

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Bioquímica)**

**FELIPE MARCELO ALMEIDA DE JESUS**

**Interações entre o relógio biológico e a  
sinalização do estado energético em plantas do  
complexo Saccharum**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**28/06/2021**

FELIPE MARCELO ALMEIDA DE JESUS

**Interações entre relógio biológico e sensores do  
estado energético em plantas do complexo  
Saccharum**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Biológicas (Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta*

**Versão corrigida da Dissertação**

São Paulo

2021

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

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

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

A319i Almeida-Jesus, Felipe Marcelo Interações entre o relógio biológico e a sinalização do estado energético em plantas do complexo Saccharum / Felipe Marcelo Almeida-Jesus. - São Paulo, 2021.  
92 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador: Hotta, Carlos Takeshi

1. Cana-de-açúcar . 2. Relógio biológico . 3. Target of Rapamycin (TOR). 4. Metabolismo energético . 5. Transcrição. I. T. II. Hotta, Carlos Takeshi , orientador.

**Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.**

---

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

**APROVADO(A) POR:**

---

**Profa. Dra. Flavia Vischi Winck**  
**CENA – USP**

---

**Prof. Dr. Igor Cesarino**  
**IB - USP**

---

**Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz**  
**IB - UNICAMP**

**SÃO PAULO**

**02 de setembro de 2021**

## AGRADECIMENTOS

Esse momento não acontece todo dia para pessoas como eu, não atoa, só acontece devido ao esforço de muitos. Ter consciência disso permeou esse mestrado, principalmente nesse período final que acontece durante a maior pandemia da história. Com tanto conhecimento sendo produzido e o descaso em utilizá-los para lidar com a pandemia, eu sinto que além de estar me formando em bioquímica, consegui fazê-lo ao sobreviver um genocídio organizado pelo governo do meu país, coisa que muitos, hoje, mais de 550mil pessoas, não conseguiram.

Neste contexto, agradeço a insistência por parte da minha família na minha educação formal, ainda que questione os métodos utilizados, é o suporte que deram que me ajudou a chegar até aqui e conseguir planejar continuidade na academia, uma área de atuação que, sem investimento como atualmente, só se faz viável com um suporte familiar gigante\$. Espero que minha jornada seja mais que um exemplo de que com suporte financeiro nós podemos o que quiser, mas um exemplo de que é possível pensar fora do que está escrito para nós, e sabendo que esse é o objetivo de tanto trabalho da geração anterior, obrigado por conseguirem e que eu não seja o último. Em especial, nossa família não passou isenta pela pandemia, meu tio Carlos sempre será uma das primeiras vozes a me apoiar na ciência, esse trabalho é dedicado a ele e a minha avó Dulcelina de Souza Moraes, de quem sou um decimo quarto filho. Sei que dei orgulho a você e minha mãe.

Eu não posso reclamar de orientadores. Essa é uma frase muito mais importante do que parece, principalmente chegando ao doutorado, na verdade, esse é um dos poucos momentos que eu entendo o que é “privilégios”. Não sei se é por eu ser o único entre meus amigos a ter orientadores millenialskkk(como eu), mas, enquanto os orientadores do PIBIC me fizeram escolher a ciência, no mestrado eu tenho aprendido que as minhas possibilidades são múltiplas, algo que eu tento acreditar todo dia e vale mais que diplomas. No país onde fazer doutorado está associado a maior incidência de doenças mentais eu só tenho o que agradecer. Enquanto isso, estudar cana-de-açúcar neste lab, uma planta nada familiar lá na Amazônia, tem mostrado que a ciência para ser praticada como método precisa principalmente, de boas ideias, com elas nós somos capazes de moldar as ferramentas disponíveis. Por isso, muito obrigado ao meu orientador Carlos Hotta, e meus colegas do laboratório de fisiologia vegetal, em especial a quem me apresentou as técnicas utilizadas, apresentou aos amigos dos outros labs, a máquina de café do laboratório de Araras e a carteira assinada, João Paulo, e a pessoa quem eu mais aposto como ícone científico e/ou escritora/ilustradora e/ou o que mais ela quiser, a plural Ana Paula.

Eu, pessoa preta, de Manaus, me formando na melhor universidade da América Latina, tenho inúmeros agradecimentos para dar, mais que a minha memória pode juntar no período de escrita dessa dissertação. Cada professor e amigo que incentivou, botou fé, e está lendo isso agora sintam-se abraçados, por telepatia está podendo. Meus

agradecimentos se estendem aos colaboradores deste projeto, pelos dados, metodologias e conselhos, doutora Marina Martins, doutora Monalisa Sampaio, doutora Camila Caldana, bem como as agências financiadoras deste projeto, CAPES, CNPQ, FAPESP, Instituto Serrapilheira.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Saccharum, complexa fonte de recursos biotecnológicos.....	16
1.2 Sensores do estado energético TOR e SnRK1 .....	19
1.3 O relógio biológico .....	25
<b>2. HIPÓTESE PRINCIPAL</b> .....	29
2.1 Objetivos específicos:.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 Material Vegetal.....	30
3.2 Dados agronômicos.....	31
3.3 Coletas e delineamento experimental .....	31
3.4 Quantificação de Amido.....	32
3.5 Extração de RNA.....	33
3.6 PCR em tempo real (RT-qPCR).....	33
3.7 Genes normalizadores.....	34
3.8 Análises estatísticas.....	35
<b>4. Resultados</b> .....	36
4.1 Grupos com distintas partições de carbono .....	36
4.1 Amido .....	39
<i>Metabolismo de amido em folha</i> .....	39
<i>HS e HF apresentam metabolismo rítmico de amido em folha</i> .....	40
4.2 Relógios biológicos no complexo Saccharum. ....	42
<i>O loop central do relógio biológico tem o mesmo padrão de transcrição no complexo Saccharum, mas em diferentes amplitudes.</i> .....	42
<i>Perfil de transcrição dos genes ScPRR59, ScPRR73, ScPRR95</i> .....	44
<i>A transcrição gênica de componentes do relógio biológico divide os acessos em dois grupos distintos.</i> .....	46
4.3 Relações entre subunidades do complexo TOR e relógio biológico .....	48
<i>Expressão das subunidades do complexo TOR acontecem em ambos os ZTs</i> .....	48
<i>A amplitude de expressão do complexo TOR se correlaciona com altura</i> .....	51
<i>Subunidades de sensores energéticos diferencialmente expressas em grupos de partição de carbono contrastante</i> .....	52
<i>Expressão de genes do relógio biológico e das proteínas alvos de TOR, em horários diferentes, destacam as variedades matinais IN84-82, IN84-105 e 28NG289</i> .....	55
4.4 Correlações entre transcrição de componentes do relógio biológico, sensores energéticos e dados agronômicos .....	58

<i>Correlações entre nove variedades do complexo Saccharum</i> .....	58
<i>Correlações em grupos com partição de carbono distinta</i> .....	60
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	64
5.1 <i>Resumo de resultados nos grupos distintos</i> .....	64
<i>Grupos distintos com índice fisiológico de funcionamento do relógio biológico</i> .....	65
<i>Grupos de cana de açúcar com diferentes relógios biológicos e partição de carbono contrastante</i> .....	67
<i>Co-expressão e alta amplitude das subunidades do complexo TOR ocorrem em momentos distintos do dia</i> .....	70
5.2 <i>Resumo das correlações de expressão gênica</i> .....	74
<i>Componentes de relógio biológico e sensores dos estados energéticos, revelam mecanismos relacionados as partições de carbono contrastante</i> .....	77
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	80
<b>7. RÊFERÊNCIAS</b> .....	81
Figuras suplementares .....	94

## Lista de Figuras

Figura 1 Origem das espécies do complexo Saccharum. Origem das espécies do complexo Saccharum. Genótipos selvagens das espécies Saccharum spontaneum, Saccharum robustum, Miscanthus e Erianthus são parentais de plantas cultivares, selecionados pelas características agronômicas, até os dias atuais. A alta variação de ploidia do complexo saccharum está presente em acesos ancestrais e cultivares comerciais. Modificado de D'Hont et al., 2008. .... 17

Figura 2 Modelo ilustrativo da relação entre TOR-SnRK1 e sinalização energética. Em Arabidopsis, os sensores energéticos TOR e Snrk1 sinalizam fome e excesso energético a regulação de autofagia. O modelo representa três condições, (i) fome de açúcar, (ii) condições normais (sem estresse) de crescimento, (iii) altos níveis de açúcar e / ou condições de estresse. (i) Níveis baixos de T6P, análogo de fome de açúcar, ativam SnRK1 e por consequência, autofagia. SnRK1 ativo, inibe a TOR, ativando a autofagia. (ii) Suc (sacarose) é quebrado em açúcares por sintase de sacarose (SuSy) e invertases (INV). Quando essas enzimas de divisão de Suc (Susy / INV) estão ativas e capazes de lidar com o fluxo de Suc, o T6P é sintetizado por TPS e TPP, tem seu nível espelhando aos níveis de Suc. T6P inibe SnRK1 que por sua vez inibe o complexo TOR, um inibidor da autofagia. (iii) Níveis de excesso de açúcar (importação excessiva, suprimento de açúcar exógeno) também pode induzir autofagia, pelo menos parcialmente por meio da estimulação da síntese ABA e da sinalização do nexo SnRK / TOR. Suc também pode ser metabolizado no apoplasto pela parede celular INV (cwINV), produzindo glicose(Glc) e frutose(Fru) livres. Normalmente, essas hexoses são rapidamente importadas por proteínas de transporte de açúcar (STP) e usadas para crescimento associado à sinalização de TOR. Sob estresse, este crescimento é comprometido, levando à redução de absorção e aumento da Glc extracelular, que pode ser detectada pelo Regulador de sinalização da proteína G (RGS1), por sua vez, ativando a autofagia por meio de um mecanismo ainda desconhecido. Setas vermelhas indicam regulação negativa(repressão) e verde regulação positiva(indução). As linhas tracejadas representam potenciais mecanismos regulatórios. As enzimas indicadas estão em azul .Os mecanismos que não estão ativos durante um específico período ou condição, estão desbotadas. Adaptado de (JANSE VAN RENSBURG; VAN DEN ENDE; SIGNORELLI, 2019) ..... 24

Figura 3 Alças de regulação transcricional do relógio biológico vegetal e o papel dos genes PRRs. Em azul: PRR9 e PRR7 reprimem CCA1 e LHY, enquanto CCA1 e LHY ativam PRR9 e PRR7. A expressão de PRR9 é induzida por LWD1, e foi proposto que PRR9 indiretamente ativa LWD1. CCA1 e LHY reprimem a expressão dos genes noturnos ELF4, ELF3 e LUX. ELF4, ELF3 e LUX forma um complexo que reprime a expressão de PRR9. Destacado em roxo: TOC1(PRR1) reprime a expressão de CCA1 e LHY, e CCA1 e LHY reprime a transcrição de TOC1. CCA1 e LHY também reprimem CHE, e CHE reprime diretamente CCA1. A ligação de TOC1 a CHE ativa indiretamente CCA1. Em destaque em verde: PRR5 regula negativamente a expressão de CCA1 e LHY. PRR5 forma um ciclo de feedback com RVE8 em que PRR5 reprime RVE8 e RVE8 ativa PRR5 em troca. Não destacado: A regulação pós-tradução de PRR5 e TOC1 envolve a degradação da proteína mediada por ZTL. Ligação de TOC1 a PRR3 ou PRR5 estabiliza os níveis de proteína TOC1. Painel direito: PRRs reprimem a expressão de muitos genes que influenciam os processos fisiológicos expressos pela manhã.(FARRÉ; LIU, 2013)..... 26

Figura 4 Normalizador mais estável através de RefFinder entre ATP\_sintase, GAPDH e Tubulina, no ZT3(Manhã) e ZT12(Tarde). Fonte: RefFinder..... 35

Figura 5: Divergências fenotípicas entre os acessos. A) Boxplot de correlação entre grupos de acessos utilizando porcentagem de açúcares, %Pol. HS: alto açúcar; LF: baixa fibra. HF: alta fibra; LS: baixo açúcar. B) Boxplot de correlação entre grupos de acessos utilizando porcentagem de fibra, %Fibra. HS: alto açúcar; LF: baixa fibra. HF: alta fibra; LS: baixo açúcar.36

Figura 6 HS e HF, grupos com partição de carbono contrastante. A) Dois primeiros componentes principais representados no biplot, componente 1(F1): 62,91% e componente 2(F2): 18,42% da variabilidade de dados. altura (m), diâmetro (mm), número de perfilho, teor de sacarose (Pol%Caldo e Pol%Cana), teor de sólidos solúveis (°Brix) e teor de fibra (%) e Peso. .... 39

Figura 7 Perfil de metabolismo de amido. Quantificação de amido em nove acessos de cana-de-açúcar. Amostras de folha+1 coletadas em campo no começo da manhã, ZT3, meio do dia ZT7, começo da noite, ZT12 e início do dia seguinte, ZT27. .... 40

Figura 8 : Perfil de metabolismo de amido dos grupos HS e HF.A área sem preenchimento corresponde ao período luminoso e com preenchimento é relativa à noite. As letras, a, aa, b, bb correspondem a diferenças estatísticas entre ZTs e grupos,  $P < 0,05$ ..... 41

Figura 9 Acessos com perfis rítmicos de metabolismo de amido. A) Perfil de SP80-3280, *S.officinarum* híbrida. B) Perfil de IN84-82, *S. spontaneum* . C) Perfil de IN84-105, *S.officinarum*. D) Perfil de 75//09, *Erianthus* sp. Em todos os gráficos a área sem preenchimento corresponde ao período luminoso e com preenchimento é relativa à noite. As letras corresponde a diferença estatística, ZTs com letras diferentes diferem significativamente, teste-t pareado,  $P < 0,05$ ; método de ajuste: BH..... 42

Figura 10: A transcrição dos ponteiros centrais, ScLHY e ScTOC1, entre horários, não diferem como a partição de carbono dos acessos. A) Diferença entre Zts de Transcrição do gene matutino LHY entre os acessos. B) Diferença entre Zts de Transcrição do gene noturno, ScTOC1 entre os acessos. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta.  $p < 0,05$ . .... 43

Figura 11: Distribuição dos acessos pela transcrição de ScLHY e ScTOC1.Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):92,29% e componente 2(F2): 5,78% da variabilidade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, KRAKATAU, 75//09, 28NGNG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: LHY\_manhã (ZT3), LHY\_tarde (ZT12), TOC1\_manhã (ZT3), TOC1\_tarde (ZT12). (Figura suplementar 6)..... 44

Figura 12: Distinção entre os acessos em transcrição dos genes PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRR) 95, 73 e 59.A) Heatmap de correlações de spearman entre acessos.

