

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO FATOR DE  
TRANSCRIÇÃO *SHINE* E SEU POTENCIAL COMO  
REGULADOR MASTER NA SÍNTESE DE PAREDE  
CELULAR SECUNDÁRIA EM *Sorghum bicolor* L.**

**Natália Gonçalves Takahashi**

Bacharel em Biotecnologia

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO FATOR DE  
TRANSCRIÇÃO *SHINE* E SEU POTENCIAL COMO  
REGULADOR MASTER NA SÍNTESE DE PAREDE  
CELULAR SECUNDÁRIA EM *Sorghum bicolor* L.**

**Natália Gonçalves Takahashi**

**Orientador: Prof. Dr. Dilermando Perecin**

**Co-orientadores: Dr. Michael dos Santos Brito**

**Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

**2017**

T136c Takahashi, Natália Gonçalves  
Caracterização molecular do Fator de Transcrição *SHINE* e seu potencial como regulador master na síntese de parede celular secundária em *Sorghum bicolor* L. / Natália Gonçalves Takahashi. -- Jaboticabal, 2017  
x, 78 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientadora: Dilermando Perecin  
Banca examinadora: Michael dos Santos Brito, Elisson Antônio da Costa Romanel, Luciana Rossini Pinto  
Bibliografia

1. Etanol 2G. 2. Fator de Transcrição. 3. SHINE. 4. Sorgo. 5. Parede Secundária. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:661.723

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO SHINE E SEU POTENCIAL COMO REGULADOR MASTER NA SÍNTESE DE PAREDE CELULAR SECUNDÁRIA EM *Sorghum bicolor*

AUTORA: NATÁLIA GONÇALVES TAKAHASHI

ORIENTADOR: DILERMANDO PERECIN

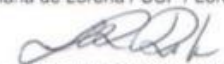
COORIENTADOR: MICHAEL DOS SANTOS BRITO

COORIENTADORA: SILVANA APARECIDA CRESTE DIAS DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

  
Pesquisador Dr. MICHAEL DOS SANTOS BRITO  
Laboratório de Biotecnologia / IAC - Ribeirão Preto/SP

  
Prof. Dr. ELISSON ANTÔNIO DA COSTA ROMANEL  
Escola de Engenharia de Lorena / USP / Lorena/SP

  
Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO  
Laboratório de Biotecnologia / IAC / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 05 de junho de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**NATÁLIA GONÇALVES TAKAHASHI** – nascida em 09 de outubro de 1990 em Barretos (SP), Brasil, iniciou o curso de Bacharelado em Biotecnologia no ano de 2010, na Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias – Campus Araras. Durante a graduação estagiou no Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA da RIDESA/UFSCar). Executou o estágio curricular obrigatório na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo/Piracicaba sob a supervisão do pesquisador Dr. Carlos Alberto Labate no ano de 2013. Em 2014 recebeu o grau de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos. Em março de 2015 ingressou na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o curso.

“A leitura torna o homem completo, a conversação o torna  
ágil e o escrever lhe dá precisão.”  
Francis Bacon

“Dedico aos meus mestres.  
Deus, Família e Professores.”

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP - Jaboticabal), pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Ao Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, em Ribeirão Preto - SP, pelo auxílio para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Dilermando Perecin, pela orientação e por confiar em mim, me apresentando aos meus co-orientadores Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza e Dr. Michael dos Santos Brito.

À Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia, no qual encontrei o suporte necessário para realização dos meus experimentos.

Ao Dr. Michael dos Santos Brito, por todo conhecimento dividido, por todas as dúvidas esclarecidas, por ser paciente e amigo em todos os momentos, pela confiança ofertada e por ser o melhor “co-orientador orientador” que poderia existir.

À Dra. Paula Macedo Nobile pela amizade e ensinamentos.

Aos doutores, Larissa Mara Andrade, Alexandre Palma Boer Martins e Maria Natália Guindalini Melloni, e às amigas Izadora Farina Pastore e Jéssica Freira pela amizade e por todo socorro a mim prestado quando necessário.

Ao Dr. Erich Grotewold e ao Center for Applied Plant Sciences (CAPS – The Ohio State University) por nos cederem espaço e “know-how” para realizar alguns de nossos experimentos.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (USP – Ribeirão Preto) e em especial a Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman pela ajuda na execução inicial do experimento com Western blot.



Ao LMMC (USP – Ribeirão Preto) e a Ma. Elizabete Rosa Milani pela ajuda com as análises de localização subcelular.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pela ajuda com as discussões do trabalho.

Aos amigos de pós-graduação João, Renan, Luana e Thiago pelo companheirismo nas disciplinas e por tornarem menos maçante o tempo de viagem de Ribeirão Preto a Jaboticabal todos os dias.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia, Fernanda, Juliana, Lúcia, Luis, Maicon, Marta, Raquel, Thaís e William, pela atenção que disponibilizaram durante meus dias no laboratório.

A Ma. Marina Lyra Soriano Saleme e ao Paulo Henrique por toda ajuda que me foi dada no projeto.

Aos demais pesquisadores e funcionários do Centro de Cana, por contribuírem de alguma forma com minha pesquisa.

Aos professores da Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp – Jaboticabal, pelo conhecimento passado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às amigas Camille Antequera Valente, Ana Sílvia de Almeida Scarcella, Letícia Paula Magalhães Silva e Larissa Mara de Andrade e a minha prima Letícia Kitagawa por proporcionarem um lar para mim em Ribeirão Preto, por me apoiarem, pelas histórias divididas, por me fazerem sair da rotina estressante, por me ouvirem e me ajudar sempre que preciso, mesmo quando eu fui orgulhosa e não quis pedir socorro.

À minha família amada, tios e primos, por sempre estarem presente, por se mostrarem orgulhosos de minhas conquistas (o que me faz sempre buscar mais), por tentar entender o que eu estudo, por não perguntarem se eu não iria começar a trabalhar.

Às minhas avós, vó Zilda e vó Rosa, das quais sinto muitas saudades e sei que estariam felizes e orgulhosas por verem minhas conquistas.

Ao meu irmão, Vitor Gonçalves Takahashi, por sempre ser meu espelho, meu exemplo, mesmo sendo o mais novo. Obrigada pela vida maravilhosa que você me proporcionou ao nascer, pelas brincadeiras de infância, pelas cantorias na

adolescência, e pela amizade de toda vida. Obrigada por ser o melhor e mais orgulhoso irmão que eu poderia ter tido.

Aos meus pais, José Akira Takahashi e Lair Donizete Gonçalves Takahashi, por todo amor ofertado incondicionalmente, pela proteção, pelo apoio, conselhos e broncas quando necessário. Obrigada por me ajudarem a levantar quando eu cai, e a me ensinarem desde os meus primeiros passos até hoje, por sempre me darem motivos para querer ser alguém da qual vocês pudessem se orgulhar. Agradeço por tudo que são e representam em minha vida, sem vocês eu nada seria.

Obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Etanol de Segunda Geração .....	5
2.2 Parede Celular Vegetal .....	6
2.3 Fatores de Transcrição e a Parede Celular Secundária.....	10
2.4 O Fator de Transcrição SHINE .....	13
2.5 Sorgo.....	16
3. OBJETIVOS .....	18
3.1 Gerais.....	18
3.2 Específicos .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Material Vegetal .....	19
4.1.1 <i>Sorghum bicolor</i> .....	19
4.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i> para análise de localização subcelular .....	19
4.2 Coleta dos Materiais.....	20
4.3 Análises de bioinformática .....	21
4.3.1 Análises Filogenéticas.....	21
4.3.2 Análise <i>in silico</i> da expressão gênica.....	22
4.4 Obtenção do DNA complementar (cDNA).....	22
4.4.1 Preparo do material para extração de RNA .....	22
4.4.2 Extração de RNA total.....	23

4.4.3 Tratamento com DNase.....	23
4.4.4 Síntese de cDNA.....	23
4.5 Clonagem do gene <i>SbSHN1</i> .....	24
4.5.1 Desenho dos “primers” .....	24
4.5.2 Amplificação da Sequência desejada.....	24
4.5.2 Ligação do fragmento amplificado no pENTR™/D-TOPO®(Invitrogen).....	25
4.5 Produção do anticorpo antiSNH.....	27
4.6 Expressão Heteróloga da Proteína <i>SbSHN</i> .....	27
4.6.1 Recombinação com o vetor de Expressão.....	27
4.6.2 Transformação e Indução da Expressão em <i>E. coli</i> .....	28
4.6.3 Lise bacteriana para liberação das proteínas.....	29
4.6.4 Gel SDS-PAGE .....	29
4.6.5 Predição da massa proteica.....	30
4.7 Teste do anticorpo antiSHN .....	30
4.7.1 Transferência para Membrana e “Western blot” .....	30
4.7.2 Revelação da Membrana .....	31
4.8 Expressão transiente do gene <i>SbSHN</i> fusionado à GFP .....	31
4.8.1 Recombinação com o vetor de destino .....	31
4.8.2 Transformação em <i>E. coli</i> .....	32
4.8.3 Transformação em <i>Agrobacterium</i> .....	33
4.8.4 Agroinfiltração de folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	33
4.8.5 Microscopia Confocal das folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	33
4.9 Análise do Perfil de Expressão de <i>SbSHN1</i> e <i>SbSHN2</i> .....	34
4.9.1 Desenho dos “primers” .....	34
4.9.2 PCR em tempo real (qPCR).....	35
4.9.3 Análise dos dados.....	35

4.10	Imunoprecipitação de Cromatina.....	36
4.10.1	Imunoprecipitação de Cromatina de Inflorescência de sorgo.....	36
4.10.2	Análise de bioinformática .....	38
4.10.3	Desenho dos “primers” .....	38
4.10.4	Determinação de alvos de <i>SbSHN</i> em sorgo por CHIPqPCR.....	39
4.10.5	Análise dos dados .....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1	Análises bioinformáticas.....	41
5.2	Clonagem do gene <i>SbSHN</i> .....	46
5.3	Expressão heteróloga da proteína SHN e análise de especificidade do anticorpo antiSHN .....	47
5.4	Localização Subcelular de <i>SbSHN</i> .....	49
5.5	Análise do Perfil de Expressão do gene <i>SbSHN</i> em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do sorgo .....	51
5.6	Determinação dos prováveis genes-alvos de <i>SbSHN</i> em sorgo .....	54
6.	CONCLUSÕES .....	58
7.	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE A.....	69
	APÊNDICE B.....	74
	APÊNDICE C .....	77

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *SHINE* E SEU  
POTENCIAL COMO REGULADOR MASTER NA SÍNTESE DE PAREDE  
CELULAR SECUNDÁRIA EM *Sorghum bicolor* L.**

**RESUMO-** A busca pela diversificação de fontes da matriz energética, priorizando fontes renováveis, acarreta no maior consumo de etanol de primeira geração, podendo este ser insuficiente em suprir a necessidade da frota brasileira. Dessa forma, o etanol de segunda geração (E2G) surge como uma alternativa para aumento da produção de combustíveis renováveis. Ele é produzido a partir da fermentação dos resíduos de glicose após a quebra da celulose presente na biomassa vegetal. Contudo, além da celulose, a biomassa vegetal é também composta pela lignina, composto considerado recalcitrante no processo de obtenção deste tipo de etanol. Para transpor este obstáculo, é necessário encontrar maneiras de diminuir a quantidade ou modificar a composição da lignina. Fatores de transcrição (FTs) são alvos altamente promissores para a modificação deste polímero, uma vez que estão envolvidos com a regulação de sua via de biossíntese, bem como, da formação de toda parede celular secundária (PCS). Plantas de arroz transformadas para a superexpressão de *AtSHN2* de *Arabidopsis*, apresentaram uma diminuição na quantidade de lignina e mostraram uma modulação na via de celulose, enquanto que a superexpressão do outro gene *SHN* de *Arabidopsis* (*AtSHN1*) em *Arabidopsis* apresentou uma modificação na via de biossíntese de cera e cutina. Isto ressalta a necessidade de avaliar os FTs de maneira espécie-específica. Assim sendo, este trabalho vem com o objetivo de ajudar a elucidar os mecanismos de funcionamento do FT *SHINE* (SHN), considerado um potencial regulador da PCS em gramíneas. Para a caracterização do FT *SbSHN* em sorgo foi primeiramente realizado um alinhamento de sequências de aminoácidos, contendo as proteínas codificadas pelos dois genes *SHN* em sorgo (*SbSHN1* – *Sb04g006970* e *SbSHN2* – *Sb10g023600*) com outras sequências SHN disponíveis na literatura. Em seguida foi gerada uma árvore filogenética contendo todos esses mesmos SHN. Após isso, foi realizada a clonagem do FT *SbSHN1* em vetor comercial pENTR/D-TOPO (Invitrogen), após verificação, a sequência foi recombinada com vetores de destino. Primeiramente, com o vetor pDEST15 para a expressão heteróloga da proteína SHN em *E. coli*. De maneira complementar foi produzido um peptídeo sintético para reconhecimento da proteína *SbSHN* (anticorpo antiSHN). Posteriormente foi produzido um vetor contendo a sequência de SHN em fusão com GFP, que foi utilizado para agroinfiltração de folhas de *N. benthamiana*, a fim de observar a localização subcelular do FT *SbSHN*. Para determinação da expressão através de qPCR em sorgo foram utilizados a folha, dividida em base e ponta, e a inflorescência, imatura e madura. Além disso, foi realizada a imunoprecipitação de cromatina (ChIP) das inflorescências imaturas e maduras de sorgo, com posterior análise inicial por ChIPqPCR para validação de alguns alvos de *SbSHN*. Como resultados, através da expressão heteróloga foi produzida uma proteína com massa de aproximadamente 52kDa (massa da proteína SHN adicionada de cauda GST),

que foi reconhecida pelo anticorpo antSHN produzido. Foi confirmada a presença do FT *SbSHN* no núcleo celular, através de observação das folhas transformadas por agroinfiltração. As inflorescências imaturas de sorgo apresentaram maior expressão tanto de *SbSHN1* quanto de *SbSHN2*. Com a técnica de ChIPqPCR foi possível validar *in vivo* os alvos *SbNAC91* (*Sb07g001550*), *SbNAC115* (*Sb10g000460*), *SbMYB87* (*Sb07g024970*) e *SbMYB60* (*Sb04g031110*) do FT *SbSHN* em sorgo. Em uma perspectiva de longo prazo, acredita-se que o conhecimento obtido a partir destes estudos não só fornecerão informações importantes sobre a função dos reguladores *SHN* em todo o reino vegetal, mas também fornecer uma poderosa ferramenta para a engenharia metabólica de compostos fenólicos e lignina por meio de melhoramento convencional ou abordagens transgênicas, impactando diretamente sobre a produção de E2G.

**Palavras-chave:** Etanol 2G, Fator de transcrição, *SHINE*, Sorgo, Parede secundária

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE *SHINE* TRANSCRIPTION FACTOR AND ITS POTENTIAL AS MASTER REGULATOR IN THE SECONDARY CELLULAR WALL SYNTHESIS IN *Sorghum bicolor* L.

**ABSTRACT-** The search for alternative sources of the energy, prioritizing renewable sources, increase the consumption of first generation ethanol, which could not be enough to supply the needs of the Brazilian flex fuel car fleet. In this scenario, second generation ethanol (E2G) appears as an alternative to increase production of renewable fuels. E2G it is produced from the fermentation of glucose residues after breaking the cellulose present in the plant biomass. However, adhered to the cellulose is lignin, a compound considered recalcitrant in the process of obtaining this type of ethanol. To overcome this obstacle, it is necessary to find ways to decrease the amount or modify the lignin composition. Transcription factors (TFs) are highly promising targets for the modification of this polymer, since they are involved in the regulation of its biosynthesis pathway, as well as the formation of the whole secondary cell wall (PCS). Rice plants transformed for the overexpression of *AtSHN2* from *Arabidopsis* showed a decrease in the amount of lignin and a modulation of cellulose pathway whereas the overexpression of another gene of *SHN* (*AtSHN1*) in *Arabidopsis* showed a modification in the biosynthesis pathway of wax and cutin. This highlights the need to evaluate TFs in a species-specific manner. Basing on this, the present work has the objective of helping to elucidate the mode of action of TF *SHINE* (*SHN*), considered a potential regulator of PCS in grasses. Aiming to characterize *SbSHN* TF in sorghum, initially an alignment was performed using amino acid sequence of proteins encoded by the two *SHN* genes in sorghum (*SbSHN1* - Sb04g006970 and *SbSHN2* - Sb10g023600) with other *SHN* sequences available in the literature. Then a phylogenetic tree containing all these *SHN* sequences was generated. After that, the *SbSHN1* FT was cloned into commercial vector pENTR / D-TOPO (Invitrogen) and later used to recombine in different destination vectors using gateway system. First, the vector pDEST15 was used for the production of heterologous expression in *E. coli*. Complementary, a synthetic peptide was produced for recognition of the *SbSHN* protein (anti*SHN* antibody). In parallel, the vector pK7WGF2 was used to obtain *SHN* phusioned to GFP. This vector was transiently expressed in leaves of *N. benthamiana* in order to observe the subcellular location of *SbSHN* TF. Complementary, to determine the expression through qPCR, sorghum leaves, were splitted in base and tip, and the inflorescence, in immature and mature developmental stages, were used. In addition, chromatin immunoprecipitation (ChIP) of immature and mature sorghum inflorescences was performed, with initial analysis by ChIPqPCR for validation of some *SbSHN* targets. As results, through heterologous expression, a protein with mass of approximately 52kDa (mass of the *SHN* protein added with GST tail) was obtained, which was recognized by the anti*SHN* antibody produced. The presence of *SbSHN* TF in the cell nucleus was confirmed by observation of the transformed leaves by agroleakage. The immature inflorescences of sorghum presented higher expression level of both *SbSHN1* and *SbSHN2* genes. With the ChIPqPCR technique it was possible to validate *in vivo* some *SHN* targets such as: *SbNAC91* (*Sb07g001550*), *SbNAC115* (*Sb10g000460*), *SbMYB87* (*Sb07g024970*) and *SbMYB60* (*Sb04g031110*) in sorghum.



In a long-term perspective, we believe that the knowledge gained from these studies will not only provide important information about the function of SHN as a master regulators throughout the plant kingdom, but also provide a powerful tool for the metabolic engineering of phenolic compounds and lignin using conventional breeding or transgenic approaches, directly impacting the production of E2G.

**Keywords:** 2G Ethanol, Transcription factor, SHINE, Sorghum, Secondary wall

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA – DNA complementar  
C<sub>f</sub> – Concentração final  
ChIP – Imunoprecipitação de Cromatina  
DBD – Domínio de Ligação ao DNA  
E2G – Etanol de Segunda Geração  
EMSA - Electrophoretic mobility shift assay  
ERF – Fatores Responsivos a Etileno  
FT – Fator de Transcrição  
FTs – Fatores de Transcrição  
RRG – Redes Reguladoras de Genes  
NIB – Tampão Isolador de Núcleo  
NIBA – Tampão Isolador de Núcleo + PIC  
PIC – Coquetel Inibidor de Protease  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PCS – Parede Celular Secundária  
RRGs - Redes Reguladoras de Genes  
*SHN* – *SHINE*  
qPCR – PCR quantitativo  
q.s.p. – quantidade suficiente para  
Y1H - Yeast1-hybrid

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fenótipos apresentados por plantas com genes modificados que codificam enzimas da via de biossíntese de lignina baseado em (YOON; CHOI; NA, 2015).....	9
Tabela 2 - Resumo dos diferentes fenótipos encontrados em trabalhos realizados com o gene SHN em diferentes organismos e a partir de diferentes abordagens. ....	14
Tabela 3 – “Primers” utilizados na reação de amplificação para clonagem do gene <i>SbSHN1</i> . ....	24
Tabela 4 - Sequência de “primers” utilizados para o experimento de qPCR ..	35
Tabela 5 Possíveis alvos de regulação de <i>SHN</i> em sorgo. ....	38
Tabela 6 Sequencia de “primers” utilizados para ChIPqPCR .....	39
Tabela 7 - Predição de epítomos a partir de peptídeos sintéticos utilizados para a produção de um anticorpo antiSHN. ....	48
Tabela 8 Análise “in silico” para identificar a localização subcelular da proteína <i>SbSNH1</i> (SHEN;CHOU, 2007).....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Abordagens de mapeamentos RRG (Modificado de MEJIA-GUERRA et al., 2012). .....	12
Figura 2 Planta de sorgo em estágio V5, ou seja, que apresentam cinco folhas já completas (com lígula visível). Seta preta indica a folha coletada.....	20
Figura 3 Amostras utilizadas: (A) quarta folha de sorgo em estágio V5 (Base e Ponta) e (B) Inflorescência [Imatura (esquerda) e Madura (Direita)]. .....	21
Figura 4 Vetor de entrada pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO®. ....	26
Figura 5: Vetor de Expressão em <i>E. coli</i> .....	28
Figura 6 Vetor de proteínas de fusão pK7WGF2 (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002) .....	32
Figura 7 Alinhamento de proteínas SHN e seus similares mais próximos em diferentes plantas. ....	42
Figura 8 Árvore filogenética de FTs <i>SHN</i> AP2/ERF. ....	43
Figura 9 Padrão de expressão por análise de RNA-Seq dos genes (A) <i>SbSHN1</i> e (B) <i>SbSHN2</i> (DUGAS et al., 2011). ....	44
Figura 10 Padrão de expressão indicado no banco de dados The Bio-Analytic Resource for Plant Biology (BAR) (LI et al., 2010). ....	45
Figura 11 Estrutura dos genes <i>SbSHN</i> . ....	45
Figura 12 Análise do produto de PCR amplificando a sequência codificadora do gene <i>SbSHN1</i> , em gel de agarose 1% através de eletroforese. M: Marcador de peso molecular (100pb); CN – Controle Negativo. Seta indica fragmento amplificado do gene contendo 646 pb (642 nucleotídeos do gene mais a “tag” CACC). ....	46
Figura 13 Eletroforese em gel de agarose. ....	47
Figura 14 Expressão heteróloga da proteína SHN e teste do anticorpo antiSHN. ....	49
Figura 15 Determinação da localização subcelular da proteína <i>SbSHN</i> . ....	51
Figura 16 Análise de expressão dos genes <i>SbSHN</i> . ....	53

Figura 17 Determinação da presença de sítios para a ligação do FT SHN em seus respectivos alvos de sorgo. ....	55
Figura 18 Análise por ChIPqPCR de quatro genes alvos ( <i>SbMYB87</i> , <i>SbMYB60</i> , <i>SbNAC115</i> e <i>SbMYB91</i> ) de <i>SbSHN</i> de amostras INPUT, amostras imunoprecipitadas com SORO e com anticorpo antiSHN. ....	56

## 1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é considerada uma das principais fontes de matéria orgânica do planeta, apresentando como vantagem a facilidade de obtenção e grande abundância na natureza (MCKENDRY, 2002). Os materiais lignocelulósicos são compostos, principalmente, por três diferentes polímeros associados entre si: celulose, hemicelulose e lignina (MCKENDRY, 2002). Dentre esses, a lignina é considerada um dos principais problemas para a produção de etanol lignocelulósico também conhecido como etanol de segunda geração (E2G) (CHEN; DIXON, 2007). A lignina encontra-se aderida à celulose na parede celular (PC), dificultando a ação das enzimas, além disso, após ocorrer sua hidrólise, são liberados compostos fenólicos que juntamente com ácidos fracos e derivados de furano promovem uma inibição na etapa de fermentação, diminuindo o crescimento e a produtividade dos microrganismos por interferir na duplicação do DNA e causar mutações (SIQUEIRA, 2015), acarretando um menor rendimento na produção de etanol (PALMQVIST; HAHN-HÄDERGAL, 2000). Os monolignóis: cumarílico (H), coniferílico (G) e sinapílico (S) são álcoois que se polimerizam de diferentes maneiras, mediante ação de lacases e peroxidases, dando origem às diversas formas de lignina (MONTEIRO; PEREIRA; ABREU, 2004; AZADI et al., 2013). Chen e Dixon (2007) demonstraram que ao silenciar genes que codificam as enzimas participantes da via de biossíntese de lignina, há uma diminuição do teor de lignina que supera efetivamente a recalcitrância da PC à bioconversão. Contudo, Yoon, Choi e An (2015) afirmam que essas alterações afetam o desenvolvimento da planta. Muitos autores, ao suprimirem genes de biossíntese de lignina obtiveram como resultados fenótipos anormais tais como xilema colapsado, mudança de coloração, colmo flexível e retardo de crescimento (LI et al., 2009; SCHILMILLER et al., 2009; GUI et al., 2011; XU et al., 2011; SABALLOS et al., 2012). Por outro lado, alguns transgênicos mostraram produzir quase o dobro de açúcar proveniente do processo de sacarificação de PCs contra aquelas do tipo selvagem, de forma que a modificação da lignina poderia evitar a necessidade de pré-tratamento ácido e assim facilitar a consolidação do bioprocesso (CHEN; DIXON, 2007). Para se conseguir tal

objetivo é essencial o conhecimento da via de biossíntese de lignina bem como de genes que controlam toda a regulação da via, como os FTs. FTs vêm sendo utilizados para a melhor compreensão das vias biossintéticas que levam à formação da PCS (ZHAO; DIXON, 2011; GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012; HUSSEY et al., 2013) e para produção de plantas transformadas (YANG et al., 2012; MARTINS, 2017). No trabalho de Yang et al. (2012) foram geradas plantas saudáveis com redução da biossíntese de lignina em vasos (trocando o promotor da enzima C4H pelo promotor do FT VND6) e também plantas com um aumento do espessamento da PC (colocando o gene do FT NST1 sob indução do promotor do gene IRX8), obtendo-se uma maior produção de açúcares após sacarificação. Martins (2017) transformou plantas de arroz com o FT *ShSHN* (*SHN* de cana-de-açúcar) obtendo plantas com maior teor de biomassa e menor teor de lignina, com um aumento significativo no processo de sacarificação.

