		5235	C	-	Exon 4	stop codon	.
	3		5249	G	-	Exon 4	stop codon	.
	4		5250	T	-	Exon 4	stop codon	.
	5		5251	G	-	Exon 4	stop codon	.
	6		5253	A	G	Exon 4	E > S	.
	7		5254	A	T	Exon 4	S > S	.
	8		5257	G	C	Exon 4	G > V	.
	9		5283	A	G	Exon 4	.	.
	10		5287	A	G	Exon 4	K > E	.
	11		8088	T	C	Exon 6	V > R	.
	12		8113	A	C	Exon 6	.	.
	13		8124*	C*	T*	Exon 6	S > L*	.
	14		8125*	A*	G*	Exon 6	S > L*	.
	15		8344	T	A	Exon 7	.	.
	16		8368	C	T	Exon 7	.	.
	17		8369	G	A	Exon 7	G > S	.
	18		8432	A	G	Exon 7	N > D	.
	19		8790	G	C	Exon 7	G > A	.
	20		9305	T	C	Exon 8	.	CCT

Tabela 6.6: Todos os SNPs encontrados na CDS dos genes do relógio biológico da cana analisados neste trabalho – parte 3. * SNPs pertencentes a um mesmo códon; [1] SNP encontrado em diferentes clones: num deles num par com o SNP anterior e no outro encontrado individualmente.

Gene	SNP	Contig genômico de referência	Posição do nucleotídeo no contig	Nucleotídeo de referência (ref)	Nucleotídeo alterado (alt)	Localização no gene	Substituição de aminoácido (refalt)	Domínios
ScPRR73	1	scga7_uti_cns_0008685	1288	C	G	Exon 1	C > W	PRR
	2		4012	G	A	Exon 2	G > S	PRR
	3		4032	T	A	Exon 2	.	PRR
	4		4267	A	G	Exon 3	N > D	PRR
	5		4546	T	C	Exon 4	.	.
	6		4549	T	C	Exon 4	.	.
	7		4555	C	T	Exon 4	.	.
	8		4558	C	T	Exon 4	.	.
	9		4576	C	T	Exon 4	.	.
	10		4605	A	G	Exon 4	N > S	.
	11		5165	A	G	Exon 5	.	.
	12		5229	A	G	Exon 5	K > E	.
	13		6470	C	G	Exon 7	T > R	.
	14		7152	G	A	Exon 8	.	CCT
ScPRR95	1	scga7_uti_cns_0218008	14557	A	G	Exon 4	N > D	.
	2		14568	T	C	Exon 4	.	.
	3		14606	A	G	Exon 4	E > G	.
	4		14608	A	G	Exon 4	R > G	.
	5		14613	C	T	Exon 4	.	.
	6		14628	T	C	Exon 4	.	.
	7		14634	A	G	Exon 4	.	.
	8		14657	A	G	Exon 4	D > G	.
	9		14672	A	G	Exon 4	N > S	.
	10		15134	G	A	Exon 5	S > N	.
	11		15142	A	G	Exon 5	T > A	.

	12		16611	A	G	Exon 7	N > S	.
	13		16633	A	G	Exon 7	.	.
	14		16862	G	A	Exon 8	.	CCT
ScTOC1	1	scga7_uti_cns_0300183	811	C	A	Exon 2	.	PRR
	2		1322	A	G	Exon 4	K > R	

Além dos alelos expressos com SNPs, também foram encontradas as formas alélicas expressas com as sequências dos contigs genômicos. Para os homólogos de *ScLHY* e *ScPRR37*, foram encontrados diferentes alelos para cada um desses genes expressando tanto a isoforma alternativa com rentenção intrônica como a completamente processada desses transcritos. A ocorrência de diferentes alelos expressos varia de acordo com o gene, isto é, não foi observado um mesmo número de alelos expressos para todos os genes (**Figura 6.13**). Cada haplótipo expresso para cada região gênica analisada foi chamado de “h”, seguidos por números a partir de 1, sendo “h1, h2, h3, ... hn”. Os haplótipos correspondentes aos observados nas sequências dos contigs genômicos sempre são os últimos e estão destacados em azul e aqueles haplótipos que apresentavam algum evento de AS estão destacados em lilás (**Figura 6.13**). Nem todos os alelos expressos encontrados nos experimentos deste trabalho foram encontrados também nas sequências genômicas.

ScTOC1 expressou 3 haplótipos, identificados na região analisada, entre os éxons 1 e 4 (**Figura 6.13**). Um deles, h3, foi o mais frequente (5/7 dos clones) e sua sequência corresponde à sequência desta mesma região do contig genômico scga7_uti_cns_0300183. Os dois haplótipos h1 e h2 foram detectados em 1/7 dos clones, cada.

Para *ScPRR95*, foram utilizadas duas regiões diferentes para identificação de SNPs (**Figura 6.13**). 8 haplótipos expressos foram encontrados na região entre os éxons 3 e 5, incluindo o haplótipo correspondente a essa mesma região do contig genômico scga7_uti_cns_0218008, que foi detectada em 7/14 dos clones e os outros 7 haplótipos foram detectados em 1/14 dos clones, cada. Na segunda região de *ScPRR95*, entre os éxons 7 e 8, 4 haplótipos foram expressos, sendo um deles

presente em 2/9 dos clones, outros dois expressos em 1/9 dos clones, cada, e a vasta maioria, 5/9 dos clones, correspondeu à mesma sequência encontrada nesta região do contig gênico scga7_uti_cns_0218008.

ScPRR73 foi analisado para presença de haplótipos expressos a partir de 4 regiões. Na primeira região analisada, entre os éxons 1 e 4, foram observados 2 haplótipos, sendo aquele do contig genômico observado em 1/3 dos genes. A segunda região, entre os éxons 4 e 6, revelou 3 haplótipos diferentes expressos na mesma proporção de 1/3 dos clones. A terceira região, entre os éxons 6 e 7, mostrou 1 alelo com indel de menos 15 nucleotídeos presente em apenas 1/5 dos clones, enquanto os outros 4/5 de clones eram similares à sequência desta região do contig genômico scga7_uti_cns_0008685. A última região, entre os éxons 7 e 8, apenas revelou 2 haplótipos expressos, um deles presente em 1/3 dos clones e o outro, semelhante a esta região do contig genômico (**Figura 6.13**).

ScPRR37 foi investigado em 3 regiões. Na primeira, entre os éxons 1 e 3, foram detectados 6 haplótipos na mesma proporção, com um deles similar a esta região do contig gênico scga7_uti_cns_0091208. Na segunda região, entre os éxons 6 e 7, foram observados 2 haplótipos, um com e outro sem SNPs, igualmente representados em 1/2 dos clones, cada. Na terceira região, entre os éxons 7 e 8, foram revelados 3 haplótipos, com 2 deles (incluindo o haplótipo sem SNPs) presentes em 2/5 dos clones, cada, e o último observado em 1/5 dos clones (**Figura 6.13**).

A região entre os éxons 1 e 3 de *ScLHY* apresentou 3 alelos com seus respectivos padrões de SNPs (**Figura 6.13**). Um único haplótipo estava presente em 5/7 dos clones e os outros dois foram observados em 1/7 dos clones, cada.

Depois de todos estes resultados, decidiu-se fazer uma investigação mais aprofundada, voltada para detectar o maior número possível de haplótipos para um

único gene, neste caso *ScLHY*, foi realizada na região entre os éxons 6 e 7 (**Figura 6.13**). Os resultados das rodadas de clonagem mostraram 21 haplótipos nesta região. Os haplótipos diferentes para *ScLHY* expressos nesta região variaram em frequência de ocorrência, partindo de 1/37 dos clones (h3, h4, h5, h6, h8, h9, h11, h12, h13, h14, h15, h16, h17, h19 e h20) para 5/37 dos clones (h2 e h21) (**Figura 6.13**). Para os haplótipos h1, h7, h21 havia pelo menos um dos clones expressando um evento de AS – no caso retenção do íntron 5 (I5R). Para os haplótipos h4, h9, h10, h14, h15, h19, h20, todos os clones encontrados apresentaram I5R.

ScLHY - região entre éxons 2 a 3

```
ScLHY_h1     2264  GGTTCCTTGAAGCCTTGAAACTTTATGGCAGAGCATGGCTGCGTATAGAAG  2314
ScLHY_h2¹          GGTTCCTTGAAGCCTTGAAACTTTATGGCAGAGCATGGCAGCGTATAGATG
ScLHY_h3*          GGTTCCTTGAAGCCTTGAAACTTTATGGCAGAGCATGGCAGCGTATAGAAG
                   ************************************ ********* *
```

ScLHY - região entre éxons 5 a 6

```
ScLHY_h1*¹   1317  ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT  1367
ScLHY_h2*          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h3           ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h4¹          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h5           ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h6           ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGAATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h7¹          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h8           ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCGTTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h9¹          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h10¹         ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h11          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h12          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h13          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h14¹         ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h15¹         ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h16          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h17          ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h18*         ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h19¹         ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h20¹         ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
ScLHY_h21*¹        ACCACAGGAGCTGATACAAGTGATGCATTCAGGAATAAGAAAAAGCAGGAT
                   *************************  ************************

ScLHY_h1*¹  1389  ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC  1439
ScLHY_h2*         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h3          ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h4¹         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h5          ACACCTTCAAGTAGTGGTGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h6          ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h7¹         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCT---AAGGAAGAC
ScLHY_h8          ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGCTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h9¹         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h10¹        ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGTGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h11         ACACCTTCAGGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h12         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h13         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCT---AAGGAAGAC
ScLHY_h14¹        ACATCTTCGAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h15¹        ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h16         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h17         ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h18*        ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h19¹        ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
ScLHY_h20¹        ACACCTTCAGGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAG---GAAGAC
ScLHY_h21*¹       ACACCTTCAAGTAGTGATGTAGATGCGGACAATGTTCCTGAGAAGGAAGAC
                  *** ****  ****** ******** ******** ****      *******
```

```
ScLHY_h1*¹    1440  AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAATAACTCTTCAGCT  1490
ScLHY_h2*           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h3            AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h4¹           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h5            AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h6            AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h7¹           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h8            AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGTAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h9¹           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAATAACTCTTCAGCT
ScLHY_h10¹          AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h11           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h12           AATGATAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h13           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGTAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h14¹          AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h15¹          AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h16           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h17           AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h18*          AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h19¹          AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h20¹          AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
ScLHY_h21*¹         AATGCTAATGAGAAGGTGAAGCAAGCCTCCTGCAGCAACAACTCTTCAGCT
                    **** *************************** ***** ************

ScLHY_h1*¹    1493  TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG  1543
ScLHY_h2*           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h3            TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGGAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h4¹           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h5            TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h6            TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h7¹           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h8            TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h9¹           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h10¹          TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h11           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h12           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h13           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h14¹          TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h15¹          TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h16           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h17           TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h18*          TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h19¹          TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h20¹          TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
ScLHY_h21*¹         TGACACTAACCACCGCAGATTTAGAAGCAGTGGAAGCACAAGTGATTCATG
                    ********************************** *****************
```

```
ScLHY_h1*¹    1652  GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCACAAAGC  1702
ScLHY_h2*           GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h3            GGTCGTCTGGCTTTCCATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h4¹           GGTCGTCTGGCTTTCCATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h5            GGTCGTCTGGCTTTCCATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h6            GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h7¹           GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h8            GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h9¹           GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAGAGCTTCCACAAAGC
ScLHY_h10¹          GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h11           GGTCGTCTGGCTTTCCATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h12           GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h13           GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h14¹          GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h15¹          GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h16           GGTCGTCCGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h17           GGTCGTCTGGCTTTCCATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h18*          GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h19¹          GGTCGTCTGGCTTTCCATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h20¹          GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
ScLHY_h21*¹         GGTCGTCTGGCTTTCGATGCGCTGTTCAGTAGAGAAAAGCTTCCGCAAAGC
                    ******* ******* ******************** ******* ******

ScLHY_h1*¹    1711  CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGAGGAAGATGAAGT  1761
ScLHY_h2*           CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGAGGAAGATGAAGT
ScLHY_h3            CTGCC---------------------------AAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h4¹           CTGCC---------------------------AAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h5            CTGCC---------------------------AAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h6            CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h7¹           CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGAGGAAGATGAAGT
ScLHY_h8            CCCACAAGCAGAAGCCTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGAGGAAGATGAAGT
ScLHY_h9¹           CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGAGGAAGATGAAGT
ScLHY_h10¹          CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGAGGAAGATGAAGT
ScLHY_h11           CTGCC---------------------------AAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h12           CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h13           CCCACAAGCAGAAGCCTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGAGGAAGATGAAGT
ScLHY_h14¹          CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h15¹          CCCACAAGCAGAAGACTCAGAGGAGGTTGCCAAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h16           CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h17           CTGCC---------------------------AAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h18*          CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGTGGAAGATGAAGT
ScLHY_h19¹          CTGCC---------------------------AAGGAGGTGGAAGATGAAGC
ScLHY_h20¹          CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGAAGGAAGATGAAGT
ScLHY_h21*¹         CCCACAAGCAGAAGACTCAAAGGAGGTTGCCAAGGAGGTGGAAGATGAAGC
                    *   *                           ******  ***********
```

```
ScLHY_h1*¹    1762  GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA  1808
ScLHY_h2*           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h3            GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h4¹           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h5            GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h6            GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h7¹           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h8            GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h9¹           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h10¹          GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h11           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h12           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h13           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h14¹          GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h15¹          GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h16           GACCACAGTGGCGGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h17           GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h18*          GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h19¹          GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h20¹          GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
ScLHY_h21*¹         GACCACAGTGGCAGTTGACCTCAACAAGAACGCCACAAGCATTTATCATGA
                    ************ ************************************
```