Significância  $p < 0,05$  nos pontos mais escuros (vermelho); os pontos mais claros (laranjas e amarelos) não são significativos,  $p > 0,05$ . B) B) Dispersão entre os acessos e nível de transcrição dos genes PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRR) 95, 73 e 59 nos ZT3 e ZT12. Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1): 87,4% e componente 2 (F2): 8,2% da variabilidade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, KRAKATAU, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR599\_ZT3, PRR599\_ZT12, PRR733\_ZT3, PRR733\_ZT12, PRR955\_ZT3, PRR955\_ZT12. (Figura suplementar 7)..... 46

Figura 13: Distinção de dois grupos com base na Transcrição de genes componentes do relógio biológico. A) Heatmap de correlações de Spearman entre acessos. Significância  $p < 0,05$  nos pontos mais escuros (vermelho); os pontos mais claros (laranjas e amarelos) não são significativos,  $p > 0,05$ . B) Dispersão entre os acessos e Transcrição dos genes PRR5, 7, 9, ScLHY e ScTOC1, nos ZT3 e ZT12, dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):81,06% e componente 2(F2): 9,39% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde. (Figura suplementar 8)... 47

Figura 14: Diferença de transcrição das subunidades do complexo TOR entre horários. Amplitude de transcritos das subunidades de TOR entre horários de coleta. .... 50

Figura 15: Distribuição dos acessos em transcrição do complexo TOR. A) Dispersão dos acessos. Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):70,96% e componente 2(F2):20,03% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORa\_ZT3, TORa\_ZT12, TORB\_ZT3, TORB\_ZT3, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12. B) Dispersão da transcrição das subunidades do complexo TOR no ZT3 e ZT12. Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1): 58,98% e componente 2 (F2): 30,28% da variabilidade de dados, significância 5%. Variáveis ativas: RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORa\_ZT3, TORa\_ZT12, TORB\_ZT3, TORB\_ZT3, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12. Observações ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. (Figura suplementar 9)..... 51

Figura 16: Variedades com expressão rítmica das diferentes subunidades do complexo TOR são mais altas. NR: variedades sem provável perfil rítmico, R: Provável perfil de transcrição rítmica(>2x) das subunidades do complexo TOR. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$  ..... 52

Figura 17: A transcrição da subunidade LST8 é relacionado ao acúmulo de açúcar e tem amplitude de expressão relacionada à altura dos acessos. A) Diferença de transcritos da subunidade LST8 entre acessos do complexo Saccharum. B) LST8 é mais expresso em variedades do grupo HS. C) Diferença de altura média entre os grupos de acessos divididos

pela amplitude de LST8. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ ..... 53

Figura 18: Nível de Transcrição de KIN10 no começo da noite maior em PRR que LHY. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . 55

Figura 19: Dispersão dos acessos com dados de transcrição gênica do relógio biológico e sensores energéticos. Dois primeiros componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):77,38% e componente 2(F2):10,36% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_ZT3, LHY\_ZT12, TOC1\_ZT3 e TOC1\_ZT12, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORa\_ZT3, TORa\_ZT12, TORB\_ZT3, TORB\_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12. .... 56

Figura 20: Dispersão dos acessos com dados de transcrição gênica do relógio biológico e sensores energéticos. Dois primeiros componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):67,3% e componente 2(F2):13,8% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORa\_ZT3, TORa\_ZT12, TORB\_ZT3, TORB\_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12, TAP46\_ZT3, TAP46\_ZT12, S6k1.1\_ZT3, S6k1.1\_ZT12, S6k1.2\_ZT3, S6k1.2\_ZT12. (Figura suplementar 10) ..... 57

Figura 21: Correlação da transcrição dos genes analisados com dados agronômicos de todos os acessos juntos. Total de correlações entre dados de transcrição genica mensurados, dados agronômicos e de concentração de amido de todos os acessos analisados. Spearman. Significância 5%,  $p < 0,05$ . .... 60

Figura 22: Correlações entre plantas do grupo HF. Total de correlações entre dados de transcrição gênica mensurados, dados agronômicos e de concentração de amido dos acessos IN84-82, 75//09, IN84-58 e 28NG289, presentes no grupo previamente selecionado HF. Spearman. Significância 5%,  $p < 0,05$ . .... 61

Figura 23: Correlações do grupo PRR. Total de correlações entre transcrição gênica e dados agronômicos no grupo PRR, SP80-3280, KRAKATAU, CHINA, IN84-105 e NG57221. Spearman. Significância 5%,  $p < 0,05$ ; ..... 63

Figura 24: Esquema dos achados de metabolismo de amido, maquinaria do relógio biológico e sensores energéticos..... 65

Figura 25: Resumo das correlações significativas entre transcritos de componentes do relógio biológico e da via de sinalização dos sensores dos estados energéticos TOR e Kin10 com dados

agronômicos nos 9 acessos do complexo Saccharum. A partir de amostras de folha +1, quantificamos transcritos dos genes PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORA\_ZT3, TORA\_ZT12, TORB\_ZT3, TORB\_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12, TAP46\_ZT3, TAP46\_ZT12, S6k1.1\_ZT3, S6k1.1\_ZT12, S6k1.2\_ZT3, S6k1.2\_ZT12 em tempo real nos dois horários de coleta, ZT3 e ZT12. Linhas pretas correspondem a correlações positivas entre os genes. Linhas vermelhas correspondem a correlações negativas entre os genes. Estão representadas apenas as correlações  $p < 0,05$ , Spearman. .... 75

Figura 26: Resumo das correlações significativas entre transcritos de componentes do relógio biológico e da via de sinalização dos sensores dos estados energéticos TOR e Kin10 com dados agronômicos nos grupos com partição de carbono contrastante. A) Grupo PRR, KRAKATAU, SP80-3280, NG57221, IN84-105 e CHINA. B) Grupo HF: IN84-82, IN84-58, 75//09, KRAKATAU e 28NG289. A partir de amostras de folha +1, quantificamos transcritos dos genes PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORA\_ZT3, TORA\_ZT12, TORB\_ZT3, TORB\_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12, TAP46\_ZT3, TAP46\_ZT12, S6k1.1\_ZT3, S6k1.1\_ZT12, S6k1.2\_ZT3, S6k1.2\_ZT12 em tempo real nos dois horários de coleta, ZT3 e ZT12. Ilustração feita por min na ferramenta BioRender.com. Linhas pretas correspondem a correlações positivas entre os genes. Linhas vermelhas correspondem a correlações negativas entre os genes. Estão representadas apenas as correlações  $p < 0,05$ , Spearman. .... 76

## Lista de Tabela

- Tabela 1: Genótipos utilizados neste trabalho, acessos retirados do banco de germoplasma da REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTIC (RIDESA). Gênero, país de origem, D: domesticada, S: selvagem, POL: percentual de açúcares totais, Fib: percentual de fibras. .... 30
- Tabela 2: Correlação de Spearman entre os dados agronômicos de todas as variedades juntas. .... 37
- Tabela 3: Teste ANOVA entre dados agronômicos dos grupos HS e HF. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . .... 37
- Tabela 4: Diferença de transcritos dos componentes de relógio biológico entre os grupos de acessos HS e HF. Teste ANOVA para componentes de relógio biológico entre grupos selecionados com base em suas partições de carbono preferenciais, HS e HF, Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . .... 43
- Tabela 5: Teste ANOVA de transcrição dos componentes de relógio biológico entre grupos separados pelo PCA de transcrição de componentes do relógio biológico. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . .... 48
- Tabela 6: Teste ANOVA de dados agronômicos entre grupos separados pelo PCA de transcrição de componentes do relógio biológico. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . .... 48
- Tabela 7: Componentes do complexo enzimático TOR kinase, KIN10 e alvos da via de sinalização. .... 49
- Tabela 8: Teste ANOVA de expressão dos genes das subunidades do complexo TOR entre ZT3 e ZT12. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . .... 50
- Tabela 9: Diferença da transcrição das subunidades do complexo TOR entre os grupos PRR e LHY. Teste ANOVA entre grupos separados pelo PCA de transcrição de componentes do relógio biológico, dados em negrito diferem significativamente entre os grupos. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . .... 54
- Tabela 10: A transcrição de ScKIN10 não difere entre horários e grupos de partição de carbono. Teste ANOVA entre manhã e tarde e entre grupos HS e HF. Dados em negrito diferem significativamente entre os grupos, significância 5%, estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ . .... 54

## RESUMO

(Almeida-Jesus. F.M) **Interações entre relógio biológico e sensores energéticos em ancestrais de cana-de-açúcar.** 2021. Número de páginas do trabalho (ex: 87p). Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A cana-de-açúcar e a cana energia são plantas intercruzáveis que compõem o complexo *Saccharum*. Estas plantas são fonte de biomassa para produção de açúcar, biocombustíveis, eletricidade, entre outros, e utilizam a energia assimilada pela fotossíntese de forma contrastante, ainda que ambas resultem em alta produtividade. O relógio biológico é um mecanismo molecular que gera informações sobre a hora do dia em conjunto com estímulos ambientais, adaptando respostas fisiológicas em prol de otimizar o desenvolvimento dos organismos em um ambiente cíclico, processo que regula cerca de 64% dos genes de cana-de-açúcar no campo. Em organismos sésseis como as plantas, o recorrente processo de produção de energia apenas durante o período luminoso, gera ritmos de metabólitos que influenciam na atividade de enzimas quinases que assim funcionam como sensores do estado energético, em vias conservadas nos eucariotos. Porém, pouco se sabe a respeito de como estes sinais são percebidos a nível transcricional, principalmente em plantas cultiváveis. Para elucidar como estas vias atuam em conjunto em plantas do complexo *Saccharum*, medimos o nível de transcrição de componentes do relógio biológico, de subunidades que compõem o complexo TOR, e da subunidade catalítica de SnRK1, KIN10. Medimos o desempenho do relógio biológico das variedades através da quantificação de amido em quatro pontos temporais, para obter uma dinâmica de produção e consumo, processo que é regulado pelo relógio biológico e tem genes com perfil de expressão rítmicos em cana de-açúcar. Curiosamente, uma das quatro variedades onde identificamos provável perfil rítmico de consumo de amido é a *S.officinarum* SP80-3280, cana-de-açúcar utilizada anteriormente para estudos de relógio biológico. Os nove acessos foram divididos em dois grupos com base em sua partição de carbono contrastante. HF (*high fiber*) com mais fibras e perfilho e grupo HS (*high sucrose*), com maior armazenamento de açúcares e amido que HF, em todos os horários de coleta, e com baixa produção de fibras. Estes grupos não diferem em expressão dos componentes de relógio biológico, no entanto, HS tem maior transcrição de uma subunidade do complexo TOR, em apenas um dos horários analisados (ZT12). Em conjunto, a expressão dos componentes do relógio biológico divide os acessos entre os que possuem altos níveis de transcrição de *ScLHY*, *no ZT03*, e os que possuem maior transcrição dos genes *PRR59*, *73* e *95*, *no ZT12*, grupos com contrastante partição de carbono. A transcrição dos sensores energéticos se correlaciona no começo da noite em acessos de HS e Krakatau e, no começo da manhã, em acessos de HF e IN84-105, sem agrupar as variedades por espécie ou destino de carbono. Este trabalho sugere que há diferentes níveis de correlação entre a transcrição dos genes mensurados e as contrastantes partições de carbono das plantas do complexo *Saccharum*.

**Palavras-chave:** (Cana-de-açúcar, Metabolismo energético, Relógio biológico, Target of Rampamicyn(TOR), Transcrição)

## ABSTRACT

(Almeida-Jesus. F.M) Biological clock and energy sensors in plants from Saccharum complex. 2021. Number of pages of work (e.g. 87p). Master Thesis - Graduate Program in Biological Sciences (Biochemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sugarcane and Energycane are intercrossable plants that make up the *Saccharum complex*. These plants are a source of biomass, sugar, biofuels, electricity among others, and even though they use the energy assimilated by photosynthesis in a contrasting way, both results in high productivity. The biological clock is a molecular mechanism that generates information about the time of day in conjunction with environmental stimuli, adapting physiological responses to optimize the development of organisms in a cyclic environment, a process that regulates about 64% of sugarcane genes in field-grown plants. In organisms such as plants, the recurrent process of energy production that happens only during the luminous period generates rhythmicity that may influence the activity of kinase enzymes, thus giving an energy sensor property for then. However, little is known about how these signs are perceived at the transcriptional level, especially in crops and monocots. To elucidate how these pathways act together in plants of the *Saccharum complex*, we measured the transcription level of the daytime loop of the biological clock, subunits that make up the TOR complex, and the catalytic subunit of SnRK1, KIN10. We measured starch content in four time points, to obtain a dynamic of production and consumption, a process that is regulated by the biological clock and has genes with a rhythmic expression profile in sugarcane. Interestingly, one of the four varieties where we could identify a probable rhythmic profile of starch consumption is a sugarcane SP80-3280 (*S. officinarum*), that have been used for biological clock studies. The nine genotypes were divided into two groups based on their contrasting carbon partition. HF (high fiber) with more fiber and tiller and group HS (high sucrose), with higher sugar and starch storage than HF, but with lower fiber production. These groups do not differ in expression of biological clock components; however, HS has a higher transcription of a subunit of the TOR complex, in only one of the analyzed times (ZT12). Together, the expression of components of the biological clock divides the genotypes between those with higher levels of *SCLHY* in ZT03 and those with more transcripts of *PRR59*, *73* and *95* genes in ZT12, groups that also have contrasting carbon partition. The transcription of TOR complex correlates in the early evening in HS and KRAKATAU, but in the morning, in HF and IN84-105, with no clear correlation with the C destination preferences. This work suggests that there are different levels of correlation between the transcription of biological clock and energy sensors component genes and the contrasting carbon partitions of plants from the *Saccharum complex*.

### **Keywords:**

(Sugarcane, energy metabolism, biological clock, Target of Rampamicyn(TOR), Transcription)

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Saccharum, complexa fonte de recursos biotecnológicos

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. ), C4, da família Poaceae, é uma cultura utilizada para produzir o açúcar, um *commodity* de alta importância econômica e social, e o etanol, biocombustível estratégico na matriz energética do Brasil. O gênero *Saccharum* inclui seis espécies (*Saccharum barberi* Jeswiet, *S. edule* Hassk, *S. officinarum* L., *S. robustum*, Brandes & Jew, *S. sinense* Roxb.,, *S. spontaneum* L.), que juntas aos gêneros filogeneticamente próximos e intercruzáveis *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*, constituem o ‘Complexo Saccharum’(MUKHERJEE, 1957, DANIELS; DANIELS, 1975).

Plantas das espécies *S. officinarum* são cultivares domesticados com alto percentual de açúcares nos colmos. Nomeada de cana nobre pelos cultivadores holandeses, supunha-se que esta espécie seria uma derivação da espécie ancestral *S. robustum* devido à forte relação morfológica (GRIVET et al., 2004). No entanto, evidências recentes apontam um evento de especiação que diferenciou plantas *S. officinarum* de *S. robustum* há ao menos 385 mil anos, enquanto o ancestral de ambas provavelmente se separou da espécie *S. spontaneum* há cerca de 769 mil anos (ZHANG et al., 2019). Estas três espécies são utilizadas em programas de melhoramento para alto rendimento até os dias atuais. Zhang e colaboradores 2019 chegaram a estas datas com base no sequenciamento de 2000 genes entre as três espécies citadas (Figura 1)

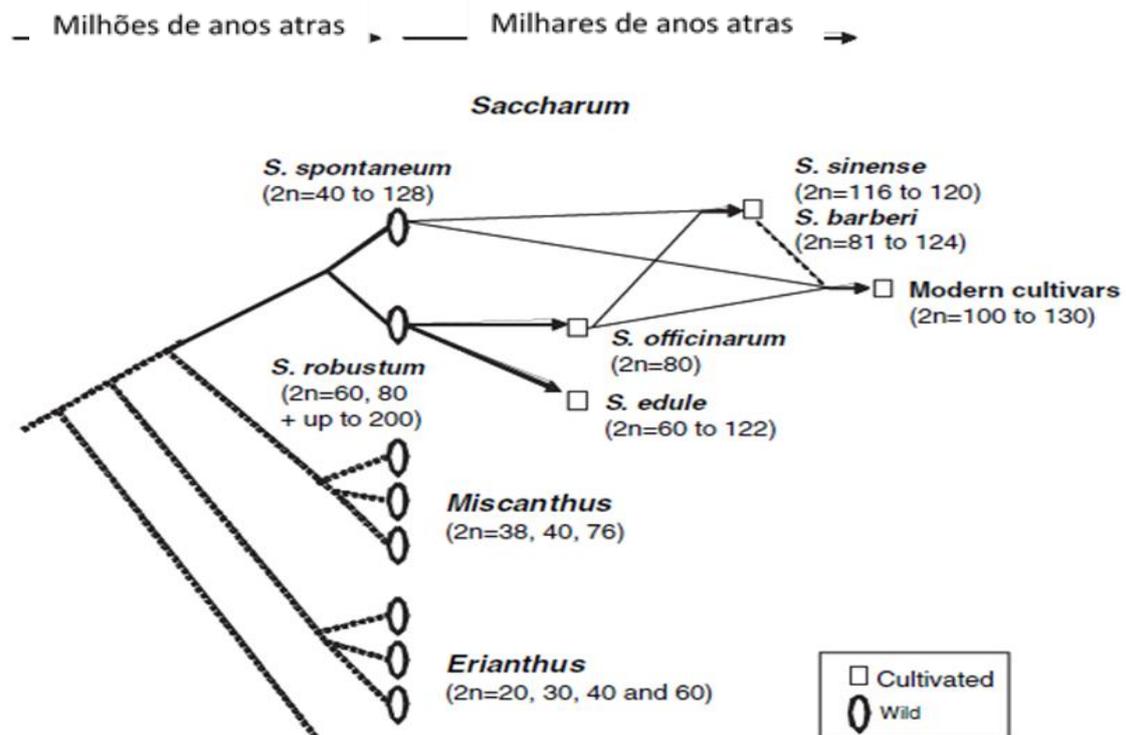


Figura 1 Origem das espécies do complexo *Saccharum*. Origem das espécies do complexo *Saccharum*. Genótipos selvagens das espécies *Saccharum spontaneum*, *Saccharum robustum*, *Miscanthus* e *Erianthus* são parentais de plantas cultivares, selecionados pelas características agronômicas, até os dias atuais. A alta variação de ploidia do complexo *saccharum* está presente em acessos ancestrais e cultivares comerciais. Modificado de D'Hont et al., 2008.