Nos últimos anos tem ocorrido um grande progresso no que se diz respeito à existência de uma complexa rede hierárquica de regulação de FTs e a síntese de PCS (CASSAN-WANG et al., 2013). FTs MYB- relacionados de *Antirrhinum majus*, popular boca-de-leão, foram superexpressos em tabaco, sendo tal família conhecida, até então, por regularem diferentes ramos do metabolismo flavonóide em plantas, porém acreditava-se que poderiam desempenhar papéis mais amplos na regulação do metabolismo de fenilpropanóides. Os genes *AmMYB308* e *AmMYB330*, ao serem superexpressos, reprimiram o metabolismo do ácido fenólico e a biossíntese de lignina, comprovando tal teoria (TAMAGNONE et al., 1998). A partir deste ponto, muitos outros FTs foram descritos e caracterizados em diversas espécies, com atenção especial para *Arabidopsis* (GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012; CESARINO et al., 2016).

Atualmente, acredita-se que a regulação da PCS envolva três níveis hierárquicos com FTs das famílias NAC (1º nível) sendo seguidos por membros da família MYB (2º e 3º níveis de regulação), sendo que, alguns destes FTs possuem função espécie-específica [para mais detalhes (GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012; HANDAKUMBURA; HAZEN, 2012)]. Apesar deste modelo já estabelecido, um novo FT surge como potencial regulador de toda a PCS, o FT *SHINE* (*SHN*).

O FT *SHN* pertence à família de FTs AP2/ERF (Fator Responsivo ao Etileno), e ao clado SHINE/WAX INDUCER (SHN/WIN) (AHARONI et al., 2004;). Em *Arabidopsis*, foram caracterizados por Broun et al. (2004) e Aharoni et al. (2004) três representantes desta subfamília: o *AtSHN1*, o *AtSHN2* e o *AtSHN3*, tendo o *AtSHN1* a função de síntese de cera na cutícula das folhas, o que dá a elas um aspecto brilhoso, o que explica o nome posteriormente dado ao gene (AHARONI et al., 2004). Aharoni et al. (2004) notaram que a superexpressão de *SHN* também alterava a estrutura epidérmica das folhas, o número de tricomas, ramificações e estômato, contribuindo assim para a tolerância à seca.

Com o intuito de aumentar a tolerância à seca em uma espécie de interesse agrônômico, Ambavaram et al. (2011) superexpressaram o gene *AtSHN2* de *Arabidopsis* em arroz (*Oryza sativa*, uma monocotiledônea). Ao contrário do esperado, os autores observaram plantas transgênicas com fenótipo distinto do observado em *Arabidopsis*, apresentando um aumento significativo de celulose, enquanto que a quantidade de lignina, por sua vez, diminuiu, sem qualquer relação com a síntese de cera ou cutina. Os autores também avaliaram se o homólogo de *AtSHN2* em arroz (*Os06g40150*) possuía associação com as vias de PC, a qual foi confirmada por estudos de coexpressão e posteriormente validadas através de análise de PCR quantitativo (qPCR).

FTs ERF são conhecidos por possuir afinidade a sítio de reconhecimento (DBD – Domínio de Ligação ao DNA) descrito como motivos GCC Box ([AG]CCGNC) na região promotora dos genes alvos (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995; NAKANO et al., 2006). Tais sítios de ligação de FTs podem ser utilizados na busca por genes alvos de um determinado FT, através da técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), uma técnica poderosa realizada *in vivo* (WEI et al., 2006).

Embora existam muitos estudos envolvendo a análise de FTs na síntese de PCS em dicotiledôneas, pouco se sabe sobre sua ação em monocotiledôneas de grande importância agrônômica (AMBAVARAM et al., 2011; HANDAKUMBURA; HAZEN, 2012; CESARINO et al., 2016), como a cana-de-açúcar, milho e sorgo.

*Sorghum bicolor*, popularmente conhecido como sorgo, é uma gramínea de origem africana da família Poaceae. Esta gramínea se espalhou rapidamente pelos



continentes asiáticos, europeu e australiano, bem como por demais países devido a características como alta adaptabilidade, versatilidade e rusticidade. Apresenta uma ótima opção para minimizar a ociosidade da indústria de cana-de-açúcar, podendo ocupar espaço na entressafra da cultura (SANTOS et al, 2015). Desta forma, tem sido considerada uma excelente opção para diversas regiões, tendo o potencial de se consolidar como um importante fornecedor de energia renovável, em um período de tempo relativamente curto.

Este trabalho está inserido no projeto de Jovem Pesquisador intitulado "Identificação de genes alvos regulados pelo FT SHINE em monocotiledôneas", fomentado pela FAPESP 2014/08468-4, do Dr. Michael dos Santos Brito. Buscando entender melhor o FT SHN, objetivou-se identificar seus alvos através da realização de experimentos de CHIP em sorgo, milho e cana-de-açúcar.

No presente estudo, utilizou-se o sorgo como modelo para o melhor entendimento do FT *SHN*, uma vez que essa espécie apresenta dois diferentes genes (*SbSHN1: Sb04g006970* e *SbSHN2: Sb10g023600*). Foram comparados os níveis de expressão de *SbSHN1* e *SbSHN2* em diferentes tecidos, a fim de identificar onde estavam sendo mais expressos e a partir destes foi realizado a imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e posterior ChIPqPCR para detectar possíveis alvos de *SHN* em sorgo. Em uma perspectiva a longo prazo, almeja-se que o conhecimento derivado desses estudos não só irão fornecer informações importantes sobre a função dos reguladores *SHN* em todo o reino vegetal, mas também fornecer uma ferramenta poderosa para a engenharia metabólica de fenólicos e compostos de lignina para melhoramento tradicional ou através de transgenia, com o subsequente impacto na produção de E2G.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Etanol de Segunda Geração

Atualmente há um interesse mundial na criação de novas estratégias para aumentar a produção e o consumo de combustíveis de fontes renováveis. No Brasil, por exemplo, o consumo de derivados do petróleo decresceu 0,2% no ano de 2013 (Ministério de Minas e Energia - BEN, 2014). O alto custo para produção da gasolina, uma futura possível escassez das reservas petrolíferas, além do aumento da conscientização social pela preservação ambiental, estão entre os motivos para tais mudanças (HIMMEL et al., 2007).

O etanol possui características, como um elevado teor de oxigênio, cerca de 35% em massa de etanol, que possibilita uma combustão mais limpa, além de melhorar o desempenho dos motores, resultando em uma menor emissão de poluentes (SILVA, 2010). Assim, faz-se uso de biocombustíveis, para substituição dos combustíveis fósseis, diminuindo a dependência por recursos não renováveis.

O etanol de primeira geração (E1G), obtido principalmente através de milho e do caldo de cana-de-açúcar é considerado, até o presente momento, a única fonte com capacidade de suprir a alta demanda por energia renovável de baixo custo e de baixo poder poluente (SANTOS et al., 2012).

As principais matérias-primas utilizadas para a produção do etanol são sacarinas ou amiláceas, respectivamente cana-de-açúcar no Brasil e milho nos Estados Unidos da América (SANTOS et al., 2012). Apesar de suprirem o mercado atual, há um crescente esforço da comunidade científica para desenvolver técnicas para que sejam utilizados os resíduos da biomassa, como a componente lignocelulósica, para a produção de E2G (ZHENG et al., 2009).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (OGATA, 2013). A lignina, que está aderida à celulose na PC, corresponde a um dos principais problemas para a produção de etanol lignocelulósico (ALVES; MACRI, s.d.; CHEN; DIXON, 2007). Ela age naturalmente como uma barreira, protegendo a planta contra agentes externos. Entretanto, ela

dificulta o acesso das enzimas ao substrato (celulose e hemicelulose) gerando baixos rendimentos de açúcares na hidrólise enzimática (MORO, 2015).

Segundo a Raízen (2014), o E2G apresenta como benefício o aproveitamento dos subprodutos do E1G, além da redução na emissão de carbono. Dessa forma, o E2G pode aumentar a produção de etanol em até 50% sem a expansão da área de cultivo. É importante frisar que a composição do produto final é idêntica à do E1G, de modo que as diferenças entre os dois é a matéria-prima utilizada e o processo produtivo (RAÍZEN, 2014). Além das vantagens apresentadas acima, a produção de E2G não compete com a produção de alimentos e com o cultivo de terras agrícolas, pois os materiais lignocelulósicos estão disponíveis de forma abundante e barata, e muitas vezes são considerados resíduos (MORO, 2015).

A rota tecnológica resume-se em um pré-tratamento para que os polissacarídeos se tornem disponíveis, seguido de hidrólise (ácida ou enzimática), obtendo-se neste processo os açúcares (hexoses e pentoses), com posterior fermentação microbiana dos açúcares em etanol, com separação e concentração do etanol por métodos tradicionais (ZUÑIGA, 2010). O pré-tratamento é a etapa chave na obtenção de celulose digerível, formando a menor quantidade possível de inibidores para os processos subsequentes (ZUÑIGA, 2010). Contudo, esta etapa ainda não apresenta uma eficiência que seja considerada ideal. Para contornar esse obstáculo, modular a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese de lignina vem sendo encarada como uma alternativa na tentativa de modificar este polímero de forma estrutural ou em quantidade (EMBRAPA, s.d.).

## 2.2 Parede Celular Vegetal

A célula vegetal apresenta como uma de suas principais características a presença de uma parede celular (FARINAS, 2011). Esta parede é composta por três camadas distintas: a lamela média, PC primária e PCS (LAGAERT; BELIËN; VOLCKAERT, 2009). A lamela média é a camada mais externa da parede, que consolida a união entre células, PC primária e secundária. A parede primária é depositada durante o crescimento celular, consistindo principalmente de polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas, além de proteínas

estruturais (POPPER, 2008; TAIZ; ZIEGER, 2002). Já a PCS é depositada após cessar o crescimento celular, internamente à PC primária e confere estabilidade mecânica a planta (POPPER, 2008; TAIZ; ZIEGER, 2002). A PCS apresenta compostos de celulose e hemicelulose, e que são muitas vezes impregnados de lignina. Além dos polissacarídeos, a parede das células vegetais contêm centenas de diferentes proteínas (TAIZ; ZIEGER, 2002).

Os genes relacionados com a PCS para celulose, xilano e biossíntese de lignina devem ser coordenadamente expressos durante o desenvolvimento da PCS (ZHONG; YE, 2014).

A celulose é um homopolissacarídeo não-ramificado constituído somente de moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -D (1,4). Uma ligação glicosídica é formada por duas unidades de glicose adjacentes após a eliminação de uma molécula de água (FARINAS, 2011). A estrutura da celulose apresenta regiões cristalinas altamente ordenadas, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e regiões menos ordenadas ou amorfas onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FARINAS, 2011).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila. Tais açúcares são ligados entre si principalmente por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura principal de um dado composto, da qual saem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos. Sua classificação é dada de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral (FARINAS, 2011).

A lignina corresponde a até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e atingindo até 40% do peso seco em teor de resíduos vegetais (RODRIGUES, 2007). Está presente principalmente em tecidos que participam da condução de solutos e suporte mecânico, representando um conjunto de polímeros amorfos de alto peso molecular e muitas ligações cruzadas (FARINAS, 2011). É um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas (GUEDES, 2010). Possui natureza química bem distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura aromática de natureza eminentemente fenólica (FARINAS, 2011). Sua estrutura é baseada em três

precursores monoméricos: os alcoóis trans-p-cumarílico (H), trans-coniferílico (G) e álcool trans-sinapílico (S) (FENGEL; WEGENER, 1989; GRAY; CAPARRÓS-RUIZ; GROTEWOLD, 2012). Devido à natureza fenólica da lignina, essa fração não pode ser diretamente convertida em etanol. A lignina tem sido usada para a produção de energia pelo processo de combustão (LARSEN et al., 2008) ou para a conversão em outros bioprodutos de interesse comercial.

Lapierre (1993), baseando-se na suscetibilidade relativa à hidrólise, classificou a lignina em dois grupos: “core” e não “core”. As ligninas não “core” apresentam após a hidrólise compostos fenólicos de baixo peso molecular, enquanto as ligninas “core” são muito resistentes à degradação, pois são constituídas de fenilpropanóides altamente condensados, sendo compostos de unidades H, G e S em diferentes proporções, de acordo com a origem.

De acordo com Chen (1991) as ligninas de madeiras duras, ou angiospermas, são formadas principalmente de unidades G e S; ligninas de madeiras moles, ou gimnospermas, são formadas basicamente de unidades G; ligninas de gramíneas compreendem G-S-H. Havendo, entretanto, ligninas de certas espécies de gimnospermas e de gramíneas que apresentam abundância de G e S.

Remover a lignina é primordial para melhorar a digestibilidade enzimática de biomassa lignocelulósica (ALVES; MACRI, s.d.), sendo que Draude, Kurniawan e Duff demonstraram em 2001 que remover 67% de lignina acarreta num aumento de até duas vezes a taxa de hidrólise da celulose e praticamente três vezes os teores de açúcares resultantes da conversão.

O silenciamento de genes que codificam enzimas participantes da via de biossíntese de lignina pode resultar em uma diminuição do teor de lignina que supera efetivamente a recalcitrância da PC à bioconversão (ROHDE et al., 2004; CHEN; DIXON, 2007; HUANG et al., 2010). Contudo, Yoon, Choi e An (2015) afirmam que essas alterações afetam o desenvolvimento da planta, como apresentado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 Fenótipos apresentados por plantas com genes modificados que codificam enzimas da via de biossíntese de lignina baseado em (YOON; CHOI; NA, 2015).

<b>Espécie</b>	<b>Gene</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Arabidopsis</i></b>	C3H	Nanismo e xilema colapsado	FRANKE et al., 2002
<b><i>Arabidopsis</i></b>	C4H	Nanismo, esterelidade masculina e ramos inchados	SCHILMILLER et al., 2009
<b><i>Arabidopsis</i></b>	PAL1, PAL2, PAL3, PAL 4	Menor teor de lignina e tamanho atrofiado	HUANG et al, 2010
<b><i>Panicum virgatum</i></b>	Pc4CL1 (4CL)	Nervura central da folha marrom, e manchas marrons nos internós do colmo	XU et al., 2011
<b><i>Oryza sativa</i></b>	CAD7	Colmo flexível, semi-nanismo, florescimento atrasado e menor quantidade de sementes	LI et al., 2009
<b><i>Oryza sativa</i></b>	Os4CL3 (4CL)	Tamanho reduzido	GUI; SHEN; LI, 2011
<b><i>Oryza sativa</i></b>	CAD2	Coloração vermelha amarronzada, colmos com certa flexibilidade	ZHANG et al., 2006; OOKAWA et al., 2014
<b><i>Zea mays</i></b>	bm3	Nervura central marrom avermelhada	VIGNOLS et al. 1995
<b><i>Sorghum bicolor</i></b>	bmr12 (COMT)	Folhas e pecíolo com tecido vascular marrom	BOUT; VERMERRIS, 2003
<b><i>Sorghum bicolor</i></b>	bmr2 (4CL)	Esclerenquima e nervura central marrom	SABALLOS et al., 2012

Muitos autores, ao suprimirem genes de biossíntese de lignina obtiveram como resultados fenótipos anormais tais como xilema colapsado, mudança de coloração, colmo flexível e retardo de crescimento (VIGNOLS et al. 1995; BOUT; FRANKE et al., 2002; VERMERRIS, 2003; ZHANG et al., 2006; LI et al., 2009; SCHILMILLER et al., 2009; HUANG et al., 2010; GUI; SHEN; LI, 2011; XU et al., 2011; SABALLOS et al., 2012; OOKAWA et al., 2014). Através dos resultados apresentados acima, aumentou-se o interesse em entender melhor a via de biossíntese de lignina bem como de genes que controlam toda a regulação da via, como os fatores de transcrição (FTs). A relação FTs com a via está melhor explicada no tópico 2.3.

### 2.3 Fatores de Transcrição e a Parede Celular Secundária

FTs correspondem a uma classe de proteínas que tem como principal característica a presença de um DBD. Este permite o ancoramento do FT em uma sequência de nucleotídeos específica do DNA (COOPER, 2000).

FTs podem interagir com outros reguladores transcricionais, incluindo proteínas de remodelação/modificação da cromatina, de modo a recrutar ou bloquear o acesso de RNA polimerases ao DNA molde, ativando ou reprimindo a transcrição (RIECHMANN et al., 2000; UDVARDI et al., 2007; RUSHTON et al., 2008). Em plantas, cerca de 7% do genoma é dedicado para codificar FTs, evidenciando o quão importante e complexa é a regulação da expressão gênica ao nível da transcrição nesses organismos (UDVARDI et al., 2007; RUSHTON et al., 2008).

Com o trabalho de Riechmann et al. (2000) foram definidas 46 famílias de genes de FTs em *Arabidopsis thaliana*, havendo 3 famílias que apresentam um grande número de membros: AP2/EREBP (APETALA2/proteínas de ligação a elementos responsivos a etileno), MYB-(R1)R2R3 e bHLH.

As vias biossintéticas que levam à formação da PCS, que é composta basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, são altamente reguladas ao nível da transcrição, tendo ocorrido um progresso durante a última década no que se diz

respeito à existência de um complexo de rede hierárquica de regulação de FTs (CASSAN-WANG et al., 2013). A maioria dos FTs dessa rede pertencem à duas grandes famílias de FTs, sendo elas: R2R3-MYB e NAC (NAM / ATAF / CUC) (ZHONG; YE, 2007; WANG; DIXON, 2012).

Em *Antirrhinum majus* foram identificados os primeiros reguladores da biossíntese de monolignóis (MONTEIRO; PEREIRA; ABREU, 2004). Estes reguladores pertenciam a família MYB de FTs, denominados então *AmMYB308* e *AmMYB330* (TAMAGNONE et al., 1998). A partir daí, muitos outros FTs foram descritos e caracterizados em diversas espécies, com atenção especial para *Arabidopsis* (Gray et al., 2012).

Recentemente, FTs tem sido utilizados como uma forma de engenheirar plantas, a fim de produzir compostos desejados ou ainda transpor estresses ambientais. Yang et al. (2012) reduziram a biossíntese de lignina em vasos ao trocar o promotor da enzima C4H pelo promotor do FT VND6, um promotor específico de vasos condutores. As plantas exibiram fenótipos normais sem qualquer comprometimento no seu desenvolvimento. Em segundo lugar, conseguiram obter plantas com um aumento do espessamento da PC, para isto eles colocaram o gene do FT NST1 sob indução do promotor do gene IRX8, gene de uma glicosiltransferase de parede celular secundária, também obtendo plantas saudáveis. Para os dois casos, as plantas apresentaram uma maior produção de açúcares após sacarificação.

Diferentes técnicas têm sido empregadas para a caracterização de FTs relacionados à síntese de lignina e outros compostos da PC. As mais comuns são a superexpressão e *knockout* de FTs (HUSSEY et al. 2013). Entretanto, este tipo de abordagem nos fornece dados indiretos com relação aos alvos de regulação desses FTs, sendo necessários métodos mais diretos para a determinação destes genes alvo. Segundo Hussey et al. (2013), diversas técnicas podem ser empregadas para estudos mais diretos de FTs e seus alvos, entre elas:

- EMSA – método “*in vitro*” para detecção do local de ligação do FT;
- RNA-Seq – método que pode ser utilizado para predição de possíveis alvos, necessitando de validação;



- Reconstrução a partir de dados de co-expressão – método usado para suposição de interação entre genes, necessitando de uma grande quantidade de dados em diferentes organismos, tecidos, etc.
- Y1H - técnica que avalia os reguladores de um gene específico;
- ChIP – método de análise “*in planta*” com possibilidade de selecionar FTs que não interagem diretamente com o DNA.

Esses dois últimos podem ainda ser utilizados em estudos das redes reguladoras de genes (RRGs), as quais descrevem a rede reguladora através da qual os FTs e microRNAs regulam fortemente a expressão dos genes (MEJIA-GUERRA et al., 2012). A técnica de Y1H é um exemplo de abordagem centrada nos genes, com foco em identificar os FTs que se ligam a um promotor específico, enquanto que o ChIP é uma técnica na qual a abordagem está centrada no FT, buscando identificar genes alvos para este FT (MEJIA-GUERRA et al., 2012). A figura ilustra estes tipos de abordagens.

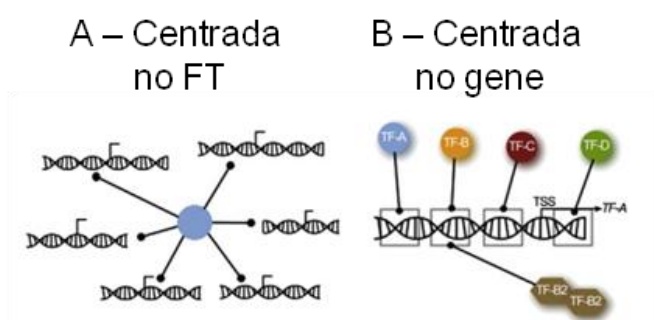


Figura 1 Abordagens de mapeamentos RRG (Modificado de MEJIA-GUERRA et al., 2012).

A – Abordagem centrada no FT, como a técnica ChIP. B – Abordagem centrada no gene, como a técnica Y1H.

A busca por genes alvo de um FT sempre foi uma área de interesse (WELLS; FARNHAM, 2002) e atualmente, o ChIP tem se tornado uma técnica muito popular e bem estabelecida usada para investigar interações entre proteína (FT) com DNA (genes alvos) (BUCK; LIEB, 2004). ChIP pode identificar “*in vivo*” os sítios de ligação de um FT que se liga diretamente ou indiretamente, através do domínio de ligação ao DNA ou agindo como coativador ou corepressor (WELLS; FARNHAM, 2002).