ScPRR37 - região entre éxons 1 a 4

```
ScPRR37_h1    4675  CAGCAAGCATGGACTTATCTTGAAGATATGCAAAGCAATATAGATATTGTT  4725
ScPRR37_h2¹         CAGCAAGCATGGACTTATCTTGAAGATATGCAAAGCAACATAGATATTGTT
ScPRR37_h3          CAGCAAGCATGGACTTATCTTGAAGATATGCAAAGCAACATAGATATTGTT
ScPRR37_h4          CAGCAAGCATGGACTTATCTTGAAGATATGCAAAGCAACATAGATATTGTT
ScPRR37_h5¹         CAGCAAGCATGGACTTATCTTGAAGATATGCAAAGCAACATAGATATTGTT
ScPRR37_h6*         CAGCAAGCATGGACTTATCTTGAAGATATGCAAAGCAACATAGATATTGTT
                    ************************************* ************

ScPRR37_h1   5235  CAGTGGTAGTGGAAGTGAAAGTGGCATTCAGACGCAGAAGTGTGACAAATCAA  5287
ScPRR37_h2¹        TAGTGGTAGTGGAAGTGAAAGTGGCATTCAGACGCAGAAGTGTGACAAATCAA
ScPRR37_h3         CAGTGGTAGTGGAAGTGAAAGTGGCATTCAGACGCAGAAGTGTGACAAGTCAA
ScPRR37_h4         CAGTGGTAGTGGAAGTGAAAGTGGCATTCAGACGCAGAAGTGTGACAAATCAG
ScPRR37_h5¹        CAGTGGTAGTGGAATGAAGTGTCGCATTCAGACGCAGAAGTGTGACAAATCAA
ScPRR37_h6*        CAGTGGTAGTGGAAGTGAAAGTGGCATTCAGACGCAGAAGTGTGACAAATCAA
                    *************   *  ** ************************ ***
```

ScPRR37 - região entre éxons 6 a 7

```
ScPRR37_h1*¹   8086  TGCTGAACAACGGAATGTATTAAGACGCTCAAATCTCTTGGCTTTTACAAG  8136
ScPRR37_h2*¹         TGTTGAACAACGGAATGTATTAAGACGATCAAATCTCTCAGCTTTTACAAG
                     ** ************************ **********  ************

ScPRR37_h1*¹   8329  GTCAAATTCAGATGCAGCTCCAATAAAACAAGGCTCCAATAGCAGTAGCAA  8379
ScPRR37_h2*¹         GTCAAATTCAGATGCTGCTCCAATAAAACAAGGCTCCAACGGCAGTAGCAA
                     *************** ************************  **********

ScPRR37_h1*¹   8389  CATGGGTTCCACTACAAAGAATGTTGTGACAAAGCCCACTACAGATAAGGA  8439
ScPRR37_h2*¹         CATGGGTTCCACTACAAAGAATGTTGTGACAAAGCCCACTACAAATAAGGA
                     ******************************************* *******
```

ScPRR37 - região entre éxons 7 a 8

```
ScPRR37_h1¹    8758  GAGCAACTCAGGCAGTAACAATGGAACCAAGGCGCAGAATGGAAGTACTAC  8808
ScPRR37_h2           GAGCAACTCAGGCAGTAACAATGGAACCAAGGGGCAGAATGGAAGTACTAC
ScPRR37_h3*          GAGCAACTCAGGCAGTAACAATGGAACCAAGGGGCAGAATGGAAGTACTAC
                     ******************************** ******************
```

```
ScPRR37_h1¹     9262  GGTACCAGAGCAGGAAGAGGCTGGCCGACCAGCGGCCGCGGGTTCGTGGGC  9312
ScPRR37_h2            GGTACCAGAGCAGGAAGAGGCTGGCCGACCAGCGGCCGCGGGTCCGTGGGC
ScPRR37_h3*           GGTACCAGAGCAGGAAGAGGCTGGCCGACCAGCGGCCGCGGGTTCGTGGGC
                      ******************************************* *******
```

ScPRR73 - região entre éxons 1 a 4

```
ScPRR73_h1      1245  ACTCTACTCGTCAGGTGGTCAGTGCCCTGCTCCGTAAGTGCTGGTATGAAG  1295
ScPRR73_h2*¹          ACTCTACTCGTCAGGTGGTCAGTGCCCTGCTCCGTAAGTGCTGCTATGAAG
                      ******************************************* *******

ScPRR73_h1      3995  CTTGTCTATCTGGCATCAGTCTGCTTAGCAAAATCACAAGTCACAAAATTT  4045
ScPRR73_h2*¹          CTTGTCTATCTGGCATCGGTCTGCTTAGCAAAATCACTAGTCACAAAATTT
                      ***************** ******************* *************

ScPRR73_h1      4252  AAGAATGAGCTTAAGGACCTTTGGCAGCACGTTTGGAGGCGATGCCACAGT  4302
ScPRR73_h2*¹          AAGAATGAGCTTAAGAACCTTTGGCAGCACGTTTGGAGGCGATGCCACAGT
                      *************** **********************************
```

ScPRR73 - região entre éxons 4 a 6

```
ScPRR73_h1      4499  GACGAGTATGAGAACGACAGTGACAGCAATCATGATGATGAAGAAAACGAC  4549
ScPRR73_h2*           GACGAGTATGAGAACGACAGTGACAGCAATCATGATGATGAAGAAAATGAC
ScPRR73_h3            GACGAGTATGAGAACGACAGTGACAGCAATCATGATGATGAAGAAAATGAT
ScPRR73_h4            GACGAGTATGAGAACGACAGTGACAGCAATCATGATGATGAAGAAAATGAT
                      ************************************************ **

ScPRR73_h1      4555  TGATGATGACGACTTCAGTGTCGGACTCAATGCTAGGGATGGAAGTGATAA  4605
ScPRR73_h2*           CGACGATGACGACTTCAGTGTCGGACTCAATGCTAGGGATGGAAGTGATAA
ScPRR73_h3            CGACGATGACGACTTCAGTGTTGGACTCAATGCTAGGGATGGAAGTGATAG
ScPRR73_h4            CGACGATGACGACTTCAGTGTCGGACTCAATGCTAGGGATGGAAGTGATAA
                       ** ***************** ***************************

ScPRR73_h1      5124  GATCAACTAGCAGATCCACCTGATAGTACATGTGCACAAGTGATTCACCCC  5174
ScPRR73_h2*           GATCAACTAGCAGATCCACCTGATAGTACATGTGCACAAGTGATTCACCCC
ScPRR73_h3            GATCAACTAGCAGATCCACCTGATAGTACATGTGCACAAGTAATTCACCCC
ScPRR73_h4            GATCAACTAGCAGATCCACCTGATAGTACATGTGCACAAGTAATTCACCCC
                      ****************************************** *********

ScPRR73_h1      5184  ATATGCAGTAACAAGTGGCTACCGACAGCAAACAAAAGGAATGGCAAGAAA  5234
ScPRR73_h2*           ATATGCAGTAACAAGTGGCTACCGACAGCAAACAAAAGGAATGGCAAGAAA
ScPRR73_h3            ATATGCAGTAACAAGTGGCTACCGACAGCAAACAAAAGGAATGGCGAGAAA
ScPRR73_h4            ATATGCAGTAACAAGTGGCTACCGACAGCAAACAAAAGGAATGGCAAGAAA
                      ********************************************* *****
```

ScPRR73 - região entre éxons 6 a 7

```
ScPRR73_h1¹     6045  TACAAAGAATGTTGTTGCAAAGCCTTCGGCTAACAG---------------  6095
ScPRR73_h2*¹          TACAAAGAATGTTGTTGCAAAGCCTTCGGCTAACAGGGAGAGAGTAACGTC
                      ************************************
```

ScPRR73 - região entre éxons 7 a 8

```
ScPRR73_h1*     6461  ATATTGCAAGACCAAACATAGAGAGTGTTAATGGTACCATGAGCCAAAATA  6511
ScPRR73_h2*           ATATTGCAACACCAAACATAGAGAGTGTTAATGGTACCATGAGCCAAAATA
ScPRR73_h3*           ATATTGCAACACCAAACATAGAGAGTGTTAATGGTACCATGAGCCAAAATA
                      ********* ****************************************

ScPRR73_h1*     7117  GTTCGCTACCAAAGCAGGAAGAGGCTTGCTGAGCAGCGGCCACGGGTCCGT  7167
ScPRR73_h2*           GTTCGCTACCAAAGCAGGAAGAGGCTTGCTGAGCAACGGCCACGGGTCCGT
ScPRR73_h3*           GTTCGCTACCAAAGCAGGAAGAGGCTTGCTGAGCAGCGGCCACGGGTCCGT
                      ************************************ ***************
```

ScPRR95 - região entre éxons 3 a 5

```
ScPRR95_h1     14554  GCAGACGGTGGGCCCGATGTGCACCACATACAACAAGAAGAGAATCTTGCA 14604
ScPRR95_h2            GCAAACGGTGGGCCTGATGTGCACCACATACAACAAGAAGAGAATCTTGCA
ScPRR95_h3            GCAAACGGTGGGCCTGATGTGCACCACATACAACAAGAAGAGAATCTTGCA
ScPRR95_h4            GCAAACGGTGGGCCTGATGTGCACCACATACAACAAGAAGAGAATCTTGCA
ScPRR95_h5            GCAAACGGTGGGCCTGATGTGCACCACATACAACAAGAAGAGAATCTTGCA
ScPRR95_h6            GCAAACGGTGGGCCTGATGTGCACCACATACAACAAGAAGAGAATCTTGCA
ScPRR95_h7*¹          GCAAACGGTGGGCCTGATGTGCACCACATACAACAAGAAGAGAATCTTGCA
                      *** ********** ************************************

ScPRR95_h1     14605  GAAAGAATCGAACAGAAGACTGGTGTGACGAAAGCTGATAATTTGAACAGA 14655
ScPRR95_h2            GGAAGAATCGAACAGAAGACTGGCGTGACAAAAGCTGATAATTTGAACAGA
ScPRR95_h3            GGAAGAATCGAACAGAAGACTGGCGTGACAAAAGCTGATAATTTGAACAGA
ScPRR95_h4            GAAGGAATTGAACAGAAGACTGGTGTGACAAAAGCTGATAATTTGAACAGA
ScPRR95_h5            GAAAGAATCGAACAGAAGACTGGTGTGACAAAAGCTGATAATTTGAACAGA
ScPRR95_h6            GAAAGAATCGAACAGAAGACTGGTGTGACAAAAGCTGATAATTTGAACAGA
ScPRR95_h7*¹          GAAAGAATCGAACAGAAGACTGGTGTGACAAAAGCTGATAATTTGAACAGA
                      * * **** ************** ***** *********************

ScPRR95_h1     14656  GATGGACCCCGTAAAAATAGAGAATGCAGTGAACAAGAAAGTGATGCTCAA 14706
ScPRR95_h2            GGTGGACCCCGTAAAAATAGAGAATGCAGTGAACAAGAAAGTGATGCTCAA
ScPRR95_h3            GATGGACCCCGTAAAAATAGAGAATGCAGTGAACAAGAAAGTGATGCTCAA
ScPRR95_h4            GATGGACCCCGTAAAAGTAGAGAATGCAGTGAACAAGAAAGTGATGCTCAA
ScPRR95_h5            GATGGACCCCGTAAAAATAGAGAATGCAGTGAACAAGAAAGTGATGCTCAA
ScPRR95_h6            GATGGACCCCGTAAAAATAGAGAATGCAGTGAACAAGAAAGTGATGCTCAA
ScPRR95_h7*¹          GATGGACCCCGTAAAAATAGAGAATGCAGTGAACAAGAAAGTGATGCTCAA
                      * ************** **********************************

ScPRR95_h1     15133  AGTTCTTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGCTGAAAGTAAGCAAACTAACAAC 15183
ScPRR95_h2            AGTTCTTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGCTGAAAGTAAGCAAACTAACAAC
ScPRR95_h3            AGTTCTTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGCTGAAAGTAAGCAAACTAACAAC
ScPRR95_h4            AGTTCTTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGCTGAAAGTAAGCAAACTAACAAC
ScPRR95_h5            AATTCTTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGCTGAAAGTAAGCAAACTAACAAC
ScPRR95_h6            AGTTCTTGCGCAAGGTCAGAGCTGGAGGCTGAAAGTAAGCAAACTAACAAC
ScPRR95_h8*¹          AGTTCTTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGCTGAAAGTAAGCAAACTAACAAC
                      * ******* ****************************************
```

ScPRR95 - região entre éxons 7 a 8

```
ScPRR95_h1     16596  GTGATAGCACTTCCAGCCTGATCACTACCCCTACTGAATCATCCAATGCAT 16646
ScPRR95_h2            GTGATAGCACTTCCAACCTGATCACTACCCCTACTGAGTCATCCAATGCAT
ScPRR95_h3*¹          GTGATAGCACTTCCAACCTGATCACTACCCCTACTGAATCATCCAATGCAT
ScPRR95_h4*           GTGATAGCACTTCCAACCTGATCACTACCCCTACTGAATCATCCAATGCAT
                      *************** ******************** *************

ScPRR95_h1     16845  GTTCGATACCAGAGCCGGAAATTACTTGCAGAGCAGCGTCCACGGGTCAAG 16895
ScPRR95_h2            GTTCGATACCAGAGCCGGAAATTACTTGCAGAGCAGCGTCCACGGGTCAAG
ScPRR95_h3*¹          GTTCGATACCAGAGCCGAAAATTACTTGCAGAGCAGCGTCCACGGGTCAAG
ScPRR95_h4*           GTTCGATACCAGAGCCGGAAATTACTTGCAGAGCAGCGTCCACGGGTCAAG
                      ***************** **********************************
```

ScTOC1 - região entre éxons 1 a 4

```
ScTOC1_h2       908   CAAGATGCTCAAGTACATTGCCAGGAACAAGGACCTGCGCCACATCCCCAT  958
ScTOC1_h1             CAAGATGCTCAAGTACATTGCCAGGAACAAGGACCTGCGACACATCCCCAT
ScTOC1_h3*            CAAGATGCTCAAGTACATTGCCAGGAACAAGGACCTGCGCCACATCCCCAT
                      ************************************** ************

ScTOC1_h2      1306   CTTGGTTTGCCCGAGAGAAACTTCTTCAATGACAACTTCGAGTTGGTGCTC  1356
ScTOC1_h1             CTTGGTTTGCCCGAGAAAAACTTCTTCAATGACAACTTCGAGTTGGTGCTC
ScTOC1_h3*            CTTGGTTTGCCCGAGAAAAACTTCTTCAATGACAACTTCGAGTTGGTGCTC
                      **************** **********************************
```

Figura 6.13: Localização dos SNPs e indels encontrados nos cinco genes analisados do relógio biológico da cana-de-açúcar. O número indica a posição de cada sequência dentro do respectivo contig genômico (**Tabela 6.2**). Os SNPs para trocas de aminoácidos não-sinônimos estão em vermelho; os SNPs para aminoácidos sinônimos estão em verde. As sequências em azul correspondem aos haplótipos de sequência igual à do contig genômico. Haplótipos em lilás representam aqueles com eventos de AS. Sequências em rosa representam indels.
*haplótipos confirmados por sequências de contigs genômicos.
[1]haplótipos com eventos de AS.