*S. barberi* ( $2n = 82-124$ ) e *S. sinense* ( $2n = 88$ ) são espécies ancestrais, híbridas de *S. spontaneum* e *S. officinarum* e de poliploidia natural. Estas espécies eram tipos de cana-de-açúcar cultivadas em regiões da Índia e China, respectivamente, pois têm alto percentual de fibras e maior resistência a stress que as plantas ancestrais de *S. officinarum*, apesar de possuírem apenas moderada concentração de açúcares (D'HONT; PAULET; GLASZMANN, 2002, MOORE; PATERSON; TEW, 2013). Hoje em dia, com o desenvolvimento de acessos ainda mais resistentes e produtivos, podemos encontrar poucos cultivos de *S. sinense* e *S. barberi*, com essas espécies estando principalmente em bancos de germoplasma (DILLON et al., 2007, MOORE; PATERSON; TEW, 2013).

Os cultivares modernos de *Saccharum* spp. são plantas selecionadas para alta produtividade de biomassa, importante fonte de alimentação animal, açúcar, combustíveis e bioenergia (DINIZ et al., 2019). Resultados de hibridações interespecíficas, principalmente, entre as espécies *S. officinarum* ( $2n = 80$ ), cana doce

com baixo teor de fibra nos colmos, e *S. spontaneum* ( $2n = 40 - 128$ ), plantas com menos açúcares acumulados, mais perfilho por planta e colmos fibrosos, as canas-de-açúcar convencionais passam ainda por retrocruzamentos com plantas *S. officinarum*, um processo chamado de nobilitação, que proporciona a retenção de características que levam ao acúmulo de sacarose. (GRIVET et al., 2004). Contudo, está limitada técnica de hibridização resulta em plantas com limitações de acúmulo de biomassa e resistência a stress. Introduzir plantas de outros gêneros do complexo *Saccharum*, com características mais fibrosas, como *Erianthus* sp., em programas de melhoramento de cana-de-açúcar aumenta a sua heterogeneidade e com isso, canas mais produtivas. (MEENA et al., 2020). A participação de diferentes espécies contribui para a alta poliploidia e aneuploidia de híbridos *Saccharum* spp. que apresentam maior número de alelos efetivos e polimorfismos em comparação com as plantas ancestrais *S. spontaneum*, *E. arundinaceus* e *S. sinense* (ALI et al., 2019).

As hibridizações entre canas-de-açúcar comerciais com espécies ancestrais, como *S. spontaneum*, *S. robustum* e *Erianthus* sp., permitem ainda a produção de genótipos com outras características, como um alto percentual de fibras e um maior número de perfilho, as chamadas canas-energia. Este tipo de cana, mais fibrosa que capaz de acumular açúcar, tem alto rendimento e favorece a produção de etanol de segunda geração e eletricidade. (SANTCHURN et al., 2013) (SILVEIRA et al., 2016). Além da alta concentração de sacarose, que pode chegar a 700 mM nos entrenós, direcionar o carbono em prol de desenvolvimento de fibras também é importante para aumentar o rendimento de biomassa, tanto de canas comuns, quanto de canas-energia. Apesar disso, esta característica tem sua importância negligenciada em índices de seleção. Estima-se que conseguimos cerca de 22% do potencial biológico de rendimento em biomassa dos tipos cana-de-açúcar modernos, de um potencial de rendimento em biomassa fresca de  $381 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ . A produção atual obtém cerca de  $84 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ . (MOORE, 1995, GOLDEMBERG, 2007, WACLAWOVSKY et al., 2010, YANG et al., 2019)

A cana-energia é uma alternativa sustentável à utilização de petróleo, com potencial de diminuir o impacto ambiental da produção de energia sem comprometer a segurança alimentar. Porém, devido ao seu cultivo ser baseado em crescimento vegetativo, impedimentos fisiológicos como altas taxa de floração e baixa biomassa

por unidade de colmo, são importantes pontos de melhoramento genético. (GOLDEMBERG, 2007, CARVALHO-NETTO et al., 2014, MATSUOKA et al., 2014, SOUZA; FILHO, 2015, JAISWAL et al., 2017, KLINE et al., 2017). Elucidar os mecanismos moleculares que regulam a partição de carbono entre o armazenamento e a utilização de energia, como produção de amido e/ou acúmulo de sacarose; consumo de hexoses via glicólise e processos mitocondriais para geração de energia e/ou fabricação de carboidratos estruturais, é também entender como melhorar o rendimento de canas-de-açúcar convencionais e canas-energia.

## 1.2 Sensores do estado energético TOR e SnRK1

A fotossíntese é o processo pelo qual seres clorofilados transformam luz solar em energia química, oxidando moléculas de água no processo. No reino vegetal, a energia química gerada pela fotossíntese é utilizada para fixar moléculas de carbono atmosférico em carboidratos. Plantas com fotossíntese tipo C<sub>4</sub>, como as do complexo Saccharum, utilizam a bainha perivascular como um mecanismo de concentração de carbono, uma diferença compartimental nas folhas que diminui a probabilidade da enzima Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) em se ligar a moléculas de oxigênio.

As trioses sintetizadas nos cloroplastos dos órgãos fotossintetizantes (órgãos fonte) são transportadas ao citosol, onde ocorre a síntese de sacarose, que é utilizada para produção e acúmulo de amido e/ou transportada aos órgãos em desenvolvimento (órgãos-dreno). Durante a noite, o amido deixa o cloroplasto, principalmente na forma de maltose, em direção ao citoplasma, onde é novamente convertido em sacarose. (GRAF et al., 2010). Durante a assimilação de C pela fotossíntese, o excesso de sacarose se movimenta para fora da célula, atravessando a membrana plasmática e circulando pelos espaços intercelulares, formados por macro- e microporos da parede celular (apoplasmos), podendo chegar até as células vasculares do floema - elemento crivado. Barreiras físicas ao redor das células vasculares impedem o transporte apoplástico de sacarose nos colmos maduros de cana-de-açúcar, uma especialização que aumenta a capacidade de acumular sacarose nestes colmos. Esta especialização limita o transporte de sacarose à via simplástica,

que utiliza de plasmodesmos (PD), nanoporos com diâmetro em torno de 20 e 60 nm, que conectam os protoplastos e deslocam livremente açúcares e nutrientes minerais entre eles. Sendo assim, o transporte de açúcar em órgãos que acumulam sacarose fica limitado à quantidade e intensidade das ligações via PD entre superfícies das células adjacentes ao longo do sistema crivado. (WELBAUM; MEINZER, 1990, JACOBSEN et al., 1992, KOMOR, 2000, BIHMIDINE et al., 2013). As plantas utilizam os esqueletos de C para construção de toda maquinaria bioquímica (aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, hormônios) e estrutural (lignina, celulose, hemicelulose, pectina). Uma vez sintetizados os carboidratos, essa energia é dividida entre dois processos contrastantes: utilização em processos anabólicos que levam a crescimento vegetativo ou armazenamento em grânulos de amido e em cana de açúcar, armazenada também sacarose (MOORE, 1995)

A partição de C em folhas de cana-de-açúcar, é caracterizada pelos baixos níveis de açúcares e alto percentual de componentes de parede celular e outros compostos, como proteínas. (MASON et al., 2020). A baixa concentração de açúcares nos tecidos foliares, principalmente carboidratos não estruturais, é também um indicativo de forte processo fonte-dreno. A lignificação, característica mais presente em plantas fibrosas como *S. spontaneum*, demanda alta energia, cerca de 2.6–3.0 mg de glicose, para sintetizar um grama de lignina (AMTHOR, 2003, FERREIRA et al., 2016, MASON et al., 2020 ). O amido, molécula de reserva energética das plantas, também funciona como um dreno de carboidratos. Porém, esse açúcar é utilizado para manter o fluxo de carboidratos durante a noite, quando não há luz, diferente dos carboidratos estruturais (GRAF et al., 2010).

O metabolismo de amido é uma sequência de reações bioquímicas reversíveis, composto por enzimas com isoformas citosólicas e plastidiais diferentemente reguladas, dependendo do tipo celular, localização e estágio de desenvolvimento (TIESEN; PADILLA-CHACON, 2013). Hotta e colaboradores (2013) reportaram o perfil rítmico na transcrição de enzimas envolvidas em síntese, ramificação, degradação e desramificação de amido no *Saccharum sp.* SP80-3280, antigo cultivar comercial de cana-de-açúcar. Em plantas de milho (*Zea mays*), manter o nível de amido suficiente, isto é, sem que ocorra estresse energético ao fim da noite, se correlaciona positivamente com a taxa de crescimento das plantas. (LIANG et al., 2019). O relógio

biológico age como um filtro temporal nos níveis de sacarose, ajustando a utilização de amido de acordo com a demanda, isso beneficia as plantas filtrando as flutuações naturais dos níveis de sacarose, uma dinâmica de ajuste do sistema circadiano que contribui para a homeostase de carbono. (SEKI et al., 2017)

A sinalização pelo complexo proteico Ser/Thr quinase *Target of Rapamycin* (TOR), controla a comunicação via plasmodesmos em folhas da espécie modelo *Arabidopsis thaliana*. *AtTOR*, limita o transporte via plasmodesmos em folhas maduras, que são órgãos mais fotossintetizantes que agem como órgãos-fonte. Enquanto em folhas jovens, que pela menor capacidade fotossintética agem como órgãos-dreno, a atividade do complexo TOR é reduzida e há livre transporte via plasmodesmos (BRUNKARD et al., 2020). Isso foi verificado em metodologias que impediam a formação do complexo TOR, e corroborado pelo fenótipo de carregamento do floema mais rápido encontrado em plantas sem expressão da subunidade *LST8-1*, fundamental para a integridade do complexo (AZZOPARDI et al., 2012, p. 8) Influenciando o carregamento de sacarose no floema apenas das folhas mais fotossintetizantes, o complexo TOR favorece a relação-fonte dreno de fotoassimilados contra o gradiente de concentração. Outros exemplos de especializações da via de sinalização por TOR em plantas é a integração de anabolismo e sinalização hormonal com fotossíntese. (Brunkard et al., 2020), (FORZANI; MEYER, 2019) (VAN LEENE et al., 2019)

Em *Arabidopsis*, o complexo TOR é composto por uma subunidade quinase principal chamada TOR, que apresenta perfil de expressão rítmico; RAPTOR, *Regulatory-Associated Protein of TOR*, com dois genes homólogos: *RAPTOR1A* e *RAPTOR1B*; LST8, *Lethal with Sec Thirteen 8*, com também dois genes homólogos *LST8-1* e *LST8-2*. Destes, apenas *LST8-1* apresenta função biológica aparente e em complexo com as demais subunidades. (BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007, SALEM et al., 2018, Van leene et al 2019).

As pesquisas atuais em genômica de cana-de-açúcar têm viabilizado a identificação e elucidação de alvos regulatórios chave das plantas, o que até pouco tempo atrás era um grande desafio, devido à alta aneuploidia das plantas (HOTTA et al., 2010). Na maioria das plantas, apenas um gene que codifica a subunidade TOR é

encontrado. Em cana-de-açúcar (R570, *Saccharum* híbrido) há seis haplótipos para o gene TOR (quatro de *S. officinarum* e dois de *S. spontaneum*), distintos por apenas 27 SNPs. Porém, ainda que não se saiba o padrão de expressão entre os que foram identificados, nem todos haplótipos são expressos (VILELA et al., 2017)

TOR promove processos anabólicos em todos os eucariotos, ao sinalizar condições energéticas favoráveis. (CHANTRANUPONG; WOLFSON; SABATINI, 2015) (FICHTNER et al., 2020). Os níveis de expressão da subunidade TOR se correlacionam com o crescimento de *Arabidopsis* e arroz. O Complexo TOR atua 1) na síntese de proteínas; 2) por fosforilação e ativação de proteínas S6K; 3) pela síntese de nucleotídeos e ativação de crescimento de tecidos meristemáticos; 4) inibindo a sinalização de estresse através da fosforilação e ativação de TAP46 (subunidade de enzimas fosfatase PP2C inibidoras da sinalização do hormônio ABA); e 5) pela inibição do catabolismo e degradação de proteínas, bloqueando ativadores de autofagia. (DOBRENEL et al., 2016) (DEPROST et al., 2007) (DONG et al., 2015) (CALDANA et al., 2019).

Com a chegada da noite, o escuro induz a atividade da enzima SUCROSE NON-FERMANTING RELATED KINASE 1 (SnRK1). Em *Arabidopsis*, SnRK1 é um complexo composto por 3 subunidades reguladas independentemente. SnRK1 reprime a expressão de genes envolvidos em processos variados, na sua maioria catabólicos, incluindo degradação de parede celular, amido, sacarose, aminoácidos, lipídios e proteínas, provendo uma fonte alternativa de energia e metabólitos para as células. Além disso, uma grande quantidade de genes envolvidos em biogênese e anabolismo são reprimidos por SnRK1, incluindo a fosforilação de *RAPTOR1B*, dando início a processos autofágicos. (SÁNCHEZ-VILLARREAL; DAVIS; DAVIS, 2018) (BAENA-GONZÁLEZ; HANSON, 2017). A principal subunidade catalítica de SnRK1, ativada em resposta ao baixo nível energético, é nomeada SnRK1.1 (KIN10) e regula, ao nascer e pôr do sol, a expressão de cerca de 1000 genes envolvidos em sinalização de estresse, crescimento e transição de luz. Plantas com superexpressão de *AtKIN10* apresentam o caule menos alongado e florescem mais tarde do que as plantas controle. (BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007; JOSSIER et al., 2009). Cultivares de cana-de-açúcar que contrastam em concentração de sólidos solúveis, têm a família gênica de

*ScSnRK1* diferentemente expressa, o que sinaliza tanto para a existência conservada desta via no gênero *Saccharum* quanto para o provável papel na regulação de carbono (PAPINI-TERZI et al., 2009).