Ainda com relação a FTs e a síntese de PCS, Aharoni et al. (2004) e posteriormente Ambaravaram et al. (2011), em seus estudos descobriram e caracterizaram um novo FT, que se mostrou importante para a formação e composição da PCS, podendo ser considerado um regulador máster em sua síntese. Este FT foi denominado *SHINE*, e será descrito abaixo no tópico 2.4.

#### 2.4 O Fator de Transcrição SHINE

O FT SHINE pertence à família de FTs AP2/ERF, ou AP2/EREB, e ao clado SHINE/WAX INDUCER (SHN/WIN) (AHARONI et al., 2004; AMBAVARAM et al., 2011). Em *Arabidopsis*, foram caracterizados por Ambaravaram et al. (2011) três representantes: o *AtSHN1*, o *AtSHN2* e o *AtSHN3*, tendo o *AtSHN1* a função de síntese de cera na cutícula das folhas em *Arabidopsis* (AHARONI et al., 2004). A superexpressão de *AtSHN1* também alterou a estrutura epidérmica das folhas, o número de tricomas, ramificações e estômato, que podem contribuir para a tolerância à seca (AHARONI et al., 2004).

À família AP2/ERF é uma das três maiores famílias em *Arabidopsis* (RIECHMANN et al., 2000), é caracterizada por apresentar o domínio AP2, que consiste em cerca de 60 a 70 aminoácidos (NAKANO et al., 2006). Estas proteínas reguladoras estão envolvidas no controle do metabolismo primário e secundário, em vias de crescimento e desenvolvimento, além de participar em respostas aos estímulos ambientais (LICAUSI; OHME-TAKAGI; PERATA, 2013).

Aharoni et al. (2004) verificaram que havia diferenças nos padrões de expressão de diferentes genes *SHN*, em uma mesma espécie. Ao examinarem a expressão de *AtSHN1*, *AtSHN2* e *AtSHN3* fusionando os ao gene repórter *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) em *Arabidopsis* foi observado que:

- *AtSHN1* apresentou expressão na inflorescência e em tecidos da raiz de *Arabidopsis*. Além disso, também foi verificada expressão em sépalas de botões florais fechados e muito jovens no estágio 6 e depois no estágio 10 a expressão foi detectada em sépalas e pétalas novamente, além de começar a ser expresso em gineceu. Nas nervuras das pétalas e sépalas foi possível observar maior expressão que no restante do tecido. Já no estágio 13, houve

redução de expressão no gineceu e iniciou-se a expressão nas anteras. Durante o estágio 16 foi observada expressão nas cápsulas de sementes.

- *AtSHN2* manifestou expressão em cápsulas de sementes e na antera, sendo sua expressão detectada no estágio 12.
- *AtSHN3* mostrou-se estar relacionado com a expressão em todos os órgãos, em diferentes intensidades e respondendo diferentemente à ferimentos de acordo com o tecido testado.

Ambavaram et al. (2011) superexpressaram o *AtSHN2* em arroz (*Oryza sativa*, uma monocotiledônea) obtendo como resultado um aumento significativo de celulose, enquanto que a quantidade de lignina, por sua vez, diminuiu.

Jägger et al. (2015) ao superexpressarem um *TaSHN* (*SHN* de trigo, monocotiledônea) em *Arabidopsis* perceberam que esta apresentou folhas brilhantes, mas também apresentou uma proliferação desorganizada da cutícula em folhas, e uma diminuição do número de estômatos por área foliar, além de que a resistência à seca não foi afetada. Estes dados mostram que este possível ortólogo provocou tanto as características já conhecidas, como novos fenótipos em comparação com outras plantas WIN/SHN superexpressas.

Martins (2017) ao transformar plantas de arroz superexpressando o FT *SHN* de cana-de-açúcar (*ShSHN*) obteve plantas com maior teor de biomassa, com aumento significativo na quantidade de pectinas, e menor teor de lignina. Além disso, foi observado que essas plantas apresentaram um aumento significativo no processo de sacarificação.

Como apresentado acima e de forma resumida na Tabela 2, os FTs podem apresentar alvos diferentes na regulação, podendo um mesmo FT apresentar diferentes funções quando expresso em monocotiledôneas e dicotiledônias.

Tabela 2 - Resumo dos diferentes fenótipos encontrados em trabalhos realizados com o gene SHN em diferentes organismos e a partir de diferentes abordagens.

Gene	Técnica	Organismo (*)	Fenótipo e Via Metabólica envolvida	Referência
<i>AtSHN1</i>	Superexpressão	<i>Arabidopsis</i> (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(AHARONI et al. 2004; Shi et al., 2011; KANNANGARA et al., 2007; BROUN et al., 2004)

<i>SISHN</i>	Superexpressão Silenciamento	Tomate (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(SHI et al., 2013; AL-ABDALLAT et al., 2014; BUXDORF et al., 2014)
<i>TaSHN</i>	Superexpressão	Arabidopsis (di)	Plantas tolerantes à seca com fenótipo relacionado à cutina	(JÄGER et al., 2015)
<i>MdSHN3</i>	QTL*	Maçã (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(LASHBROOKE et al., 2015)
<i>GmSHN1/ GmSHN9</i>	Superexpressão	Arabidopsis (di)	Biossíntese de Cera e Cutina	(XU et al., 2016)
<i>NUD</i>	Superexpressão	Cevada (mo)	Alteração na deposição de lipídios no pericarpo	(TAKETA et al., 2008)
<i>AtSHN2</i>	Superexpressão	Arroz (mo)	Aumento de celulose e Diminuição de Lignina	(AMBAVARAM et al., 2011)
<i>OsWR1</i>	Superexpressão	Arroz (mo)	Biossíntese de Cera e Cutina	(WANG et al., 2012)
<i>PvERF001</i>	Superexpressão	<i>Switchgrass</i> (mo)	Aumento de biomassa sem alteração de Lignina	(WUDDINEH et al., 2015)
<i>ShSHN</i>	Superexpressão	Arroz (mo)	Aumento de biomassa e Lignina	(MARTINS, 2017)

\* “Quatitative Trait Locus”

Ambavaram et al. (2011) ao realizar uma análise de rede de coexpressão, observaram que as regiões promotoras dos FTs NAC e MYB continham motivos GCC BOX ([AG]CCGNC) conhecidos como sítios de ligação dos FTs AP2/ERF (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995; AMBAVARAM et al., 2010). Ao final, para comprovar as hipóteses formuladas, eles utilizaram a técnica EMSA (*Eletroforetic Mobility Shift Assay*), identificando que *AtSHN2* recombinante se ligava aos prováveis FTs da PS de arroz MYB58/63, NST1/2/SND1, VND4/5/6, e MYB20/ 43. Com os resultados obtidos, Ambavaram et al. (2011) fizeram um modelo hipotético de regulação no qual afirmam que FT SHN reprime os TFs NAC, SND1/NST1/2 e VND4, MYB58/63 e diretamente ativa MYB20/43.

Kannangara et al. (2007) utilizando genética reversa e abordagens moleculares, como CHIP, identificaram em *Arabidopsis* que o gene *LACS2* é diretamente um alvo de SHN, apesar de não possuir motivos GCC BOX em seu promotor.

Para que haja um melhor entendimento de um FT torna-se necessário a existência de um bom modelo vegetal para seus estudos. Dessa forma, neste trabalho, utilizou-se o sorgo como um modelo biológico para o FT *SHN*, dados os motivos apresentados no item 2.5.

## 2.5 Sorgo

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.)], planta de origem africana e gramínea da família Poaceae, se espalhou rapidamente pelos continentes asiáticos, europeu e australiano, bem como por demais países. A produtividade mundial de sorgo no ano 2015/16 foi de 1,41 toneladas/ha, em um total de 42,54 milhões de ha (CONAB, 2017).

A cultura está ganhando espaço, pois possui características como alta adaptabilidade, versatilidade e rusticidade, além de apresentar uma ótima opção para minimizar a ociosidade da indústria de cana-de-açúcar, podendo ocupar espaço na entressafra da cultura (SANTOS et al., 2015). Além disso, em regiões muito quentes e secas, nas quais culturas como o milho não atingem o máximo em produtividade de grãos ou de forragem, são uma ótima opção (PEREIRA, 2011).

Paterson et al. (2009), através de sequenciamento “whole genome shotgun (WGS)”, apresentaram uma análise inicial do genoma de sorgo, cobrindo cerca de 98% dos genes nos cromossomos. Além disso, Ming et al. (1998) mostraram através de comparações de mapas genéticos feitas com conjuntos de marcadores a sintonia entre gramíneas, sendo que o sorgo apresentou a maior colinearidade com cana-de-açúcar.

As vantagens do sorgo vão além, pois este apresenta ciclo curto, de aproximadamente quatro meses, também pode ser propagado através de sementes, facilitando o plantio. De acordo com Berenguer e Facci (2001), o sorgo apresenta grande tolerância a altas temperaturas e ao estresse hídrico, requerendo somente um quarto da quantidade de água do que a cana necessita (MASSOM, 2013).

A planta possui metabolismo fotossintético C4, isso quer dizer que ela assimila e usa o CO<sub>2</sub> de maneira mais eficiente que outras plantas, produzindo e acumulando muita matéria seca (SANTOS et al., 2015).

Existem, basicamente 4 tipos de sorgo, sendo eles: granífero, sacarino, vassoura e forrageiro. O sorgo granífero apresenta porte baixo, com até 170 cm de altura, produzindo na extremidade superior uma panícula (inflorescência) compacta de grãos. Sendo seu principal produto o grão, muito utilizado para alimentação animal, com possível aproveitamento do restante da planta, ainda verde após a

colheita, como feno ou pastejo (IPA, 2008). Por sua vez, o sorgo sacarino apresenta porte alto, superior a dois metros, apresentando colmo doce e succulento como o da cana-de-açúcar. Sua inflorescência é aberta, produzindo poucos grãos. Sua maior utilização é como sorgo forrageiro, na forma de silagem e de corte (IPA, 2008).

O bagaço de sorgo contém, segundo Freita et al. (2016), 38,48% de celulose e 23,2% de lignina, valor muito próximo ao encontrado por Carvalho (2012) em cana-de-açúcar, de 21,6% de lignina no bagaço.

O sorgo vassoura apresenta inflorescência em forma de vassoura, o que o faz ser utilizado em algumas regiões na fabricação de vassouras e o sorgo forrageiro tem porte alto, superior a dois metros, muitas folhas, inflorescências abertas, com poucas sementes, elevada produção de forragem.

Nos EUA, estima-se que o açúcar produzido pelo sorgo sacarino pode superar o rendimento em até duas vezes se comparado ao etanol obtido a partir de grãos de milho. Já no Brasil, é possível, através da utilização do bagaço do sorgo, principalmente advindo de sorgo granífero, pelo processo de hidrólise enzimática, que se extraia cerca de 158 litros de etanol por tonelada de bagaço (GNANSOUNOU, 2005).

Devido aos fatores citados acima, a cultura pode ser considerada uma excelente opção para diversas regiões, tendo o potencial de se consolidar como um importante fornecedor de energia renovável, em um período de tempo relativamente curto.

Com base no exposto acima, neste trabalho foi realizada a caracterização do FT SHN, que apresenta dois genes em sorgo (*SbSHN1* e *SbSHN2*). Para isso utilizou-se análises de sequência, onde foi possível desenhar um peptídeo sintético que por sua vez foi utilizado para a produção de anticorpo antiSHN. Posteriormente foi realizado o teste de especificidade deste anticorpo bem como a determinação da localização subcelular da proteína SHN. Por fim, foram realizadas análises de expressão gênica que possibilitaram a realização da técnica de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) e posterior validação de genes alvos por ChIPqPCR. Os resultados aqui obtidos representam um grande passo para o entendimento do papel deste FT na regulação de diferentes componentes da parede celular secundária.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Gerais

Este trabalho teve por objetivo caracterizar molecularmente o FT SHN (gene *SbSHN1*) em sorgo *Sorghum bicolor* L..

#### 3.2 Específicos

- Realizar a clonagem do gene *SbSHN1*;
- Obter e Validar um anticorpo antiSHN;
- Promover a expressão heteróloga em *E. coli* da proteína codificada pelo gene *SbSHN*;
- Determinar a localização subcelular da proteína codificada pelo gene *SbSHN1*;
- Determinar a expressão em diferentes tecidos do gene *SHN* por qPCR;
- Realizar a imunoprecipitação a cromatina de inflorescências maduras e imaturas de sorgo;
- Determinar alguns alvos do FT *SHN* em sorgo através de CHIPqPCR.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Vegetal

#### 4.1.1 *Sorghum bicolor*

Sementes de *Sorghum bicolor* (sorgo), linhagem elite BTx623, foram plantadas em vasos de 5 litros contendo uma mistura de 1 parte de substrato Carolina Soil II (Grow Plant) para 0,6 partes de terra. A esta mistura foi adicionado 0,8g de adubo NPK 8-28-16 por litro de substrato utilizado. Em cada vaso foram feitas seis covas rasas, nas quais foram adicionadas três sementes de sorgo (IPA, 2008).

As plantas foram mantidas em casa de vegetação situada no Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, localizado em Ribeirão Preto-SP, Brasil (latitude – 21.208159°, longitude - 47.86962°). Com irrigação controlada (45 minutos, duas vezes ao dia).

Após uma semana do plantio, foi realizado o desbaste, retirando plantas com menor vigor, deixando somente três plantas por vaso.

#### 4.1.2 *Nicotiana benthamiana* para análise de localização subcelular

Sementes de *Nicotiana benthamiana* foram plantadas em tubetes contendo a mesma mistura utilizada para o sorgo. Os tubetes foram mantidos em sala com temperatura e luminosidade controladas, 22°C e 16 horas/dia de luz para 8 horas/dia de escuro, respectivamente. Após germinação e ao atingirem, aproximadamente 3 centímetros, as plantas foram transplantadas para vasos de 3 litros contendo a mesma mistura de substrato/terra/adubo e transferidas para casa de vegetação como descrito no item 4.2.1.



## 4.2 Coleta dos Materiais

Amostras de folha e inflorescência de sorgo foram coletadas e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido, sendo posteriormente estocadas em ultrareezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizadas triplicadas biológicas. No caso das folhas, cada replicata foi composta por um “pool” de seis folhas de plantas diferentes. No caso das inflorescências, cada replicata corresponde a uma inflorescência de plantas diferentes.

Para clonagem do gene *SbSHN* foram coletadas a quarta folha de plantas em estágio V5 (plantas que possuem cinco folhas completas, ou seja, que apresentam lígula visível)(LARSON, 2016), conforme ilustrada na Figura 2.

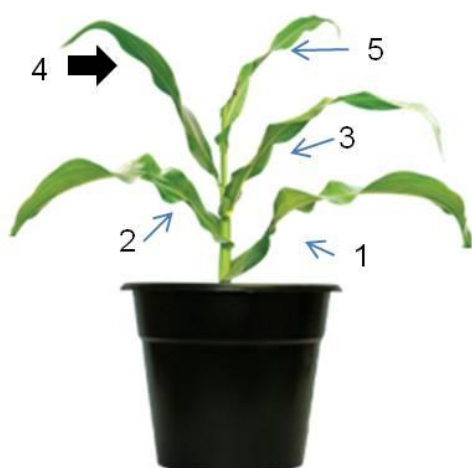


Figura 2 Planta de sorgo em estágio V5, ou seja, que apresentam cinco folhas já completas (com lígula visível). Seta preta indica a folha coletada.

Para a análise de expressão e ChIP, foi coletada a quarta folha de plantas em estágio V5. As amostras foram divididas em dois grupos: Ponta da folha e base da folha (contendo o colar da folha e uma parte da bainha). Além disso, foram coletadas inflorescências em dois estágios de amadurecimento: imatura e madura (Figura 3).

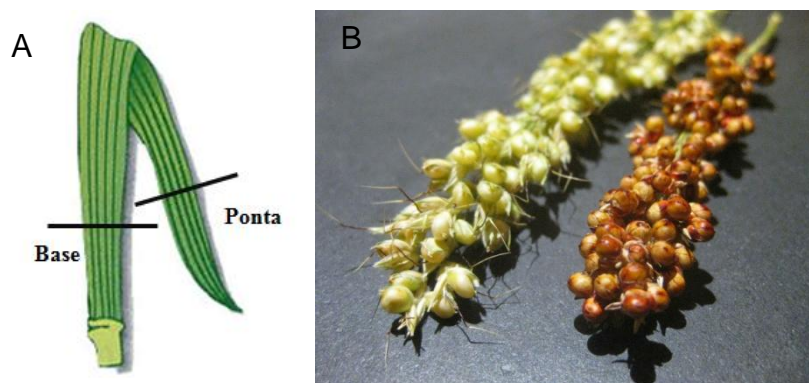


Figura 3 Amostras utilizadas: (A) quarta folha de sorgo em estágio V5 (Base e Ponta) e (B) Inflorescência [Imatura (esquerda) e Madura (Direita)].

### 4.3 Análises de bioinformática

#### 4.3.1 Análises Filogenéticas

O programa ClustalX 2.1 (JEANMOUGIN, 1998) foi utilizado para alinhar as sequências de aminoácidos homólogos ao FT SHINE previamente descritas na literatura, sendo elas *Zea mays* - milho (BRITO et al., 2015), *Arabidopsis thaliana* (AHARONI et al., 2004), *Hordeum vulgare* - cevada (TAKETA et al., 2008), *Oryza sativa* – arroz (AMBAVARAM et al., 2011; WANG et al., 2011), *Solanum lycopersicum* – tomate (SHI et al., 2013; AL-ABDALLAT et al., 2014), *Panicum virgatum* (WUDDINEH et al., 2015), *Triticum aestivum* – trigo (JÄGER et al., 2015), *Glycine Max* – soja (XU et al., 2016), cana-de-açúcar (BRITO et al., 2015; MARTINS, 2017) e *Sorghum bicolor* – sorgo (BRITO et al., 2015). Tais sequências de aminoácidos foram adquiridas junto ao banco de dados Phytozome v12.1. O alinhamento foi então visualizado através da ferramenta bioedit (HALL, 2011). Uma análise comparativa dos genes foi realizada através da construção de uma árvore filogenética, posteriormente visualizadas com o programa Mega7 (KUMAR et al., 2016), utilizando o método neighbour-joining de agrupamento com 1000 repetições por *bootstrap* e parâmetros padrões.

#### 4.3.2 Análise *in silico* da expressão gênica

Para realização da análise de expressão e posterior CHIP foi necessário, primeiramente, determinar quais seriam os tecidos a serem utilizados. Desta forma foi realizada uma busca computacional em banco de dados dos níveis de expressão dos homólogos de SHN (*SbSHN1: Sb04g006970* e *SbSHN2: Sb10g023600*) em sorgo em diferentes tipos de tecido. Para isso foi realizada uma busca no banco de dados de RNA-Seq de Sorgo (*Sorghum qTeller* - [http://qteller.com/sorghum\\_refgen1/](http://qteller.com/sorghum_refgen1/)).

Além disso, uma vez que este projeto está inserido em um projeto maior, buscando caracterizar o FT *SHN* também em milho, buscou-se no banco de dados The Bio-Analytic Resource for Plant Biology (BAR) (LI et al., 2010) pelo tecido com maior expressão em milho, acreditando-se que o mesmo perfil seria encontrado em sorgo.

#### 4.4 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

##### 4.4.1 Preparo do material para extração de RNA

A fim de minimizar o efeito das RNAses e tentar evitar a degradação do RNA, as soluções utilizadas foram preparadas com água milli-Q previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) na concentração de 1% (v/v), por 16 horas a 37 °C, seguida de autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 minutos).

Os materiais plásticos utilizados foram tratados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na concentração de 10% e submetidos à autoclavagem (120 °C, 1 atm por 20 minutos).

As vidrarias e porcelanas foram queimadas a 200 °C, por 4 horas.

#### 4.4.2 Extração de RNA total

Aproximadamente 250mg de tecido vegetal (clonagem – folha; quantificação da expressão: base da folha, ponta da folha, inflorescência imatura e inflorescência madura) foram maceradas utilizando nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), separadamente, com o auxílio de cadinho e pistilo.

O reagente Trizol (Invitrogen) foi utilizado para extração do RNA total de cada réplica, seguindo as recomendações do fabricante. A fim de quantificar e mensurar a pureza do RNA utilizou-se a análise de absorvância (razões 260/280 e 230/280) com o auxílio de um NanoDrop® (Thermo)®. De maneira complementar, foi verificada a integridade por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 2001) de cada réplica biológica. O RNA extraído de cada réplica biológica encontra-se em ultrafreezer (-80 °C).

#### 4.4.3 Tratamento com DNase

Previamente à síntese de cDNA, o RNA total foi tratado com DNase. Para isto, para cada 1 µg de RNA total foi utilizado uma unidade (1U) de DNase RQ1 (Promega) seguido de incubação por 30 minutos, a 37 °C. Para paralisar a reação, foi adicionado 0,5 µL de stop solution para cada 4 µL de RNA total, seguido de nova incubação por 10 minutos a 65°C.

#### 4.4.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o Kit comercial *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega). Em 1 µg de RNA total tratado com DNase foi adicionado 0,5 µL de Oligo dTV (0,5 µg/µl), incubando-se por 5 minutos a 70 °C.

Na reação de transcrição reversa foram utilizados 6 µL de reação (RNA total tratado com RNase + Oligo dT), 2 µL de tampão *Improm-II 5x Reaction Buffer*, 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de *Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor* (40 U/µl) e 1 µL da enzima *ImProm-II RT* (25 U/µl) em um volume final de 10 µL. A reação foi incubada em termociclador *Thermo Cycle 2720* (Applied Biosystems), com a

seguinte ciclagem: anelamento a 25 °C por 5 minutos, extensão a 42 °C por 60 minutos, e depois a 70 °C por 15 minutos para paralisação da reação.

#### 4.5 Clonagem do gene *SbSHN1*

##### 4.5.1 Desenho dos “primers”

O desenho dos “primers” utilizados para clonagem do gene *SbSHN* foi realizado após a busca no banco de dados Phytozome v12.1 da sequência de nucleotídeos da região codificante do gene *SbSHN1*, uma vez que este apresentou uma maior similaridade com outras sequências SHN previamente descritas.

Uma vez que seria usado o vetor pENTR/D-TOPO (Invitrogen) para clonagem do fragmento, foi adicionado na região 5’ do “primer” “forward” uma “tag” de sequência CACC que fará com que a sequência amplificada se ligue ao vetor de interesse de maneira dirigida, garantindo que o gene se ligue no vetor na fase de leitura correta.

Tabela 3 – “Primers” utilizados na reação de amplificação para clonagem do gene *SbSHN1*.

Sequência em negrito corresponde ao “tag” para ser adicionado em 5’ terminal para se ligar ao vetor pENTR/D-TOPO (Invitrogen) além de representar o sítio de Kozak importante para o início da tradução em eucariotos.

“Primer”	Sequência (5’ → 3’)
SbSHNpENTR_FW	<b>CACC</b> ATGGTACAGCCAAAGAAGTTTC
SbSHNpENTR_RV	TCAGATGATGAAGCGACCTTGGT
M13F (kit pENTR/D-TOPO®)	GTA AACGACGCCAG
M13R (kit pENTR/D-TOPO®)	CAGGAAACAGCTATGAC

##### 4.5.2 Amplificação da Sequência desejada

Utilizando como molde o cDNA de folhas de sorgo, foi realizada um reação de PCR a fim de amplificar a região codificadora do gene *SbSHN1*, utilizando os “primers” da tabela 3. Para a reação foi utilizado 30 ng de cDNA, 7,5µL de 10X High Fidelity PCR Buffer, 0,5µL de *Platinum®Taq* DNA Polimerase High Fidelity, 1,8µL

dNTP 10mM, 1,2µL de sulfato de magnésio 50mM, 1,8µL de cada “primer” 10mM (“forward” e “reverse”) e q.s.p. 50µL de água milliQ autoclava.