Nos ensaios de HR RT-PCR, foi possível detectar os alelos marcados pela presença de indels em *ScLHY* e *ScPRR73* ao longo de séries temporais (**Figuras 6.14 a 6.16**). Para *ScLHY*, os alelos contendo indels localizados no éxon 6 e marcados pela deleção de uma sequência de 26 nucleotídeos e pela deleção de 3 nucleotídeos foram observadas em ambas as séries temporais, de inverno (plantas com 4 meses) e verão (plantas com 9 meses) para os três órgãos analisados, F1, E1/2 e E5 (**Figuras 6.14 e 6.16**). Já o indel de *ScPRR73*, localizado no éxon 7 e que remove 15 nucleotídeos da sequência, foi detectado apenas ao longo da série temporal de inverno (plantas com 4 meses) (**Figura 6.15**).

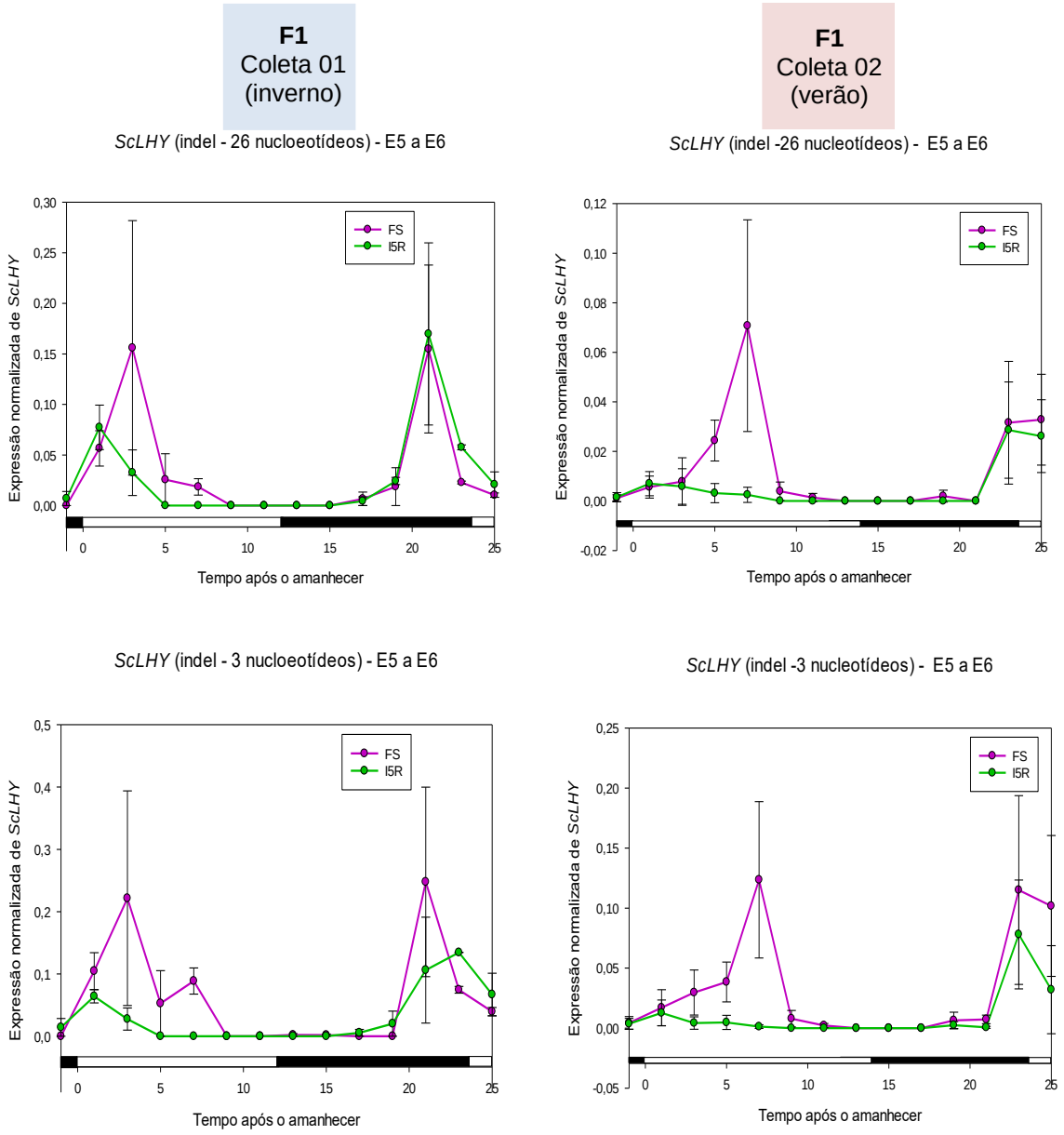


Figura 6.14: Expressão dos alelos de *ScLHY* identificados através de *indels* ao longo das séries temporais de inverno (plantas com 4 meses) e verão (plantas com 9 meses) nos experimentos de HR RT-PCR para o órgão F1. Em roxo, as formas principais completamente processadas (FS) e em verde as isoformas alternativas (IR).

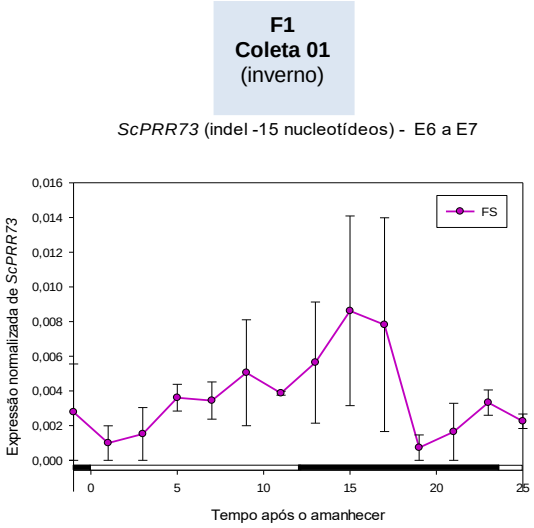


Figura 6.15: Expressão do alelo de *ScPRR73* identificado através de *indel* ao longo da série temporal de inverno (plantas com 4 meses) nos experimentos de HR RT-PCR para o órgão F1. Em roxo, as formas principais completamente processadas (FS) e em verde as isoformas alternativas (IR).

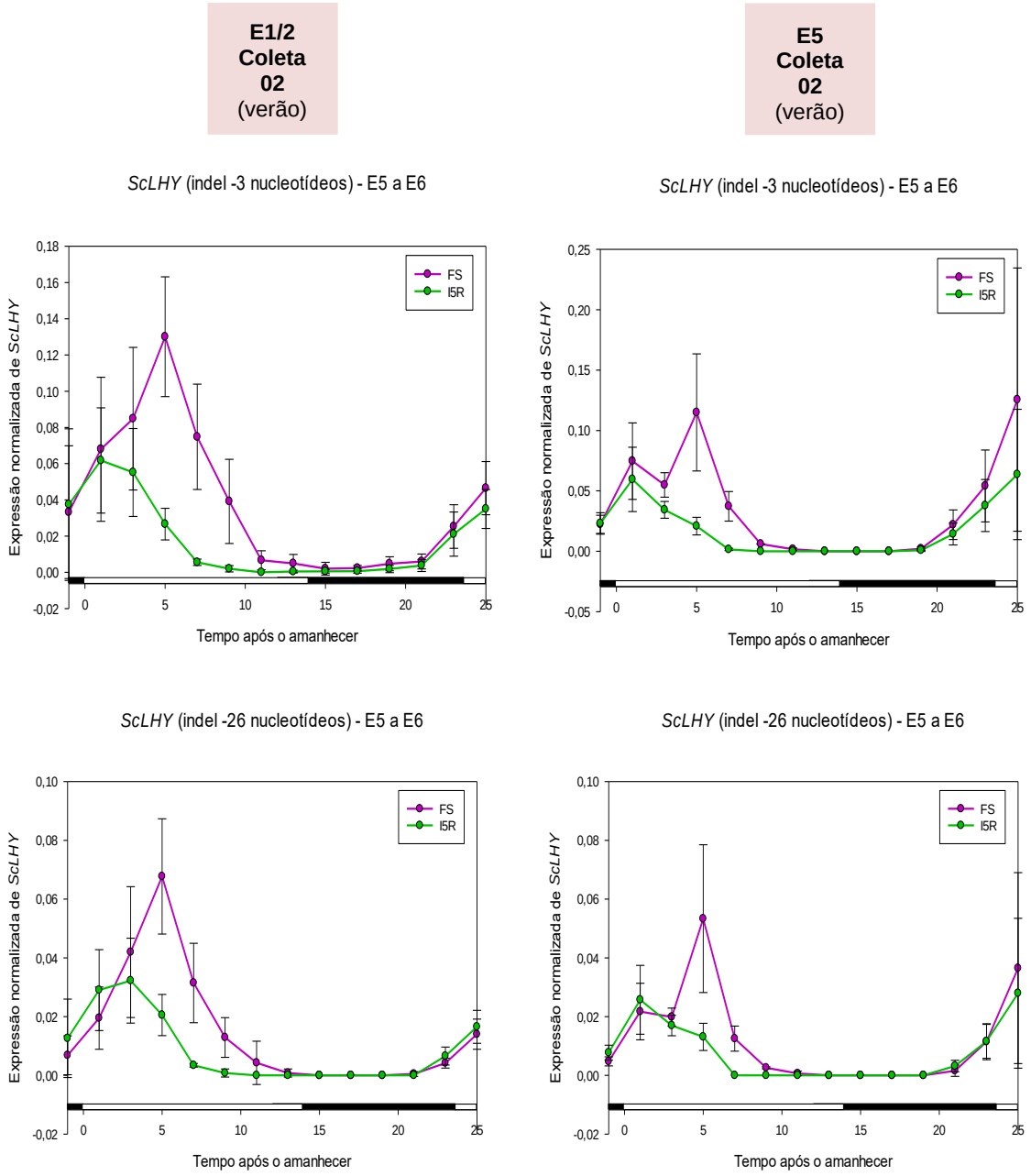


Figura 6.16: Expressão dos alelos de *ScLHY* identificados através de *indels* ao longo da séries temporais de inverno (plantas com 4 meses) e verão (plantas com 9 meses) nos experimentos de HR RT-PCR nos entrenós. Em roxo, as formas principais completamente processadas (FS) e em verde as isoformas alternativas (IR).

6.5. Discussão

Neste capítulo, foram apresentadas informações sobre a presença de AS em cana-de-açúcar. As plantas, crescidas em campo, mostraram que há expressão de formas alternativas dos transcritos no relógio biológico. Além disso, a expressão destas isoformas alternativas está presente em órgãos diferentes, com características fisiológicas distintas: F1, um órgão fonte, e E1/2 e E5, ambos órgãos dreno.

Foram escolhidos 5 genes do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar para as investigações de expressão de isoformas alternativas: *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73 ScPRR95* e *ScTOC1*. Os experimentos revelaram a presença de eventos de AS em 4 destes 5 genes. Embora haja dados de HR RT-PCR para *ScTOC1* revelando a presença de uma isoformas alternativa, este evento ainda precisa ser confirmado por clonagem e sequenciamento. Para todos os casos de AS analisados ao longo das séries temporais, a expressão das isoformas alternativas sempre foi inferior à expressão das isoformas completamente processadas (**Figuras 6.3 a 6.9**).

A maior proporção de eventos de AS encontrados foram retenções de íntrons (IR). É possível dizer que IR é o evento de AS mais difundido em cana-de-açúcar. O mesmo acontece em outras plantas (James *et al.*, 2012; Marquez *et al.*, 2012). Em Arabidopsis, os genes *AtLHY*, *AtPRR9*, *AtPRR7*, *AtPRR3* e *AtTOC1* apresentam pelo menos 1 IR (Filichkin *et al.*, 2010; James *et al.*, 2012). Em cevada, *HvLHY* e *HvPRR37*, *HvTOC1*, *HvPRR73*, *HvPRR59* e *HvPRR95* apresentam IR também (Calixto *et al.*, 2016). A retenção do íntron 1, I1R, do homólogo *ScLHY* é um evento conservado, presente também em Arabidopsis e cevada (James *et al.*, 2012; Calixto *et al.*, 2016). Tanto em cana-de-açúcar quanto em cevada, o último íntron de *HvLHY* (I8R) e *ScLHY*

(I5R) é retido (Calixto *et al.*, 2016). A maior proporção de eventos de IR encontrados em cana-de-açúcar, todavia, não foram descritos em outras plantas. Em *ScPRR73* foram observados a retenção dos íntrons 2 (I2R) e 6 (I6R). No homólogo *ScPRR95*, o íntron 7 foi retido (I7R) em um dos clones obtidos. Em *ScPRR37*, eventos de retenção de íntrons foram observados para os íntrons 2 (I2R), 6 (I6R) e 7 (I7R). Os experimentos de HR RT-PCR detectaram a retenção do íntron 3 (I3R) em *ScTOC1*. Em Arabidopsis, *TOC1* apresenta dois eventos de retenção de íntron: I1R e I4R, os quais são conservados em cevada (James *et al.*, 2012; Calixto *et al.*, 2016). A presença de transcritos contendo íntrons retidos pode ser apenas um indicativo de transcritos parcialmente processados, que jamais deixam o núcleo (James *et al.*, 2012). Em alguns casos, transcritos maduros contendo IR produzem mRNAs improdutivos em Arabidopsis (James *et al.*, 2012). De toda forma, este evento representa um passo de regulação de expressão gênica pós-transcricional (James *et al.*, 2012; Kalyna *et al.*, 2012).