Em *Arabidopsis*, a concentração de sacarose é análoga à concentração de outro açúcar sinalizador em plantas, a triose Trealose-6-fosfato (T6P), que regula negativamente a atividade de *AtSnRK1*. Durante o período luminoso – de aumento contínuo de sacarose - o aumento de T6P induz a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e nitrato redutase (NR), direcionando os fotoassimilados para produção de aminoácidos e ácidos orgânicos. Durante a noite, o aumento de T6P mantém o nível de sacarose baixo, limitando a degradação de amido e ajustando a concentração de sacarose independentemente do momento do dia (FIGUEROA; LUNN, 2016; MARTINS et al., 2013). T6P inibe atividade de SnRK1 associando-se a um fator intermediário ainda não identificado, mas fora do sítio catalítico da quinase. Em folhas maduras, o aumento da concentração de T6P não parece diminuir atividade de SnRK1, provavelmente por não haver o fator intermediário que efetua a inibição alostérica (ZHANG et al., 2009) Há outros indícios que essa sinalização, T6P-SnRK1, esteja presente em cana-de-açúcar: a expressão de PEPC (PHOSPHOENOLPIRUVATO CARBOXILASE) e NR (NITRATO REDUTASE) se correlacionam positivamente com maior expressão de genes TREALOSE FOSFATO QUINASE (TPS), responsável por catalisar a reação de síntese de T6P (DINIZ et al., 2020). (Figura 2).

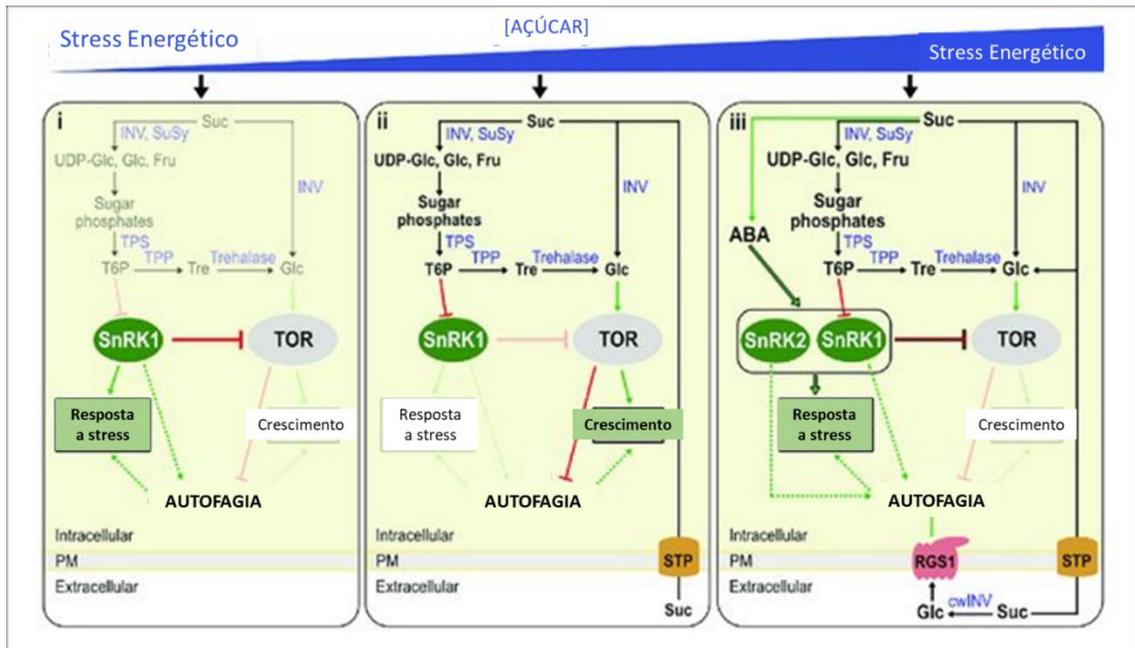


Figura 2 Modelo ilustrativo da relação entre TOR-SnrK1 e sinalização energética. Em Arabidopsis, os sensores energéticos TOR e Snrk1 sinalizam fome e excesso energético a regulação de autofagia. O modelo representa três condições, (i) fome de açúcar, (ii) condições normais (sem estresse) de crescimento, (iii) altos níveis de açúcar e / ou condições de estresse. (i) Níveis baixos de T6P, análogo de fome de açúcar, ativam SnRK1 e por consequência, autofagia. SnRK1 ativo, inibe a TOR, ativando a autofagia. (ii) Suc (sacarose) é quebrado em açúcares por sintase de sacarose (SuSy) e invertases (INV). Quando essas enzimas de divisão de Suc (Susy / INV) estão ativas e capazes de lidar com o fluxo de Suc, o T6P é sintetizado por TPS e TPP, tem seu nível espelhando aos níveis de Suc. T6P inibe SnRK1 que por sua vez inibe o complexo TOR, um inibidor da autofagia. (iii) Níveis de excesso de açúcar (importação excessiva, suprimento de açúcar exógeno) também pode induzir autofagia, pelo menos parcialmente por meio da estimulação da síntese ABA e da sinalização do nexo SnRK / TOR. Suc também pode ser metabolizado no apoplasto pela parede celular INV (cwINV), produzindo glicose(Glc) e frutose(Fru) livres. Normalmente, essas hexoses são rapidamente importadas por proteínas de transporte de açúcar (STP) e usadas para crescimento associado à sinalização de TOR. Sob estresse, este crescimento é comprometido, levando à redução de absorção e aumento da Glc extracelular, que pode ser detectada pelo Regulador de sinalização da proteína G (RGS1), por sua vez, ativando a autofagia por meio de um mecanismo ainda desconhecido. Setas vermelhas indicam regulação negativa(repressão) e verde regulação positiva(indução). As linhas tracejadas representam potenciais mecanismos regulatórios. As enzimas indicadas estão em azul .Os mecanismos que não estão ativos durante um específico período ou condição, estão desbotadas. Adaptado de (JANSE VAN RENSBURG; VAN DEN ENDE; SIGNORELLI, 2019)

Contraditório à sua atividade catabólica, mas de acordo com o metabolismo em prol de salvar energia, a superexpressão de SnRK1 aumenta a síntese de amido em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), regulando o fluxo de carbono para vias de armazenamento de açúcares (MCKIBBIN et al., 2006). Neste contexto, SnRK1 induz a síntese de amido disponibilizando metabólitos intermediários como UDP-glicose e ADP-glicose, regulando a expressão de enzimas sacarose sintase e AGPase, que catabolizam reações de quebra de sacarose e síntese de ADP-glicose, respectivamente. Os complexos TOR e SnRK1, formam uma relação crítica para o desenvolvimento

vegetal, fundamentais para a dominação terrestre das plantas, estas quinases centralizam mecanismos de sinalização e percepção de energia e estresse, mantendo ativo vias metabólicas de biogênese apenas em condições energéticas, enquanto reprime crescimento quando há estresse energético ou biótico (BELDA-PALAZÓN et al., 2020; MARTÍNEZ-BARAJAS; COELLO, 2020; ZHANG et al., 2009).

Os sensores dos níveis energéticos TOR e SnRK1 atuam também no ajuste de período do relógio biológico. Tanto a superexpressão de *AtKIN10* quanto a inibição de expressão e atividade do complexo TOR alongam o período do relógio biológico, enquanto a suplementação com glicose exógena recupera essa mudança de período, uma recuperação dependente da via de TOR. As dependentes da via de TOR diminuem a amplitude de expressão dos genes, mas não os ritmos de expressão do relógio biológico (FRANK et al., 2018; SÁNCHEZ-VILLARREAL; DAVIS; DAVIS, 2018; ZHANG et al., 2019, WANG et al., 2020). O aumento de período causado pelo baixo nível energético acontece tanto em plantas quanto em mamíferos, seja por diminuição da disponibilidade de açúcares, seja por altas concentrações de nicotinamida, que diminuem o balanço energético (razões ATP/ADP e NADH/NAD<sup>+</sup>), em favor das moléculas menos energéticas. (HAYDON et al., 2013; NAKAHATA et al., 2009; STEIN; IMAI, 2012).

### 1.3 O relógio biológico

No reino vegetal, o relógio biológico é um centralizador endógeno de respostas ao ambiente com o objetivo de antecipar mudanças cíclicas e, assim, otimizar seus processos de crescimento e especificamente, assimilação de C. A variação rítmica do ambiente, de 24h, estimula um mecanismo de retroalimentação negativa entre fatores de transcrição, que controlam diversas atividades da planta. Fotossíntese, ajuste do metabolismo de amido, acúmulo de biomassa e sobrevivência, são algumas das vantagens competitivas das plantas que possuem o relógio biológico mais sincronizado com o ambiente. (DODD et al., 2005). Pela manhã, em plantas de *Arabidopsis*, a luz ativa a expressão de dois fatores de transcrição, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* e *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, reprimindo a expressão dos *PSEUDO RESPONSE REGULATORS (PRR) 9* e *7*, que reprimem de volta a expressão de *CCA1* e *LHY*. Esse loop

matinal do oscilador central é conectado a genes noturnos por repressão direta da expressão de *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* pela ligação de LHY/CCA1 ao promotor de *TOC1*. *TOC1* é expresso à noite e exerce feedback negativo à ativação de *LHY/CCA1*. (HAYDON et al., 2013). Estas relações estão ilustradas na figura 3. Em cana-de-açúcar, *LHY* tem pico de expressão entre ZT00-02 (0 h a 2 h após o amanhecer), os *PRR59*, *73* e *95* entre os ZTs 06-10 e *TOC1* no ZT 12, começo da noite (DANTAS et al., 2020)

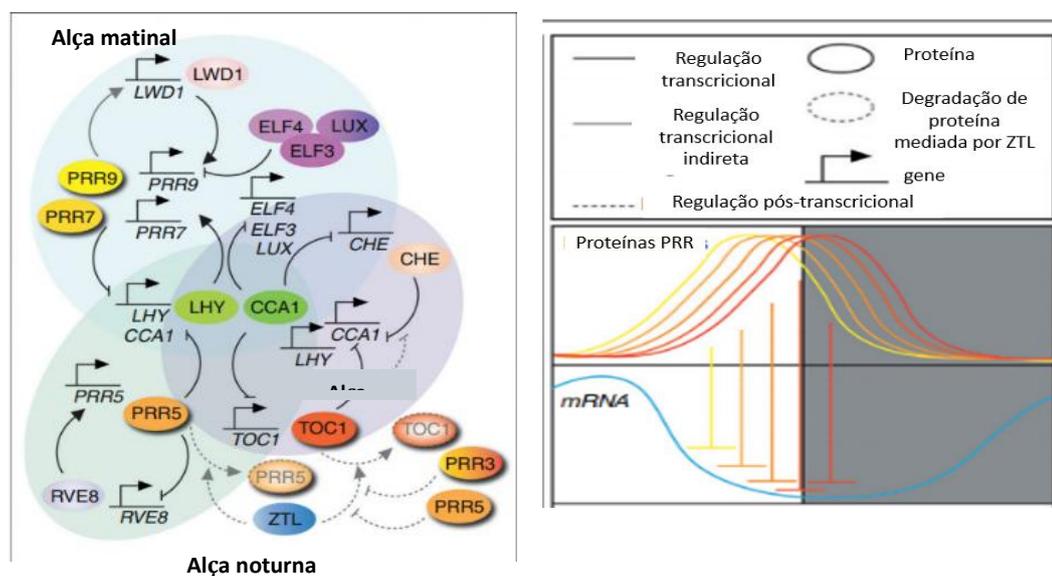


Figura 3 Alças de regulação transcricional do relógio biológico vegetal e o papel dos genes PRRs. Em azul: PRR9 e PRR7 reprimem CCA1 e LHY, enquanto CCA1 e LHY ativam PRR9 e PRR7. A expressão de PRR9 é induzida por LWD1, e foi proposto que PRR9 indiretamente ativa LWD1. CCA1 e LHY reprimem a expressão dos genes noturnos ELF4, ELF3 e LUX. ELF4, ELF3 e LUX forma um complexo que reprime a expressão de PRR9. Destacado em roxo: TOC1(PRR1) reprime a expressão de CCA1 e LHY, e CCA1 e LHY reprime a transcrição de TOC1. CCA1 e LHY também reprimem CHE, e CHE reprime diretamente CCA1. A ligação de TOC1 a CHE ativa indiretamente CCA1. Em destaque em verde: PRR5 regula negativamente a expressão de CCA1 e LHY. PRR5 forma um ciclo de feedback com RVE8 em que PRR5 reprime RVE8 e RVE8 ativa PRR5 em troca. Não destacado: A regulação pós-tradução de PRR5 e TOC1 envolve a degradação da proteína mediada por ZTL. Ligação de TOC1 a PRR3 ou PRR5 estabiliza os níveis de proteína TOC1. Painel direito: PRRs reprimem a expressão de muitos genes que influenciam os processos fisiológicos expressos pela manhã.(FARRÉ; LIU, 2013)

Algumas das interações entre o metabolismo energético e a maquinaria do relógio biológico descobertas recentemente são: as funções mitocondriais e o relógio biológico estão acoplados (FUKUSHIMA et al., 2009). *AtPRR7* é regulado por açúcares e KIN10 (FRANK et al., 2018). Em *A. thaliana* que não expressam os genes *PRR9*, *7* e *5*,

há importante aumento de metabólitos intermediários do ciclo de Krebs, independente da luminosidade e do horário da coleta (FUKUSHIMA et al., 2009). Ainda nesta espécie, enquanto o açúcar produzido pela fotossíntese aumenta gradualmente, a diminuição da atividade de *AtPRR7* ocorre na mesma proporção, promovendo assim a expressão dos genes matutinos *LHY/CCA1* (WEBB et al., 2019). Recentemente, foi demonstrado que a interação entre metabolismo energético e ajuste de período acontece antes mesmo da luz solar chegar, horas antes do amanhecer metabólico (FRANK et al., 2018). O baixo nível energético causado pelo fim das reservas de amido induz a atividade quinase de SnRK1. SnRK1 fosforila o fator de transcrição bZIP63, que interage e favorece o acúmulo proteico de *AtPRR7*, inibidor do gene matutino *AtLHY* (FRANK et al., 2018).

O relógio biológico de cana-de-açúcar não é apenas funcional, como também apresenta genes rítmicos diferentemente expressos em cada órgão e controla mais de 30% do transcriptoma em folha de plantas cultivadas em câmaras de crescimento (Hotta et al. 2013). Em campo, a proporção de transcritos rítmicos é superior a 60% (Dantas et al. 2020), Além das mencionadas vias do metabolismo de amido, a expressão de genes de fotossíntese como dos fotossistemas, fixação de carbono, concentração de CO<sub>2</sub>, e armazenamento de açúcar como síntese e degradação de sacarose, são alguns dos eventos diários regulados pelo relógio biológico em cana de açúcar. Em cana-de-açúcar capazes de alto acúmulo de sacarose, os transcritos das vias de ABA e seca, síntese de proteína e relógio biológico têm alta ritmicidade, com horários diferentes em cada órgão. Síntese de proteína por exemplo, tem pico de transcritos rítmicos no ZT12 (12 horas após o amanhecer) em folha, e ao ZT0 nos entrenós 1 e 5 (HOTTA; JR; SOUZA, 2013), (DANTAS et al., 2020).

Embora fundamental para a bioquímica vegetal, a relação entre os mecanismos moleculares que integram o relógio biológico com vias bioquímicas que sinalizam o estado energético de plantas ainda é pouco explorada, principalmente em espécies não modelo. Neste contexto, estudar o perfil de transcrição de genes do relógio biológico e dos sensores do nível energético em plantas com características contrastantes dos perfis de partição de carbono, se mostra como um interessante

modelo para encontrarmos correlações entre estas vias e fenótipos característicos de plantas representantes do complexo *Saccharum*, visando a potencial descoberta de novos alvos genéticos para melhoramento biotecnológicos em cana-de-açúcar convencional e cana-energia.

## 2. HIPÓTESE PRINCIPAL

A expressão de componentes do relógio biológico e sensores dos níveis energéticos acontecem de forma diferente em cana-de-açúcar com contrastante partição de carbono.