A reação foi conduzida em termociclador *Thermo Cycle 2720* (Applied Biosystems), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, pareamento dos “primers” a 62°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto.

O produto da amplificação foi investigado por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X, a 80V. Após corrida o gel foi visualizado sob luz UV a 254nm.

O fragmento de DNA amplificado foi excisado e purificado a partir do gel de agarose, com o auxílio do Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Após, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) e armazenado a -20 °C.

#### 4.5.2 Ligação do fragmento amplificado no pENTR™/D-TOPO®(Invitrogen)

O fragmento purificado foi inserido no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) (Figura 4), sendo a reação de ligação composta por 0,5 µL de vetor pENTR/D-TOPO (15-20 ng/µL); 1 µL de produto de PCR purificado (20 ng/µL); 0,5 µL de solução salina diluída (1:4) num volume total de 4µL. Após deixar a reação por 1 hora em temperatura ambiente, 1 µL da reação de ligação foi inserida por eletroporação (cubeta de 1 mm; 25 µF; 180 Ω; 1650V) em 40 µL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa cepa DH10B. Em seguida, as células foram colocadas em 1mL de meio LB (Apêndice A) e incubadas a 37°C sob agitação 180rpm por 1 hora. As células foram então espalhadas em placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido de 50 µg/mL de canamicina, levadas para incubação 37°C durante 18 horas. . Após a ligação no vetor pENTR/D-TOPO, o vetor resultante foi denominado pENTRSbSHN.

Colônias individuais foram selecionadas após cultivo das células em meio seletivo para confirmar a presença da sequência *SbSHN1* através de uma reação de PCR de colônia, utilizando os “primers” M13F (presentes no vetor pENTR/D-

TOPO®) e SbSHNpENTR\_Rv (Tabela 3). Os produtos resultantes da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, a 80 V, por 45 minutos, e as bandas obtidas foram visualizadas por meio de coloração com brometo etídio (10 µg/mL), sobre luz ultravioleta, a 254 nm (FRITSCH; SAMBROOK; MANIATIS, 1989). Após a confirmação dos transformantes, os clones selecionados foram inoculados em meio LB líquido contendo canamicina, separadamente, e incubados por 18 horas sob agitação 200rpm, para a posterior extração plasmidial.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o Kit comercial *Pure Yield Plasmid Miniprep System* (Promega), quantificado e enviado para sequenciamento utilizando os mesmos “primers” M13F e M13R (Tabela 3). O sequenciamento das amostras foi realizado no Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - SP ([www.genoma.ib.usp.br/pt-br/servicos/sequenciamento-de-dna](http://www.genoma.ib.usp.br/pt-br/servicos/sequenciamento-de-dna)).

A análise de qualidade das sequências e a formação dos “contigs” foram realizadas com o auxílio do *software* BioEdit. Para identificação da sequência proveniente da análise de sequenciamento utilizou-se o programa BLAST do National Center For Biotechnology Information (NCBI). As sequências de nucleotídeos foram traduzidas para sequências de aminoácidos utilizando a ferramenta Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>).

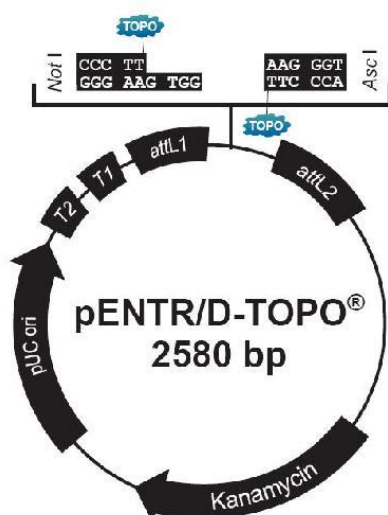


Figura 4 Vetor de entrada pENTR™/D-TOPO®.

#### 4.5 Produção do anticorpo antiSHN

Para a produção do anticorpo antiSHN foi utilizado um peptídeo sintético para a imunização do animal. Para a produção deste peptídeo sintético foram utilizadas as sequências de aminoácidos das proteínas SHN de cana-de-açúcar, milho e sorgo. Para a seleção das sequências mais adequadas para a produção do antígeno, foram utilizados alguns critérios como: distância do domínio de ligação ao DNA, antigenicidade, hidrofobicidade entre outros. Após a escolha, este peptídeo sintético foi utilizado para a produção do anticorpo antiSHN pela empresa Genescript.

#### 4.6 Expressão Heteróloga da Proteína *SbSHN*

Para a construção do vetor de expressão contendo a sequência *SbSHN1* foi utilizado o Sistema Gateway de Recombinação (Life Technologies).

##### 4.6.1 Recombinação com o vetor de Expressão

Após a confirmação da presença e correta orientação de *SbSHN1* no vetor de entrada, procedeu-se com a recombinação com o vetor de destino selecionado para a expressão heteróloga da proteína SHN. A transferência ocorreu através de reação de recombinação entre o vetor de entrada e o vetor pDEST15 (Figura 5). A reação de recombinação para ambos os vetores foi composta por 1,0 µL pENTRSbSHN (50-150 ng/µL); 1,0 µL pDEST15 (150 ng/µL); 6,0 µL TE buffer pH 8,0; 2,0 µL LR Clonase II enzime mix (Invitrogen). As reações de recombinação foram incubadas por 1 hora a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 1 µL de Proteinase K (2µg/µL) e incubou-se por 10 minutos a 37°C.



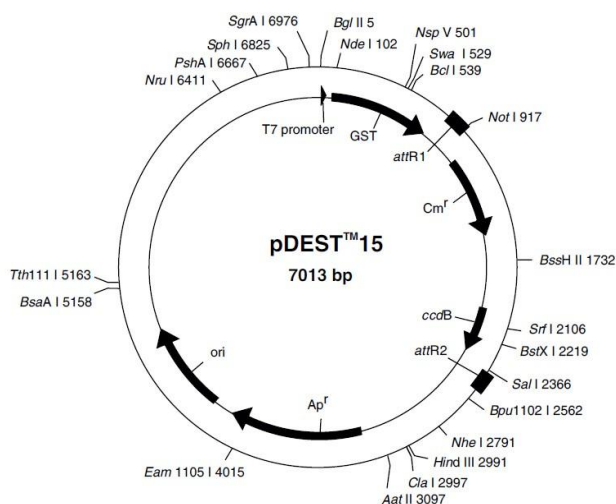


Figura 5: Vetor de Expressão em *E. coli*.

#### 4.6.2 Transformação e Indução da Expressão em *E. coli*

Foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  de cada reação de recombinação para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* linhagem Códon-plus BL21 (DE3)DH10B através de eletroporação (cubeta de 1 mm; 25  $\mu\text{F}$ ; 180  $\Omega$ ; 1650V). Após o procedimento de transformação, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado no tubo, e este foi incubado a 37°C sob agitação de 180rpm durante 1 hora.

As células foram estriadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de ampicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ). As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas. Colônias individuais foram selecionadas e inoculadas separadamente em 5 mL de LB líquido acrescido de ampicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas a 37°C em agitação de 200rpm durante 18 horas. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o Kit comercial *Pure Yield Plasmid Miniprep System* (Promega). Posteriormente, uma reação de PCR com os “primers” de interesse foi feita para verificar a presença do gene no vetor de destino.

Foram selecionadas algumas colônias positivas, que foram inoculadas em 5mL de meio LB líquido acrescido do antibiótico ampicilina e cloranfenicol (34 $\mu\text{g/mL}$ ). Este pré-inóculo foi deixado em agitação 200 rpm a 37°C por 18 horas. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado em 100mL de meio LB líquido em erlenmeyer de 250mL adicionados de ampicilina e cloranfenicol para seleção, sendo retirada uma alíquota nomeada de fração não induzida (NI). Os inóculos foram então mantidos sob

agitação de 200rpm a 37°C até atingir O.D.<sub>600nm</sub> entre 0,2 a 0,4. Ao atingir a O.D. adicionou-se 1mM de isopropyl  $\beta$ -d-thiogalactopyranoside (IPTG) e coletou-se 1 mL do meio, a alíquota foi denominada de porção tempo zero (T0) e logo após os inóculos foram incubados por 5 horas a 37°C, sob agitação de 200rpm. Ao término da indução, centrifugou-se as culturas a 4°C por 10 minutos a 5000rpm, obtendo-se a fração “pellet” (PE). As alíquotas de 1mL NI e T0 foram centrifugadas a 4°C por 3 minutos a 1300rpm. Precipitados celulares foram lisados e os extratos proteicos analisados em gel SDS-PAGE.

#### 4.6.3 Lise bacteriana para liberação das proteínas

Os precipitados bacterianos foram ressuspensos em 5mL de Tampão de Lise (Apêndice A) e incubados em gelo por 30 minutos. Em seguida as amostras foram sonicadas em Bioruptor® Sonication System (Diagenode) por 10 minutos na maior potência (30 segundos ligado e 30 segundos desligado). As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos, a 10500rpm, sendo os precipitados ressuspensos em 5mL de Tampão de Lise. Em seguida as frações foram adicionadas de Tampão de Amostra 4X (Apêndice A) e aquecidas a 100°C por 5 minutos.

#### 4.6.4 Gel SDS-PAGE

Seguindo a técnica de Laemmli (1970), a concentração de acrilamida do gel foi determinada de acordo com o tamanho da proteína que pretendia-se visualizar. O gel de separação foi feito com concentração 15% (10mL de acrilamida 30%, 5mL de 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 0,2mL de SDS 10%, 4,6mL de H<sub>2</sub>O milliQ, 0,8mL de persulfato de amônia e 0,008mL de TEMED) e o gel de empacotamento 5% (0,67mL de acrilamida 30%, 0,5mL de 1,0 M Tris-HCl pH 6,8, 0,04mL de SDS 10%, 2,7mL de H<sub>2</sub>O milliQ, 0,04mL de persulfato de amônia e 0,004mL de TEMED). O gel foi montado de modo que o gel de separação ficasse na parte inferior e sobre ele o gel de empacotamento. Foram montados dois géis, os quais marcador e amostras foram adicionados de forma espelhada, um dos géis foi então corado com

Coomassie 0,2% (Apêndice A), enquanto o outro foi utilizado para análise de especificidade do anticorpo antiSHN (item 4.7).

#### 4.6.5 Predição da massa proteica

A massa da proteína SHN após expressão em *E. coli* foi calculada com base na seqüência do gene SHN (~21 kDa), que foi acrescida dos aminoácidos referentes ao cassete de expressão composto por uma tag de GST presente no vetor pDEST15 (~30 kDa) utilizando a ferramenta Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi0/](http://web.expasy.org/compute_pi0/)).

#### 4.7 Teste do anticorpo antiSHN

##### 4.7.1 Transferência para Membrana e “Western blot”

O gel SDS-PAGE espelho foi utilizado de modo que suas bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema “Mini Protein Tetra Cell” (BioRad). Para isso, primeiramente, o gel foi incubado por 15 minutos em Tampão de Transferência (Apêndice A) previamente gelado, juntamente com todos os acessórios necessários para a transferência (membrana de nitrocelulose, papéis filtro e esponjas), em seguida a transferência foi realizada por 1 hora a 100V. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S (Apêndice A), para verificar se as bandas haviam mesmo sido transferidas. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada em solução de bloqueio (Tampão TBS (Apêndice A) contendo leite em pó desnatado 5%) por 3 horas em geladeira. Em seguida, a solução de bloqueio foi lavada através de lavagem de 15 minutos com Tampão TBS.

Posteriormente, incubou-se a membrana em solução de bloqueio contendo anticorpo primário antiSHN 1:1000 por cerca de 4 horas sob fraca agitação em temperatura ambiente sendo submetida a 4 lavagens com tampão TBS por 5 minutos. Em seguida a membrana foi incubada em solução de bloqueio adicionada de anticorpo secundário Anti Coelho IgG 1:5000 (mmolécula inteira)– Anticorpo de

fosfatase alcalina produzido em cabra (Sigma) por 1 hora em temperatura ambiente, seguida de 4 lavagens de 5 minutos com Tampão TBS, sendo então submetidas a um processo de revelação.

#### 4.7.2 Revelação da Membrana

A revelação da membrana ocorreu de acordo com protocolo padrão do laboratório, na qual primeiramente macera-se 0,03g de Fast Blue (Sigma) em solução de Cloreto de Magnésio ( $MgCl_2$ ) e em seguida completa-se o volume para 30mL com Solução Substrato (Apêndice A). A membrana foi então incubada nesta solução por 30 minutos no escuro sob leve agitação. Ao final lavou-se a membrana por 3 vezes por 3 minutos com Tampão TBS. A membrana então foi colocada em hipoclorito de sódio 20% por 15 minutos sob leve agitação, lavada com água e posteriormente seca.

#### 4.8 Expressão transiente do gene *SbSHN* fusionado à GFP

Para a construção do vetor de expressão transiente contendo a sequência *SBSHN1* foi utilizado o Sistema Gateway de Recombinação (Life Technologies).

##### 4.8.1 Recombinação com o vetor de destino

A recombinação ocorreu de forma similar à recombinação do PENTRSbSHN com o vetor de expressão em *E. coli*. Após a confirmação da presença e correta orientação de *SbSHN1* no vetor de entrada, procedeu-se com a recombinação com o vetor de destino selecionado para a expressão heteróloga da proteína SHN. A transferência ocorreu através de reação de recombinação no vetor pK7WGF2 (<https://gateway.psb.ugent.be/search>) (Figura 6) para obtenção do vetor p35S::GFP-SbSHN. A reação de recombinação para ambos os vetores foi composta por 1,0  $\mu$ L pENTRSbSHN (50-150 ng/ $\mu$ L); 1,0  $\mu$ L pDEST15 (150 ng/ $\mu$ L); 6,0  $\mu$ L TE buffer pH 8,0; 2,0  $\mu$ L LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen). As reações de recombinação



#### 4.8.3 Transformação em *Agrobacterium*

O vetor p35S::GFP-SbSHN, após confirmação, foi transformado em *Agrobacterium* (Cepa pGV2260) por eletroporação (cubeta de 1 mm; 25  $\mu$ F; 200  $\Omega$ ; 2200V). Além disso, foi utilizado o vetor pCAMBIA1302 para transformar *Agrobacterium*, sendo utilizado para controle positivo (p35S::GFP). Após a aplicação da corrente elétrica, foi acrescentado 1 mL de LB líquido, e as células foram mantidas a 28°C durante 4 horas, sob agitação de 200 rpm. Decorrido este período, as células foram espalhadas em placas de Petri contendo LB sólido acrescido de canamicina (50  $\mu$ g/mL) e rifampicina (50  $\mu$ g/mL). Incubou-se as placas a 28°C durante 24 horas. Após a confirmação dos clones positivos por PCR, foi realizado um inóculo e este utilizado para a realização de transformação transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana* de acordo com o protocolo estabelecido por Li (2011).

#### 4.8.4 Agroinfiltração de folhas de *Nicotiana benthamiana*

Foi selecionada uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção, inserindo-a em meio LB líquido contendo canamicina (50  $\mu$ g/mL) e rifampicina (50  $\mu$ g/mL), sendo incubada a 28°C, sob agitação de 200rpm durante 18 horas. Após a incubação, 5mL da cultura foram centrifugados (800 rpm por 5 minutos) e o “pellet” foi ressuspensionado em 1mL de meio MES/MgCl<sub>2</sub> (Apêndice A). A O.D.<sub>600nm</sub> foi medida em espectrofotômetro, até O.D. ideal de aproximadamente 0,2-0,3, sendo adicionado meio MES/MgCl<sub>2</sub> caso necessário. Foi adicionado acetoseringona C<sub>f</sub> 100 $\mu$ M ao meio e com o auxílio de uma seringa de 1mL foi realizada a agroinfiltração do meio contendo *A. tumefaciens* na superfície abaxial de folha de *Nicotiana benthamiana*.

#### 4.8.5 Microscopia Confocal das folhas de *Nicotiana benthamiana*

As plantas foram mantidas em temperatura ambiente e após 3 dias da agroinfiltração folhas transformadas e não transformadas foram selecionadas e submetidas à marcação dos núcleos celulares com a utilização do reagente DAPI

(4'-6-diamidino-2-fenilindo) e em seguida, a localização da fluorescência do GFP foi observada em microscópio Confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifocal (LMMC – USP/Ribeirão Preto), bem como a visualização em Campo Claro (Imogen et al., 2010).

De modo complementar, análises computacionais utilizando a sequência de aminoácidos referente ao gene *SbSHN1* foram realizadas com o auxílio da ferramenta Plant-mPloc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) para a predição computacional de sua localização subcelular.

#### 4.9 Análise do Perfil de Expressão de *SbSHN1* e *SbSHN2*

##### 4.9.1 Desenho dos “primers”

Inicialmente, “primers” específicos para os genes *SbSHN1* e *SbSHN2* foram desenhados com o auxílio da ferramenta PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) em regiões não conservadas dos genes, ou seja, evitando os domínios AP2 e os motivos “mm” e “cm”, dando preferência pela região 5' e 3' não traduzida.

Como normalizadores da expressão foram utilizados Ubiquitina-UBQ (*Sb10g027470*) e EIF4A1 (*Sb04g003390*) (Shakoor et al., 2014), buscando-se as sequências desses genes no banco de dados Phytozome v12.1.

As sequências dos “primers” são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequência de “primers” utilizados para o experimento de qPCR

Nome do “primer”	Sequência (5’- 3’)	Tamanho do Amplicon (pb)
<i>SbelF4a1</i> Fw	TGATGAGCGGATGCTGTTT	89
<i>SbelF4a1</i> Rv	TCATCTAGAGAAGGTCAGCGA	
<i>SbUBQ</i> Fw	GCAGACTACAACATCCAGAAGG	118
<i>SbUBQ</i> Rv	GAAGGCACCAGACATGTGAA	
p6970 Fw	CAGTGTATGCCGCCTTCTATC	109
p6970 Rv	TCGCTGCGTAGGTAGTAAGA	
p23600 Fw	GTCATCTGAAACACCACCGA	106
p23600 Rv	ACCACACTCTACTATACCAAACAC	

FW – primer sense Rv – primer antisense

#### 4.9.2 PCR em tempo real (qPCR)

O experimento de qPCR foi realizado com cDNA diluído (1:3) e GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), e 0,25mM dos “primers” FW e RV, com água milli-Q q.s.p. 10µL. Para este experimento triplicata técnica e biológica foram utilizadas, em um iQ5 multicolor Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad) sob as seguintes condições de ciclagem: 5 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60°C, 40 segundos a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72 °C. Primers específicos dos genes *SbSHN 1* e *SbSHN 2* foram usados para detectar os níveis de RNA de *SbSHN* e normalizados com Ubiquitina-UBQ (*Sb10g027470*) e EIF4A1 (*Sb04g003390*) (Shakoor et al., 2014). As sequências dos primers são mostradas na tabela 4.

#### 4.9.3 Análise dos dados

Para o cálculo da expressão gênica relativa, foi utilizado o método do  $\Delta\Delta C_t$  comparativo. Os valores de  $C_t$  gerados foram transformados em  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para realização das análises estatísticas, seguida de normalização pelos genes constitutivos.



## 4.10 Imunoprecipitação de Cromatina

### 4.10.1 Imunoprecipitação de Cromatina de Inflorescência de sorgo

- “Crosslink”

Para realizar o ChIP foram utilizados dois estágios de inflorescência de sorgo – Imaturo e Maduro – em triplicata biológica. Inicialmente pesou-se 1,5g de cada amostra, cortada em pequenos pedaços para haver uma maior área de contato com a solução. O material foi então colocado em Solução de Crosslink (Apêndice A), de modo a descongelar após ser imerso no líquido em tubo de 50mL.

Os tubos plásticos foram colocados abertos no recipiente da bomba a vácuo, esta foi então ligada por 5 minutos e após desligada, o vácuo foi deixado por mais 5 minutos. O vácuo foi então retirado e o procedimento foi repetido. Para cada 12,5mL de Solução de “Crosslink” utilizada foi adicionado 0,8mL de Glicina 2M estéril para paralisar o efeito da Solução de “Crosslink”. Aplicou-se vácuo novamente (5 minutos de bomba ligada, 5 minutos desligada). As amostras foram então lavadas com água destilada, secas e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e então armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

- Extração

As amostras foram maceradas com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido, após a obtenção de um pó fino, foi adicionado Tampão Isolador de Núcleo NIB (“kit CellLytic PN - Sigma), as amostras foram então passadas em Mesh de “nylon” 100µm, o líquido resultante foi colocado em falcon de 15mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, 1200 g a 4°C. O “pellet” foi então ressuscitado em 1mL de NIBA (NIB adicionado de 1mM de Coquetel Inibidor de Protease CIP (Sigma)), sendo adicionado 25µL de 10% Triton X100. As amostras foram então transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugadas durante 10 minutos a 10000g, 4°C. O pellet foi então ressuscitado em 300µL de NIBA, centrifugou-se por mais 10 minutos a 10000g, 4°C. O pellet foi ressuscitado em 300µL de Tampão de lise ChIP (Apêndice A) sendo logo após sonificado. A sonicação da cromatina foi realizada em Bioruptor® Sonication Sytem (Diagenode) por 50 minutos com pulsos de 30 segundos on e 30 segundos off (a cada 10 minutos

água foi retirada e substituída por gelo). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 10000g por 5 minutos a 4°C.

- Pré-limpeza

O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 1,5mL contendo 20µL de proteína A acopladas a dynabeads (Promega). Os tubos foram levados para agitação a 4°C em agitador por 5 horas. Os tubos foram colocados em estante magnética, sendo o sobrenadante coletado e dividido em 3 frações de mesmo volume (100µL cada): “INPUT 100%” que foi armazenado em geladeira, fração SHINE, na qual foi adicionada 5µL de anticorpo antiSHN (1:4000 – imunoprecipitado) e a fração SORO, na qual foram adicionados 4µL de soro (1:5000 controle negativo). As amostras foram mantidas a 4°C por 18 horas sob agitação.

Cerca de 30µL de Proteína A acopladas a dynabeads previamente lavadas com Tampão de Lise CHIP foram adicionados as amostras, que foram em seguida levadas a geladeira por 4 horas sob fraca agitação.

- Lavagem/ Eluição

Durante a lavagem sempre descartou-se o sobrenadante. Primeiramente, colocar os tubos em estante magnética, descartando o líquido inicial. Foi adicionado 500µL de Tampão de Lise CHIP, os tubos foram invertidos 10 vezes e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500µL de Tampão de Lise CHIP, levando os tubos para agitação a 4°C por 5 minutos. Os passos foram repetidos para o Tampão LNDET (Apêndice A) e em seguida para o TE (Apêndice A). Após os 5 minutos incubados em TE, o sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 100µL de Tampão de Eluição CHIP (Apêndice A), incubando-se os tubos a 65°C por 10 minutos, recolhendo o sobrenadante ao final e acrescentando-se mais 100µL de Tampão de Eluição CHIP, incubando-se novamente os tubos a 65°C por 10 minutos, recolhendo o sobrenadante ao final. Em paralelo foi feito o INPUT 30%, adicionando-se 30µL do INPUT 100% em 70µL de Tampão de Eluição CHIP.

Ao final, foi adicionado para cada amostra NaCl com concentração final ( $C_f$ ) 200mM e incubou-se os tubos a 65°C por 18 horas. Foi acrescentado Proteinase K  $C_f$  0,2mg/mL e incubou-se novamente a amostra a 37°C por 45 minutos. Em

seguida, para inativar a proteinase K, as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos. RNase A foi adicionada com C<sub>f</sub> 0,005mg/mL, incubando-se as amostras por 1 hora em temperatura ambiente.