Em alguns casos, como para os genes *AtLHY*, *AtTOC1* e *HvLHY*, estas IR inserem PTCs nos seus transcritos, que posteriormente podem seguir uma via de degradação. A inserção de PTCs pode levar o transcrito a dois destinos distintos: 1) degradação via NMD (Filichkin and Mockler, 2012; Kalyna *et al.*, 2012; Marquez et al, 2012); 2) produção de proteínas truncadas e parcialmente funcionais (Seo *et al.*, 2011; Mastrangelo *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2013). Em plantas, foram observados transcritos que, embora tenham IR, não acionam a degradação via NMD (Kalyna *et al.*, 2012; Marquez et al, 2012). Nos experimentos de identificação de AS em cana-de-açúcar, todas as IR inserem PTCs nos transcritos, porém não foram realizados experimentos ou análises *in silico* para verificar o destino destes transcritos, se seriam sinalizados para degradação via NMD ou não.

A presença de eventos de AS nos genes do relógio biológico aparece como resposta a alguns estímulos ambientais. Basicamente, durante a coleta 01 (realizada no inverno), a expressão dos transcritos contendo eventos de AS é maior, isto é, as isoformas alternativas são expressas em maior proporção do que na coleta 02 (realizada no verão) (**Figuras 6.3 a 6.9**). Desconsiderando que as plantas estavam em idades diferentes nas coletas 01 (realizada no inverno com as plantas contando 4 meses) e 02 (realizada no verão com as plantas contando 9 meses), é possível afirmar que em condições naturais, com as plantas em campo, a influência da mudança de temperatura no AS é real. Consequentemente, o oscilador central pode ter seu funcionamento alterado ao longo das estações do ano nas plantas crescidas em condições naturais. A exceção é o gene *ScPRR37*, cujo comportamento vai na contramão do que foi observado para os demais transcritos alternativos do relógio da cana-de-açúcar.

É notável analisar que há paralelos entre este comportamento da cana-de-açúcar e o que foi observado em Arabidopsis e cevada, no sentido de que a temperatura influencia a expressão das isoformas alternativas dos genes do relógio biológico. Na coleta 01 (realizada no inverno), o nível de expressão das isoformas alternativas I2R, E3S, I6R e I7R foi menor do que na série temporal de verão. O que foi descrito, em termos de resposta à baixas temperaturas sob condições controladas para a família das *PRRs* de Arabidopsis foi um comportamento de redução de isoformas alternativas para *AtPRR7* e *AtPRR3* a baixas temperaturas e o oposto, isto é, elevação da expressão de isoformas alternativas em *AtPRR9* e *AtPRR5* (James *et al.*, 2012). No homólogo para *ScPRR37* em cevada, *HvPRR37*, o que acontece é uma redução generalizada da expressão deste gene a baixas temperaturas, possivelmente impulsionada pelo aumento da expressão de variadas isoformas alternativas, portanto

o oposto do que foi observado em cana-de-açúcar (Calixto *et al.*, 2016). Em condições controladas, o tratamento com alta intensidade de luz (seis vezes mais intensa do que o controle) eleva o grau de IR no gene *AtCCA1* de Arabidopsis, ao passo que tratamento a baixas temperaturas (4ºC) reduz este mesmo evento de AS em *AtCCA1* (Filichkin *et al.*, 2010). Esse gene é importante para esta discussão porque, embora não esteja presente nas monocotiledôneas, nas eudicotiledôneas ele é parcialmente redundante a *AtLHY*. No caso de *AtLHY*, o tratamento com baixa temperatura (4ºC) tem efeito oposto, levando à produção de transcritos inativos e/ou à degradação por NMD, pela elevação da expressão de transcritos com IR (Filichkin *et al.*, 2010; Filichkin & Mockler, 2012; James *et al.*, 2012). No caso de *AtPRR7*, eventos de AS são mais frequentemente observados sob condições de baixa temperatura, também levando a uma redução na expressão deste gene (James *et al.*, 2012). Em cevada, o homólogo *HvLHY* apresenta comportamento conservado diante da exposição a baixas temperaturas, isto é, a proporção de isoformas alternativas improdutivas eleva-se a 4ºC, causando uma redução geral da expressão deste gene (Calixto *et al.*, 2016). No caso do homólogo *PPD-H1* (ou *HvPRR37*), o efeito da baixa temperatura é semelhante ao observado em Arabidopsis (Calixto *et al.*, 2016). A última consequência deste fenômeno observado em cana-de-açúcar sugere a redução da expressão do produto final destes genes, o que poderia ter um efeito nas vias fisiológicas e metabólicas reguladas pelo relógio.

É possível estabelecer comparações na expressão de uma dada isoforma num mesmo órgão coletado em estações e fases de desenvolvimento diferentes, bem como comparar órgãos diferentes coletados numa mesma estação e fase de desenvolvimento. Como já foi observado, exceto pelo comportamento de *ScPRR37*, os eventos de AS são mais expressos na série temporal de inverno, quando as

temperaturas eram mais baixas e as plantas, mais jovens. Ao comparar a expressão de *ScLHY* e *ScPRR37* nos órgãos F1, E1/2 e E5, o perfil de expressão para cada gene é bastante diferente. Em comum, apenas a observação de que os níveis de expressão para todas as isoformas, sejam alternativas ou completamente processadas, é menor nos entrenós em relação à F1. Outro aspecto que não passa despercebido é a semelhança do padrão de ritmicidade entre os órgãos F1 e E5. Isso é intrigante, sobretudo pelas diferenças de perfis metabólicos e fisiológicos entre esses órgãos. Em comum, apenas o fato de que ambos são expostos à grandes concentrações de açúcares: em F1, açúcares sintetizados pela fotossíntese (é um órgão fonte) e em E5, os açúcares acumulados pela cana-de-açúcar (é um órgão dreno). É possível ver o padrão rítmico característico destes genes na maioria dos casos, exceto para os transcritos de *ScPRR37*. Para este gene, o padrão rítmico está bastante fraco, possivelmente devido ao nível de expressão normalizada baixo, nas regiões investigadas entre os éxons 1 e 4 (em todas as isoformas) de E1/2 e na região entre os éxons 7 e 8 (isoformas principal completamente processada).

Outra característica dos eventos de AS encontrados nos transcritos do relógio da cana-de-açúcar analisados é a mudança de fase observada quando compara-se o mesmo órgão, no caso F1, nas coletas de inverno e verão. Nos experimentos de HR RT-PCR, a análise da segunda série temporal, a de verão, revela que o pico de expressão para os genes do relógio está 2 h atrasada, isto é, há uma mudança de fase de 2 h na expressão das isoformas, sejam completamente processadas ou alternativas. A hipótese levantada para explicar esta alteração de fase é o efeito do sombreamento das plantas em campo, abordado de forma mais aprofundada no **Capítulo 2**.

Esta mudança de fase é percebida e processada nos entrenós, porém é variável de acordo com o gene analisado. No caso de *ScLHY*, na região entre os éxons 1 e 3, há sincronização dessa mudança de fase entre os três órgãos na expressão das isoformas principal completamente processada e com íntron 1 retido (I1R). Na região entre os éxons 5 e 6, primeiro a isoforma com I5R é expressa e apenas 4 h depois a isoforma FS é expressa. Este padrão para expressão de I5R é seguido pelos três órgãos. No caso da isoformas FS, há uma mudança de fase entre órgãos: No órgão F1 o pico de expressão ocorre 2 h depois do pico de expressão dos entrenós. Para *ScPRR37*, a expressão da isoformas FS da região entre os éxons 1 e 4 mostra mudança de fase entre os órgãos F1 e E5 correspondente a +2 h para E5. Este padrão se mantém para a isoformas I2R, com o mesmo atraso de fase verificado nos entrenós em relação a F1. Na isoformas E3S, não há sincronização da fase entre os três órgãos e o pico de expressão ocorre na sequência: E1/2, E5 e F1. Esta falta de sincronização de fase parece acompanhar a expressão de todas as isoformas FS analisadas para este gene. Na expressão da isoforma I6R, o pico de expressão está sincronizado em F1 e E5 antecipado em 2 h em E1/2. No caso da isoforma I7R, há sincronização de fase entre os órgãos.

Mesmo havendo conservação entre alguns eventos de AS, novos eventos de AS foram descritos na cana que não haviam sido observados em outros homólogos de outras espécies de plantas. No gene *ScPRR37*, um éxon alternativo foi encontrado no começo do íntron 1 (Ex1a Alt). É interessante pontuar, todavia, que em *AtLHY* e *HvLHY* há éxons alternativos nos íntrons 5 (Ex5a Alt) e 6 (Ex6a Alt), respectivamente. Estas isoformas alternativas foram observadas em experimentos de HR RT-PCR (James *et al.*, 2012; Calixto *et al.*, 2016). No caso do Ex1a Alt de *ScPRR37*, devido ao tamanho do fragmento produzido, os experimentos de HR RT-PCR não detectaram

sua dinâmica ao longo das séries temporais deste trabalho. O processamento de éxons inteiros (*exon skipping*, ES) também é outro evento de AS encontrado nos genes do relógio biológico das plantas. No caso da cana-de-açúcar, um novo evento desta natureza foi descrito para o éxon 3 de *ScPRR37* (E3S). Em cevada, este evento é observado no gene *HvGI* (E2S) (Calixto *et al.*, 2016) e em Arabidopsis há a extração do éxon 4 (E4S) de *PRR7* (James *et al.*, 2012). Além destes eventos de AS, sítios alternativos de *splicing* (Alt ss) foram detectados em diferentes genes do relógio da cana-de-açúcar. Em *ScPRR37*, há 1 Alt SS na extremidade 5' do éxon 4. Em *ScPRR73*, a presença de um sítio alternativo de *splicing* remove 245 nucleotídeos da metade final do éxon 4 e da primeira metade do éxon 5 e um sítio alternativo de *splicing* foi encontrado no éxon 5 de *ScPRR95*. Em Arabidopsis, é comum encontrar este evento de AS nos genes do relógio biológico. Há relatos de Alt ss para *AtLHY*, *AtCCA1*, *AtPRR9*, *AtPRR5* e *AtPRR3* (James *et al.*, 2012). Em cevada, *HvLHY*, *HvPRR37*, *HvGI* e *HvCO2* possuem pelo menos 1 evento de Alt ss para cada um destes genes (Calixto *et al.*, 2016).

Os dados que apontam para a presença de eventos de AS sobre os genes do relógio biológico da cana de açúcar *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73* e *ScPRR95* parecem sugerir um nível de regulação da expressão gênica pós-transcricional a partir da influência direta do ambiente. Isto sugere que o oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar cultivada em campo pode ter múltiplos comportamentos, de acordo com a estação do ano e temperatura na qual a planta se encontra. Sendo o relógio biológico relacionado à fisiologia e metabolismo, é possível sugerir que haja um impacto desta funcionalidade sazonal sobre as vias de resposta do relógio.

Também foi realizada uma exploração inicial sobre a expressão de diferentes haplótipos para estes mesmos genes do relógio biológico (*ScLHY*, *ScPRR37*,

ScPRR73 ScPRR95 e *ScTOC1*) nestas mesmas plantas de cana-de-açúcar crescidas em campo, sendo encontrados transcritos com SNPs para todos os genes analisados. Estes dados sugerem a presença de múltiplos alelos para os genes do relógio expressos no órgão F1

Os dados de expressão de transcritos com SNPs revelam evidências de que há mais de um alelo expresso para os genes do relógio analisados, culminando em 21 alelos diferentes encontrados para *ScLHY*. Mas, de novo, o objetivo era fazer uma investigação inicial da ocorrência de SNPs nos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar. Embora alguns desses SNPs tenham sido confirmados em sequências genômicas ainda não publicadas, o arranjo deles que foi encontrado em alguns dos transcritos, constituindo um possível haplótipo não foi. Ou seja, alguns haplótipos encontrados neste trabalho não foram confirmados através de sequências genômicas. Entretanto, em *ScLHY*, no qual a busca por SNPs foi direcionada, alguns desses são respaldados por múltiplos clones.

Alguns SNPs foram encontrados na região que codifica domínios proteicos importantes, como foi o caso dos SNPs não-sinônimos encontrados no domínio MYB de *ScLHY* e dos SNPs não-sinônimos encontrados no domínio de resposta regulatória de *ScPRR73*. Por se tratar de alterações na estrutura primária proteica destas regiões, é possível que haja algum impacto no enovelamento e, consequentemente, funcionalidade destes fatores de transcrição. Em cana-de-açúcar, a ocorrência de SNPs que levaram diferentes sequências de aminoácidos foi investigada nos genes para sacarose sintase (*SuSy*) (Zhang *et al.*, 2013) e para transportadores de sacarose (Zhang *et al.*, 2016). Vale salientar que SNPs sinônimos foram encontrados no domínio de resposta regulatória dos genes do relógio *ScPRR37*, *ScPRR73* e *ScTOC1* e no domínio CTT *ScPRR37*, *ScPRR73* e *ScPRR95*.

Não é novidade que a cana-de-açúcar tem múltiplos alelos em seu genoma (Garcia *et al.*, 2013) e expressos em seu transcriptoma (Cardoso-Silva *et al.*, 2014). De fato, o número de alelos genômicos mais frequente encontrado na cana pertence ao intervalo de 6 a 14, podendo, porém, partir de um mínimo de 4 e chegar a 20 (Garcia *et al.*, 2013). Estes números fornecem respaldo ao que foi observado em *ScLHY*, por exemplo, com 21 haplótipos detectados numa das regiões de busca, entre os éxons 5 e 6, e *ScPRR73*, com 4 haplótipos detectados entre os éxons 4 e 6. Apenas 3 haplótipos expressos foram detectados para *ScTOC1*, mas é possível que no genoma haja um número maior.