### 2.1 Objetivos específicos:

- a) Definir grupos de cana-de-açúcar com partição de carbono contrastante, baseado nos dados agronômicos;
- b) Elucidar o perfil de metabolismo de amido nos diferentes genótipos de cana de açúcar;
- c) Quantificar a transcrição de genes componentes do relógio biológico e do complexo TOR e KIN10, sensores energéticos;
- d) Buscar correlações entre dados agronômicos dos acessos e o nível de transcrição de genes do relógio biológico e sensores energéticos.
- e) Encontrar possíveis caminhos para a participação dos genes analisados na distinta partição de carbono, entre grupos de cana-de-açúcar correlatas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Foram utilizados neste projeto nove genótipos de cana-de-açúcar pertencentes ao Painel Brasileiro de Genótipos de Cana-de-Açúcar (PBGCA), que é gerido pelo programa de cana-de-açúcar da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), na Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), Araras, Brasil. Com base nos dados agronômicos contrastantes, os acessos escolhidos foram de cinco espécies ancestrais do complexo *Saccharum*: *Erianthus sp*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense* e *S. spontaneum*.

Krakatau, IN84-82 e IN84-58 são três genótipos escolhidos que pertencem à espécie selvagem *S. spontaneum*. São genótipos coletados na Indonésia e estão presentes em estudos de canas energia por possuírem alto teor de fibras e baixo de sacarose. (SILVEIRA et al., 2015, 2015, 2016). Durante o processamento das coletas, uma das variedades *S. officinarum*, TUC71-7, foi excluída do projeto por estar em período de floração, processo que altera a fisiologia da planta e tem participação fundamental do relógio biológico na sincronização de período luminoso e floração (PARK et al., 2016). IN84-105, que também é da Indonésia, pertence a espécie *S. officinarum* e produz mais sacarose que fibras, como característico desta espécie. SP80-3280 (*S. officinarum*), a única cultivar comercial brasileira utilizada neste projeto, é base para estudos de relógio biológicos (DANTAS et al., 2019, 2020). Outro acesso da espécie *S. officinarum* é o ancestral NG57221, originária da Nova Guiné. 28NG289 é da espécie *S. robustum*, genótipo originário de Coimbatore, Índia. *S. robustum* é caracterizado pela grande quantidade de pequenos colmos e baixa sacarose presente no suco, esta e as outras variedades utilizadas de *S. officinarum* foram descritas por BRASILEIRO e colaboradores, (2014). (Tabela 1 e Figura Suplementar).

*Tabela 1: Genótipos utilizados neste trabalho, acessos retirados do banco de germoplasma da REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTIC (RIDESA). Gênero, país de origem, D: domesticada, S: selvagem, POL: percentual de açúcares totais, Fib: percentual de fibras.*

.Nome	Gênero	País	D	POL (%)	Fib (%)
-------	--------	------	---	---------	---------

28NG289	<i>S. robustum</i>	Índia	S	9.27	26.72
IN84-105	<i>S. officinarum</i>	Indonésia	D	17.13	12.18
KRAKATAU	<i>S. spontaneum</i>	Indonésia	S	5.13	24.98
IN84-58	<i>S. spontaneum</i>	Indonésia	S	5.26	26.88
75//09	<i>Erianthus</i>	-	S	6.10	27.39
NG57221	<i>S. officinarum</i>	Nova Guiné	D	18.44	12.06
IN84-82	<i>S. spontaneum</i>	Indonésia	S	6.06	23.37
CHINA	<i>S. sinense</i>	China	D	15.80	16.56
SP80 3280	<i>S. officinarum</i> h.	Brasil	D	16.61	11.83

### 3.2 Dados agronômicos

As medidas morfológicas e agronômicas para altura (m), diâmetro do colmo (mm), número de perfilho, além de teor de sacarose (Pol%Caldo e Pol%Cana), teor de sólidos solúveis (°Brix) e teor de fibra (%) foram realizadas como descrito no manual de instruções elaborado pelo Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Consecana) e aplicada para caracterização fenotípica do PBGCA por BARRETO, 2016. Foram utilizados os dois primeiros anos de corte. Esses dados foram cedidos pelo grupo de pesquisa da Dra. Monalisa Carneiro a este projeto para análises de correlações.

### 3.3 Coletas e delineamento experimental

As coletas aconteceram nos dias 11 e 12 de setembro de 2017, o amanhecer no primeiro dia ocorreu às 6h10, chamamos esse horário de ZT0, ou *Zeitgeber Time 0*, este termo refere-se ao tempo definido por ciclos ambientais que sincronizam ou ajustam um ritmo circadiano (GABRIELSSON, 2005). O nascer do sol nos dias 11 e 12 ocorreu às 6h:10 e 6h:09, respectivamente, com o pôr do sol ocorrendo as 18:01 em ambos os dias, um fotoperíodo de aproximadamente 12h. Em nenhum dos dois dias de coleta houve precipitação ou variação abrupta de temperatura e umidade do ar (U.R). No primeiro dia, a temperatura média foi de 24,9 °C ( ZT3: 23,0 ° C, ZT12: 30,5 ° C), U.R

de 55,3%, (ZT3: 66,4%, ZT12: 35,5%). No segundo dia a temperatura média foi de 25,3 °C (ZT3: 19,3 °C, ZT12: 30,4 °C) e U.R de 53,8% (ZT0: 62,6%, ZT12: 34,7%).

As demais coletas do dia 11 ocorreram às 9 h (ZT3); 13 h (ZT9) e 18 h (ZT12). No dia seguinte repetimos a coleta no ZT3 (ZT27), o que contempla o tempo de produção e consumo de amido, índice fisiológico utilizado para medir o desempenho do relógio biológico entre as diferentes canas-de-açúcar. No total foram coletadas 5 réplicas biológicas de 10 genótipos de cana-de-açúcar em cada horário, contabilizando 200 amostras de folha +1.

### 3.4 Quantificação de Amido

A quantificação de amido foi realizada em colaboração com o Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO, IB-USP), sob a supervisão da Dra. Marina Martins e I.C João Pereira. Foi utilizado um método de quantificação indireta, através de ensaio enzimático da reação catalisada por hexoquinase (Glicose + ATP → Glicose-6-fosfato) na presença de coenzima NADH, usando da proporção de 1 mol de NADH para cada mol de glicose, como descrito por Smith e colaboradores (2006).

Construímos uma curva padrão de consumo de glicose em espectrofotômetro. Utilizando da correspondência de absorvância obtida com a multiplicação da concentração com coeficiente extinção molar de extinção (6,22) e espessura do tubo (1 cm). Utilizamos o slope da curva padrão para correção das amostras coletadas. Após a conversão da absorvância obtida em cada poço, seguimos de correção pela quantidade solventes utilizados nos processos de degradação do pellet, em 40 µL (NaOH + tampão de degradação) e extração 460 µL (EToH 80%). Por fim, os dados expressos nos gráficos estão corrigidos pela massa fresca utilizada para extração, 20 mg. Foram utilizadas 5 réplicas biológicas de cada genótipo.

Para se obter o perfil de acúmulo e degradação de amido foi feita a quantificação deste, em todos os horários coletados. Com o intuito de viabilizar uma mesma extração para diferentes análises utilizamos o método de extração por Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE), o que nos possibilita a análise de metabólitos na fase sobrenadante e

quantificação de amido após tratamento do *pellet* resultante. (SMITH; ZEEMAN, 2006, SALEM et al., 2016).

### 3.5 Extração de RNA

Para a extração de RNA total foi utilizado 100 mg de material foliar pulverizado, utilizando TRIzol como agente extrator (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguido por tratamento com 3 U de DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em temperatura ambiente por 15 min e neutralizado com EDTA 25 mM a 65°C por 10 min. A qualidade da extração de cada amostra foi testada em espectrofotômetro utilizando 1 µL de RNA recém-extraído em aparelho Nanodrop, seguido de verificação da integridade do RNA a partir da análise de corrida das amostras em gel de eletroforese desnaturante. Após os procedimentos de extração e purificação as amostras foram armazenadas a -80°C.

### 3.6 PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para a análise de expressão gênica utilizamos a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, aqui referida como RT-qPCR. Foram sintetizados cadeias de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) a partir de 1 µg de RNA total extraído. A síntese do cDNA foi feita com o kit SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), segundo o protocolo do fabricante. Utilizando o aparelho Fast 7500/Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), foi estabelecido um protocolo único para ampliações entre as 10 variedades, todas as reações seguiram o seguinte protocolo: 6 µl do detector FAST SYBR® Green Master Mix; 3 µL de água duplamente destilada; 2,4 µl do par de primers sentido 5' (*forward*) e sentido 3' (*reverse*) específicos de cada gene a ser amplificado, na concentração 10 µM e 0,6 µl de cDNA. Seguindo as especificações de temperatura de reação fornecidas pelo fabricante. A diluição seriada utilizada para determinar a melhor concentração de cDNA foi 1:5, 3x, onde escolhemos

a concentração 0.04. A quantificação relativa à expressão dos genes do relógio biológico, do complexo TOR e de KIN10 foi retirada da média de expressão de três genes normalizadores, *ScGAPDH*, *ScATPsintase* e *ScTubulina*, pela técnica de Delta Cycle Threshold (DCT). A amplitude de variação dos genes de relógio e do metabolismo energético foram obtidas subtraindo os valores do ZT3 do ZT12, pico e vale de expressão dos genes matinais respectivamente e o inverso para os genes noturnos. Utilizamos a sequência primária de nucleotídeos dos genes de interesse em espécies próximas, *Sorghum* e *Setaria viridis*, para procurar quais as sequências mais próximas dessas em cana-de-açúcar, através do software SUCEST, após a obtenção dessas sequências e utilizando do software PRIMER3, foram feitos primers para a amplificação de todos os genes do complexo ScTOR, devido à grande quantidade de pares de base, foram feitos dois primers para a proteína TOR, chamados TORa e b, e um par de primers para cada isoforma das subunidade RAPTOR e LST8. Foram construídos também primers para alvos conhecidos regulados por TOR, TAP46, S6k1.1 e S61.2. Os primers feitos para este projeto foram testados nas variedades IN84-105 (alta taxa de sacarose) e 75//09 (alto teor de fibras) para confirmar especificidade independente da partição de carbono. No nosso laboratório, já havia todos os primers para amplificação dos genes de relógio estudados bem como os genes normalizadores (Figura suplementar 4). Sequências de plantas pertencentes à família Poaceae, *Sorghum* sp., (entrada: 8084725) e *Setaria* sp., (entrada: 101780377), depositadas no banco de dados KEGG, foram utilizadas como referências na ferramenta de BLASTN dentro da plataforma SUCEST-FUN para encontrarmos sequências homólogas de todas as subunidades e alvos do complexo TOR no espaço genômico do cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280.

### 3.7 Genes normalizadores

Utilizamos a ferramenta online RefFinder, para rastrear genes de referência a partir dos conjuntos de dados experimentais. Ele integra os principais programas computacionais atualmente disponíveis (geNorm, Normfinder, BestKeeper e o método comparativo Delta-Ct) para comparar e classificar os genes de referência candidatos testados. Com base nas classificações de cada programa, atribui um peso apropriado a

um gene individual e calcula a média geométrica de seus pesos para a classificação final geral. A média dos três normalizadores. ( VANDESOMPELE et al., 2002, ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004; PFAFFL et al., 2004; SILVER et al., 2006; XIE et al., 2012) (Figura 4)

Method	Ranking Order (Better--Good--Average)			
	1	2	3	4
Delta CT	Media_manha	ATP_MANHA	TUB_MANHA	gapdh_manha
BestKeeper	TUB_MANHA	Media_manha	ATP_MANHA	gapdh_manha
Normfinder	Media_manha	ATP_MANHA	TUB_MANHA	gapdh_manha
Genom	ATP_MANHA   Media_manha		TUB_MANHA	gapdh_manha
<b>Recommended comprehensive ranking</b>	<b>Media_manha</b>	<b>ATP_MANHA</b>	<b>TUB_MANHA</b>	<b>gapdh_manha</b>

Figura 4 Normalizador mais estável através de RefFinder entre ATP\_sintase, GAPDH e Tubulina, no ZT3(Manhã) e ZT12(Tarde). Fonte: RefFinder

### 3.8 Análises estatísticas

As análises foram feitas utilizando o software Addinsoft (2021). XLSTAT *statistical and data analysis solution*. (New York, USA). <https://www.xlstat.com>. Buscando classificar os grupos de variedades, aplicamos análises de componente principal (PCA) nos dados fenotípicos e de transcrição, além de construção de heatmaps para elucidar as possíveis correlações presentes. Utilizamos de correlação linear de Spearman e teste de variância Welch-ANOVA, para explorar interações entre a expressão gênica e os caracteres agrônômicos. O nível de significância aplicado em todos os testes foi de p-valor < 0,05, entre as variedades e entre ZTs.

## 4. Resultados

### 4.1 Grupos com distintas partições de carbono

Analisando-se os dados cedidos pela Dra. Monalisa Sampaio Carneiro (UFSCar), separamos dois grupos distintos de variedades: plantas com maior percentual de açúcares em relação a fibras, chamado High Sucrose (HS), e plantas com baixo percentual de açúcares, mas alto teor de fibras, chamado High Fiber (HF) (Figura 5). Os grupos HS e HF possuem dados agronômicos distintos, como diâmetro do colmo, °BRIX, percentual de açúcar em cana e caldo e teor de fibras (Tabela 3). O número de perfilhos e o percentual de fibras são dados com alta correlação,  $R^2 = 0,817$ , e são negativamente relacionados com as medições de açúcares no caldo, na cana e de açúcares solúveis (°BRIX),  $R^2 = -0,783$  com perfilho e  $R^2 = -0,883$  com fibras. O número de perfilhos e o percentual de fibras também têm correlação forte e negativa com o diâmetro do colmo,  $R^2 = -0,933$  e  $R^2 = -0,816$ , respectivamente. toneladas por hectare (TPH) se correlaciona positivamente com as medições de açúcares  $R^2 = 0,883$  e diâmetro do colmo  $R^2 = 0,766$ , mas negativamente com o percentual de fibras,  $R^2 = -0,85$ . (Tabela 2). Sendo assim, as relações entre os dados agronômicos mensurados podem se correlacionar com a partição de carbono das plantas.

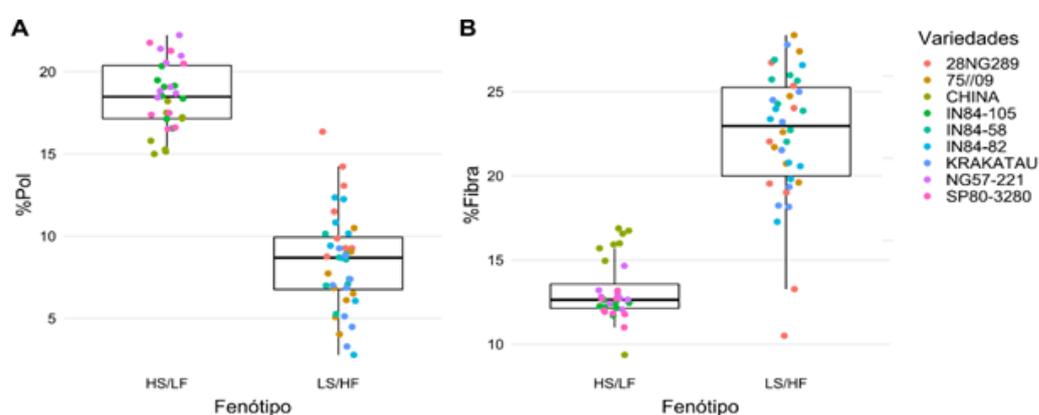


Figura 5: Divergências fenotípicas entre os acessos. A) Boxplot de correlação entre grupos de acessos utilizando porcentagem de açúcares, %Pol. HS: alto açúcar; LF: baixa fibra. HF: alta fibra; LS: baixo açúcar. B) Boxplot de correlação entre grupos de acessos utilizando porcentagem de fibra, %Fibra. HS: alto açúcar; LF: baixa fibra. HF: alta fibra; LS: baixo açúcar.

Tabela 2: Correlação de Spearman entre os dados agrônômicos de todas as variedades juntas.