A purificação do DNA, após a etapa de reversão do crosslinking, foi realizada utilizando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e precipitadas com etanol (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.10.2 Análise de bioinformática

Ambavaram et al. (2011) validaram previamente em seu trabalho alvos do gene *AtSHN*, em arroz, através da técnica de EMSA, sendo eles: MYB58/63, NST1/2/SND1, VND4/5/6 e MYB20/43 de arroz (*Oryza sativa*). Através de análises no banco de dados Phytozome v12.1, buscou-se por homólogos desses genes alvos em sorgo. Primeiramente, utilizando o banco de dados de FTs Grassius (<http://grassius.org/grasstfdb.html>) buscou-se pelo “Gene ID” através do nome da proteína. Em seguida, a sequência de aminoácidos foi buscada no banco de dados Phytozome v12.1 e esta sequência foi usada na ferramenta BLAST para encontrar o homólogo do gene em sorgo. A tabela 5 indica o respectivo homólogo em sorgo dos alvos de *AtSHN* em arroz.

Tabela 5 Possíveis alvos de regulação de *SHN* em sorgo. Entre parênteses segue o nome da proteína encontrado no banco de dados de FT Grassius.

<b>Alvo de <i>AtSHN</i> em arroz</b>	<b>Homólogo em Sorgo</b>
<i>NST1/2/SND1</i>	<i>Sb07g001550 (SbNAC91)</i>
<i>MYB58/63</i>	<i>Sb04g031110 (SbMYB60)</i>
<i>VND4/5/6</i>	<i>Sb10g000460 (SbNAC115)</i>
<i>MYB20/43</i>	<i>Sb07g024970 (SbMYB87)</i>

#### 4.10.3 Desenho dos “primers”

A fim de determinar quais genes são alvos de regulação de *SbSHN* buscou-se manualmente na região promotora pela presença de GCC Box ([AG]CCGNC). Para essas análises, a sequência promotora dos genes com comprimento de 1,5kb

“*upstream*” foi examinada em busca de regiões [AG]CCGNC (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995; AMBAVARAM et al., 2010) utilizando o banco de dados Phytozome v12.1. “Primers” para as sequências promotoras dos genes foram sintetizados com o auxílio da ferramenta PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) de modo a flanquear regiões que apresentavam motivos GCC Box, de modo que os “amplicons” tivessem tamanho entre 150 e 250 pb. Como controle foi utilizado o gene de Actina (*Sb09g021660*) (AGARWAL et al., 2016). As sequências dos “primers” estão indicadas na tabela 6.

Tabela 6 Sequencia de “primers” utilizados para ChIPqPCR

Nome do “primer”	Sequência 5' → 3'
p1550 – qChIP 1.1 Fw	CTGAGCCCATTGTTGCACTA
p1550 – qChIP 1.1 Rv	CTCTCTTTCGATTGAACGACGAC
p1110 – qChIP 1.1 Fw	GAAGACCTAGCCGCCATTG
p1110 – qChIP 1.1 Rv	GCTTTCCTTCCCATCGTGTT
p0460 – qChIP 1.2 Fw	CGGGAGAGACTAGACAAAGTTAAG
p0460 – qChIP 1.2 Rv	AGAAGAAGAAGAGGAGGAGGAA
p4970 – qChIP 1.1 Fw	CTCGTGATCTCATCCCATCATC
p4970 – qChIP 1.1 Rv	GCCCTGTTTGGCTGTCTA
p Actina Fw	GTTACTCCGCGCCAAACA
p Actina Rv	CCCAGGCAACTAGAGACCAA

#### 4.10.4 Determinação de alvos de *SbSHN* em sorgo por ChIPqPCR

PCR quantitativo foi realizado com QuantiNova SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) em um iQ5 multicolor Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad) sob as seguintes condições de ciclagem: 3 minutos a 95 °C, seguidos por 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, 30 segundos a 60 °C. Foram utilizados 3 uL de DNA recuperado como molde, numa reação que consistiu em 5 uL de 2x SYBR Green PCR Master Mix e 0.25 µM de cada “primer” em uma reação de 10uL.

Para cada uma das 3 frações (INPUT 30%, SHINE e SORO) foram utilizadas duplicatas técnicas e triplicatas biológicas.

#### 4.10.5 Análise dos dados

Para análise dos dados, primeiramente foi feito um  $\Delta Ct$  através da normalização com actina [ $2^{-(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ actina})}$ ]. Em seguida, foi realizada a comparação entre  $\Delta Ct$  inflorescência imatura x  $\Delta Ct$  inflorescência madura, tanto para INPUT como para SHINE e SORO.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análises bioinformáticas

Com o intuito de buscar pelo homólogo do gene *SHN* previamente caracterizado em *Arabidopsis thaliana* (Aharoni et al., 2004) foi realizado o alinhamento das sequências SHN de *Arabidopsis* juntamente com sequências SHN de *Sorghum bicolor* (*Sb10g023600* e *Sb04g006970*) (BRITO et al., 2015), *Zea mays* (*ZmEREB46* e *ZmEREB145*) (BRITO et al., 2015), *Arabidopsis thaliana* (*AtSHN1*, *AtSHN2* e *AtSHN3*) (AHARONI et al., 2004), *Hordeum vulgare* (*HvNUD*) (TAKETA et al., 2008), *Oryza sativa* (*Os02g10760* e *OsSHN06g40150*) (AMBAVARAM et al., 2011; WANG et al., 2011), *Solanum lycopersicum* (*SISHN1*, *SISHN2* e *SISHN3*) (SHI et al., 2013; Al-ABDALLAT et al., 2014), *Panicum virgatum* (*PvERF001*) (WUDDINEH et al., 2015), *Triticum aestivum* (*TaSHN1*) (JÄGER et al., 2015), *Glycine Max* (*GmSHN1* e *GmSHN9*) (XU et al., 2016) e *Saccharum hybrids* (*ShSHN1*) (MARTINS, dados não publicados) que evidenciou a existência do domínio AP2 e dos motivos “mm” e “cm” descritos como específicos do clado SHN (AHARONI et al., 2004), o que pode ser observado na Figura 7. A partir da elaboração da árvore filogenética (Figura 8) utilizando as sequências de aminoácidos é possível verificar a existência de dois grupos distintos. No primeiro grupo, encontram-se membros da família AP2 apresentando o domínio AP2, contudo não apresentando ou apresentando de maneira incompleta os motivos “mm” e “cm”. Já no segundo grupo estão presentes os membros do clado SHINE, que apresentam o domínio AP2 e os motivos proteicos “mm” e “cm” completos, o que vem de encontro aos dados obtidos previamente por Aharoni et al. (2004) e Brito et al. (2016). Além disso, é possível observar, dentro do segundo grupo, uma nova separação entre sequências de monocotiledôneas e dicotiledôneas, evidenciando o fato de que, assim como esperado, os genes *SHN* de soja, tomate e *Arabidopsis* (dicotiledôneas) são mais próximos entre si, bem como os genes *SHN* de monocotiledôneas (sorgo, *switchgrass*, arroz, trigo, milho, cana e cevada).

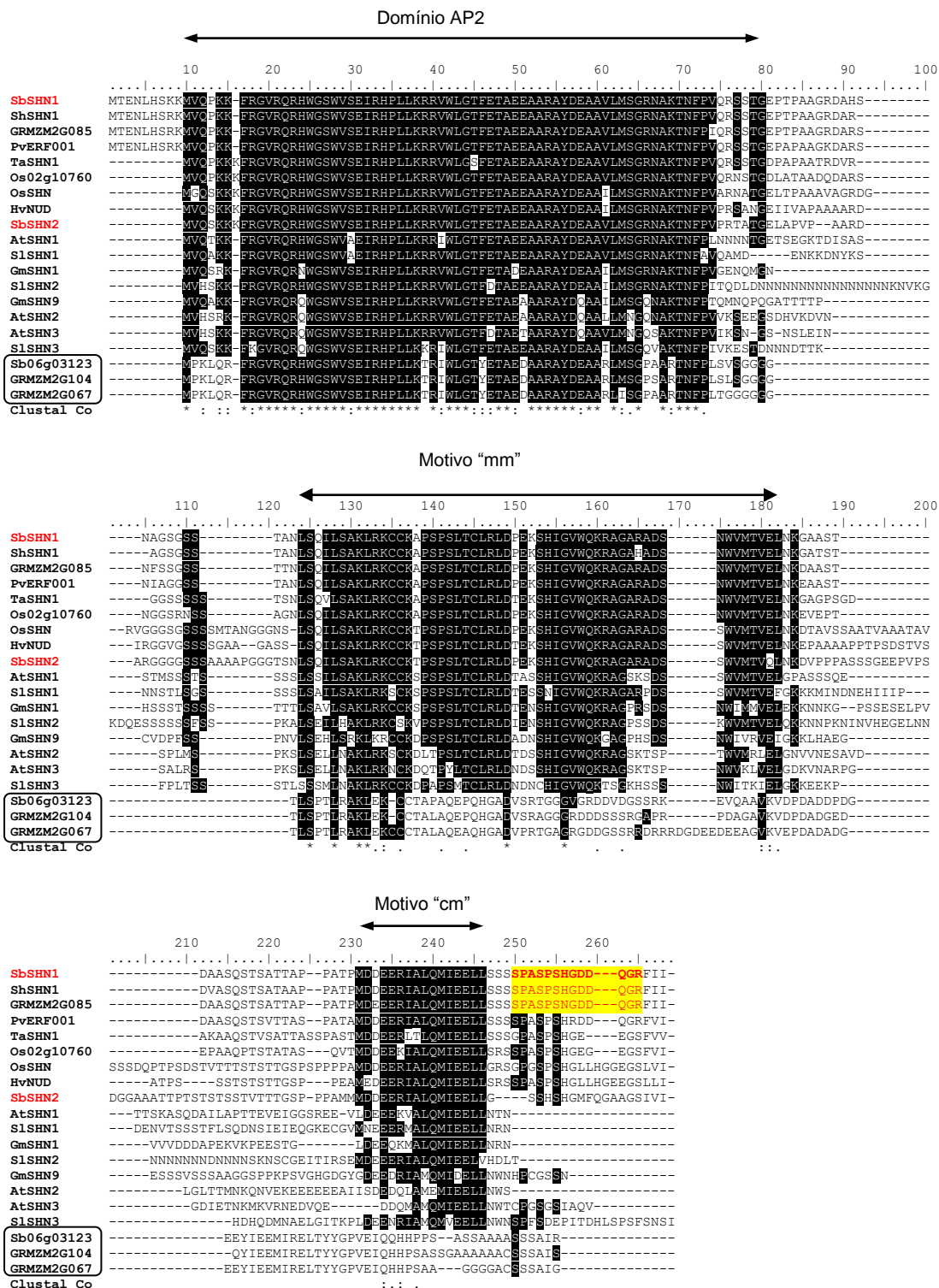


Figura 7 Alinhamento de proteínas SHN e seus similares mais próximos em diferentes plantas.

As barras correspondem aos domínios conservados AP2 e os motivos “mm” e “cm” (exclusivos do clado SHN). Grupos indicados com um retângulo são proteínas AP2, não pertencendo ao clado SHN por não possuírem os motivos “mm” e “cm”. Sb (*Sorghum bicolor*) indicados em vermelho, GRMZM (*Zea mays*), Pv (*Panicum virgatum*), Os (*Oryza sativa*), Ta (*Triticum aestivum*), Hv (*Hordeum vulgare*) Gm

(*Glycine Max*), *Sl* (*Solanum lycopersicum*) *Sh* (*Saccharum hybrids*) e *At* (*Arabidopsis thaliana*). Peptídeos grifados em amarelos indicam o epítipo do anticorpo antiSHN.

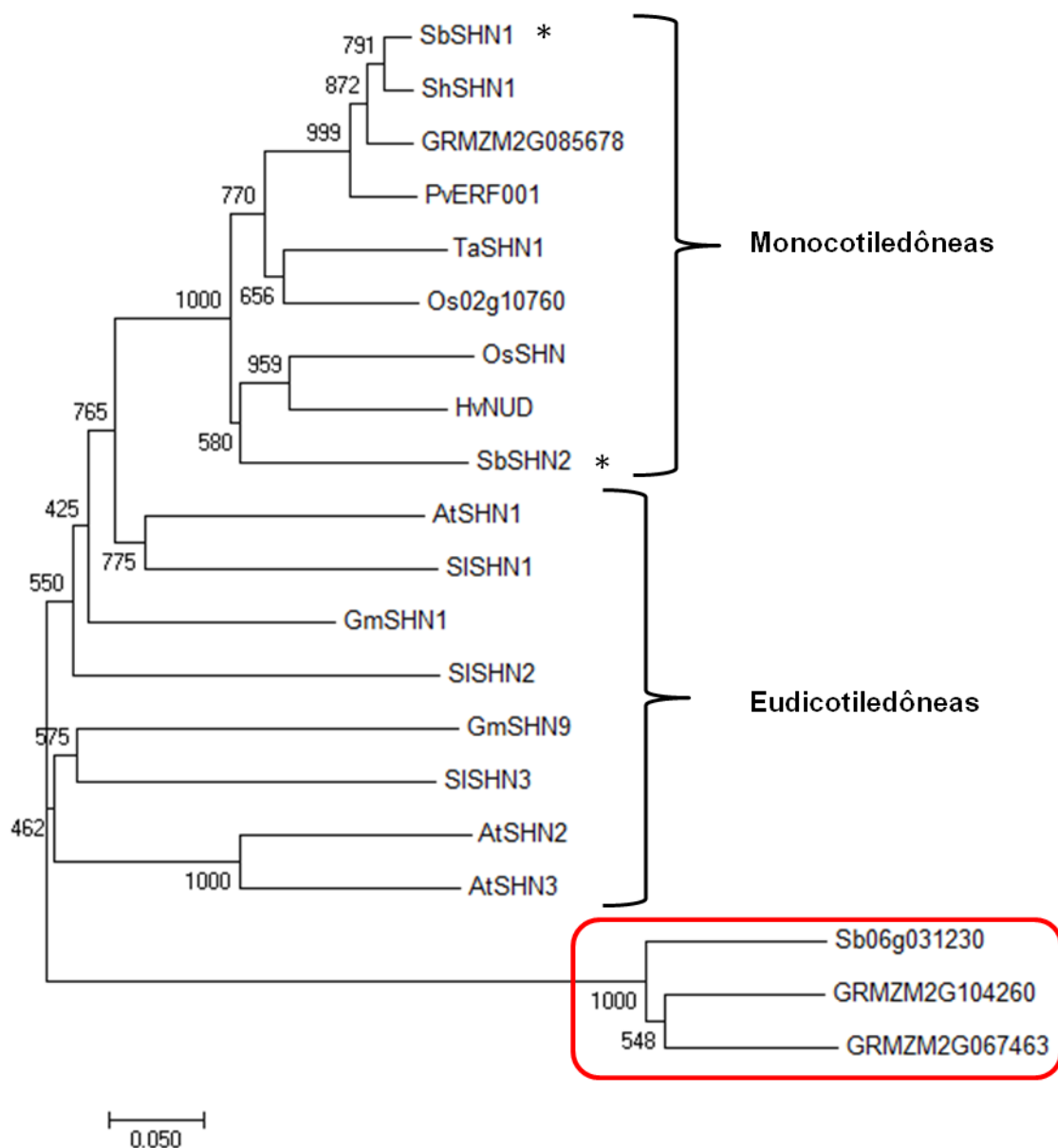


Figura 8 Árvore filogenética de FTs *SHN* AP2/ERF.

A árvore foi construída pelo método de neighbour-joining com 1000 reamostragens de bootstrap. Grupo indicado por retângulo: Não pertencentes ao clado SHN; Monocotiledôneas: *Sb* (Sorgo), *Pv* (*Switchgrass*), *Os* (Arroz), *Ta* (Trigo), *GRMZM* (milho), *Sh* (cana) e *Hv* (Cevada); Dicotiledôneas: *Gm* (Soja), *Sl* (Tomate) e *At* (*Arabidopsis*). \*Sequências SHN de sorgo. Números nos nós da árvore indicam que em X/1000 amostragens as seqüências estavam reunidas em um ramo contendo apenas as três seqüências



A fim de escolher o melhor material para a realização do ChIP, foi realizada uma busca pelo banco de dados de expressão (RNA-Seq *Sorghum qTeller*) e no banco de dados The Bio-Analytic Resource for Plant Biology (BAR – milho). Ao observarmos a figura 9 pode-se notar que o pistilo é o material que apresenta a maior expressão tanto de *SbSHN1* quanto de *SbSHN2*, seguido de inflorescência imatura. Uma vez que, o pistilo é uma unidade da flor e a flor é uma unidade da inflorescência, sendo este tecido mais fácil de coletar, além de apresentar um alto nível de expressão dos genes *SbSHN* a inflorescência foi escolhida como um dos materiais para teste. Como materiais contrastantes, foram escolhidas a inflorescência imatura, com maior expressão esperada, e a inflorescência madura, sem informação no banco de dados.

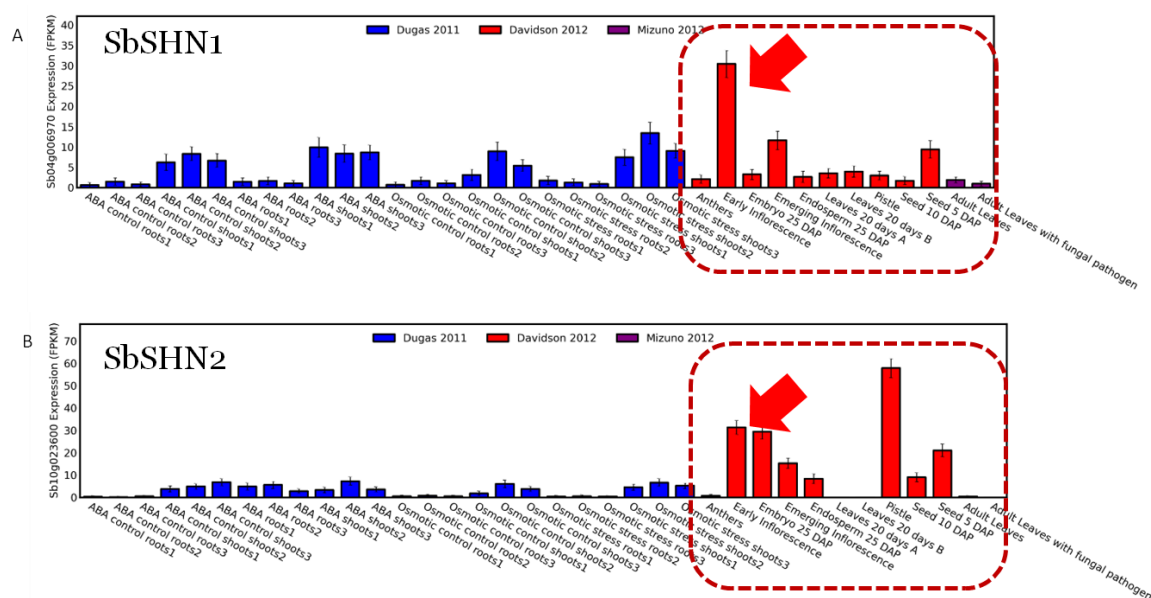


Figura 9 Padrão de expressão por análise de RNA-Seq dos genes (A) *SbSHN1* e (B) *SbSHN2* (DUGAS et al., 2011).

Setas indicam tecido escolhido para posterior avaliação da expressão por qPCR.

Contudo, Agarwal et al. (2016) em seus estudos de ChIP de milho, sorgo e arroz utilizaram como material de estudo base e ponta de folhas. Além disso, Brito et al (dados não publicados) também utilizaram em seu trabalho com ChIP de milho a base e a ponta de folhas, tecidos indicados pelo banco de dados de milho consultado (BAR) como os tecidos contendo maior e menor expressão de *SHN* em milho (GRMZM2G085678), respectivamente (Figura 10). Esperando encontrar o

mesmo padrão de expressão de sorgo em milho, este tecido foi também validado neste trabalho como um possível tecido para realização do ChIP. Os quatro tecidos escolhidos tiveram então sua expressão avaliada por qPCR.

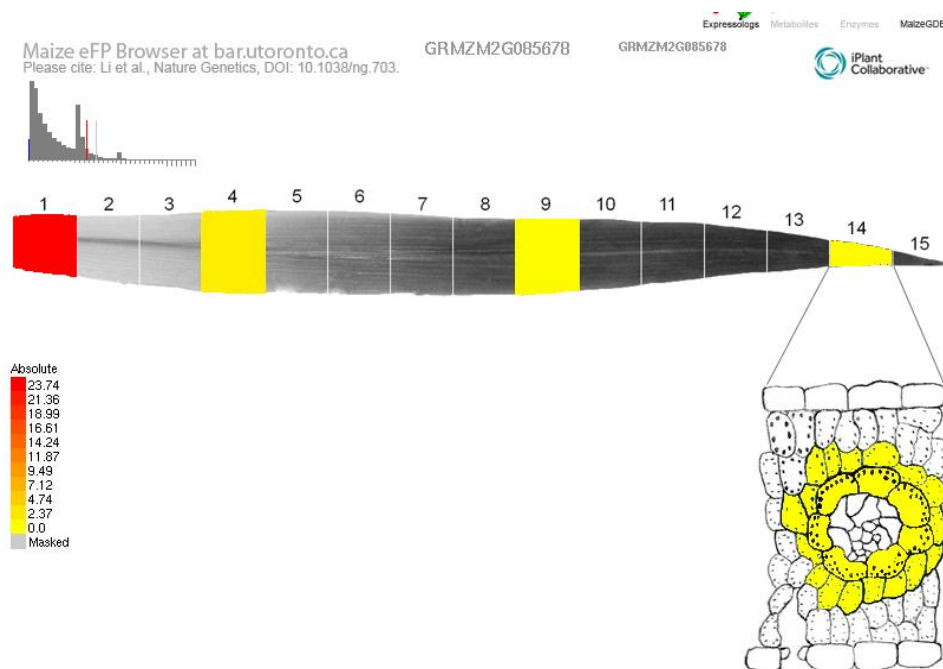


Figura 10 Padrão de expressão indicado no banco de dados The Bio-Analytic Resource for Plant Biology (BAR) (LI et al., 2010).

Através de análise prévia no banco de dados Phytozome v12.1, foi observado que o gene *SbSHN1* (*Sb04g006970*) é constituído de 642 pares de base, apresentando um íntron de 101pb após 107 pb. Por sua vez, *SbSHN2* (*Sb10g023600*) apresenta 708 pb, com região intrônica de 196 pb após 83 pb, tal estrutura dos genes pode ser melhor elucidada na figura 11.

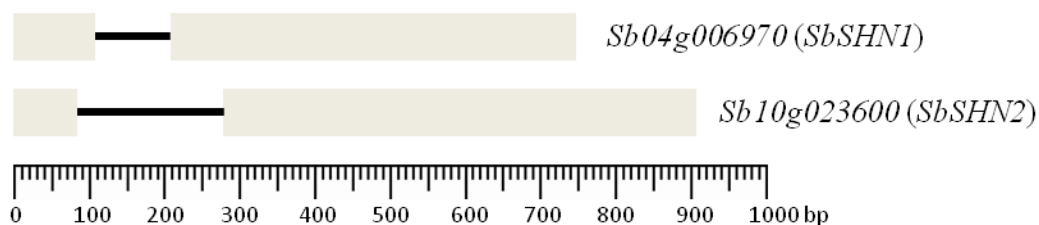


Figura 11 Estrutura dos genes *SbSHN*.

Estrutura gênica dos genes *SHN* em sorgo, apresentando seus dois éxons e um íntron e a diferença de tamanho deles em pb.

## 5.2 Clonagem do gene *SbSHN*

Após as análises “in silico”, ficou evidente que o gene *SbSHN1*, apresentou maior proximidade com os genes *SHN* de cana-de-açúcar e milho, e por este motivo foi escolhido para ser clonado. A partir da sequência nucleotídica de *Sb04g006970*, obtida no banco de dados Phytozome v12.1, foram desenhados “primers” *SbSHNpENTR\_FW* e *SbSHNpENTR\_RV* (Tabela 3), conforme descrito no item 4.5.1. Esta sequência apresenta 642 nucleotídeos em sua fase de leitura aberta e um total de 213 aminoácidos. A amplificação por PCR de *SbSHN1* foi realizada a partir de cDNAs de folha de sorgo (item 4.4). O produto foi então visualizado em gel de agarose 1%, após corrida eletroforética, apresentando banda única de aproximadamente 650pb (Figura 12).