O número de SNPs encontrado ao longo dos genes do relógio não teve uma distribuição uniforme, pelo contrário, variou bastante de acordo com a região do gene analisada. Logo, o número máximo de haplótipos possivelmente expressos era definido de acordo com a região com maior incidência de SNPs. *ScLHY* foi analisado em duas regiões: na primeira, entre os éxons 2 e 3, apenas 3 haplótipos foram observados a partir de 2 SNPs detectados, enquanto que na região entre os éxons 5 e 6 apresentou 29 SNPs, além de 1 *indel* que retirou 26 nucleotídeos de um dos alelos. Isto possibilitou a descoberta de possíveis 21 alelos expressos. Dos 20 SNPs detectados nos transcritos de *ScPRR37*, metade está na região entre os éxons 1 e 4, gerando 6 haplótipos. 8 SNPs encontrados entre os éxons 6 e 7 revelaram 2 haplótipos. A última região de *ScPRR37* analisada, entre os éxons 7 e 8, contou 2 SNPs e 3 haplótipos. *ScPRR73* apresentou 14 SNPs, dos quais 4 estavam entre os éxons 1 e 4 e geraram 2 haplótipos. Os 8 SNPs entre os éxons 4 e 6 agruparam-se em 4 haplótipos e um indel deletando 15 nucleotídeos na região entre os éxons 6 e 7 gerou 2 haplótipos. A região final entre os éxons 7 e 8, com 2 SNPs, deu origem a 3 haplótipos. Em *ScPRR95*, 14 SNPs ao todo, a região entre os éxons 3 e 5 contava

com 11 SNPs que deram origem a 4 haplótipos, enquanto a região entre os éxons 7 e 8 com seus 3 SNPs contava com 4 haplótipos. *ScTOC1*, analisado em 1 região apenas, entre os éxons 1 e 4, tinha 2 SNPs e 3 haplótipos.

É interessante notar que os experimentos de HR RT-PCR detectaram os alelos de *ScLHY* e *ScPRR73* que continham *indels* nas duas séries temporais analisadas, de inverno e verão. Para os dois casos, estes alelos eram mais expressos durante o inverno do que durante o verão. A partir desta observação, possível sugerir que pode haver influência de variáveis ambientais na expressão de alelos dos genes do relógio. Talvez a temperatura seja um fator considerado na expressão alélica destes genes na cana-de-açúcar.

6.6. Conclusões

Neste capítulo, o conjunto de dados apresenta um panorama geral da expressão 1) de isoformas alternativas, geradas por eventos de AS; e 2) de múltiplos alelos dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar analisados aqui, que foram *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73*, *ScPRR95* e *ScTOC1*. Os dados de AS sugerem que este é difundido entre os genes do relógio biológico da cana, o que também é observado em outras espécies de plantas, como Arabidopsis e cevada. O evento de AS mais frequentemente observado nos genes do relógio da cana foi a retenção de íntron (IR), encontrado em 4 dos 5 genes analisados. Os eventos de AS encontrados inserem PTCs na sequência do transcrito, à exceção dos sítios alternativos de *splicing*, que embora retirem nucleotídeos da sequência do transcrito, mantém a janela de leitura da proteína. Em *ScLHY* foi encontrado apenas IR nos íntrons 1 (I1R) e 5 (I5R). No gene *ScPRR37*, além de retenção dos íntrons 2 (I2R), 6 (I6R) e 7 (I7R), um éxon alternativo foi encontrado no começo do íntron 1, um sítio alternatido de *splicing* na extremidade 5' do éxon 4 e o éxon 3 foi retirado do transcrito de um dos clones. Em *ScPRR73* foram observados a retenção dos íntrons 2 (I2R) e 6 (I6R) e a presença de um sítio alternativo de *splicing* que remove 245 nucleotídeos da metade final do éxon 4 e da primeira metade do éxon 5. No homólogo *ScPRR95*, o íntron 7 foi retido (I7R) num dos clones e um sítio alternativo de *splicing* foi encontrado no éxon 5. Os dados de HR RT-PCR revelaram que, ao longo das séries temporais analisadas, uma durante inverno e quando as plantas contavam 4 meses, e a outra durante o verão, quando as plantas contavam 9 meses, os eventos de AS tendem a serem menos expressos. Ao comparar os resultados de HR RT-PCR, a maioria dos eventos encontrados nas clonagens foram detectados ao longo das séries temporais, à exceção dos sítios alternativos de *splicing* de *ScPRR73*, o qual remove 245

nucleotídeos da metade final do éxon 4 e da primeira metade do éxon 5, e de *ScPRR37*, que remove 30 nucleotídeos do éxon 4. Em *ScTOC1*, embora nenhum evento de AS tenha sido clonado, os ensaios de HR apontam para a presença da retenção do íntron 3 (I3R).

A expressão de múltiplos alelos para os genes do relógio de cana foi observada, algo de acordo com o que foi descrito para alelos no genoma e expressos no transcriptoma. Ela variou, em termos de números, de gene para gene no órgão analisado, F1. 79 SNPs foram detectados na cana, organizados em 29 para *ScLHY*, 20 para *ScPRR37*, 14 para *ScPRR73*, 14 para *ScPRR95* e 2 para *ScTOC1*. Estes SNPs, quando agrupados, deram origem a haplótipos expressos que variaram em número, desde 2 em *ScPRR37* até 21 em *ScLHY*. A presença de *indels* em *ScPRR73* e *ScLHY* marcou a expressão de outros alelos destes genes, as quais eram maiores na série temporal de inverno do que naquela de verão, sugerindo influência de fatores ambientais na expressão alélica de genes do relógio biológico da cana-de-açúcar.

7. Discussão Geral

7.1. O relógio da cana-de-açúcar cultivada em condições flutuantes é funcional

O relógio biológico é um mecanismo interno que gera ritmos autossustentados. Dados de estudos prévios em cana-de-açúcar realizados em condições circadianas revelaram que esta planta possuía um relógio biológico ativo neste contexto circadiano (Hotta *et al.*, 2013). Porém, não havia estudos que mostrassem o comportamento do relógio biológico da cana-de-açúcar em um ambiente cujas condições variassem, isto é, num ambiente flutuante. A novidade que estre trabalho traz é justamente levantar estas informações sobre o relógio biológico da cana-de-açúcar e ir além, analisando o funcionamento do relógio biológico de diferentes órgãos desta planta cultivada em campo.

Realizar esta análise é importante para acessar a influência conjunta do relógio biológico com o ambiente natural sobre a fisiologia e o metabolismo das plantas em campo. As variações ambientais (luz e temperatura, por exemplo) são percebidas pelas vias de entrada do relógio biológico, incorporadas ao seu oscilador central e resultam em respostas fisiológicas e metabólicas organizadas temporalmente (Filichkin *et al.*, 2011; Izawa *et al.*, 2011). Além disso, é importante conduzir experimentos em campo com plantas porque estas condições são as mais próximas possíveis daquelas enfrentadas por elas. As plantas cultivadas em condições controladas, embora forneçam embasamento para compreensão da fisiologia, do metabolismo e do fenótipo das plantas, possuem taxas de crescimento mais elevadas, maiores áreas foliares, concentrações de nitrogênio mais elevadas do que plantas

crescidas no campo (Poorter *et al.*, 2016). Portanto, estas plantas apresentam resultados afastados da realidade de uma planta em seu habitat natural.

Os relógios biológicos dos três órgãos analisados, F1, E1/2 e E5 são funcionalmente ativos, mesmo que com ritmos de amplitudes diferentes (por exemplo, a amplitude de *ScLHY* em F1 é maior do que a de E1/2 e E5). Quando comparados os transcritos expressos de cada órgão, é possível encontrar diferentes categorias: 1) transcritos expressos e rítmicos em um único órgão; 2) transcritos expressos em ambos os órgãos, mas rítmicos em apenas um deles; 3) expressos rítmicos nos dois órgãos, mas com fases distintas; 4) rítmicos em ambos os órgãos com a mesma fase; 5) rítmicos e coexpressos (**vide Figura 4.4, Capítulo 1**). Estas comparações apontam para a noção de que os relógios biológicos de cada órgão, assim como os transcritos por ele influenciados, passam por variações de acordo com cada órgão, mas atuam de forma sincronizada para gerar os ritmos da planta como um todo (James *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015; Bordage *et al.*, 2016). Por isso é que é necessário, dentro dos estudos do relógio biológico, analisar órgãos diferentes, como mostram as evidências trazidas de estudos anteriores sobre diferenças na expressão do relógio biológico em diferentes órgãos de plantas (James *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015; Bordage *et al.*, 2016). Também é possível que o perfil fisiológico de um órgão esteja relacionado ao perfil de expressão específico dos genes do oscilador do relógio biológico, como no caso de E5, marcadamente o primeiro entrenó a acumular sacarose, que possui ritmos em vias associadas ao metabolismo de açúcares que podem ser importantes para desenvolver estratégias voltadas para aumento de produção de sacarose.

Respondida a pergunta inicial sobre se haveria um relógio biológico funcional em plantas crescidas em campo, a próxima pergunta recaiu sobre o impacto deste relógio

biológico sobre as vias de resposta a ele associadas. A influência do ambiente mostrou-se intensa, pois, considerando apenas o órgão F1, 60,9% dos transcritos foram classificados como rítmicos (**vide Capítulo 1**). Esta porcentagem é quase o dobro dos 32% de transcritos rítmicos observados no mesmo órgão em plantas de cana-de-açúcar em condições circadianas (Hotta *et al.*, 2013). Em todos os órgãos, os transcritos analisados como regulados pela ação sinérgica do relógio biológico e do ambiente flutuante estão associados a vias fundamentais, tais como fotossíntese, metabolismo de sacarose, transporte de açúcares, vias clássicas hormonais, resposta à luz, além de vias de regulação da expressão gênica e epigenética. Em Arabidopsis (Harmer *et al.*, 2000; Covington *et al.*, 2008), arroz (Filichkin *et al.*, 2011; Izawa *et al.*, 2011) e milho (Khan *et al.*, 2010), os transcritos associados ao relógio biológico também compreendem algumas destas vias, o que reforça a ideia de que a ação do relógio biológico é bastante conservada em plantas vasculares. Tamanha expressão rítmica sobre vias metabólicas, fisiológicas e regulatórias observada na cana-de-açúcar cultivada em campo ressalta a importância do estudo do relógio em condições naturais para abrir novas alternativas para aumento de produtividade na cana-de-açúcar.

7.2. O papel do AS na atividade do relógio biológico da cana-de-açúcar

Um outro aspecto importante observado neste trabalho sobre o funcionamento do relógio biológico da cana-de-açúcar crescida em campo é a regulação pós-transcricional a partir de eventos de AS detectados nos genes do relógio biológico. É possível sugerir que os eventos de AS influenciam o funcionamento do relógio biológico numa escala sazonal, isto é, quando as plantas estão submetidas as condições ambientais diferentes, através do ajuste da expressão gênica. Esta estratégia de regulação da função do relógio biológico diante de alterações

ambientais, entretanto, não é uma novidade da cana-de-açúcar ou das condições flutuantes de campo às quais as plantas avaliadas neste estudo foram submetidas. Pelo contrário, eventos de AS foram observados em genes do relógio biológico de Arabidopsis (James *et al.*, 2012) e cevada (Calixto *et al.*, 2016) a partir de experimentos conduzidos em condições controladas, o que dá uma ideia do quão conservada esta estratégia pode ser na regulação da expressão gênica. Por isso, é possível sugerir que o AS pode ser uma maneira de promover alterações no funcionamento do relógio biológico das plantas (Mastrangelo *et al.*, 2012).

Esta ideia de que os eventos de AS representam um ajuste da expressão gênica às condições ambientais nas quais se encontram as plantas de cana-de-açúcar ganha força nos dados de detecção de eventos de AS nos três órgãos da cana-de-açúcar analisados, F1, E1/2 e E5. Algumas semelhanças observadas nos padrões de ritmicidade, precisamente período ou nível de expressão, dos eventos de AS nos órgãos F1 e E5 reforça a ideia de que, embora sejam órgãos fisiologicamente bastante distintos – F1 é um órgão fonte, que realiza fotossíntese, enquanto E5 é um órgão dreno, no qual inicia-se o acúmulo de sacarose na cana-de-açúcar – a presença de açúcar pode ser um elemento que equaliza os processos de expressão gênica rítmica em ambos. Esta comparação entre F1 e E5 fica evidente, por exemplo, no gene *ScLHY* no evento de I1R e na isoforma FS entre os éxons 1 e 4 e no gene *ScPRR37*, na isoforma FS entre os éxons 1 a 4 e nos eventos I6R e I7R. De toda forma, com a ideia de que os relógios de diferentes órgãos atuam em sincronia para gerar os ritmos em plantas (Endo *et al.*, 2014; Bordage *et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2015), é interessante perceber que um mesmo mecanismo de regulação de expressão gênica está atuando sobre diferentes órgãos e sobre os mesmos genes do relógio biológico. Em outras palavras, os eventos de AS em diferentes órgãos, que aparecem em

resposta às condições ambientais, estão regulando os relógios de diferentes órgãos através de um mecanismo semelhante.

Os eventos de AS promovem uma alteração na concentração de mRNAs funcionais, isto é, que são traduzidos para a proteína funcionalmente ativa. No caso dos genes do relógio investigados (*ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73 ScPRR95* e *ScTOC1*), os eventos de AS podem ter reduzido os níveis desses fatores de transcrição nas condições ambientais de temperatura baixa (inverno, como foi observado), o que pode ter levado a alterações no funcionamento do relógio biológico. Sem os níveis normais dos fatores de transcrição atuando no oscilador central do relógio biológico, é interessante pensar no impacto sobre a dinâmica funcional das alças de repressão transcricional características do relógio biológico, às quais pertencem os genes analisados, principalmente porque a função de geração de ritmo a partir do oscilador central depende das oscilações na expressão e nos níveis proteicos dos fatores de transcrição (Filichkin & Mockler, 2012). Em última análise, uma hipótese pode ser levantada sobre possíveis prejuízos que isoformas alternativas podem trazer aos eventos fisiológicos e metabólicos regulados pelo relógio biológico, como a fotossíntese, por exemplo. No caso da cana-de-açúcar, uma fotossíntese prejudicada tem impacto direto na síntese de açúcares e, consequentemente, na sacarose acumulada pelos entrenós.