Variáveis	Altura (m)	Peso	TCH	Perfilho	Diâmetro (mm)	TPH	FIBRA (%)	BRIX_Lab(°Brix)	POL_Caldo (%)	POL_Cana%
Altura (m)	<b>1</b>	0,617	0,617	-0,100	0,333	0,567	-0,400	0,483	0,483	0,483
Peso	0,617	<b>1</b>	<b>1,000</b>	-0,217	0,433	0,667	-0,383	0,333	0,333	0,333
TCH	0,617	<b>1,000</b>	<b>1</b>	-0,217	0,433	0,667	-0,383	0,333	0,333	0,333
Perfilho	-0,100	-0,217	-0,217	<b>1</b>	<b>-0,933</b>	-0,650	<b>0,817</b>	<b>-0,783</b>	<b>-0,783</b>	<b>-0,783</b>
Diâmetro (mm)	0,333	0,433	0,433	<b>-0,933</b>	<b>1</b>	<b>0,767</b>	<b>-0,817</b>	<b>0,783</b>	<b>0,783</b>	<b>0,783</b>
TPH	0,567	0,667	0,667	-0,650	<b>0,767</b>	<b>1</b>	<b>-0,850</b>	<b>0,883</b>	<b>0,883</b>	<b>0,883</b>
FIBRA (%)	-0,400	-0,383	-0,383	<b>0,817</b>	<b>-0,817</b>	<b>-0,850</b>	<b>1</b>	<b>-0,883</b>	<b>-0,883</b>	<b>-0,883</b>
BRIX_Lab(°Brix)	0,483	0,333	0,333	<b>-0,783</b>	<b>0,783</b>	<b>0,883</b>	<b>-0,883</b>	<b>1</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>
POL_Caldo (%)	0,483	0,333	0,333	<b>-0,783</b>	<b>0,783</b>	<b>0,883</b>	<b>-0,883</b>	<b>1,000</b>	<b>1</b>	<b>1,000</b>
POL_Cana% (teor de sacarose)	0,483	0,333	0,333	<b>-0,783</b>	<b>0,783</b>	<b>0,883</b>	<b>-0,883</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1</b>

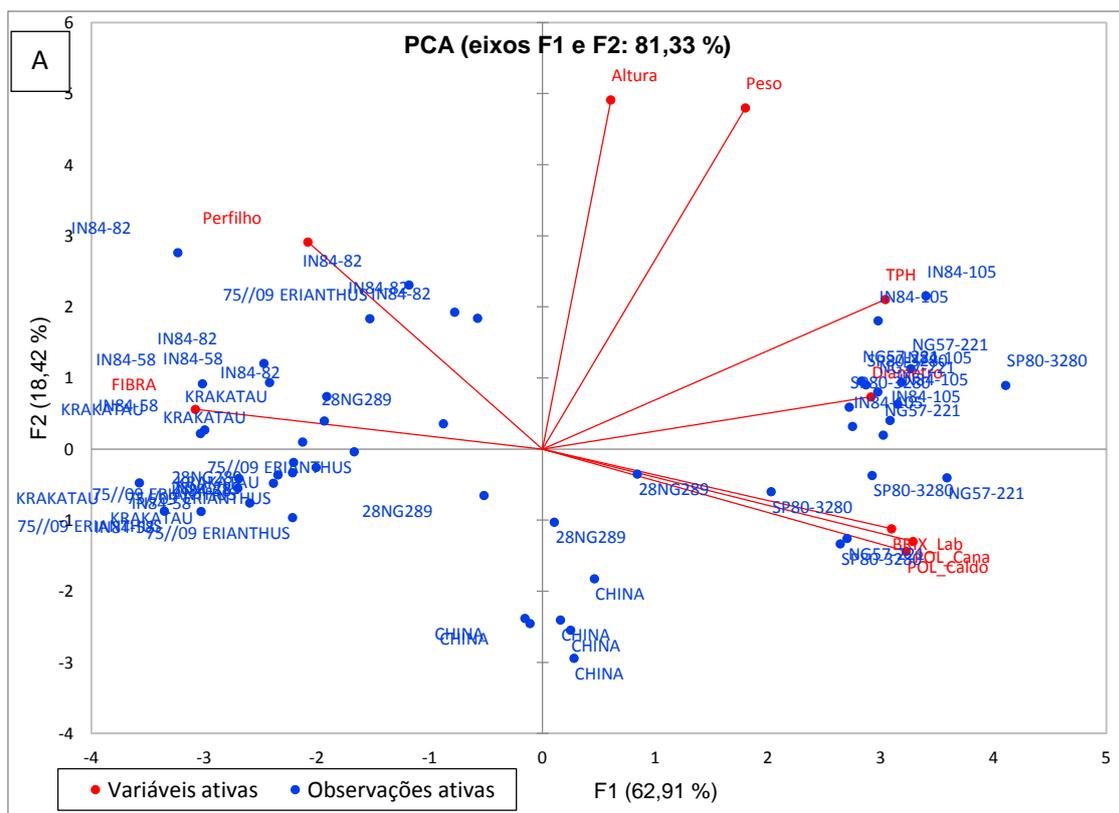
Os valores em negrito são diferentes de 0 com um nível de significância  $\alpha=0,05$

Tabela 3: Teste ANOVA entre dados agrônômicos dos grupos HS e HF. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p<0,05$ .

	HS/HF						
	Diâmetro	Altura	BRIX	POL_Caldo	POL_Cana	FIBRA	Peso
R <sup>2</sup>	0,605	0,009	0,879	0,908	0,913	0,912	0,167
F	10,735	0,062	50,998	69,109	73,446	72,222	1,405
Pr > F	<b>0,014</b>	0,810	<b>0,000</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,275

A análise dos acessos e dados agrônômicos por componente principal (PCA), corrobora a formação de dois grupos, explicado pela distinção dos acessos da espécie *S. officinarum*, ancestrais e híbridas, dos acessos mais fibrosos, com menores concentrações de sacarose e ancestrais de canas-energia. 81,33% da variabilidade dos dados agrônômicos está presente nos dois primeiros componentes principais (F1 e F2). No primeiro quartil, o percentual de fibra e número de perfilhos agregam os acessos *S. spontaneum* e *Erianthus sp.* Já, toneladas por hectare (TPH) e diâmetro de colmo se correlacionam com acessos *S. officinarum* selecionados para a produção de açúcares no segundo quartil. As medições de açúcares também distinguem acessos *S. officinarum*, principalmente o genótipo SP80-3280. Este e o acesso 28NG289 (*S. robustum*) estão distribuídos pelo terceiro quartil. CHINA (*S. sinense*) é menor e menos pesada que as demais plantas e têm quantidades equivalentes de açúcares e fibra, um perfil parecido com acessos *S. robustum*, o que distribui esses genótipos entre o terceiro e quarto quartis. A análise de Clustering Hierárquico Aglomerativo (CHA), construída a partir das coordenadas obtidas no PCA corrobora a formação de dois

grupos, alocando genótipos de CHINA e 28NG289 em HS e HF, respectivamente, ainda que estes acessos apresentem características do grupo oposto (Figura 6B e Figura suplementar 2). Definimos assim dois grupos distintos de plantas com partição de carbono contrastante: HS, composto por genótipos com maior acúmulo de açúcares, diâmetro de colmo e TPH; e HF, com maior capacidade de produção de fibras e perfilhamento, características de crescimento vegetativo (Figura 6).



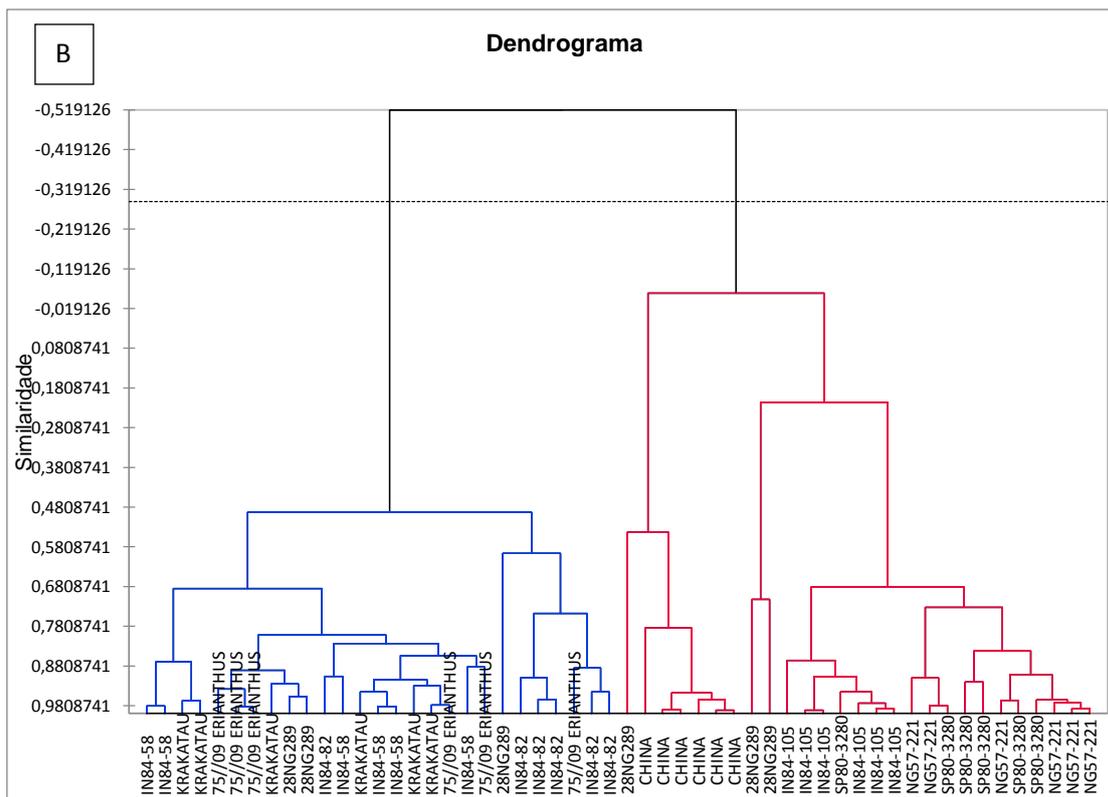


Figura 6 HS e HF, grupos com partição de carbono contrastante. A) Dois primeiros componentes principais representados no biplot, componente 1(F1): 62,91% e componente 2(F2): 18,42% da variabilidade de dados. altura (m), diâmetro (mm), número de perfilho, teor de sacarose (Pol%Caldo e Pol%Cana), teor de sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix) e teor de fibra (%) e Peso.

#### 4.1 Amido

##### *Metabolismo de amido em folha*

Apesar de diferentes órgãos das plantas produzirem amido, utilizamos apenas as folhas, pois nos permite observar um ritmo de síntese e degradação deste polissacarídeo de reserva em um período de 24h. (SMITH; ZEEMAN, 2006). A curva padrão de consumo de glicose e as quantificações de amido foram feitas em colaboração com a Dra. Marina C. M. Martins Soldi, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) (Figura suplementar 3). Devido à alta variação de dados entre replicadas, utilizamos o Welch ANOVA em detrimento de ANOVA convencional para análise dos dados (Tabela 11). Não foi

possível quantificar amido no ZT7, meio do dia em KRAKATAU e IN84-58, e NG57221 devido à perda das amostras. Apesar disso, com exceção do acesso NG57221, os acessos apresentam mais amido no começo da noite (ZT12), que no começo da manhã (ZT3). O IN84-58 e NG57221 apresentaram mais amido em ZT27 que em ZT12, provavelmente explicado pelo alto erro verificado em ZT12, uma vez que geralmente não ocorre produção de amido durante a noite.

A mesma dinâmica diária de metabolizar amido foi encontrado na maioria dos acessos, produzindo amido durante a fase luminosa, através de açúcares foto assimilados (ZT3-ZT12), e utilizando a reserva energética para manter o metabolismo durante a noite (ZT12-ZT27), com diferenças de amplitude. Os acessos e, 28NG289 (*S. robustum*) e CHINA (*S. sinense*) têm perfil parecido, não variando significativamente a quantidade de amido entre os horários, entretanto com mais amido no começo da noite (ZT12).

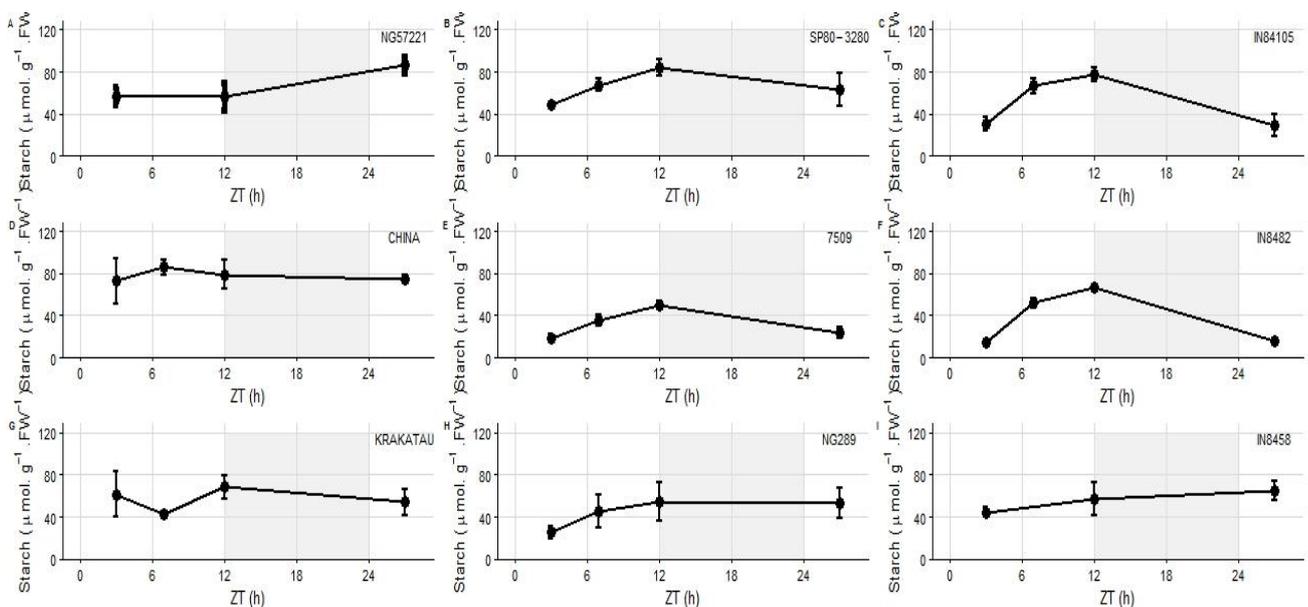


Figura 7 Perfil de metabolismo de amido. Quantificação de amido em nove acessos de cana-de-açúcar. Amostras de folha+1 coletadas em campo no começo da manhã, ZT3, meio do dia ZT7, começo da noite, ZT12 e início do dia seguinte, ZT27.

#### *HS e HF apresentam metabolismo rítmico de amido em folha*

O grupo de acessos HS possui mais amido que HF, no meio do dia, fim da fase luminosa e começo da manhã seguinte (Figura 19). A diferença entre ZT12 e ZT27 é

estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Ao observarmos cada horário, vemos que entre ZT7 e ZT12 não há diferença estatística, porém, há mais amido no ZT12 que o começo de ambos os dias coletados (ZT3 e ZT27), em ambos os grupos.