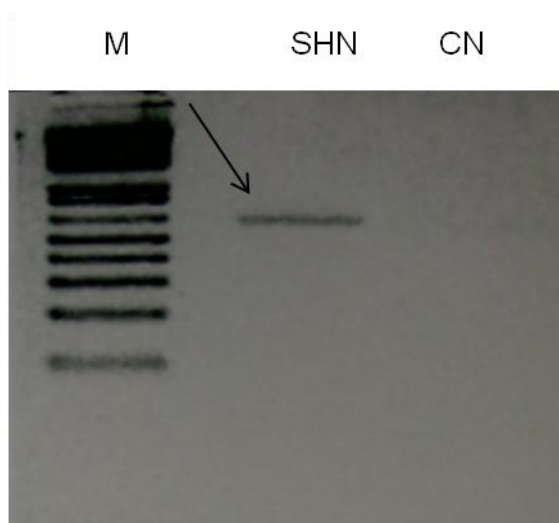


Figura 12 Análise do produto de PCR amplificando a sequência codificadora do gene *SbSHN1*, em gel de agarose 1% através de eletroforese. M: Marcador de peso molecular (100pb); CN – Controle Negativo. Seta indica fragmento amplificado do gene contendo 646 pb (642 nucleotídeos do gene mais a “tag” CACC).

Em seguida, a banda foi excisada do gel de agarose, purificada e clonada no vetor comercial *pENTR/D-TOPO* (Invitrogen). O vetor contendo o produto da amplificação foi transformado em *E. coli*, obtendo-se bactérias transformadas, que foram testadas para confirmação da presença do gene através de uma PCR de colônia (Figura 13) utilizando os “primers” M13F e *SbSHNpENTR\_Rv* (Tabela 3).

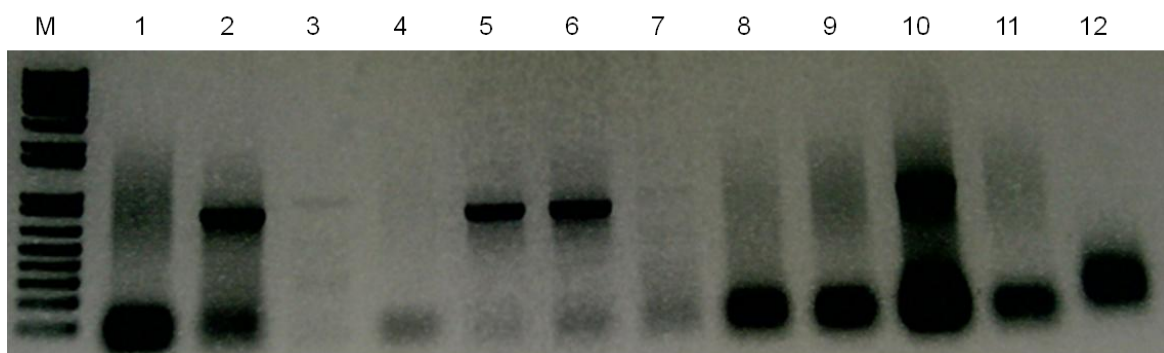


Figura 13 Eletroforese em gel de agarose.

Gel de agarose 1% para verificação da clonagem da sequência de *SbSHN1* no vetor pENTR-D TOPO. Foram testadas 12 colônias de *E. coli* por PCR mostrando a amplificação de *SbSHN1*. M: marcador de peso molecular 100pb. Colônias 2, 5 e 6 possuem o gene inserido no vetor.

Após a confirmação do gene no vetor foi realizado o sequenciamento (Apêndice B) utilizando os “primers” M13F e M13R (Tabela 3). As duas sequências geradas foram unidas em um único “contig” (Apêndice C), o qual mostrou identidade com a sequência de sorgo *SbSHN1* presente no banco de dados Phytozome v12.1.

### 5.3 Expressão heteróloga da proteína SHN e análise de especificidade do anticorpo antiSHN

O desenho do anticorpo antiSHN foi realizado baseando-se em critérios como distância do domínio de ligação ao DNA (que poderia “esconder” esta parte da proteína e prejudicar o reconhecimento por parte do anticorpo), antigenicidade, hidrofobicidade entre outros. Para isso o epítipo deveria ter um total de 13 aminoácidos e um resíduo de Cisteína (indicado na tabela 7 por um C verde), utilizado para ancorar uma “tag” que foi utilizada para posterior purificação do anticorpo, além disso, proporciona um melhor desempenho em Western blot e ChIP. O epítipo escolhido, de acordo com os critérios citados, para o anticorpo antiSHN está indicado na tabela 7 em cinza. Após a escolha foi realizado a confecção do peptídeo sintético e produção do respectivo anticorpo antiSHN em coelho.

Tabela 7 - Predição de epítomos a partir de peptídeos sintéticos utilizados para a produção de um anticorpo antiSHN.

Começo	Determinante antigênico	Comprimento (aa)	Antigenicidade / Superfície / Hidrofilicidade
83	CPAAGR <b>D</b> ARAGSGSS	14	2.94/0.93/0.56
5	LHSRKMVQPK <b>K</b> FRGC	14	2.88/0.79/0.67
195	CSSPASPS <b>H</b> G <b>D</b> DQGR	14	2.84/1.00/0.43
65	RNAKTNFPVQ <b>R</b> SSTC	14	2.02/0.79/0.32
168	CATTAPPATPM <b>D</b> DEE	14	1.61/0.93/0.47

aa - aminoácidos

A proteína SbSHN1 foi expressa em fusão com cauda GST, a qual facilitaria um posterior processo de purificação, o qual não foi necessário. Para que ocorresse tal fusão, a sequência de *SbSHN1* clonada em vetor pENTR/D-TOPO foi recombinada com o vetor pDEST15, o qual fusiona a região N-terminal da proteína de interesse, com a cauda GST.

O vetor transformado foi inserido em *E. coli* cepa BL21 (DE3) Códon-plus por eletroporação. Um colônia transformada foi induzida com IPTG, após atingir O.D. entre 0,4 e 0,6, e crescidas por 5 horas a 37°C sob agitação. Sendo retiradas alíquotas ao adicionar a colônia ao inóculo (NI), ao se adicionar o IPTG (T0) e após as 5 horas de indução (PE). As proteínas foram então extraídas como referido no item 4.6.3.

O resultado da extração de proteínas foi observado em gel SDS-PAGE (Figura 14 A), no qual é possível observar uma banda com maior intensidade, com a massa esperada de aproximadamente 52 kDa na fração “*pellet*”. Não foi observada banda de mesmo tamanho e intensidade nas frações NI (momento em que o pré-inóculo foi adicionado ao inóculo) e TO (fração não induzida, momento em que foi adicionado o IPTG).

O teste para verificar a especificidade do anticorpo foi realizado por western blot (item 4.7.1) e, como observado na figura 14 B, o anticorpo produzido é capaz de reconhecer a proteína SbSHN1, sem marcação inespecífica. Isto garante que o anticorpo pode ser utilizado em experimentos de ChIP (Milne et al., 2009; Gade e Kalvakolanu, 2012).

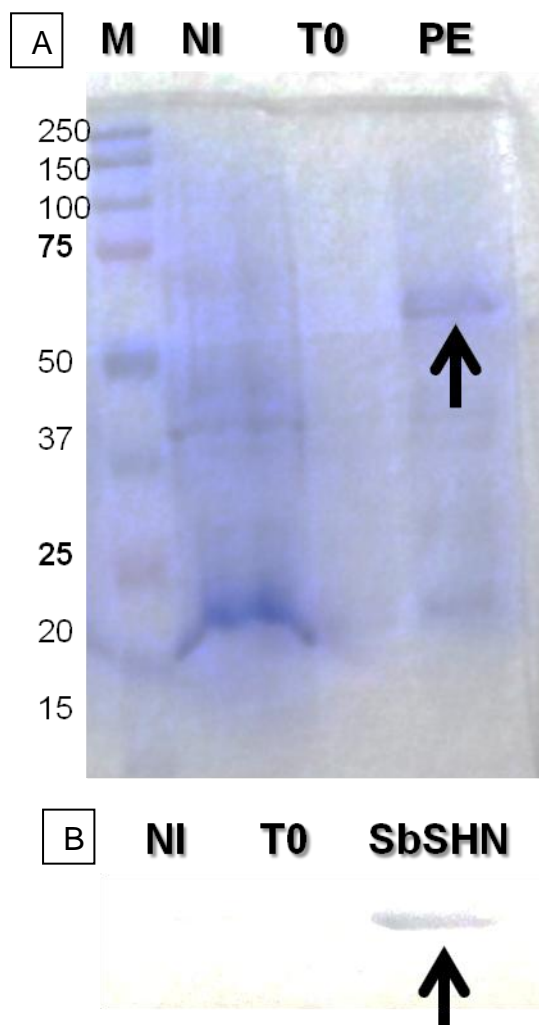


Figura 14 Expressão heteróloga da proteína SHN e teste do anticorpo antiSHN. A- Expressão da proteína recombinante SHN de sorgo em células da linhagem códon plus. Seta indica a proteína recombinante, com um peso molecular predito de 52kDa, na fração pellet. B-Análise de Western blot usando anticorpo antiSHN reconhecendo a proteína recombinante de sorgo. M, marcador de proteína; T0, pré-inóculo; NI, não induzido; PE, fração pellet da proteína recombinante induzida com 1mM de IPTG.

#### 5.4 Localização Subcelular de SbSHN

Inicialmente foi realizada uma análise *in silico* a fim de avaliar a localização predita da proteína SHN de sorgo. Para isso, utilizou-se a sequência completa de aminoácidos de SbSHN com o auxílio da ferramenta mPloc (item 8.1). O resultado indicou que, assim como esperado para um FT, SHN está sendo direcionado para o núcleo (Tabela 8). A fim de confirmar experimentalmente essa sinalização nuclear, a

região N-terminal da proteína codificada por *SbSHN1* foi fusionada à região C-terminal da proteína GFP, proteína verde fluorescente amplamente usada como gene repórter. Uma cultura bacteriana de *Agrobacterium* contendo o vetor p35S::GFP-SbSHN foi utilizada para agroinfiltrar folhas de *Nicotiana benthamiana* conforme descrito no item 3.8.

Tabela 8 Análise “in silico” para identificar a localização subcelular da proteína SbSNH1 (SHEN;CHOU, 2007).

Plant-mPLOC Computation Result	
Proteína de interesse	Localização Predita
SbSHN1	Núcleo

A figura 15 mostra a análise de lâmina preparada com células da folha de *N. benthamiana* infectadas com culturas de *Agrobacterium* contendo o vetor p35S::GFP-SbSHN, que foi comparada com lâmina de folha não infectada (controle negativo). Para as folhas não infectadas, não foi visualizado qualquer tipo de fluorescência quando se utilizou o filtro para GFP, apenas para as imagens obtidas com o filtro de DAPI (marcador positivo para núcleo). Para as folhas transformadas com a construção p35S::GFP-SbSHN, foi possível observar um sinal de fluorescência no núcleo, assim como esperado para FTs. Esse sinal de localização nuclear pode ser confirmado através da sobreposição de sinal observado quando comparado com o sinal obtido no filtro do marcador positivo para núcleo DAPI. O resultado obtido na análise de localização subcelular vem de acordo com o que foi sugerido por Jofuku et al. (1994) de que proteínas pertencentes à família AP2 funcionam como FTs nucleares, estando a proteína SHN de sorgo localizada no núcleo das células.

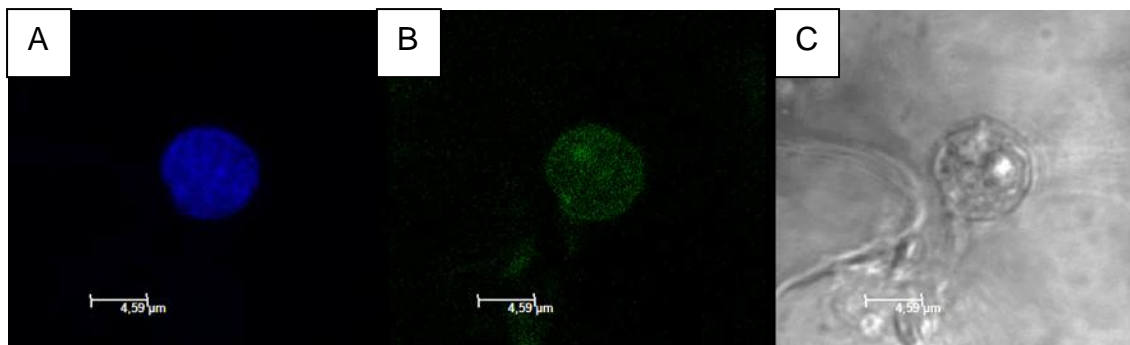


Figura 15 Determinação da localização subcelular da proteína SbSHN.

A sequência que codifica a proteína SHN de sorgo (*SbSHN1*) fusionada na extremidade C-terminal do gene repórter GFP e usada para transformar transitoriamente folhas de *Nicotiana benthamiana*. Células transformadas foram visualizadas em microscópio confocal SP5 (Leica microsystem) em diferentes filtros. Células transgênicas SbSHN apresentaram sinal de GFP no núcleo, como esperado, enquanto que o mesmo sinal não foi visualizado nas plantas controle não transformadas. (A) Filtro DAPI, marcador específico para núcleo; (B) GFP, filtro específico para visualização deste gene repórter e (C) visualização em campo claro, sem fluorescência. Escala: 4,59μm.

#### 5.5 Análise do Perfil de Expressão do gene *SbSHN* em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do sorgo

A expressão específica, ou pelo menos preferencial, do FT em um determinado tecido e/ou tipo celular é considerada uma das exigências para a realização da técnica de ChIP (GADE; KALVAKOLANU, 2012). Portando desta informação, foi realizada a análise de expressão por qPCR do gene *SbSHN* em diferentes tecidos.

A partir das sequências *SbSHN*, foram desenhados “primers” para estudar os níveis de expressão desses genes nos tecidos escolhidos. A quantificação foi realizada por qPCR e os “primers” foram desenhados em regiões não conservadas do gene, a fim de não quantificar erroneamente transcritos pertencentes a outros membros da família AP2. Para o gene *SbSHN2* os “primers” foram desenhados na região 3’ UTR do gene, enquanto que para o gene *SbSHN1* os “primers” foram desenhados na região 5’ UTR, uma vez que os “primers” desenhados na região 3’ UTR não funcionaram.



Para a normalização das expressões, foram utilizados os genes de referência Ubiquitina (*Sb10g027470*) e EIF4A1 (*Sb04g003390*) uma vez que haviam sido previamente utilizados em estudos de expressão por SHAKOOR et al. (2014).

As reações de qPCR foram realizadas pelo método relativo com base nos genes de referência. Após análise pelo método de  $\Delta\Delta Ct$  (PFAFFL, 2001), foram gerados os gráficos de expressão relativa. O gene *SbSHN1* apresentou um perfil de expressão diferente daquele observado para o gene *SbSHN2* (Figura 16). O gene *SbSHN* encontra-se mais expresso, em ambas as formas, em inflorescências imaturas. *SbSHN1* apresenta expressão em todos os tecidos estudados, podendo ser observada maior expressão na ponta da folha que na base da mesma. Não foi detectada expressão de *SbSHN2* na ponta da folha e sua expressão foi baixa em sua base. O mesmo perfil de *SbSHN2* foi encontrado em milho, ao estudarem a dinâmica de acumulação de fatores de transcrição em folha, com 68% dos FTs mais expressos na base da folha, dentre os quais estão inclusos FTs envolvidos na regulação de determinadas vias metabólicas como: cera, lignina e carbono ( por exemplo: AP2/EREBP: SHN1 e WRI1; NAC: NST1) (LI et al., 2010), confirmando os dados de expressão aqui obtidos.

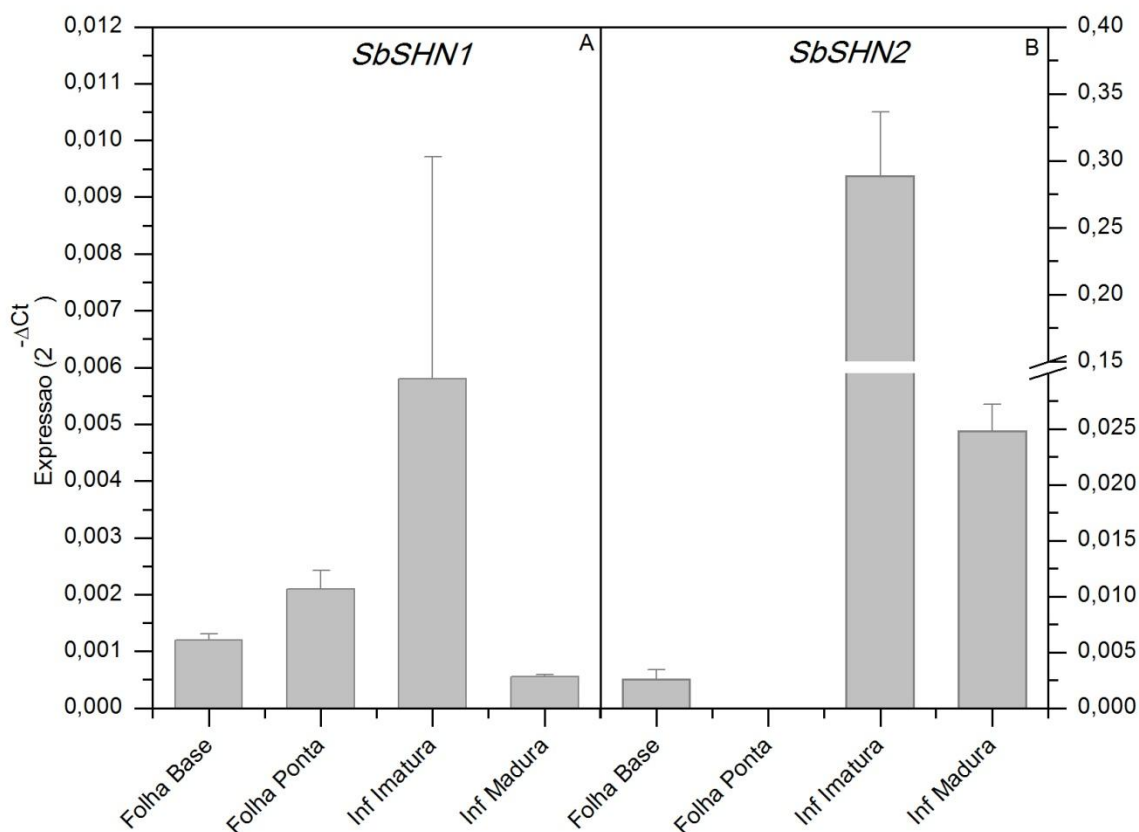


Figura 16 Análise de expressão dos genes *SbSHN*.

(A) Determinação da expressão dos genes *SbSHN1* e (B) determinação da expressão de *SbSHN2* por qPCR em duas regiões da folha (base e ponta) e de inflorescência em dois diferentes estágios de maturação (Imatura e Madura).

Diferenças nos padrões de expressão de diferentes genes *SHN*, em uma mesma espécie, também foi verificado por Aharoni et al. (2004). Ao examinarem a expressão de *AtSHN1*, *AtSHN2* e *AtSHN3* fusionando os ao gene repórter *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) foi observado que *AtSHN1* tem expressão relacionada à inflorescência e suas estruturas, podendo mudar conforme idade da planta, enquanto *AtSHN2* está relacionado com sementes e antera e *AtSHN3*, por sua vez encontra-se expresso em todos os órgãos, apresentando respostas diferentes à ferimentos, de acordo com o tecido ferido.

Do mesmo modo, espera-se que ao ser analisada a expressão de *SHN* em sorgo, outros tecidos também podem apresentar expressão de *SHN*.

## 5.6 Determinação dos prováveis genes-alvos de *SbSHN* em sorgo

A partir de dados previamente validados por Ambavaram et al. (2011) no qual eles identificaram, através da técnica de EMSA, quatro alvos do gene *AtSHN*, em arroz: *OsMYB58/63*, *OsNST1/2/SND1*, *OsVND4/5/6* e *OsMYB20/43*, buscou-se por homólogos desses genes-alvo em sorgo, a fim de constatar se *SHN* apresentava os mesmos alvos também em sorgo. Para isto, buscou-se no banco de dados Grassius (<http://grassius.org/grasstfdb.html>) pelo “Gene ID” desses genes em arroz, com posterior busca no banco de dados Phytozome v12.1 por suas sequências de aminoácidos, as quais foram utilizadas para buscar, utilizando a ferramenta Blast (ALTSCHUL et al., 1990), seus homólogos em sorgo.

A fim de determinar se os genes são alvos de regulação de *SbSHN* buscou-se manualmente na região promotora pela presença de GCC Box ([AG]CCGNC). Para essas análises, a sequência promotora dos genes com comprimento de 1,5kb “*upstream*” foi examinada em busca de regiões [AG]CCGNC (AMBAVARAM et al., 2011). “Primers” foram sintetizados de modo a flanquear regiões que apresentavam motivos GCC nos promotores dos genes.

Como pode ser observado na figura 17, o gene *Sb07g001550* (*SbNAC91*), homólogo ao NST1 de arroz, apresentou somente uma região GCC Box (ACCGCC) na posição -1160pb “*upstream*” do gene. *Sb04g031110* (*SbMYB60*), homólogo ao MYB58/63, apresentou 4 motivos GCC nas posições -1476, -1371, -1231 e -857 pares de bases a montante do gene. *Sb10g000460* (*SbNAC115*), homólogo à VND, não apresentou qualquer motivo GCC na região promotora de 1500 pb upstream do gene, porém, no início da região 5’UTR (91pb) foi encontrado GCC Box (ACCGCC). *Sb07g024970* (*SbMYB87*), assim como o MYB20/43 em milho, também apresentou 4 motivos GCC, muito próximos entre si: -821, -800, -597 e -584. Os triângulos indicam locais onde esses sítios GCC foram encontrados. Todos os “primers” foram testados, contudo alguns apresentaram um melhor enriquecimento que os outros, ou até não funcionaram. Triângulos brancos indicam o local cujo melhor combinação de “primers” para cada possível gene-alvo flanqueiam (Figura 17) e que foram utilizados para a geração dos resultados apresentados da figura 18.

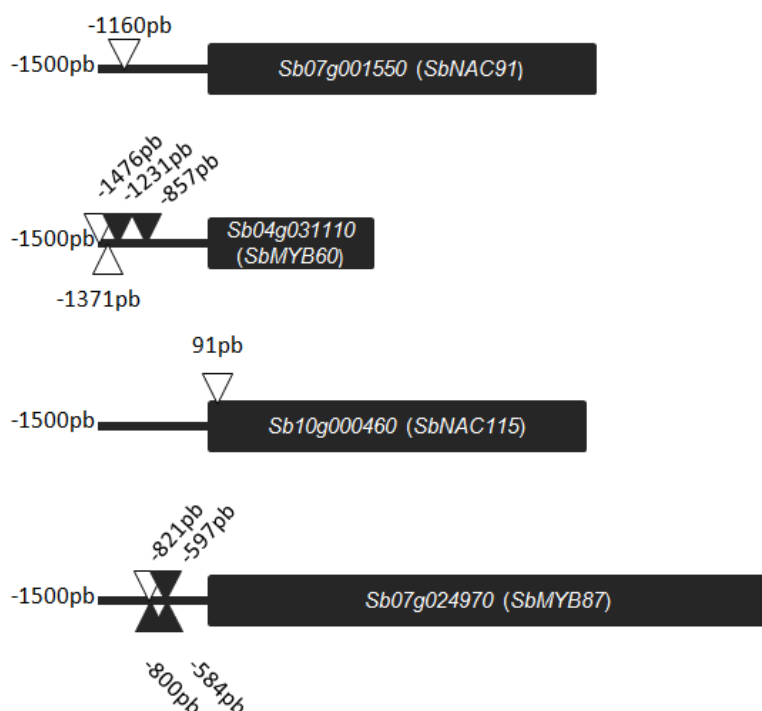


Figura 17 Determinação da presença de sítios para a ligação do FT SHN em seus respectivos alvos de sorgo.