7.3. O relógio biológico da cana-de-açúcar possui múltiplos alelos expressos

Uma característica intrínseca aos cultivares comerciais de cana-de-açúcar é a autopoliploidia. As estimativas mais recentes dão conta de uma variação de ploidia de 6 a 14 cromossomos (Garcia *et al.*, 2013). Além disso, dados de expressão gênica apontam para a expressão de múltiplos haplótipos em cultivares comerciais de cana-

de-açúcar (Cardoso-Silva *et al.*, 2014) e também em espécies de cana-de-açúcar ancestrais (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). Ou seja, a poliploidia da cana parece não estar restrita ao genoma, ela se manifesta na expressão dos genes, abrindo possibilidades para especulação sobre a complexidade do relógio biológico da cana-de-açúcar.

Os dados deste trabalho revelaram que parece haver expressão de múltiplos alelos para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73 ScPRR95* e *ScTOC1* e, ainda assim, os dados mostram que o relógio da cana-de-açúcar é funcional. A partir da presença de SNPs nos transcritos destes genes, foi possível detectar possíveis alelos diferentes sendo expressos no órgão F1 da cana-de-açúcar, mesmo sabendo que a frequência de SNPs não necessariamente aponta para uma diversidade de haplótipos (Zhang *et al.*, 2013). Neste trabalho não há dados que provem que todos os alelos expressos em termos de transcritos são traduzidos em proteínas ativas. Sendo assim, uma das especulações possíveis é que alguns alelos expressos possam ser silenciados.

Os haplótipos marcados pela presença de *indels*, notadamente pertencentes a *ScLHY* e *ScPRR73,* foram detectados em maior nível na coleta 01 (inverno), do que na coleta 02 (verão) (**vide Capítulo 3**). Esta observação sugere que pode haver uma regulação do ambiente sobre a expressão dos múltiplos alelos do relógio da cana-de-açúcar. Seguindo esta hipótese, é possível que haja uma expressão de alelos do relógio biológico da cana-de-açúcar cultivada em campo regulada pela sazonalidade, isto é, pode ser que diferentes números de alelos sejam expressos em diferentes estações do ano.

A expressão de alelos múltiplos representa um novo grau de complexidade de funcionamento do relógio biológico da cana-de-açúcar e reflete a heterozigosidade do cultivar SP80-3280. Sendo o cultivar comercial SP80-3280 um híbrido interespecífico de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, e pensando na seleção artificial voltada para obtenção de cultivares que produzam mais açúcar e mais biomassa, é apenas lógico que cerca de 80% do genoma dos cultivares modernos de cana-de-açúcar venham de *S. officinarum*, espécie ancestral marcada pelo acúmulo de sacarose e por sua maior biomassa comparada à *S. spontaneum*. A partir daí, é possível falar sobre uma herança maior do relógio biológico de *S. officinarum* em detrimento de *S. spontaneum*. A análise de SNPs e alelos para os genes do relógio destes dois ancestrais aliada a uma comparação com os SNPs e alelos expressos encontrados nos cultivares modernos, como SP80-3280, seria uma estratégia interessante para mapear diferenças e semelhanças entre os genes do relógio biológico dos ancestrais e a frequência de cada um deles dentro do genoma dos cultivares modernos. A heterozigosidade ainda está relacionada ao ganho de biomassa pelo cultivar (Li *et al.*, 2016). Sendo o relógio biológico associado a vias fisiológicas também relacionadas a acúmulo de biomassa, compreender a complexidade da regulação de expressão de alelos e a origem destes alelos (em termos de análise do perfil dos alelos dos ancestrais), juntamente com mapeamento de QTLs a partir destas regiões marcadas por SNPs nos genes do relógio pode auxiliar no aprimoramento da produtividade dos cultivares modernos da cana-de-açúcar.

7.4. O sombreamento das plantas no campo leva a alterações no funcionamento do relógio biológico da cana-de-açúcar

A partir da comparação dos dados de expressão para os genes do relógio *ScLHY* e *ScTOC1* nas coletas 01 (realizada no inverno, quando as plantas tinham cerca de 4

meses) e 02 (realizada no verão, quando as plantas tinham 9 meses), observou-se inicialmente uma alteração na fase da expressão de *ScLHY* de 2 h. Em se tratando de plantas cultivadas em campo, sombreando-se reciprocamente, a hipótese levantada para explicar esta alteração no funcionamento do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar foi a influência do ambiente marcado pelo sombreamento causado pelo próprio campo. Ou seja, o relógio biológico da cana-de-açúcar estava sendo influenciado pelo ambiente e, assim, em uma espécie de fuso horário diferente do ambiente externo ao campo. Esta hipótese encontra fundamento na plasticidade do relógio biológico, que é capaz de ajustar seu funcionamento diante de mudanças nas pistas ambientais (Hu & Harmer, 2014).

Os dados também revelaram que este ajuste de fase do relógio biológico foi sincronizado entre todos os órgãos analisados – F1, E1/2 e E5 (**vide Capítulo 2**). Há algumas hipóteses que podem ser levantadas para explicar o que estaria por trás desta sincronização, isto é, que tipo de estímulo ou molécula estaria sincronizando órgãos com perfis fisiológicos tão distintos e espacialmente tão afastados no contexto de uma planta de cana-de-açúcar com 9 meses de idade (**vide Material e Métodos Gerais**). Uma das hipóteses seria a da sincronização através da sinalização pelo açúcar, que é largamente produzido pelos órgãos foliares, incluindo F1, e cujo excedente é alocado para os entrenós para fornecer energia para as atividades celulares meristemáticas (o que acontece no E1/2) ou para acúmulo sob forma de sacarose (o que começa a acontecer em E5). Esta hipótese encontra respaldo em experimentos anteriores realizados em Arabidopsis sob condições controladas, nos quais se viu que açúcares produzidos pela fotossíntese podem se comportar como um sinal reconhecido pelas vias de entrada do relógio biológico, regulando-o (Haydon *et al.*, 2013). A segunda hipótese se apoia na luz como sinal sincronizador. Esta

hipótese baseia-se em um trabalho recentemente publicado em Arabidopsis (Bordage *et al.*, 2016). Nele, os dados revelaram que o relógio biológico de raiz de Arabidopsis sofre influência direta da luz (Bordage *et al.*, 2016). Considerando o porte da cana-de-açúcar adulta e as condições de campo, seria mais plausível considerar a primeira hipótese para explicar a sincronização entre os órgãos da alteração de fase do relógio biológico que foi observada.

Uma das consequências diretas do sombreamento do campo associado à alteração de fase do relógio biológico poderia recair sobre a fotossíntese, via sobre a qual já recaem efeitos do sombreamento em sorgo (Li *et al.*, 2014) e cana-de-açúcar (Marchiori *et al.*, 2014), por exemplo. Com fotossíntese alterada, a produção e acúmulo de açúcares pela cana-de-açúcar poderia sofrer algum tipo de dano, como ocorre no sorgo (T. Li *et al.*, 2014). Ou, por outro lado, assumindo que as plantas de SP80-3280 estariam adaptadas a este contexto, não haveria dano à produtividade da cana-de-açúcar.

Uma questão pertinente que poderia ser levantada neste contexto de sombreamento do campo está relacionada à via de *Shade Avoidance Response* (SAR). As evidências de presença de SAR são bastante claras e envolvem estratégias adaptativas desenvolvidas pela planta para responder ao sombreamento: redução de ramificação; aumento na altura da planta via elongação do caule; redução do número de folhas; alteração da relação folha:pecíolo e, como consequência deste conjunto, redução de produção de biomassa (Carriedo *et al.*, 2016; Roig-villanova & Martínez-garcía, 2016). Particularmente no caso de gramíneas, a SAR provoca redução de perfilhamento (Carriedo *et al.*, 2016). Entretanto, ao longo da domesticação das gramíneas agricultáveis, foram selecionadas plantas adaptadas à alta densidade populacional no campo (Wang *et al.*, 1999). De fato, as plantas de cana-de-açúcar

não demonstraram sintomas de SAR, como por exemplo redução de perfilhamento, queda na biomassa, elongação e redução do número foliar, nos campos analisados, de modo que a hipótese de SAR podendo, de alguma forma, influenciar os eventos observados foi descartada.

8. Conclusões Gerais

A análise de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo revelou que o relógio biológico não só existe em diferentes órgãos (F1, E1/2 e E5), como é sincronizado entre órgãos, embora oscile com amplitude menor nos órgãos dreno (E1/2 e E5). Os transcritos regulados pela ação conjunta do relógio biológico e ambiente flutuante agruparam-se em torno de vias metabólicas, fisiológicas e de regulação gênica e epigenética. Todas estas vias são essenciais para a produtividade da cana-de-açúcar.

A comparação entre a expressão dos genes *ScLHY* e *ScTOC1* do oscilador central do relógio biológico da cana-de-açúcar na coleta 01 (inverno; plantas com cerca de 4 meses) e na coleta 02 (verão; plantas com 9 meses) apontou para uma alteração na fase do relógio biológico da planta, que, de acordo com a hipótese levantada e resultados dos experimentos subsequentes, foi causada pelo sombreamento mútuo das plantas no campo. O significado desta influência do ambiente local sobre o relógio biológico ainda precisa ser medida para as vias de resposta associadas ao relógio biológico.

O relógio biológico da cana-de-açúcar sofre uma profunda influência de eventos de AS, detectado nos genes *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73* e *ScPRR95*. Os eventos de AS em cana-de-açúcar parecem estar associados a baixas temperaturas, visto que foram observados em maior nível na coleta 01, de inverno. A maioria dos eventos de AS encontrados inserem PTCs na sequência do transcrito, levando à degradação do mRNA e, consequentemente, menor expressão final destes genes. Esta possível redução de proteínas pode ter efeitos sobre o funcionamento do relógio biológico da cana-de-açúcar numa escala sazonal.

Há evidência para a expressão de múltiplos alelos para os genes do relógio biológico da cana-de-açúcar *ScLHY*, *ScPRR37*, *ScPRR73*, *ScPRR95* e *ScTOC1*. Esta observação corrobora a maciça poliploidia observada nos cultares comerciais de cana-de-açúcar. A análise da expressão dos alelos marcados por *indels* em *ScPRR73* e *ScLHY* revelou que sua expressão era maior na coleta 01 (de inverno) do que na coleta 02 (de verão). Estes dados permitem especular sobre uma influência ambiental sobre a expressão alélica dos genes do relógio biológico da cana-de-açúcar. Assim, é possível que diferentes alelos sejam expressos em diferentes estações do ano. Este perfil de expressão dos múltiplos alelos abre, em geral, caminho para desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para genes do relógio biológico, permitindo acompanhar sua expressão ao longo das estações.

9. Referências

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. http://doi.org/10.1126/science.1061320.

Beales, J., Turner, A., Gri, S., Snape, J. W., & Laurie, D. A. (2007). A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (Triticum aestivum L.). Theor Appl Genet. 115(5):721–733. http://doi.org/10.1007/s00122-007-0603-4.

Berger, J. A., Hautaniemi, S., Järvinen, A., Edgren, H., Mitra, S. K., & Astola, J. (2004). Optimized LOWESS normalization parameter selection for DNA microarray data. BMC Bioinformatics. 9;5:194 1–13. http://doi.org/10.1186/1471-2105-5-194.

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 Phytol. 212(1):136-149.

Calixto, C. P. G., Waugh, R., & Brown, J. W. S. (2015). Evolutionary Relationships Among Barley and Arabidopsis Core Circadian Clock and Clock-Associated Genes. *Journal of Molecular Evolution*, *80*(2), 108–119. http://doi.org/10.1007/s00239-015-9665-0.

Calixto, C. P. G., Simpson, C. G., Waugh, R., & Brown, J. W. S. (2016). Alternative Splicing of Barley Clock Genes in Response to Low Temperature. PLoS One. 11(12): e0168028. 1–24. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0168028.

Campoli, C., Shtaya, M., Davis, S. J., & Korff, M. Von. (2012). Expression conservation within the circadian clock of a monocot : natural variation at barley Ppd-H1 affects circadian expression of flowering time genes , but not clock orthologs. BMC Plant Biol. 21;12:97. 1–15. doi: 10.1186/1471-2229-12-97.

Cardoso-Silva, C. B., Costa, E. A., Mancini, M. C., Balsalobre, T. W. A., Costa Canesin, L. E., Pinto, L. R., Carneiro, M.S., Garcia, A.A., de Souza, A.P., Vicentini, R. (2014). De novo assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. *PLoS ONE*, *9*(2). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0088462.

Carriedo, L. G., Maloof, J. N., & Brady, S. M. (2016). ScienceDirect Molecular control of crop shade avoidance. *Current Opinion in Plant Biology*, *30*, 151–158. http://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.005.

Conab (2015). Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, Companhia Nacional de Abastecimento.

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*(8), R130. http://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r130.

Cuadrado, A., Acevedo, R., Moreno Díaz De La Espina, S., Jouve, N., & De La Torre, C. (2004). Genome remodelling in three modern S. officinarum x S. spontaneum sugarcane cultivars. *Journal of Experimental Botany*, *55*(398), 847–854. http://doi.org/10.1093/jxb/erh093.

D'Hont, A. (2005). Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenetic and Genome Research*, *109*(1–3), 27–33. http://doi.org/10.1159/000082378.

D'Hont, A., Grivet, L., Feldmann, P., Rao, S., Berding, N., & Glaszmann, J. C. (1996). Characterization of the double genome structure of sugarcane cultivars (Saccharum ssp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.*, *250*, 405–413.

Dai, S., Wei, X., Pei, L., Thompson, R. L., Liu, Y., & Heard, J. E. (2011). BROTHER OF LUX ARRHYTHMO Is a Component of the Arabidopsis Circadian Clock. Plant Cell. 23(3):961-72. http://doi.org/10.1105/tpc.111.084293.

de Setta, N., Monteiro-Vitorello, C., Metcalfe, C., Cruz, G. M., Del Bem, L., Vicentini, R., Nogueira, F.T., Campos, R.A., Nunes, S.L., Turrini, P.C., Vieira, A.P., Ochoa-Cruz, E.A., Corrêa, T.C., Hotta, C.T., de Mello-Varani, A., Vautrin, S., da Trindade, A.S., de Mendonça-Vilela, M., Lembke, C.G., Sato, P.M., de Andrade, R.F., Nishiyama, M.Y. Jr, Cardoso-Silva, C.B., Scortecci, K.C., Garcia, A.A., Carneiro, M.S., Kim, C., Paterson, A.H., Bergès, H., D'Hont, A., de Souza, A.P., Souza, G.M., Vincentz, M., Kitajima, J.P., Van Sluys, M.A. (2014). Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. *BMC Genomics*, *15*(1), 540. http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-540.