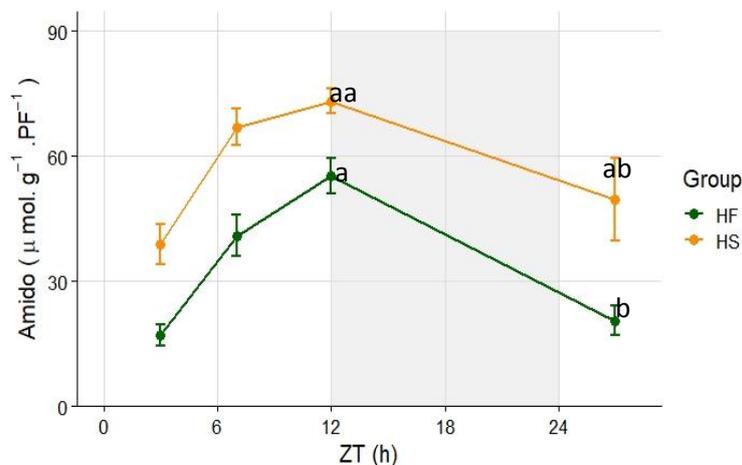


Figura 8 : Perfil de metabolismo de amido dos grupos HS e HF. A área sem preenchimento corresponde ao período luminoso e com preenchimento é relativa à noite. As letras, a, aa, b, bb correspondem a diferenças estatísticas entre ZTs e grupos,  $P < 0,05$ .

Baseado na alta amplitude de produção e consumo de amido, quatro acessos apresentaram um perfil rítmico perceptível de metabolismo de amido. Dois acessos híbridos de *S. officinarum*, o acesso *Erianthus* sp. e um *S. spontaneum*, apresentam mudanças significativas na quantidade de amido entre os pontos coletados, Welch ANOVA,  $p < 0,05$ , (Figura 20). Em HS, o acesso SP80-3280 apresenta variação significativa entre os quatro horários de coleta (Figura 20A). IN84-105 (*S. officinarum*) é outro acesso rítmico, as medições do começo da manhã, nos dois dias (ZT3 e ZT27), diferem do ZT7 e ZT12, já a medição entre esses dois horários não é significativamente diferente (Figura 19C). Em HF, encontramos dois acessos com perfil rítmico de amido. IN84-82 (*S. spontaneum*) e 75q/09 (*Erianthus* sp), têm significativamente mais amido no começo da noite (ZT 12) que as medições do Z 3 e ZT27, porém a medição do meio do dia não difere entre os demais ZTs. (Figura 20). As altas amplitudes de metabolismo de amido encontradas em poucos acessos de cada grupo podem sugerir regulação pelo relógio biológico não acontece com a mesma intensidade entre acessos do complexo Saccharum, principalmente os ancestrais. Ainda assim, as altas variações

mencionadas nos impedem de inferir que as variedades que não apresentam perfil rítmico, realmente não sejam otimizadas.

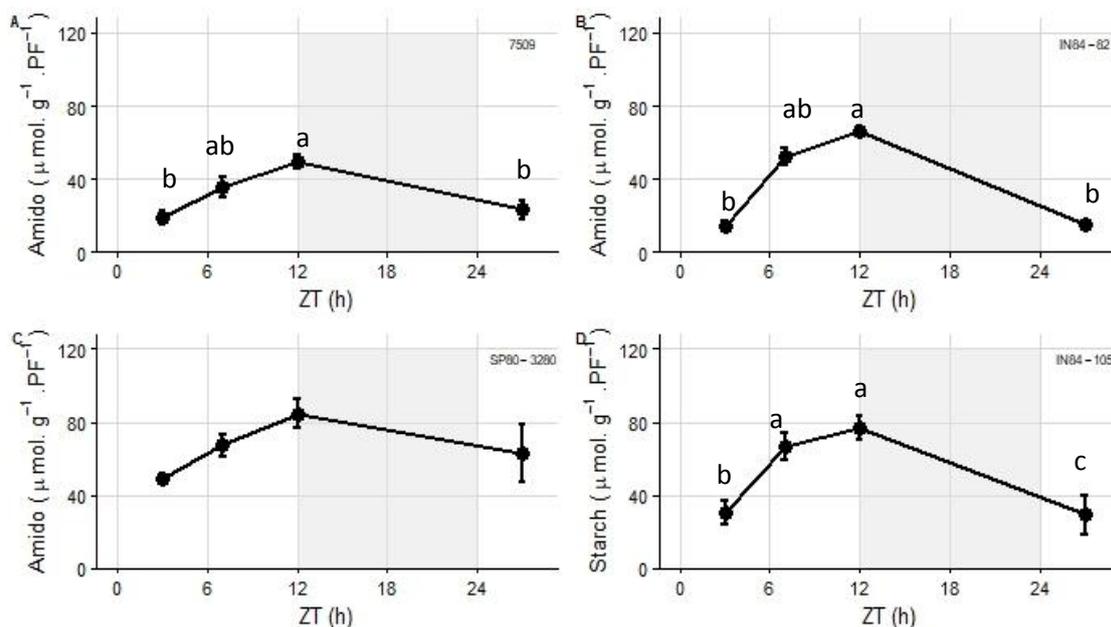


Figura 9 Acessos com perfis rítmicos de metabolismo de amido. A) Perfil de SP80-3280, *S.officinarum* híbrida. B) Perfil de IN84-82, *S. spontaneum*. C) Perfil de IN84-105, *S.officinarum*. D) Perfil de 75//09, *Erianthus* sp. Em todos os gráficos a área sem preenchimento corresponde ao período luminoso e com preenchimento é relativa à noite. As letras corresponde a diferença estatística, ZTs com letras diferentes diferem significativamente, teste-t pareado,  $P < 0,05$ ; método de ajuste: BH.

#### 4.2 Relógios biológicos no complexo Saccharum.

*O loop central do relógio biológico tem o mesmo padrão de transcrição no complexo Saccharum, mas em diferentes amplitudes.*

*ScLHY* e *ScTOC1*, compõem a alça central do relógio biológico vegetal e foram identificados em cana-de-açúcar pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores, nos acessos *S. officinarum* comercial RB855453 e SP80-3280. (HOTTA; JR; SOUZA, 2013, DANTAS et al., 2020). Todos os acessos apresentam o mesmo perfil de transcrição: mais transcritos de *ScLHY* no começo do dia (ZT3) do que no começo da noite (ZT12), e mais transcritos de *ScTOC1*, em ZT12 do que em ZT3, com diferenças de amplitudes. (Figura 10). Não encontramos diferença de expressão destes genes entre os grupos, HS e HF. (Tabela 4).

Tabela 4: Diferença de transcritos dos componentes de relógio biológico entre os grupos de acessos HS e HF. Teste ANOVA para componentes de relógio biológico entre grupos selecionados com base em suas partições de carbono preferenciais, HS e HF, Estatística de Welch utilizado como teste robusto de

	HS/ HF									
	ZT 3					ZT 12				
	PRR59	PRR73	PRR95	LHY	TOC1	PRR59	PRR73	PRR95	LHY	TOC1
R <sup>2</sup>	0,220	0,134	0,026	0,250	0,098	0,349	0,330	0,232	0,017	0,131
F	1,970	1,086	0,186	2,331	0,758	3,760	3,449	2,109	0,123	1,059
Pr > F	0,203	0,332	0,679	0,171	0,413	0,094	0,106	0,190	0,736	0,338

igualdade de média,  $p < 0,05$ .

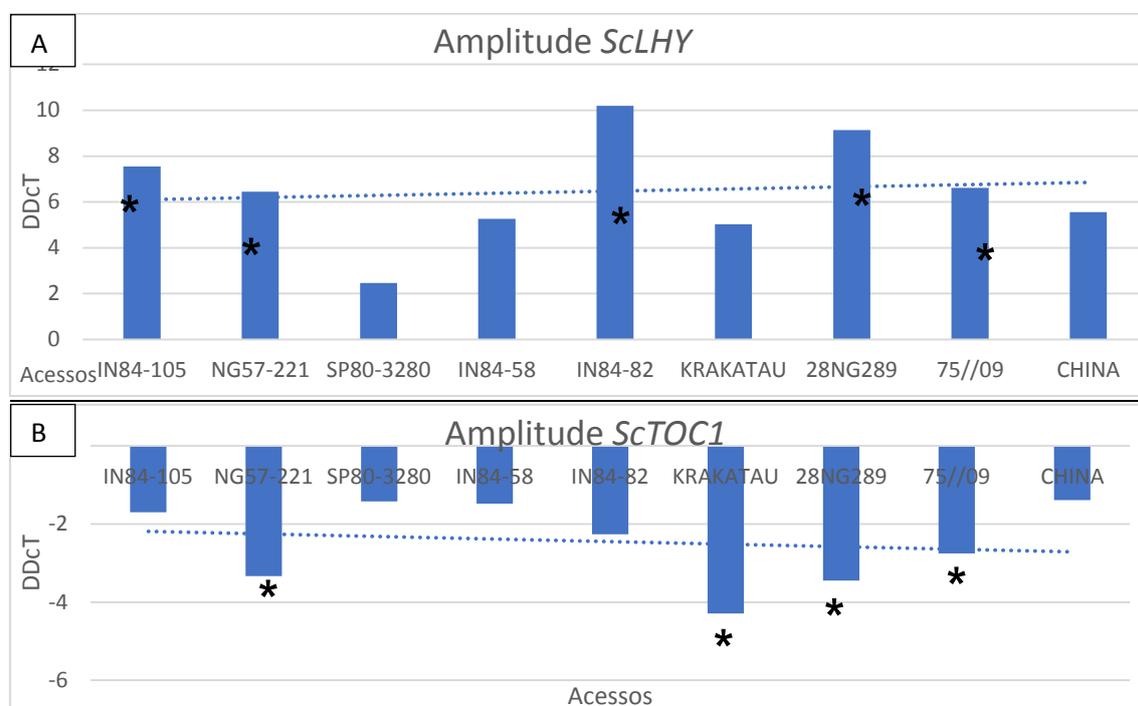


Figura 10: A transcrição dos ponteiros centrais, SclHY e ScTOC1, entre horários, não diferem como a partição de carbono dos acessos. A) Diferença entre Zts de Transcrição do gene matutino LHY entre os acessos. B) Diferença entre Zts de Transcrição do gene noturno, ScTOC1 entre os acessos. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta.  $p < 0,05$ .

Com o objetivo de agrupar os acessos de acordo apenas com a transcrição relativa da alça central do relógio, fizemos uma análise de componente principal com dados de ambos os horários. Há baixa variabilidade de transcrição destes ponteiros principais, com 98,07% presentes nos dois primeiros componentes principais. NG57221 e IN84-58 estão associados aos níveis de expressão do gene SclHY no ZT3, enquanto CHINA,

IN58-105, KRAKATAU, IN84-82 e 28NG289 estão relacionados aos níveis de expressão de *ScTOC1* no ZT 12. (Figura 11)

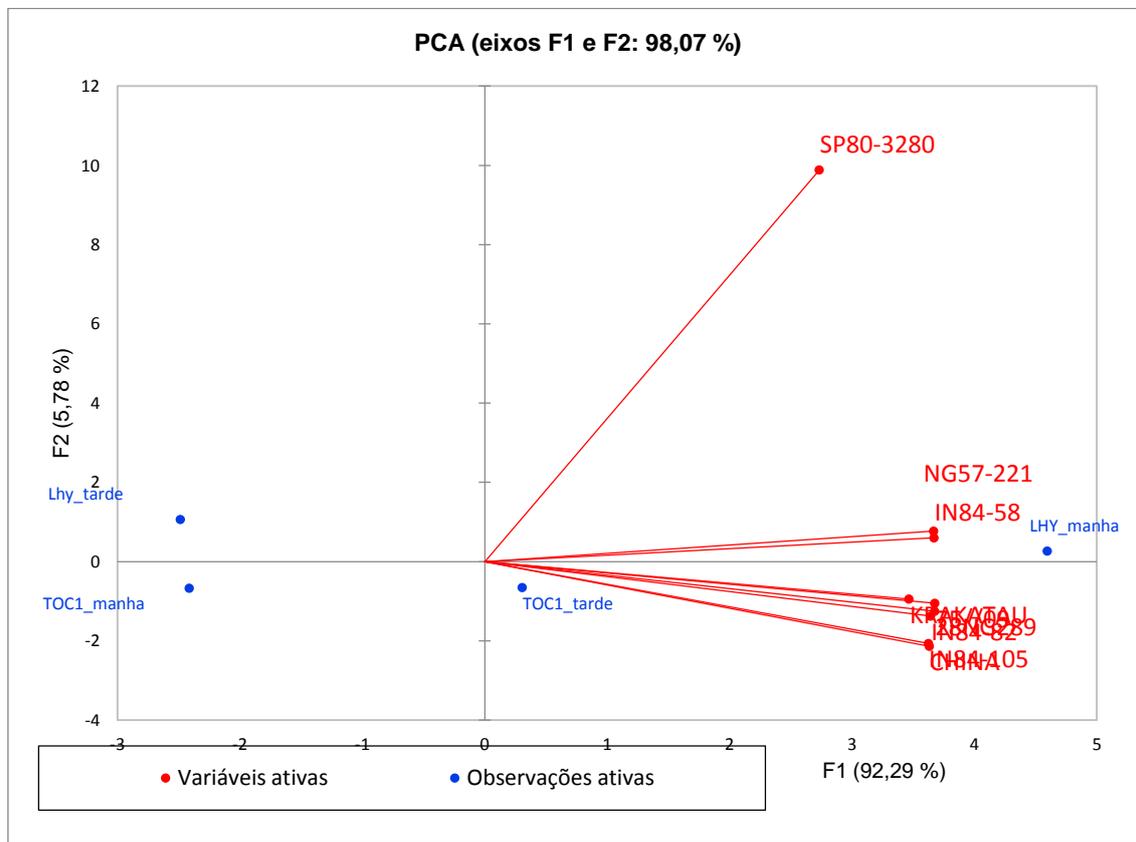


Figura 11: Distribuição dos acessos pela transcrição de *ScLHY* e *ScTOC1*. Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):92,29% e componente 2(F2): 5,78% da variabilidade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, KRAKATAU, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: LHY\_manhã (ZT3), LHY\_tarde (ZT12), TOC1\_manhã (ZT3), TOC1\_tarde (ZT12). (Figura suplementar 6)

#### Perfil de transcrição dos genes *ScPRR59*, *ScPRR73*, *ScPRR95*

Entre os genes diurnos *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)*, o *ScPRR59* é o menos transcrito. Na maioria dos acessos, o gene *ScPRR59* é mais transcrito no ZT12 que no ZT3. Porém, nos acessos IN84-105 (*S. officinarum* híbrido), e IN84-82 (*S. spontaneum*), este gene é mais transcrito no começo da manhã (ZT3). No acesso ancestral da espécie *S. officinarum*, NG57-221, há mais transcritos de *ScPRR95* no fim do período luminoso (ZT 12) que no ZT3. IN84-82, IN84-105, SP80-3280 e 28NG289,

têm mais transcrito de *ScPRR73* no começo da manhã, enquanto os demais acessos tem mais transcritos deste gene no ZT12. (Figura 12)

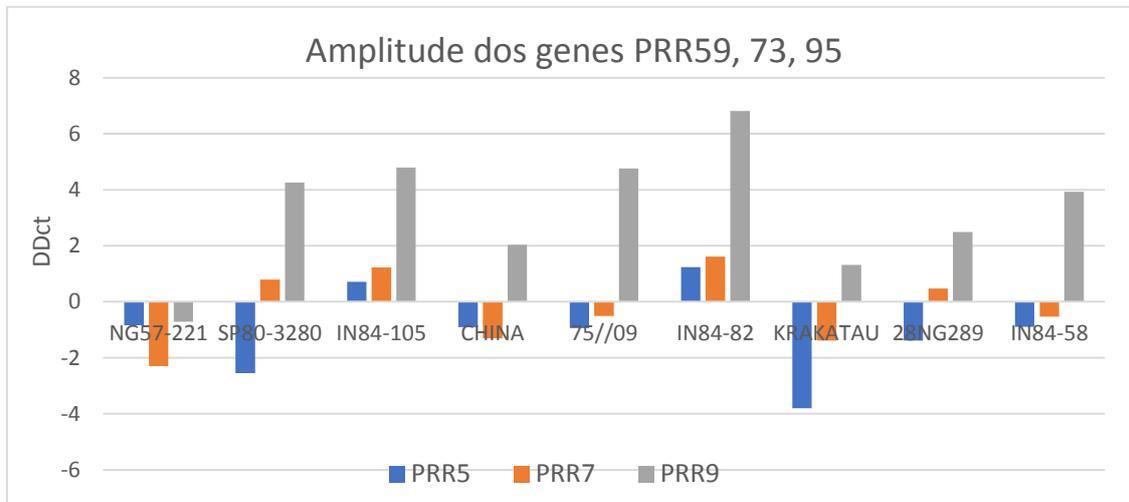


Figura 12: Transcrição entre horários dos genes Pseudo Responsive Regulators 59, 73, e 95. Diferença de transcritos medidos no ZT03 e ZT12. Em azul, transcritos de PRR59. Em laranja, transcritos de PRR73. Em cinza transcritos de PRR59.