Os triângulos pretos indicam locais na região promotora que contém GCC Box ([AG]CCGNC) de genes regulados por *SHN*, triângulos brancos indicam locais que contém GCC Box ([AG]CCGNC) onde os “primers” utilizados para a obtenção dos resultados de ChIPqPCR flanqueiam.

Bailey e Elkan (1994) afirmam que um motivo é um padrão comum entre um conjunto de sequências nucleicas que partilham alguma propriedade biológica ou função, como por exemplo, um local comum de ligação de uma determinada proteína, tais como os motivos GCC Box ([AG]CCGNC) na região promotora dos genes alvos, que são reconhecidos por FTs SHN (AP2/ERF) (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995; NAKANO et al., 2006).

As três frações (INPUT, ou fração na qual foi realizado o “crosslink” e fragmentação, porém não houve imunoprecipitação; SORO, fração na qual foi realizada a imunoprecipitação com o soro do animal no qual foi produzido o anticorpo antiSHN e SHN, fração na qual houve imunoprecipitação com o anticorpo antiSHN) de cada inflorescência em diferentes idades (madura e imatura) foram utilizadas como moldes para os “primers” em PCR em tempo real. Os dados foram

então normalizados com o gene da actina e em seguida foi calculada a razão de Imaturo/Maduro.

Os genes testados, como apresentado na figura 18, indicaram um maior enriquecimento na inflorescência imatura, quando comparado à inflorescência madura, isto indica que esses genes são genes alvos de regulação do FT SHN em sorgo. Tais resultados vão de acordo com o previsto, uma vez que por ser apresentada uma maior expressão do FT *SHN* nas inflorescências imaturas, espera-se que, naquele tecido, exista uma maior quantidade de genes-alvo sendo ligados pelo FT. Além disso, é possível observar que os controles, ou seja, a fração não imunoprecipitada (INPUT) e a fração imunoprecipitada com somente o soro do animal, sem anticorpo (SORO), apresentaram razão de enriquecimento em torno de um, o que era esperado para essas frações.

Os resultados aqui encontrados vão de encontro aos apresentados por Ambavaram et al. (2011), ou seja, o FT *SbSHN* apresenta os mesmos alvos em sorgo, do que FT *AtSHN* em arroz.

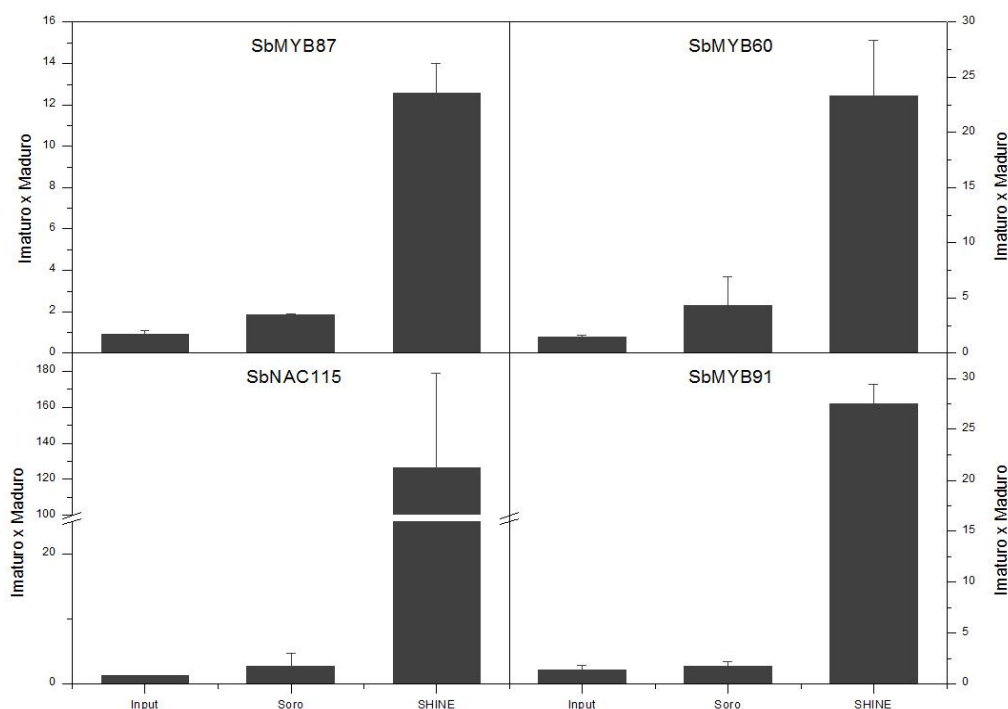


Figura 18 Análise por ChIPqPCR de quatro genes alvos (*SbMYB87*, *SbMYB60*, *SbNAC115* e *SbMYB91*) de *SbSHN* de amostras INPUT, amostras imunoprecipitadas com SORO e com anticorpo antiSHN.

O gene da actina foi usado como normalizador. Valores apresentados representam o enriquecimento da inflorescência imatura frente à inflorescência madura.

Apesar da sobreposição de dados apresentada neste trabalho quando comparado ao encontrado por AMBAVARAM et al. (2011), muitas vezes um FT apresenta diferentes alvos em diferentes espécies. SHEN et al. (2012) verificou uma diferença na composição de lignina (conteúdo S/G) em plantas de *Panicum virgatum* e *Nicotiana tabacum* superexpressando o gene *PvMYB4*. Recentemente, Agarwal et al. (2016) também trabalharam com a teoria de que a função de alguns FTs é conservada em monocotiledôneas, mais precisamente em milho, sorgo e arroz. O grupo teve como foco de estudos os FTs *ZmMYB31* e *ZmMYB42*, FTs da família R2R3-MYB que também estão relacionados com regulação dos genes fenilpropanóides no milho. Os genes-alvos testados foram genes que codificam para as enzimas da via de fenilpropanóides, sendo eles: *4CL2*, *COMT1*, *F5H*, *CSE*, além da interação entre eles mesmos (*MYB31* e *MYB42*). Eles encontraram que nem todos os genes-alvo de um mesmo FT em uma espécie são alvos desse mesmo FT em outra espécie, agindo de forma espécie específica. Como exemplo dessa modo de ação espécie específica, pode-se citar que na base da folha *Zm4CL2* é ligado pelo FT *MYB 42* e *OsCse* é ligado pelo FT *MYB31*. De maneira interessante, *MYB31* liga-se ao promotor do gene *Cse* em todas as espécies estudadas, porém *MYB42* só se liga a esse gene em sorgo e milho. Contudo, foi encontrado que *COMT1* é um alvo comum de *MYB31* e *MYB42* nos tecidos de folhas maduras de milho, sorgo e arroz.

A partir dos resultados encontrados por Agarwal et al. (2016) e como já discutido, o próprio SHN que tem apresentado diferentes genes-alvo e fenótipos associados a diferentes plantas, torna-se claro que, para um melhor entendimento de um FT, é necessário estudá-lo de maneira espécie específica. Assim, como continuidade deste trabalho e do projeto maior ao qual este encontra-se inserido, os próximos passos estão sendo dados na tentativa de comparar os mesmos genes-alvo do FT *SHN* em milho e também em cana-de-açúcar, além de novos ensaios envolvendo outros possíveis genes-alvo.

## 6. CONCLUSÕES

Ao final do trabalho foi possível obter algumas conclusões:

- Após as análises de alinhamento e filogenia podemos concluir que os *genes* *Sb04g006970(SbSHN1)* e *Sb10g023600(SbSHN2)* pertencem ao clado SHINE, uma vez que estes também apresentam o domínio AP2 e os motivos “mm” e “cm” característicos deste clado da família AP2. Além disso, quando construída uma árvore filogenética com essas mesmas sequências tanto *SbSHN1* quanto *SbSHN2* se agrupam juntamente com outras sequências *SHN* de monocotiledôneas, sendo *SbSHN1* mais próxima de *ShSHN1* (*SHN* de cana-de-açúcar) e *SbSHN2* mais próxima de *HvNUD* (*SHN* de cevada) e *OsSHN* (*SHN* de arroz);
- O anticorpo antiSHN foi produzido com sucesso e é capaz de reconhecer proteína SHN de sorgo podendo este ser utilizado em estudos de CHIP para a determinação dos alvos do FT SHN;
- A análise de localização subcelular permitiu concluir que o FT SHN encontra-se localizado no núcleo;
- A expressão de *SHN* é maior em inflorescência imatura, tanto para *SbSHN1* quanto para *SbSHN2*. Para *SbSHN1* a expressão em inflorescência madura foi menor do que em folhas, sendo que a base da folha apresentou expressão menor que a ponta da mesma. Já para *SbSHN2* não foi detectada expressão na ponta da folha e a sua base apresentou expressão menor que a inflorescência madura.
- O FT *SbSHN* apresenta os mesmos alvos em sorgo do FT *AtSHN* em arroz determinados através de EMSA por Ambavaram et al. (2011), sendo eles *SbNAC91* (*Sb07g001550*), *SbNAC115* (*Sb10g000460*), *SbMYB87* (*Sb07g024970*) e *SbMYB60* (*Sb04g031110*).

Sendo assim, o conjunto de dados gerados neste trabalho, juntamente com os dados originados anteriormente por outros autores poderá ser utilizado para um

completo entendimento da ação de SHN como um regulador máster na deposição de diferentes componentes da PCS. No futuro esses dados poderão servir como uma ferramenta no aspecto biotecnológico a fim de apoiar os programas de melhoramento, bem como, através de engenharia genética obter plantas geneticamente modificadas para que apresentem uma PC mais adequada para a produção do etanol de segunda geração.



## 7. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, T.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A. I.; GRAY, J. MYB31/MYB42 Syntelogs Exhibit Divergent Regulation of Phenylpropanoid Genes in Maize, Sorghum and Rice. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.28502, 22 jun. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28502>.
- AHARONI, A.; DIXIT, S.; JETTER, R.; THOENES, E.; VAN ARKEL, G.; PEREIRA, A. The SHINE Clade of AP2 Domain Transcription Factors Activates Wax Biosynthesis, Alters Cuticle Properties, and Confers Drought Tolerance when Overexpressed in Arabidopsis. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 16, p. 2463–2480, 2004.
- AL-ABDALLAT, A. M.; AL-DEBEI, H. S.; AYAD, J. Y.; HASAN, S. Over-Expression of SISHN1 Gene Improves Drought Tolerance by Increasing Cuticular Wax Accumulation in Tomato. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, p. 19499-19515, 2014.
- ALVES, J. M. B.; MACRI, R. C. V. **Second Generation of Ethanol: Study of Applications Lignocellulosic Materials Lignin.** [s.d.] Disponível em: <<http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/viewFile/45/pdf>>. Acesso em: 10 maio 2015.
- AMBAVARAM, M. M. R.; KRISHNAN, A.; TRIJATMIKO, K. R.; PEREIRA, A. Coordinated Activation of Cellulose and Repression of Lignin Biosynthesis Pathways in Rice. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 155, p.916-931, 2011.
- AZADI, P.; INDERWILDI, O. R.; FARNOOD, R.; KING, D. A. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 21, p.506-523, 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.12.022>.
- BAILEY, T.L.; ELKAN, C. Fitting a Mixture Model by Expectation Maximization to Discover Motifs in Biopolymers. In: PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNATIONAL CONFERENCE ON INTELLIGENT SYSTEMS FOR MOLECULAR BIOLOGY. AAAI, Menlo Park, California, 1994. p. 28-36.
- BERENQUER, M. J.; FACI, J. M. Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Yield Compensation Processes under Different Plant Densities and Variable Water Supply. **European Journal of Agronomy**, v. 15, p.43-55, 2001.
- BOUT, S.; VERMERRIS, W. A candidate-gene approach to clone the sorghum Brown midrib gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. **Mol Genet Genom**, [s.l.], v. 269, p. 205–214, 2003.
- BRITO, M. S.; NOBILE, P. M.; BOTTCHER, A.; DOS SANTOS, A. B.; CRESTE, S.; DE LANDELL, M. G. A.; VINCENTZ, M.; VICENTINI, R.; MAZZAFERA, P. Expression Profile of Sugarcane Transcription Factor Genes Involved in Lignin Biosynthesis. **Tropical Plant Biology**, [s.l.], v. 8, p.19-30, 2015.

- BROUN, P.; POINDEXTER, P.; OSBORNE, E.; JIANG, C.; RIECHMANN, J. L. WIN1, a Transcriptional Activator of Epidermal Wax Accumulation in Arabidopsis. **PNAS**, [s.l.], v. 101, p.4706-4711, 2004.
- BUCK, M. J.; LIEB, J. D. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. **Genomics**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.349-360, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.11.004>.
- BUXDORF, K.; RUBINSKY, G.; BARDA, O.; BURDMAN, S.; AHARONI, A.; LEVY, M. The transcription factor SISHINE3 modulates defense responses in tomato plants. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 84, n.1-2, p.37-47, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-013-0117-1>.
- CASSAN-WANG, H.; GOUÉ, N.; SAIDI, M.N.; LEGAY, S.; SIVADON, P.; GOFFNER, D.; GRIMA-PETTENATI, J. Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 4, n. 189, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00189>.
- CESARINO, I.; SIMÕES, M. S.; BRITO, M.S.; FANELLI, A.; SILVA, T. F.; ROMANEL, E. Building the wall: recent advances in understanding lignin metabolism in grasses. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l.], v. 38, n.11, 14 p., 2016.
- CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.759-761, 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1316>.
- CONAB. **Conjuntura Mensal: Sorgo**. 2017. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_04\\_10\\_08\\_20\\_55\\_conjuntura\\_sorgo\\_fevereiro\\_-\\_3\\_x\\_7\\_-\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_10_08_20_55_conjuntura_sorgo_fevereiro_-_3_x_7_-_2017.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- DAVIDSON, R. M.; GOWDA, M.; MOGHE, G.; LIN, H.; VAILLANCOURT, B.; SHIU, S.; JIANG, N.; BUELL, C. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 71, P.492-502, 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313x.2012.05005.x>.
- DIEN, B.S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. F.; SATTLER, S. E.; CHEN, H.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. Improved Sugar Conversion and Ethanol Yield for Forage Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Lines with Reduced Lignin Contents. **Bioenergy Research**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.153-164, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-009-9041-2>.
- DO, C. T.; POLLET, B.; THEVENIN, J.; SIBOUT, R.; DENOUE, D.; BARRIERE, Y.; LAPIERRE, C.; JOUANIN, L. Both caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in Arabidopsis. **Planta**, [s.l.], v. 226, p. 1117–1129, 2007.
- DRAUDE, K. M.; KURNIAWAN, C. B.; DUFF, S. J. B. Effect of oxygen delignification on the rate and extend of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, v. 79, p.113-120, 2001.

- DUGAS, D. V.; MONACO, M. K.; OLSEN, A.; KLEIN, R. R.; KUMARI, S.; WARE, D.; KLEIN, P. A. (2011) Functional Annotation of the Transcriptome of Sorghum bicolor in Response to Osmotic Stress and Abscisic Acid. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.514, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-514>.
- EMBRAPA. Etanol Lignocelulósico. Brasília: Embrapa: Agroenergia, s.d. 6 p.
- FARINAS, C. S. A **Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação**. São Carlos: Embrapa: Instrumentação, 2011. 16 p. (Embrapa – Instrumentação. Documentos 54).
- FRANKE, R.; HEMM, M. R.; DENAULT, J. W.; RUEGGER, M. O.; HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis. **Plant Journal**, [s.l.], v. 30, p.47-59, 2002.
- FREITA, C. M.; FREITA, L. A.; ROVIERO, J. P.; TENÓRIO, E. M. F.; RABELO, S. C.; MUTTON, M. R. J. Caracterização de cinzas, lignina, celulose e hemicelulose em bagaço de sorgo e cana-de-açúcar. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental (CBMAAA), 1., 2016, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Fatec, 2016. p. 1 - 5.
- GADE, P.; KALVAKOLANU, D. V. Chromatin Immunoprecipitation Assay as a Tool for Analyzing Transcription Factor Activity. *Methods In Molecular Biology*, [s.l.], V. 809, p.85-104, 22 out. 2011. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-376-9\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-376-9_6).
- GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A.; WYMAN, C. E. Refining Sweet Sorghum to Ethanol and Sugar Economic Trade-offs in the Context of North China. **Bioresour technology**, Essex, n.96, p.985-1002, 2005.
- GRAY, J.; CAPARROS-RUIZ, D.; GROTEWOLD, E. Grass phenylpropanoids: Regulate before using! *Plant Science*, [s.l.], v. 184, p.112-120, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.008>.
- GUEDES, R. C. Estudo da influência de pré-tratamentos de dois resíduos lignocelulósicos (bagaço de peduncúlo de caju e casca de coco) utilizados como substrato na indução da síntese celulolítica. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.
- GUI, J.; SHEN, J.; LI, L. Functional characterization of evolutionarily divergent 4-coumarate: Coenzyme A ligases in rice. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 157, p.574-586, 2011.
- HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, [s.l.], v. 2, p.60-61, 2011.
- HANDAKUMBURA, P. P.; HAZEN, S. P. Transcriptional Regulation of Grass Secondary Cell Wall Biosynthesis: Playing Catch-up with Arabidopsis thaliana **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 3, p.74, 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00074>.
- HUANG, J.; GU, M.; LAI, Z.; FAN, B.; SHI, K.; ZHOU, Y. H.; YU, J. Q.; CHEN, A. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 3, p. 1526–1538, 2010.

- HUSSEY, S. G.; MIZRACHI, E.; CREUX, N. M.; MYBURG, A. A. Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Frontiers In Plant Science*, [s.l.], v. 4, p.325, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00325>.
- IPA. CULTURA do sorgo. **Folhetos explicativos**. Recife, PE, 2008, 1p.
- JÄGER, K.; MISKÓ, A.; FÁBIÁN, A.; DEÁK, C.; KISS-BÁBA, E.; POLGÁRI, D.; BARNABÁS, B.; PAPP, I. Expression of a WIN/SHN-type regulator from wheat triggers disorganized proliferation in the Arabidopsis leaf cuticle. **Biologia Plantarum**, [s.l.], v. 59, n. 1, p.29-36, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-014-0471-0>.
- JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J. D.; GOUY, M.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends In Biochemical Sciences*, [s.l.], v. 23, n. 10, p.403-405, 1998.
- JOFUKU, K. D.; DEN BOER, B. G. W.; VAN MONTAGU, M.; OKAMURO, J. K. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. **Plant Cell**, [s.l.], v. 6, p.1211-1225, 1994.
- KARIMI, M., INZÉ, D., DEPICKER, A. Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends In Plant Science*, [s.l.], v. 7, n.5, p. 193-195, 2002.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology And Evolution*, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1870-1874, 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- LARSEN, J.; PETERSEN, M. O.; THIRUP, L.; LI, H. W.; IVERSEN, F. K. The IBUS Process: Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. *Chemical Engineering & Technology*, Weinheim, v. 31, n. 5, p. 765–772, 2008.
- LASHBROOKE, J.; AHARONI, A.; COSTA, F. Genome investigation suggests MdSHN3, an APETALA2-domain transcription factor gene, to be a positive regulator of apple fruit cuticle formation and an inhibitor of russet development. *Journal Of Experimental Botany*, [s.l.], v. 66, n. 21, p.6579-6589, 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv366>.
- LI, P.; PONNALA, L.; GANDOTRA, N.; WANG, L.; SI, Y.; TAUSTA, S. L.; KEBROM, T. H.; PROVART, N.; PATEL, R.; MYERS, C. R.; REIDEL, E. J.; TURGEON, R.; LIU, P.; SUN, Q.; NELSON, T.; BRUTNELL, T. P. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 42, n. 12, p.1060-1067, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.703>.
- LI, X. Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via Agrobacterium. *Bio-protocol*, [s.l.], v. 1, n. 14, p.1-3, 2011. Bio-Protocol, LLC. <http://dx.doi.org/10.21769/bioprotoc.95>.
- LI, X.; YANG, Y.; YAO, J.; CHEN, G.; LI, X.; ZHANG, Q.; WU, C. FLEXIBLE CULM 1 encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 69, p. 685–697, 2009.

- LICAUSI, F.; OHME-TAKAGI, M.; PERATA, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. **New Phytologist**, [s.l.], v. 199, n. 3, p.639-649, 7 maio 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12291>.
- MARTINS, Alexandre Palma Boer. **Caracterização do Fator de Transcrição ShSHN1 de Cana-de-Açúcar e Sua Relação com a Biossíntese da Parede Celular Secundária em Transgênicos de Arroz**. 2016. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.
- MASSOM, I. S. **Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar**. 2013. 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 83, n. 1, p.37-46, 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00118-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00118-3).
- MEJIA-GUERRA, M. K.; POMERANZ, M.; MOROHASHI, K.; GROTEWOLD, E. From plant gene regulatory grids to network dynamics. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Regulatory Mechanisms**, [s.l.], v. 1819, n. 5, p.454-465, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.016>
- MILNE, T. A.; ZHAO, K.; HESS, J. L. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) for Analysis of Histone Modifications and Chromatin-Associated Proteins. *Leukemia*, [s.l.], p.409-423, 2009. Humana Press. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-418-6\\_21](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-418-6_21).
- MING, R.; LIU, S. C.; LIN, Y. R.; 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. Detailed Alignment of *Saccharum* and *Sorghum* Chromosomes: Comparative Organization of Closely Related Diploid and Polyploid Genomes. **Genetics Society of America**, v. 150, n. 4, p.1663-1682, dez. 1998.
- MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S.; Bioquímica da Lignificação de Células Xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, [s.l.], v. 11, p.48-57, 2004.
- MORO, M. K. **PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EXTRUSÃO COM DUPLA-ROSCA**. 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- MOROHASHI, K.; ZHAO, M.; YANG, M.; READ, B.; LLOYD, A.; LAMB, R.; GROTEWOLD, E.; Participation of the Arabidopsis bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 145, n. 3, p.736-746, 2007. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.107.104521>.
- NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 140, n. 2, p.411-432, 13 jan. 2006. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.073783>.

- OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias.** 2013. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element. *The Plant Cell Online*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.173-182, 1995. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.7.2.173>.
- OOKAWA, T.; INOUE, K.; MATSUOKA, M.; EBITANI, T.; TAKARADA, T.; YAMAMOTO, T.; UEDA, T.; YOKOYAMA, T.; SUGIYAMA, C.; NAKABA, S.; FUNADA, R.; KATO, H.; KANEKATSU, M.; TOYATA, K.; MOTONAYASHI, T.; VAZIRANJANI, M.; TOJO, S.; HIRASAWA, T. Increased lodging resistance in long-culm, lowlignin gh2 rice for improved feed and bioenergy production. **Science Rep**, [s.l.], v. 4, p.65-67, 2014.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 74, n. 1, p.25-33, 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(99\)00161-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(99)00161-3).
- PATERSON, A. H. et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, v. 457, n. 7229, p.551-556, 29 jan. 2009. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v457/n7229/pdf/nature07723.pdf>>.
- PEREIRA, R. G. **Produção de Sorgo Granífero Adubado com Nitrogênio e Fósforo na Chapada do Apodi-RN.** 2011. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2011.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G.W.; DEMPFFLE, L. Relative Expression Software Tool (REST) for Group-wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.9, 2002.
- POPPE, M. K., CORTEZ, L. B., 2012, Sustainability of sugarcane bioenergy. 1 ed., Center for Strategic Studies and Management (CGEE), Brasília, Brazil, Corporate Financial Center.
- RIECHMANN, J. L.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C.-Z.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O. J.; SAMAHA, R. R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J. Z.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, B. K.; YU, G. -L. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. **Science**, [s.l.], v. 290, n. 5499, p.2105-2110, 15 dez. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5499.2105>.
- RUSHTON, P. J.; BOKOWIEC, M. T.; THOMAS W LAUDEMAN, T. W.; JENNIFER F BRANNOCK, J. F.; XIANFENG CHEN, X.;TIMKO, M. P. TOBFAC: the database of tobacco transcription factors. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.53-60, 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-53>.
- SABALLOS, A.; SATTLER, S. E.; SANCHEZ, E.; FOSTER, T. P.; XIN, Z.; KANG, C. H.; PEDERSEN, J. F.; VERMERRIS, W. Brown midrib2 (Bmr2) encodes the major 4-coumarate: Coenzyme A ligase involved in lignin biosynthesis in sorghum. **Plant Journal**, [s.l.], v. 70, p.813-830, 2012.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning 2nd ed. Estados Unidos. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012. FapUNIFESP (SciELO).
- SANTOS, R. F.; PLACIDO, H. F.; GARCIA, E. B.; CANTÚ, C.; ALBRECHT, A. J. P.; ALBRECHT, L. P.; FRIGO, K. D. A. Sorgho sacarino na produção de agroenergia. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, [s.l.], v. 4, p. 1- 12, 2015.
- SHAKOOR, N.; NAIR, R.; CRASTA, O.; MORRIS, G.; FELTUS, A.; KRESOVICH, S. (2014) A Sorghum bicolor expression atlas reveals dynamic genotype-specific expression profiles for vegetative tissues of grain, sweet and bioenergy sorghums. **Bmc Plant Biology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.35-50, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-14-35>.
- SHEN, H.; HE, X.; POOVAIAH, C. R.; WUDDINEH, W. A.; MA J.; MANN, D. G.; WANG, H.; JACKSON, L.; TANG, Y.; STEWART, C. N. Jr.; CHEN, F.; DIXON, R. A. Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor *PvMYB4* for improvement of lignocellulosic feedstocks. **New Phytologist**, [s.l.], v. 193, n. 1, p. 121-136, 2012. ISSN 0028-646X.
- SHEN, H.; CHOU, K. "Hum-mPLoc: an ensemble classifier for large-scale human protein subcellular location prediction by incorporating samples with multiple sites", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, **355**, 1006-1011.
- SHI, J. X.; ADATO, A.; ALKAN, N.; HE, Y.; LASHBROOKE, J.; MATAS, A. J.; MEIR, S.; MALITSKY, S.; ISAACSON, T.; PRUSKY, D.; LESHKOWITZ, D.; SCHREIBER, L.; GRANELL, A. R.; WIDEMANN, E.; BERNARD, G.; PINOT, F.; ROSE, J. K. C.; ROGACHEV, I.; ROTHAN, C.; AHARONI, A. The tomato SISHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. **New Phytologist**, [s.l.], v. 197, n. 2, p.468-480, 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12032>.
- SCHILLMILLER, A. L.; STOUT, J.; WENG, J. K.; RUEGGER, M. O.; CHAPPLE, C. Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis. *Plant Journal*, [s.l.], v. 60, p. 771–782, 2009.
- SIQUEIRA, M. R. Efeito dos produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H<sub>2</sub> por fermentação. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- SILVA, N. L. C. PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE BIOMASSA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- TAKETA, S.; AMANO, S.; TSUJINO, Y.; SAISHO, D.; KAKEDA, K.; NOMURA, M.; SUZUKI, T.; MATSUMOTO, T.; SATO, K.; ANAMORI, H.; KAWASAKI, S.; TAKEDA, K. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. **Proceedings Of The National Academy Of**

- Sciences**, [s.l.], v. 105, n. 10, p.4062-4067, 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711034105>.
- TAMAGNONE, L.; MERIDA, A.; PARR, A.; MACKAY, S.; CULIANEZ-MACIA, F. A.; ROBERTS, K.; MARTINA, C. The *AmMYB308* and *AmMYB330* Transcription Factors from *Antirrhinum* Regulate Phenylpropanoid and Lignin Biosynthesis in Transgenic Tobacco. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 10, p.135-154, 1998.
- UDVARDI, M. K.; KAKAR, K.; WANDREY, M.; MONTANARI, O.; MURRAY, J. ANDRIANKAJA, A.; ZHANG, J.; BENEDITO, V.; HOFER, J. M. I.; CHUENGAND, F.; TOWN, C. D. Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 144, n. 2, p.538-549, 2007. American Society of Plant Biologists (ASPB).
- VIGNOLS, F.; RIGAU, J.; TORRES, M. A.; CAPELLADES, M.; PUIGDOMENECH, P. The brown midrib3 (*bm3*) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. **Plant Cell**, [s.l.], v. 7, p. 407–416, 1995.
- WANG, H.Z.; DIXON, R.A. On-off Switches for Secondary Cell Wall Biosynthesis. **Molecular Plant.**, v.5, p.297–303, 2012.
- WANG, Y.; WAN, L.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; QUAN, R.; ZHOU, S.; HUANG, R. An ethylene response factor *OsWR1* responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in Rice. *Plant Molecular Biology*, [s.l.], v. 78, n. 3, p.275-288, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-011-9861-2>.
- WEI, C. L.; WU, Q.; VEGA, V. B.; CHIU, K. P.; NG, P.; ZHANG, T.; SHAHAB, A.; YONG, H. C.; FU, Y.; WENG, Z.; LIU, J.; ZHAO, X. D.; CHEW, J. L.; LEE, Y. L.; KUZNETSOV, V. A.; SUNG, W. K.; MILLER, L. D.; LIM, B.; LIU, E. T.; YU, Q.; NG, H. H.; RUAN, Y. (2006) A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. **Cell**, [s.l.], v. 124, p.207–219, 2006.
- WELLS, J.; FARNHAM, P. J. Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. **Methods**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.48-56, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1046-2023\(02\)00007-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1046-2023(02)00007-5).
- WUDDINEH, W. A.; MAZAREI, M.; TURNER, G. B.; SYKES, R. W.; DECKER, S. R.; DAVIS, M. F.; STEWART JUNIOR, C. N. Identification and molecular characterization of the switchgrass AP2/ERF transcription factor superfamily, and overexpression of *PvERF001* for improvement of biomass characteristics for biofuel. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, [s.l.], v. 3, p.101, 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2015.00101>.
- XU, B.; TREVINO, L. L. E.; SATHITSUKSANO, N.; SHEN, Z.; SHEN, H.; ZHANG, Y. H. P.; DIXON, R. A.; ZHAO, B. Silencing of 4-coumarate: Coenzyme A ligase in switchgrass leads to reduced lignin content and improved fermentable sugar yields for biofuel production. **New Phytol**, [s.l.], v. 192, p.611-625, 2011.
- XU, Y.; WU, H.; ZHAO, M.; WU, W.; XU, Y.; GU, D. Overexpression of the Transcription Factors *GmSHN1* and *GmSHN9* Differentially Regulates Wax and Cutin Biosynthesis, Alters Cuticle Properties, and Changes Leaf Phenotypes in



- Arabidopsis. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 17, n. 4, p.587-609, 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17040587>.
- YANG, F.; MITRA, P.; ZHANG, L.; PRAK, L.; VERHERTBRUGGEN, Y.; KIM, J.; SUN, L.; ZHENG, K.; TANG, K.; AUER, M.; SCHELLER, H.; LOQUÉ, D. Engineering secondary cell wall deposition in plants. **Plant Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.325-335, 12 nov. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12016>.
- YANG, F.; LI, L.; JIANG, N.; YU, H.; MOROHASHI, K.; OUMA, W. Z.; MORALES-MANTILLA, D. E.; GOMEZ-CANO, F. A.; MOKUNDI, E.; PRADA-SALCEDO, L. D.; VELAZQUEZ, R. A.; VALENTIN, J.; MEJÍA-GUERRA, M. K.; GRAY, J.; DOSEFF, A. I.; GROTEWOLD, E. A Maize Gene Regulatory Network for Phenolic Metabolism. *Molecular Plant*, [s.l.], v. 10, n. 3, p.498-515, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.10.020>.
- YOON, J.; CHOI, H.; AN, G. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. **Journal Of Integrative Plant Biology**, [s.l.], v. 57, n. 11, p.902-912, 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.12422>.
- ZHANG, K.; QIAN, Q.; HUANG, Z.; WANG, Y.; LI, M.; HONG, L.; ZENG, D.; GU, M.; CHU, C.; CHENG, Z.. GOLD HULL AND INTERNODE2 encodes a primarily multifunctional cinnamyl-alcohol dehydrogenase in rice. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 140, p.972-983, 2006.
- ZHAO, Q.; DIXON, R. A. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought?. **Trends Plant Sci**, v.16, n. 4, p.227-233, abril 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.005>>. Acesso em: 19 maio 2015.
- ZHONG, R.; YE, Z. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. **Plant Science**, [s.l.], v. 229, p.193-207, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.009>.
- ZÚÑIGA, U. F. R. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. 2010. 228 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

## APÊNDICE A

### *Meios de Cultura e Soluções*

#### **Meios de Cultura (SAMBROOK; RUSSEL, 2001)**

- Meio LB líquido – 1L

10g Triptona

5g Extrato de Levedura

10g Cloreto de Sódio (NaCl)

H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 1000ml

Autoclavar por 20 minutos à 121°C.

-Meio LB sólido – 1L

10g Triptona

5g Extrato de Levedura

10g Cloreto de Sódio (NaCl)

10g ágar

H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 1000ml

Autoclavar por 20 minutos à 121°C.

#### **Antibióticos**

- Solução Acetoseríngona - **Acetoseríngona**(100mM)

Pesar 196mg de Acetoseríngona

Dissolver inicialmente a Acetoseríngona com **Álcool 70%** (1-3mL) e após, água milliQ (estéril) para um volume final de 10 mL. Em seguida, esterilizar a solução por filtração com filtro 0,22 µm (Corning), aliquotar e estocar a - 20 °C.

- Solução Estoque – **Canamicina** (100mg/mL)

Pesar 1g de Streptomicina

Dissolver a canamicina com água milliQ (estéril), para um volume final de 10 mL. Em seguida, esterilizar a solução por filtração com filtro 0,22 µm (Corning), aliquotar e estocar a - 20 °C.

- Solução Estoque – **Ampicilina** (100mg/mL)

Pesar 1g de ampicilina

Dissolver a ampicilina com água milliQ (estéril), para um volume final de 10 mL. Em seguida, esterilizar a solução por filtração com filtro 0,22 µm (Corning), aliquotar e estocar a - 20 °C.

- Solução Estoque – **IPTG** (100mM)

Pesar 23,8mg de IPTG

Dissolver o IPTG em 1mL água milliQ (estéril). Em seguida, esterilizar a solução por filtração com filtro 0,22 µm (Corning), aliquotar e estocar a - 20 °C.

### **Tampões**

- Tampão de Lise

50mM Tris-HCl pH 8,0

150mM Cloreto de Sódio (NaCl)

10mg/mL Lisozima

-Tris-Glicina 5X – 1L

125mM Tris-base

0,5% SDS  
960mM Glicina  
H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 1000mL

- Tampão de Amostra 4X  
125mM Tris-HCl pH6,8  
1% Glicerol  
4% SDS  
0,2% Azul de bromofenol  
4% β-mercaptoetanol  
H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 10mL

-Tampão de Transferência  
25Mm tris-HCl pH 8,3  
192mM Glicina  
20% Metanol

-Tampão TBS  
20mM Tris-HCl pH7,5  
150mM Cloreto de Sódio (NaCl)  
0,05% Tween 20

### **Corantes**

-Coomassie 0,2%  
50% Metanol  
10% ácido Acético  
0,2g Coomassie Blue R-250  
H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 100mL

-Ponceau S  
0,5g Ponceau  
2,5mL de ácido Acético

H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 250mL

### **Soluções Transformação Transiente**

- MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)

0,5331g MES

20ml de H<sub>2</sub>O milliQ

Acertar pH para 5,6 com KOH

H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 25mL

Filtrar com filtro 0,45µm

-MES/MgCl<sub>2</sub>

10 mL MES

1 mL de MgCl<sub>2</sub> 1M

H<sub>2</sub>O milliQ q.s.p. 100mL

### **Soluções Crosslink**

- Solução de Crosslink

0,44M de Sacarose

10mM Tris-HCl pH 8,0

1mM EDTA pH 8,0

1mM PMSF \*

1% Formaldeído\*

\*Somente acrescentar quando for realizar o crosslink das amostras, imediatamente antes do uso.

-Tampão de Lise ChIP

50mM HEPES pH7,5

150mM NaCl

1mM EDTA

1% Triton X100

0,1% Deoxychoate

0,1% SDS

1mM PMSF \*\*

1x Coquetel Inibidor de Proteinase em Plantas\*\*

\*\*Adicionar somente antes do uso.

-LNDET

0,25M LiCl

1% NP-40

1% Deoxycolato

1mM EDTA

-TE

10Mm Tris pH8,0

1mM EDTA

- Tampão de Eluição CHIP

1% SDS

0,1M NaHCO<sub>3</sub>

0,2 mg/mL Proteinase K

1mM DTT

## APÊNDICE B

Sequenciamento do gene *SbSHN1* clonado em pENTR/D-TOPO (Invitrogen) utilizando os “primers” M13F e M13R (Tabela 3).

Destacados em amarelo a tag CACC proveniente do “primer” *SbSHNpENTR\_FW* (Tabela 3) e o códon de parada TAG. Destacado em azul a metionina inicial.

> *SbSHN1* -M13R

```

NNNNNNNNNNNGNNANGCTGGGCTGCTGCTGCTCAGCAACTCTTCGATCATTTCGAGTGCGA
TCCTCTCCTCCTCATCCATCGGCGTGGCTGGTGGAGCAGTTGTTGCTGATGTGGACTGTGAT
GCAGCATCAGTGGATGCTGCATCTTTGTTGAGCTCCACTGTCATGACCCAGTTGGAGTCAGC
ACGGGCTCCTGCACGCTTCTGCCAAACACCAATGTGGGACTTCTCAGGGTCAAGGCGGAGAC
AGGTCAGGGACGGTGTGATGGCGCCTTGCAGCATTTGCGGAGCTTCGCACTGAGAATCTGGGAC
AGGTTGGTGGTAGAGGAGCCGCTGCTGAAGTTGCTGCGGGCGTCCCTTCCCAGCTGGGGT
AGGCTCCCCTGTGCTGCTTCTTTGGATTGGGAAGTTGGTCTTGGCGTTGCGTCCGCTCATCA
GCACAGCAGCCTCATCATATGCTCTCGCTGCCTCCTCAGCCGTCTCAAAGGTACCCAGCCAG
ACCCTCCTCTTAAGGAGGGGATGCCTGATCTCAGAGACCCAGGAGCCCCAGTGGCGCTGTCCG
GACTCCACGAAACTTCTTTGGCTGTACCATGGTGAAGGGGGCGGCCGCGGAGCCTGCTTTTT
TGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACT
ATCAGTCAAATAAAATCATTATTTGGGGCCCGAGCTTAAGACTGGCCGTTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACATCCATGCTAGCGTTAACGCGAGAGTANGGAAGTACCAGGCATCAA
ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAA
CGCTCTCCTGAGTANGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGTGAAGCAACGGCCNG
AAGGGTGGCCGNNNNACNNCCNGCCATAAACTGNCNNGCNTCNNACTAAGNAGAAAGGNCA
NNCTNACGGATGNNTNNNTGNNTNNCNACNAACNCTGTNNNGNNTANCGNNNNCGTATNNAT
NGCNNNNNNCTTCNCNGANCANATNNTNANNNNGNNANNNNGNNTNNNNNTCCTNNNNNGA
NNNNNGNNNCNCNNNNNGN

```

**- Sequência de Aminoácidos - 3'5' Frame 1**

caaataatgattttattttgactgatagtgacctgttcgttgcaacaaattgatgagcaa  
Q I M I L F - L I V T C S L Q Q I D E Q  
tgcttttttataatgccaaactttgtacaaaaagcaggctccgcgccgcccccttcacc  
C F F I M P T L Y K K A G S A A A P F T  
atggtacagccaaagaagtttcgtggagtcggacagcgccactggggctcctgggtctct  
M V Q P K K F R G V R Q R H W G S W V S  
gagatcaggcatccccctccttaagaggagggctctggctgggtacctttgagacggctgag  
E I R H P L L K R R V W L G T F E T A E  
gaggcagcgagagcatatgatgaggctgctgtgctgatgagcggacgcaacgccaagacc  
E A A R A Y D E A A V L M S G R N A K T  
aacttcccaatccaaagaagcagcacaggggagcctaccccagctgcgggaagggagcgc  
N F P I Q R S S T G E P T P A A G R D A  
cgcagcaacttcagcagcggctcctctaccaccaacctgtcccagattctcagtgcgag  
R S N F S S G S S T T N L S Q I L S A K  
ctccgcaaattgctgcaaggcgccatcacctcctgacctgtctccgccttgaccctgag  
L R K C C K A P S P S L T C L R L D P E  
aagtcccacattggtggttggcagaagcgtgcaggagcccgtgctgactccaactgggtc  
K S H I G V W Q K R A G A R A D S N W V  
atgacagtggagctcaacaaagatgcagcatccactgatgctgcatcacagtccacatca  
M T V E L N K D A A S T D A A S Q S T S  
gcaacaactgctccaccagccacgccgatggatgaggaggagaggatcgactgcaaatg  
A T T A P P A T P M D E E E R I A L Q M  
atcgaagagttgctgagcagcagcagcccagcctnnc  
I E E L L S S S S P X X



>SbSHN1-M13F

GNNNNNNNNNNNCNNNCTGGGGCTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGA  
GGGTCTGGCTGGGTACCTTTGAGACGGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGATGAGGCTGCT  
GTGCTGATGAGCGGACGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAATCCAAAGAAGCAGCACAGGGGA  
GCCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCCCGCAGCAACTTCAGCAGCGGCTCCTCTACCACCA  
ACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGCGCCATCACCGTCCCTG  
ACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTTGGTGTGGCAGAAGCGTGCAGGAGC  
CCGTGCTGACTCCAACCTGGGTCATGACAGTGGAGCTCAACAAAGATGCAGCATCCACTGATG  
CTGCATCACAGTCCACATCAGCAACAACCTGCTCCACCAGCCACGCCGATGGATGAGGAGGAN  
AGGATCGCACTGCAAATGATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCAGCTTCACCCTCAA  
CGGAGATGACCAAGGTCGCTTCATCATCTGAAGGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTG  
TACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTAT  
CAGTCAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACA  
TGGTCATAGCTGTTTCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCA  
CAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAG  
GGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTC AACATGGATG  
CTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCNGNGCGACAATCTATC  
GCTTGTATGGGAAGCCCGATGCNCCNNANTTGTCTGAAACATGGNAAAGGTAGCGTTGNC  
NATGATGNTACAGATGAGATGGTCAGACTAANCTGGNTGANGNAATTNNTGCNCTTNNANCA  
TCNNGCATTATCCGNACTCNGATGATGCATGGNNACNNNCCACNGCGATCCCNNAAAANNG  
CNTNNCAGGNNTANANANANCNGATNNNNNNNAAATATTNNNATNNNCTGNNNNNNCNGGNN  
NNGCATTCNANCNNNNNNNNNTNNNNNNNCNATNGCNNNTTNNNNNNNNNNGCNNNNACNA  
NNANNNNNNTTNNNNNNNCNANNNN

## - Sequência de Aminoácidos - 5'3' Frame 2

gnnnnnnnnnnncnnnctggggctcctgggtctctgagatcaggcatccccctccttaagagag  
X X X X X W G S W V S E I R H P L L K R  
agggctctggctgggtacctttgagacggctgaggaggcagcgagagcatatgatgaggct  
R V W L G T F E T A E E A A R A Y D E A  
gctgtgctgatgagcggacgcaacgcccaagaccaacttcccaatccaaagaagcagcaca  
A V L M S G R N A K T N F P I Q R S S T  
ggggagcctaccccagctgcggaaggagcggcagcaacttcagcagcggctcctct  
G E P T P A A G R D A R S N F S S G S S  
accaccaacctgtcccagattctcagtgcaagctccgcaaagtctgcaaggcgccatca  
T T N L S Q I L S A K L R K C C K A P S  
ccgtccctgacctgtctccgccttgaccctgagaagtcccacattgggtgtttggcagaag  
P S L T C L R L D P E K S H I G V W Q K  
cgtgcaggagcccgtgctgactccaactgggtcatgacagtgaggctcaacaagatgca  
R A G A R A D S N W V M T V E L N K D A  
gcatccactgatgctgcatcacagtccacatcagcaacaactgctccaccagccagccg  
A S T D A A S Q S T S A T T A P P A T P  
atggatgaggagganaggatcgcaactgcaaagtatcgaagagttgctgagcagcagcag  
M D E E X R I A L Q M I E E L L S S S S  
ccagcttcaccctcaaacggagatgaccaaggctcgttcatcatcTga aaggggtgggag  
P A S P S N G D D Q G R F I I - K G W A  
cgccgaccagctttctgtacaaagttggcattataaagaagcattgcttatcaattg  
R R P S F L V Q S W H Y K K A L L I N L  
ttgcaacgaacaggtcactatcagtcaaaataaaatcattatttgccatccagctgat

## APÊNDICE C

Sequência “contig” proveniente das duas amostras sequenciadas no pENTR/D-TOPO (Invitrogen) iniciadas com os “primers” M13F e M13R (Tabela 3).

CACCATGGTACAGCCAAAGAAGTTTCGTGGAGTCCGACAGCGCCACTGGG  
 GCTCCTGGGTCTCTGAGATCAGGCATCCCCTCCTTAAGAGGAGGGTCTGGCTGGG  
 TACCTTTGAGACGGCTGAGGAGGCAGCGAGAGCATATGATGAGGCTGCTGTGCTG  
 ATGAGCGGACGCAACGCCAAGACCAACTTCCCAATCCAAAGAAGCAGCACAGGGG  
 AGCCTACCCCAGCTGCGGGAAGGGACGCCCGCAGCAACTTCAGCAGCGGCTCCT  
 CTACCACCAACCTGTCCCAGATTCTCAGTGCGAAGCTCCGCAAATGCTGCAAGGC  
 GCCATCACCGTCCCTGACCTGTCTCCGCCTTGACCCTGAGAAGTCCCACATTGGT  
 GTTTGGCAGAAGCGTGCAGGAGCCCCTGCTGACTCCAAGTGGGTCATGACAGTG  
 GAGCTCAACAAAGATGCAGCATCCACTGATGCTGCATCACAGTCCACATCAGCAAC  
 AACTGCTCCACCAGCCACGCCGATGGATGAGGAGGAGAGGATCGCACTGCAAAT  
 GATCGAAGAGTTGCTGAGCAGCAGCAGCCCAGCTTCACCCTCAAACGGAGATGAC  
 CAAGGTCGCTTCATCATCTGA

Sequência proteica proveniente da sequência “contig” resultante do sequenciamento com os “primers” M13F e M13R (Tabela 3).

MVQPKKFRGVRQRHWGSWVSEIRHPLLKRRVWLGTFFETAEEAARAYDEAAVL  
 MSGRNAKTNFPIQRSSTGEPTPAAGRDARSNFSSGSSTTNLSQILSAKLRKCKKAPSP  
 SLTCLRLDPEKSHIGVWQKRAGARADSNWVMTVELNKDAASTDAASQSTSATTAPPA  
 TPMDEEERIALQMIEELLSSSSPASPSNGDDQGRFII