Ding, F., Cui, P., Wang, Z., Zhang, S., Ali, S., & Xiong, L. (2014). Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in Arabidopsis. *BMC Genomics*, *15*(1), 431. http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-431.

Dodd, A. N. Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J., Webb, A.A. (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. Science. 22;309(5734):630-3. http://doi.org/10.1126/science.1115581.

Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M. A., Araki, T., & Kay, S. A. (2014). Tissue-specific clocks in Arabidopsis show asymmetric coupling. *Nature*, *515*(7527), 419–422. http://doi.org/10.1038/nature13919.

Endo, M. (2016). Tissue-specific circadian clocks in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *29*, 44–49. http://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.11.003.

Faostat (2015). Food and Agricultural commodities production, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ferreira, S. D. S., Yutaka, M., Jr, N., Paterson, A. H., & Souza, G. M. (2013). Biofuel and energy crops : high-yield Saccharinae take center stage in the post-genomics era. *Genome Biology*, *14*, 210. http://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-210.

Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A., Shen, R., Bryant, D. W., Fox, S. E., Wong, W.K., Mockler, T. C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana. Genome Res. 20(1):45-58. http://doi.org/10.1101/gr.093302.109.2008.

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(6). http://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. http://doi.org/10.1186/1745-6150-7-20.

Filichkin, S. A., Cumbie, J. S., Dharmawardhana, P., Jaiswal, P., Chang, J. H., Palusa, S. G., Reddy, A.S., Megraw, M., Mockler, T. C. (2015). Environmental stresses modulate abundance and timing of alternatively spliced circadian transcripts in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *8*(2), 207–227. http://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.011

Filichkin, S., Priest, H. D., Megraw, M., & Mockler, T. C. (2015a). Alternative splicing in plants: Directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress. *Current Opinion in Plant Biology*, *24*, 125–135. http://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.008.

Fouquet, R., Martin, F., Fajardo, D. S., Gault, C. M., Gómez, E., Tseung, C.-W., Policht, T., Hueros, G., Settles, A.M. (2011). Maize rough endosperm3 encodes an RNA splicing factor required for endosperm cell differentiation and has a nonautonomous effect on embryo development. Plant Cell, 23(12), 4280–97. http://doi.org/10.1105/tpc.111.092163.

Furbank, R. T. (2017). Walking the C4 pathway: past, present, and future. Exp Bot. 267(14):4057-66 *68*(2), 1–10. http://doi.org/10.1093/jxb/erx006.

Garcia, A. a F., Mollinari, M., Marconi, T. G., Serang, O. R., Silva, R. R., Vieira, M. L. C., Vicentini, R., Costa, E.A., Mancini, M.C., Garcia, M.O., Pastina, M.M., Gazaffi, R., Martins, E.R., Dahmer, N., Sforça, D.A., Silva, C.B., Bundock, P., Henry, R.J., Souza, G.M., van Sluys, M.A., Landell, M.G., Carneiro, M.S., Vincentz, M.A., Pinto, L.R., Vencovsky, R., Souza, A. P. (2013). SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. Scientific Reports, 3, 3399. http://doi.org/10.1038/srep03399.

Gardner, M. J., Hubbard, K. E., Hotta, C. T., Dodd, A. N., & Webb, A.A.R. (2006). How plants tell the time. *Biochemical Journal*, *3*(1), 43–46. http://doi.org/10.1042/BJ20060484.

Gawronsk, P., Ariyadasa, R., Himmelbach, A., Poursarebani, N., Kilian, B., Stein, N., Steuernagel, B., Hensel, G., Kumlehn, J., Sehgal, S.K., Gill, B.S., Gould, P., Hall, A. Schnurbusch, T. (2014). A distorted circadian clock causes early flowering and temperature-dependent variation in spike development in the Eps-3Am mutant of einkorn wheat. Genes Genet. Syst., 196:1253–1261. http://doi.org/10.1534/genetics.113.158444.

Grivet, L., & Arruda, P. (2002). Sugarcane genomics: Depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(2), 122–127. http://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00234-0.

Harmer, S. L. (2009). The circadian system in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, *60*(1), 357–77. http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092054.

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(5499), 2110–2113. http://doi.org/10.1126/science.290.5499.2110.

Haydon, M. J., Mielczarek, O., Robertson, F. C., Hubbard, K. E., & Webb, A. A. R. (2013). Photosynthetic entrainment of the Arabidopsis thaliana circadian clock. *Nature*, *502*(7473), 689–92. http://doi.org/10.1038/nature12603.

Haydon, M. J., Hearn, T. J., Bell, L. J., Hannah, M. A., & Webb, A. A. R. (2013a). Metabolic

regulation of circadian clocks. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *24*(5), 414–421. http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.03.007.

Heckmann, D. (2016). ScienceDirect C 4 photosynthesis evolution : the conditional Mt . Fuji. *Current Opinion in Plant Biology*, *31*, 149–154. http://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.04.008.

Higashi, T., Aoki, K., Nagano, A. J., Honjo, M. N., & Fukuda, H. (2016). Circadian Oscillation of the Lettuce Transcriptome under Constant Light and Light–Dark Conditions. *Frontiers in Plant Science*, *7*(7), 1–10. http://doi.org/10.3389/fpls.2016.01114.

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. *Plant, Cell and Environment*, *30*(3), 333–349. http://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(2):75–87. http://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*(8). http://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*(4), 240–249. http://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.007.

Irvine, J. E. (1999). Saccharum species as horticultural classes. Theoretical and Applied Genetics. 98(2), 186–194. http://doi.org/10.1007/s001220051057.

Izawa, T., Oikawa, T., Sugiyama, N., Tanisaka, T., & Yano, M. (2002). Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. Genes Dev. 16(15):2006-2020. http://doi.org/10.1101/gad.999202.blue-light.

Izawa, T., Mihara, M., Suzuki, Y., Gupta, M., Itoh, H., Nagano, A. J., Motoyama, R., Sawada,

Y., Yano, M., Hirai, M.Y., Makino, A., Nagamura, Y. (2011). Os-GIGANTEA Confers Robust Diurnal Rhythms on the Global Transcriptome of Rice in the Field. *Plant Cell*, *23*(5), 1741–1755. http://doi.org/10.1105/tpc.111.083238

Izawa, T. (2012). Physiological significance of the plant circadian clock in natural field conditions. *Plant, Cell and Environment*, *35*(10), 1729–1741. http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02555.x.

Izawa, T. (2015). Deciphering and prediction of plant dynamics under field conditions. *Current Opinion in Plant Biology*, *24*, 87–92. http://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.003.

James, A. B., Monreal, J. A., Nimmo, G. A., Kelly, C. L., Herzyk, P., Jenkins, G. I., & Nimmo, H. G. (2008). The circadian clock in Arabidopsis roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science 322*(5909), 1832–5. http://doi.org/10.1126/science.1161403.

James, A. B., Syed, N. H., Bordage, S., Marshall, J., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., Herzyk, P., Brown, J.W., Nimmo, H. G. (2012). Alternative Splicing Mediates Responses of the Arabidopsis Circadian Clock to Temperature Changes. *The Plant Cell*, *24*(3), 961–981. http://doi.org/10.1105/tpc.111.093948.

Jones, M. A., Williams, B. A., McNicol, J., Simpson, C. G., Brown, J. W. S., & Harmer, S. L. (2012). Mutation of *Arabidopsis SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1* Causes Circadian Clock Defects. *The Plant Cell*, *24*(10), 4066–4082. http://doi.org/10.1105/tpc.112.104828.

Kalyna, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., Marshall, J., Fuller, J., Cardle, L., McNicol, J., Dinh, H.Q., Barta, A., Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *40*(6), 2454–2469. http://doi.org/10.1093/nar/gkr932.

Khan, S., Rowe, S. C., & Harmon, F. G. (2010). Coordination of the maize transcriptome by a conserved circadian clock. *BMC Plant Biology*, *10*, 126. http://doi.org/10.1186/1471-2229-10-126.

Koo, B., Yoo, S., Park, J., Kwon, C., & Lee, B. (2013). Natural Variation in OsPRR37 Regulates

Heading Date and Contributes to Rice Cultivation at a Wide Range of Latitudes. *Molecular Plant*, *6*(6), 1877–1888. http://doi.org/10.1093/mp/sst088.

Lai, A. G., Doherty, C. J., Mueller-Roeber, B., Kay, S. A., Schippers, J. H. M., & Dijkwel, P. P. (2012). CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(42), 17129–17134. http://doi.org/10.1073/pnas.1209148109.

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*(4–5), 461–477. http://doi.org/10.1007/s11103-012-9922-1.

Li, D., Huang, Z., Song, S., Xin, Y., Mao, D., Lv, Q., Zhou, M., Tian, D., Tang, M., Wu, Q., Liu, X., Chen, T., Song, X., Fu, X., Zhao, B., Liang, C., Li, A., Liu, G., Li, S., Hu, S., Cao, X., Yu, J., Yuan, L., Chen, C., Zhu, L. (2016). Integrated analysis of phenome , genome , and transcriptome of hybrid rice uncovered multiple heterosis-related loci for yield increase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41):E6026-E6035. http://doi.org/10.1073/pnas.1610115113.

Li, T., Liu, L. N., Jiang, C. D., Liu, Y. J., & Shi, L. (2014). Effects of mutual shading on the regulation of photosynthesis in field-grown sorghum. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *137*, 31–38. http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.022.

Liu, M., Yuan, L., Liu, N. Y., Shi, D. Q., Liu, J., & Yang, W. C. (2009). GAMETOPHYTIC FACTOR 1, involved in pre-mRNA splicing, is essential for megagametogenesis and embryogenesis in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*, *51*(3), 261–271. http://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00783.x.

Locke, J. C. W., Millar, A. J., & Turner, M. S. (2005). Modelling genetic networks with noisy and varied experimental data: The circadian clock in Arabidopsis thaliana. *Journal of Theoretical Biology*, *234*(3), 383–393. http://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.11.038.

Lu, S. X., Webb, C. J., Knowles, S. M., Kim, S. H. J., Wang, Z., & Tobin, E. M. (2012). CCA1

and ELF3 Interact in the Control of Hypocotyl Length and Flowering Time in Arabidopsis. Plant Physiol.*158*(2): 1079–1088. http://doi.org/10.1104/pp.111.189670.

Lu, Y., Gehan, J. P., & Sharkey, T. D. (2005). Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiology*, *138*(4), 2280–2291. http://doi.org/10.1104/pp.105.061903.

Marchiori, P. E. R., Machado, E. C., & Ribeiro, R. V. (2014). Photosynthetic limitations imposed by self-shading in field-grown sugarcane varieties. *Field Crops Research*, *155*, 30–37. http://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.09.025.

Marquez, Y., Brown, J. W. S., Simpson, C., Barta, A., & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*, *22*(6), 1184–1195. http://doi.org/10.1101/gr.134106.111.

Mastrangelo, A. M., Marone, D., Laidò, G., De Leonardis, A. M., & De Vita, P. (2012). Alternative splicing: Enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. *Plant Science*, *185*:40–49. http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.09.006.

McClung, R. C. (2006). Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell*, *18*(4):792–803. http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004.

Mccormick, A. J., Cramer, M. D., & Watt, D. A. (2006). Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. New Phytol. 171(4):759-70. http://doi.org/ 10.1111/j.1469-8137.2006.01785.x.

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*(2). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040014.

Millar, A. J. (2004). Input signals to the plant circadian clock, *55*(395), 277–283. http://doi.org/10.1093/jxb/erh034.

Millar, A. J. (2016). The Intracellular Dynamics of Circadian Clocks Reach for the Light of

Ecology and Evolution. *Annual Review of Plant Biology*, *67*(1), annurev-arplant-043014-115619. http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115619.

Min, X. J., Powell, B., Braessler, J., Meinken, J., Yu, F., & Sablok, G. (2015). Genome-wide cataloging and analysis of alternatively spliced genes in cereal crops. *BMC Genomics*, *16*(1), 721. http://doi.org/10.1186/s12864-015-1914-5.

Ming, R., Liu, S. C., Lin, Y. R., Da Silva, J., Wilson, W., Braga, D., van Deynze, A., Wenslaff, T.F., Wu, K.K., Moore, P.H., Burnquist, W., Sorrells, M.E., Irvine, J.E., Paterson, A. H. (1998). Detailed alignment of Saccharum and Sorghum chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics*, *150*(4), 1663–1682.

Ming R, Moore PH, Wu K, D'Hont A, Glaszmann JC, Tew TL, Mirkov E, Silva J, Jifon J, Rai M, Schnell RJ, Brumbley SM, Lakshmanan P, Comstock JC, Paterson AH (2006). Sugarcane Improvement through Breeding and Biotechnology. Plant Breeding Reviews. J. Janick, 27.

Mizuno, N., Nitta, M., Sato, K., & Nasuda, S. (2012). A wheat homologue of PHYTOCLOCK 1 is a candidate gene conferring the early heading phenotype to einkorn wheat, (2012), 357–367. Genes Genet Syst. 87(6):357-67. http://doi.org/10.1266/ggs.87.357.

Mizuno, T., Kitayama, M., Takayama, C., & Yamashino, T. (2014). Insight into a Physiological Role for the EC Night-Time Repressor in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant and Cell Physiology*, *56*(9), 1738–1747. http://doi.org/10.1093/pcp/pcv094.

Moll, C., Von Lyncker, L., Zimmermann, S., Kägi, C., Baumann, N., Twell, D., Grossniklaus, U., Gross-Hardt, R. (2008). CLO/GFA1 and ATO are novel regulators of gametic cell fate in plants. *Plant Journal*, *56*(6), 913–921. http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03650.x.

Moore, P. (1995). Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem. *Australian Journal of Plant Physiology*, *22*(4), 661. http://doi.org/10.1071/PP9950661.

Murakami, M., Tago, Y., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2007). Comparative overviews of clock-

associated genes of Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. *Plant and Cell Physiology*, *48*(1), 110–121. http://doi.org/10.1093/pcp/pcl043.

Murphy, R. L., Klein, R. R., Morishige, D. T., Brady, J. A., Rooney, W. L., Miller, F. R., Dugas, D.V., Klein, P.E., Mullet, J. E. (2011). Coincident light and clock regulation of pseudoresponse regulator protein 37 (PRR37) controls photoperiodic flowering in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(39), 16469–16474. http://doi.org/10.1073/pnas.1106212108.

Nagano, A. J., Sato, Y., Mihara, M., Antonio, B. A., Motoyama, R., Itoh, H., Nagamura, Y., Izawa, T. (2012). Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. *Cell*, *151*(6), 1358–1369. http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.048.

Nagel, D., & Kay, S. (2012). Complexity in the Wiring and Regulation of Plant Circadian Networks. *Curr Biol*, *22*(16), R648–R657. http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.025.

Nakamichi, N., Matsushika, A., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2003). Cell Autonomous Circadian Waves of the APRR1 / TOC1 Quintet in an Established Cell Line of Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. 44(3):360-365. http://doi.org/10.1002/cam4.1016.

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. *The Plant Cell*, *22*(3), 594–605. http://doi.org/10.1105/tpc.109.072892.

Nakaya, H. I., Amaral, P. P., Louro, R., Lopes, A., Fachel, A.A., Moreira, Y.B., El-Jundi, T.A., da Silva, A.M., Reis, E. M., Verjovski-Almeida, S. (2007). Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. Genome Biol. *8*(3):R43. http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-3-r43.

Palusa, S. G., Ali, G. S., & Reddy, A. S. N. (2007). Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: Regulation by hormones and stresses. *Plant Journal*, *49*(6), 1091–1107. http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03020.x.

Para, A., Farré, E. M., Imaizumi, T., Pruneda-Paz, J. L., Harmon, F. G., & Kay, S. A. (2007). PRR3 Is a vascular regulator of TOC1 stability in the Arabidopsis circadian clock. *The Plant Cell*, *19*(11), 3462–73. http://doi.org/10.1105/tpc.107.054775.

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*(574), 574. http://doi.org/10.1038/msb.2012.6.

Poorter, H., Fiorani, F., Pieruschka, R., Putten, W. H. Van Der, Kleyer, M., & Schurr, U. (2016). Tansley review Pampered inside, pestered outside? Differences and similarities between plants growing in controlled conditions and in the field. New Phytol. 212(4): 838–855. http://doi.org/10.1111/nph.14243. 838–855.

Reddy, A. S. N., Marquez, Y., Kalyna, M., & Barta, A. (2013). Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *The Plant Cell*, *25*(10), 3657–83. http://doi.org/10.1105/tpc.113.117523.

Rhoades, M., & Carvalho, A. (1944). The Function and Structure of the Parenchyma Sheath Plastids of the Maize Leaf. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 71(4): 335–346. http://doi.org/10.2307/2481307.

Richards, C. L., Rosas, U., Banta, J., Bhambhra, N., & Purugganan, M. D. (2012). Genome-wide patterns of Arabidopsis gene expression in nature. *PLoS Genetics*, *8*(4). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002662.

Roig-villanova, I., & Martínez-garcía, J. F. (2016). Plant responses to vegetation proximity: a whole life avoiding shade. Front Plant Sci. 29;7:236. http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00236.

Rosloski, S. M., Singh, A., Jali, S. S., Balasubramanian, S., Weigel, D., & Grbic, V. (2013). Functional analysis of splice variant expression of MADS AFFECTING FLOWERING 2 of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, *81*(1–2):57–69.

http://doi.org/10.1007/s11103-012-9982-2.

Sato, Y., Antonio, B., Namiki, N., Motoyama, R., Sugimoto, K., Takehisa, H., Minami, H., Kamatsuki, K., Kusaba, M., Hirochika, H. Nagamura, Y. (2011). Field transcriptome revealed critical developmental and physiological transitions involved in the expression of growth potential in japonica rice. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 10. http://doi.org/10.1186/1471-2229-11-10.

Seo, P. J., Hong, S. Y., Kim, S. G., & Park, C. M. (2011). Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends in Plant Science*, *16*(10): 541–549. http://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.001.

Serrato, A., Barajas-Lopez, J., Chueca, A., & Sahrawy, M. (2009). Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants. J. Exp. Bot. 60 (10):2923-2931. http://doi.org/10.1093/jxb/erp066.

Severing, E. I., van Dijk, A. D. J., Morabito, G., Busscher-Lange, J., Immink, R. G. H., & van Ham, R. C. H. J. (2012). Predicting the impact of alternative splicing on plant MADS domain protein function. *PLoS ONE*, *7*(1). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030524.

Sheen, J. (1999). C4 gene expression. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 50:187-217. http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.187.

Simpson, C. G., Fuller, J., Maronova, M., Kalyna, M., Davidson, D., McNicol, J., Barta, A., Brown, J. W. S. (2007). Monitoring changes in alternative precursor messenger RNA splicing in multiple gene transcripts. *The Plant Journal*, *53*(6), 1035–1048. http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03392.x.

Staiger, D., & Brown, J. W. S. (2013). Alternative Splicing at the Intersection of Biological Timing, Development, and Stress Responses. *The Plant Cell*, *25*(10), 3640–3656. http://doi.org/10.1105/tpc.113.113803.

Stitt, M., & Quick, P. (1989). Minireview Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. Physiologia Plantarum, 77(4):633–642. http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05402.x.

Sugliani, M., Brambilla, V., Clerkx, E. J. M., Koornneef, M., & Soppe, W. J. J. (2010). The conserved splicing factor SUA controls alternative splicing of the developmental regulator ABI3 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *22*(6), 1936–46. http://doi.org/10.1105/tpc.110.074674.

Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., & Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing in plants - coming of age. *Trends in Plant Science*, *17*(10), 616–623. http://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.001.

Tai, P. Y. P., & Miller, J. D. (2002). Germplasm Diversity among Four Sugarcane Species for Sugar Composition. Crop Sci. 42:958–964. http://doi.org/10.2135/cropsci2002.0958.

Takahashi, N., Hirata, Y., Aihara, K., & Mas, P. (2015). A Hierarchical Multi-oscillator Network Orchestrates the Arabidopsis Circadian System. *Cell*, *163*(1), 148–159. http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.062.

Turner, A., Beales, J., Sebastien Faure, Dunford, R. P., & Laurie, D. A. (2005). The Pseudo-Response Regulator Ppd-H1 Provides Adaptation to Photoperiod in Barley. Science, 310(5750):1031-1034. http://doi.org/10.1126/science.1117619.

Vettore, A. L., Da Silva, F. R., Kemper, E. L., & Arruda, P. (2001). The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology*, *24*(1–4), 1–7. http://doi.org/10.1590/S1415-47572001000100002.

Wang, R., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., & Doebley, J. (1999). The limits of selection during maize domestication. Nature 398, 236-239. http://doi.org/10.1038/18435.

Yakir, E., Hilman, D., Harir, Y., & Green, R. M. (2007). Regulation of output from the plant circadian clock. FEBS J. 274(2):335-345. http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05616.x

Zeilinger, M. N., Farré, E. M., Taylor, S. R., Kay, S. a, & Doyle, F. J. (2006). A novel computational model of the circadian clock in Arabidopsis that incorporates PRR7 and PRR9. *Mol. Syst. Biol.*, *2*, 58. http://doi.org/10.1038/msb4100101.

Zhang, J. S., Arro, J., Chen, Y. Q., & Ming, R. (2013). Haplotype analysis of sucrose synthase gene family in three Saccharum species. *Bmc Genomics*, *14*, 314.

Zhang, Q., Hu, W., Zhu, F., Wang, L., Yu, Q., Ming, R., & Zhang, J. (2016). Structure, phylogeny, allelic haplotypes and expression of sucrose transporter gene families in Saccharum. *BMC Genomics*, *17*(1), 88. http://doi.org/10.1186/s12864-016-2419-6.

Zhang, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Li, D., Li, Q., Yue, M., Li, Q., Zhang, Y.E., Xu, Y., Xue, Y., Chong, K., Bao, S. (2011). Arabidopsis floral initiator SKB1 confers high salt tolerance by regulating transcription and pre-mRNA splicing through altering histone H4R3 and small nuclear ribonucleoprotein LSM4 methylation. *The Plant Cell*, *23*(1), 396–411. http://doi.org/10.1105/tpc.110.081356.

Zhu, X., Long, S. P., & Ort, D. R. (2008). What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? Curr. Opin. Biotechnol. 19(2):153-159. http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.004.

Lista de Anexos

A - Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Luíza Lane de Barros Dantas

Nascimento: Caicó (RN), 10 de janeiro de 1985.

EDUCAÇÃO

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo - SP, 2010.

Mestrado em Ciências (área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - RN, 2007.

Graduação - Bacharelado em Ciências Biológicas

Colégio Salesiano São José, Natal - RN, 2002.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Estágio de Pesquisa no Exterior modalidade BEPE – FAPESP para desenvolver o projeto *Unveiling the relationships among circadian clock, alternative splicing and sugarcane metabolism*, Dundee (Scotland – UK) 09 de outubro de 2015 a 08 de outubro de 2016.

PUBLICAÇÕES

Artigos Publicados

1. Brandao, Marcelo M; Dantas, Luiza LB; Silva-Filho, Marcio C. AtPIN: Arabidopsis thaliana Protein Interaction Network. BMC Bioinformatics. , v.10, p.454 - , 2009. doi: 10.1186/1471-2105-10-454.

Resumos Publicados Em Anais De Congressos

1. Dantas, LLB; SORTICA, D. A. ; LIMA, C. A. ; CHAVES, G. A. T. ; CARNEIRO, M. S. ; SOUZA, G. M. ; HOTTA, C. T. . Circadian and diurnal rhythms regulate the commercial sugarcane metabolism. In: 2nd BBEST Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference, 2014, Campos do Jordão. Anais 2nd BBEST Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference, 2014.

2. Carlos T. Hotta ; Luiza LB Dantas ; Daniel Sortica ; Cícero Alves Lima ; Gustavo A.T. Chaves . Circadian and diurnal rhythms regulate the commercial sugarcane metabolism. In: SEB - The Society for Experimental Biology, 2014, Manchester. SEB Plant Abstracts, 2014.

3. Dantas, LLB; SORTICA, D. A. ; CARNEIRO, M. S. ; SOUZA, G. M. ; HOTTA, C. T. . Diurnal rhythms of transcription in sugarcane. In: IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2013, Bento Gonçalves. Anais do IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2013.

4. SCARSO, M. E. ; Dantas, LLB ; BRANDAO, M. M. ; SILVA-FILHO, M. C. . Identification and characterization of a new escort protein involved in protein translocation to chloroplasts. In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Anais do 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

5. Brandao, Marcelo M ; Dantas, LL ; Silva-Filho, Marcio C . AtPIN: Arabidopsis thaliana Protein Interaction Network. In: 5th. International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2009, Angra dos Reis. 5th. International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2009.

6. Dantas, LLB; BARBOSA, A. E. ; MARINHO, P. . Análise da expressão de um gene para uma tiorredoxina-like de Eucalyptus por RT-PCR. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006.

7. Dantas, LLB; BARBOSA, A. E. ; MARINHO, P. . Análise da expressão de um gene para uma tiorredoxina-like de Eucalyptus por RT-PCR. In: 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Anais do 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006.

8. Dantas, LLB; SALES JUNIOR, R. ; MARINHO, P. . Identificação precoce do Papaya RingSpot Virus (PRSV) no por RT-PCR no mamoeiro. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2006, Natal. Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2006.

9. MEDEIROS, A. L. M. ; Dantas, LLB ; CABRAL, T. S. ; RABELO, L. M. A. ; MARINHO, P. . Clonagem e Análise in silico do Promotor do Gene TRXh2 (Tiorredoxina) de Nicotiana tabacum. In: 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Anais do 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006.

10. MEDEIROS, A. L. M. ; Dantas, LLB ; CABRAL, T. S. ; RABELO, L. M. A. ; MARINHO, P. . Clonagem e Análise in silico do Promotor do Gene TRXh2 (Tiorredoxina) de Nicotiana tabacum. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006.

11. Dantas, LLB; BARBOSA, A. E. ; CABRAL, T. S. ; MEDEIROS, A. L. M. ; RABELO, L. M. A. ; MARINHO, P. . Análise por RT-PCR da expressão de um gene de tiorredoxina h de cana-de-açúcar. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia. Anais do 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005.

12. RABELO, L. M. A. ; BARBOSA, A. E. ; Dantas, LLB ; CABRAL, T. S. ; MEDEIROS, A. L. M. ; MARINHO, P. . Identificação e Expressão in silico do Sistema Tiorredoxina em Eucalyptus. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia. Anais do 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005.

13. CABRAL, T. S. ; Dantas, LLB ; MEDEIROS, A. L. M. ; RABELO, L. M. A. ; MARINHO, P. . Experimentos Preliminares de Clonagem de Genes que

Codificam Tiorredoxinas Citoplasmáticas em cana-de-açúcar. In: XVI Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2005, Natal. Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2005.

14. Dantas, LLB; MACEDO, F. P. ; SALES JUNIOR, R. ; MARINHO, P. . Caracterização e Diagnóstico Molecular das Viroses do Mamoeiro Causadas pelos Agentes PRSV, PMeV e PMV. In: XVI Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2005, Natal. Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2005.

15. Dantas, LLB; BARBOSA, A. E. ; MACEDO, F. P. ; SALES JUNIOR, R. ; MARINHO, P. . Detecção precoce do vírus da mancha anelar (Papaya Ringspot Virus) por RT-PCR em plantas de Carica papaya. In: 50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004, Florianópolis. Anais do 50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004.

16. Dantas, LLB; MARINHO, P. . Detecção do ?Papaya Meleira Virus? em plantas de Carica papaya no Nordeste brasileiro. In: XV Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2004, Natal. Anais do XV Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2004.