Utilizando os dados de transcrição dos três genes PRRs obtidos em ambos os ZTs, CHINA (*S.sinense*) se correlaciona com SP80-3280 (*S. officinarum* híbrido) e Krakatau (*S. spontaneum*) ( $R^2 = 0,943$ ) e, de forma mais forte, com IN84-58 (*S. spontaneum*) e 75/09 (*Erianthus* sp.) ( $R^2=1,00$ ). IN84-82, (*S. spontaneum*), se correlaciona com as variedades IN84-105 e SP80-3280 (*S. officinarum* híbridas). A maior transcrição dos três genes PRRs no ZT12, fez com que NG57221 não se correlacione com nenhum outro acesso presente, sendo o único com esse perfil. 28NG289 tem o mesmo perfil de SP80-3280, com apenas *ScPRR59* mais transcrito no ZT 12. Assim, há uma correlação positiva não significativa deste *S.officinarum* com *S. robustum*. (Figura 13A).

Também aplicamos análise de componente principal nos dados de transcrição relativa aos *ScPRR59*, 73 e 95 de ambos os ZTs que resultou em 95,6% da variabilidade dos dados representados apenas com os dois primeiros componentes principais (Figura 13). No segundo quartil, NG57-221, KRAKATAU e CHINA, estão mais associados à transcrição do gene *ScPRR73* no ZT 12, enquanto *ScPRR73* do ZT3 se associa com os acessos IN84-82, IN84-105, 28NG289 e SP80-3280. IN84-58 e 75//09 têm alta

amplitude de ScPRR95, porém em relação aos outros genótipos, a transcrição não difere o suficiente dos demais PRRs, ficando retidos próximos a origem do eixo (Figura 13B). As diferenças entre transcrição de componentes do relógio biológico podem refletir adaptações específicas, que podem ou não estar relacionadas a fenótipos de interesse comercial, ainda que não tenhamos encontrado componentes do relógio diferencialmente expressos entre os grupos previamente selecionados, HS e HF.

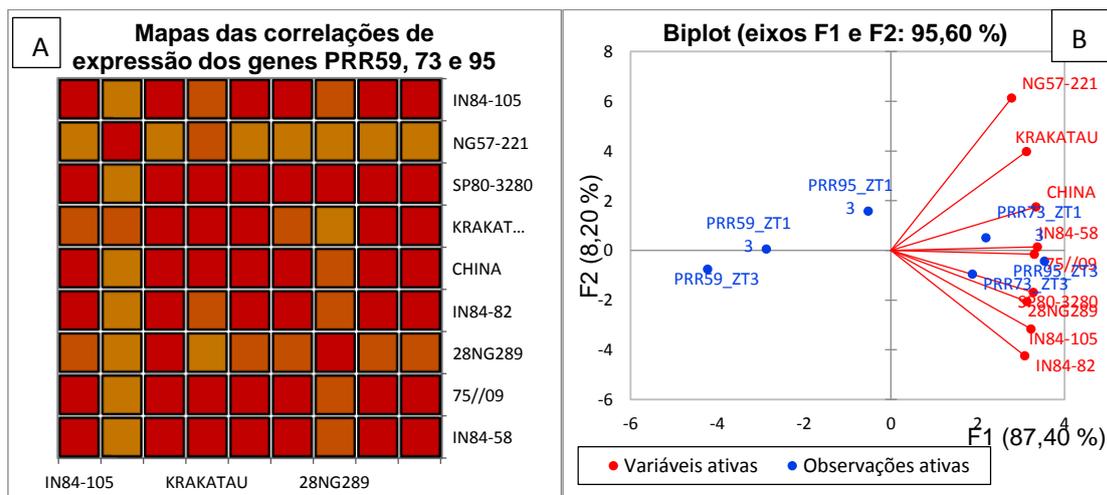


Figura 123: Distinção entre os acessos em transcrição dos genes PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRR) 95, 73 e 59. A) Heatmap de correlações de spearman entre acessos. Significância  $p < 0,05$  nos pontos mais escuros (vermelho); os pontos mais claros (laranjas e amarelos) não são significativos,  $p > 0,05$ . B) B) Dispersão entre os acessos e nível de transcrição dos genes PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRR) 95, 73 e 59 nos ZT3 e ZT12. Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1): 87,4% e componente 2 (F2): 8,2% da variabilidade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, KRAKATAU, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR599\_ZT3, PRR599\_ZT12, PRR733\_ZT3, PRR733\_ZT12, PRR955\_ZT3, PRR955\_ZT12. (Figura suplementar 7)

*A transcrição gênica de componentes do relógio biológico divide os acessos em dois grupos distintos.*

A correlação entre os acessos de acordo com os dados de transcrição de todos os genes do relógio revelou dois grupos distintos. O primeiro grupo contém apenas genótipos ancestrais representantes de HF, formado por *Erianthus sp*, dois *S. spontaneum* e o *S. robustum* (75//09, IN84-82, IN84-58, 28NG289, respectivamente). Deste grupo, 28NG289 e IN84-82 se correlacionam também com IN84-105, que foi selecionado para o grupo HS, ( $p < 0,05$ ). O segundo grupo contém KRAKATAU, CHINA,

IN84-105 e SP80-3280 e NG57221 (respectivamente, *S. spontaneum*, *S. sinense* e *S. officinarum* híbridos), ou seja, todos os acessos selecionados para HS, e um acesso de HF, KRAKATAU. CHINA se correlaciona com KRAKATAU e 28NG289. NG57221 se correlaciona apenas com o acesso KRAKATAU,  $R^2=0,830$ , ( $p<0,05$ ) (Figura 15A). No PCA, vemos que esse segundo grupo está associado pela transcrição dos genes *ScPRR73* e *95* principalmente no ZT12, enquanto o outro grupo está mais correlacionado com os níveis de transcrição de *ScLHY* (Figura 15B). 28NG289 e IN84-82 têm a maior amplitude desse gene (Figura 10). Além de mais correlacionados à transcrição dos PRRs, o grupo separado pelo PCA, possui *ScPRR59*, *73* e *95* mais transcritos no ZT 12 em relação ao outro grupo (Tabela 5). Ainda assim, os grupos não diferem pelos níveis de transcritos do gene *ScLHY*. Os grupos destacados pela transcrição do relógio biológico contrastam também em partição de carbono e acúmulo de amido. O grupo PRR possui mais açúcares no caldo, além de mais amido nos ZT3 e ZT12 ( $p<0,05$ ), enquanto o grupo LHY possui maior percentual de fibras que o outro grupo (Tabela 6).

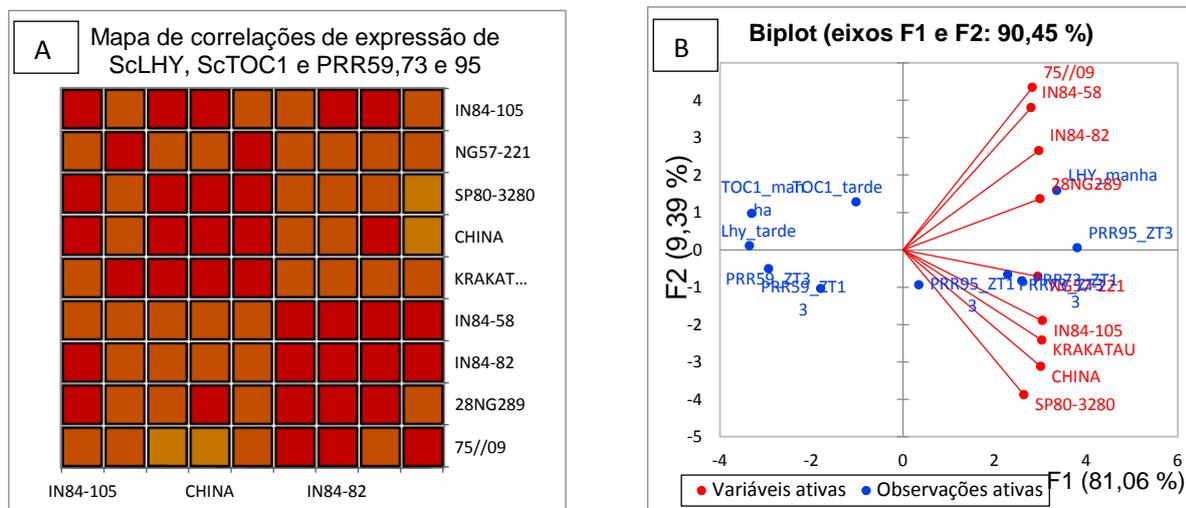


Figura 13: Distinção de dois grupos com base na Transcrição de genes componentes do relógio biológico. A) Heatmap de correlações de Spearman entre acessos. Significância  $p<0,05$  nos pontos mais escuros (vermelho); os pontos mais claros (laranjas e amarelos) não são significativos,  $p>0,05$ . B) Dispersão entre os acessos e Transcrição dos genes *PRR5*, *7*, *9*, *ScLHY* e *ScTOC1*, nos ZT3 e ZT12, dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):81,06% e componente 2(F2): 9,39% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde. (Figura suplementar 8).

Tabela 5: Teste ANOVA de transcrição dos componentes de relógio biológico entre grupos separados pelo PCA de transcrição de componentes do relógio biológico. Intervalo de confiança 95. Estatística de Welc utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ .

	Dados agrônômicos								Medições de Amido			
	Perfilho	Diâmetro	Altura	BRIX_Lab	POL_Caldo	POL_Cana	FIBRA	Peso	ZT 3	ZT 7	ZT 12	ZT27
R <sup>2</sup>	0,359	0,370	0,037	0,397	0,467	0,487	0,600	0,071	0,545	0,404	0,487	0,233
F	3,917	4,104	0,266	4,601	6,128	6,657	10,511	0,537	8,376	4,754	6,637	2,128
Pr > F	0,088	0,082	0,622	0,069	<b>0,042</b>	<b>0,036</b>	<b>0,014</b>	0,487	<b>0,023</b>	0,066	<b>0,037</b>	0,188

Tabela 6: Teste ANOVA de dados agrônômicos entre grupos separados pelo PCA de transcrição de componentes do relógio biológico. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ .

	PCA - PRR/LHY									
	ZT 3					ZT 12				
	PRR5	PRR7	PRR9	LHY	TOC1	PRR5	PRR7	PRR9	LHY	TOC1
R <sup>2</sup>	0,051	0,107	0,021	0,422	0,266	0,612	0,517	0,496	0,003	0,237
F	0,379	0,838	0,150	5,112	2,570	11,049	7,503	6,880	0,020	2,174
Pr > F	0,558	0,390	0,710	<b>0,058</b>	0,153	<b>0,013</b>	<b>0,029</b>	<b>0,034</b>	0,892	0,184

Considerando os resultados obtidos, sugerimos a existência de relógios biológicos cujas redes de organizam de forma diferente nestes acessos do complexo Saccharum: alguns acessos marcados pela maior expressão dos genes *PRR59*, *73*, *95* no *ZT12* e outro grupo com alta amplitude de transcritos do gene *SclLHY*. Estes grupos, que nomeamos respectivamente, grupo PRR e grupo LHY, também apresentam distintas partições de carbono (Tabela 6): o grupo PRR é composto por KRAKATAU, CHINA, IN84-105, NG57-221 e SP80-3280 e tem maior concentração de açúcares e amido nos ZT 3 e 12. O grupo LHY tem os acessos 28NG289, IN84-82, IN84-58 e 75/09, e possui alto percentual de fibras, significativamente mais que o grupo PRR.

#### 4.3 Relações entre subunidades do complexo TOR e relógio biológico

*Expressão das subunidades do complexo TOR acontecem em ambos os ZTs*

Buscando correlacionar a expressão dos componentes do relógio biológico com o metabolismo energético das diferentes variedades, quantificamos a transcrição de genes que codificam as subunidades do complexo enzimático TARGET OF RAMPAMYCIN (TOR), que tem atividade favorecida pelo alto nível energético celular, incluindo dois genes correspondentes às PROTEÍNAS REGULATÓRIAS ASSOCIADAS A TOR (REGULATORY-ASSOCIATED PROTEIN OF mTOR, RAPTOR): RAPTOR1 e RAPTOR2, com um par de primer específico para amplificação de cada gene, um alelo de *LETHAL WITH SEC THIRTEEN (LST8-1)* com um par de primers para amplificação desse gene, e dois primers para amplificar o gene *TOR*: *TORa* e *TORb*, bem como escolhemos proteínas alvo deste complexo. (Tabela 7)

Tabela 7: Componentes do complexo enzimático TOR kinase, KIN10 e alvos da via de sinalização.

Nome	SAS	No. copias	Contig.
RAPTOR 1	SCQSAM1031D05.g	7	_0008203,_ 0037266
RAPTOR 2	SCQSST1036A08.g	5	0327980
LST8	SCJLLR1033F02.g	6	__0064976
TOR	SCMCLR1032E03.g	4	x
KIN10	SCJFRZ2032G01.g	2	_0283874z
TAP46	SCACLR1036C04.g	3	0213041
S6k1.1	SCACLR2022A05.g	7	0240879
S6k1.2	SCMCLR1053D03.g	5	0257101

Encontramos genótipos com transcrição de todas as subunidades ocorrendo mais forte em ZT3, outros em ZT12, e acessos com co-expressão das subunidades, isto é, ocorrendo de forma mais acentuada no mesmo horário do dia. (Figura 16). Dois acessos *S. spontaneum* têm alta diferença de transcrição das subunidades do complexo TOR: KRAKATAU tem todas as subunidades do complexo TOR mais transcritas no ZT12, enquanto IN84-82, no ZT3. (Tabela 8). Outros acessos têm maior transcrição de todas as subunidades no ZT12 (Grupo Noite): *S. officinarum*: SP80-3280 e NG57-221, enquanto os acessos IN84-105 (*S. officinarum*) e 28NG289 (*S. robustum*) têm maior transcrição de todas as subunidades no ZT3 (Grupo Manhã). CHINA, IN84-58 e 75//09 compõe o grupo de variedades cujas subunidades do complexo TOR não são co-expressas. CHINA (*S. sinense*) tem apenas *RAPTOR2* mais transcrito no ZT3, em fase alternada à das outras subunidades. 75//09, *Erianthus sp*, tem a subunidade *LST8*

e um dos primers de TOR, mais transcritos no ZT12, com as demais subunidades mais transcritas no ZT3. IN84-58 (*S. spontaneum*) tem a mesma origem de outros membros do Grupo Manhã, IN84-82 e IN84-105, porém apresenta *RAPTOR2* e *TORb* mais transcritos no ZT12, com demais subunidades no ZT3. (Figura 16)

Tabela 8: Teste ANOVA de expressão dos genes das subunidades do complexo TOR entre ZT3 e ZT12. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ .

	IN84-105	IN84-82	28NG289	SP80-3280	NG57-221	KRAKATAU	IN84-58	75//09	CHINA
R <sup>2</sup>	0,083	<b>0,645</b>	0,186	0,158	0,163	<b>0,518</b>	0,033	0,004	0,004
F	0,724	<b>14,538</b>	1,825	1,503	1,562	<b>8,608</b>	0,273	0,030	0,030
Pr > F	0,419	<b>0,005</b>	0,214	0,255	0,247	<b>0,019</b>	0,615	0,866	0,868

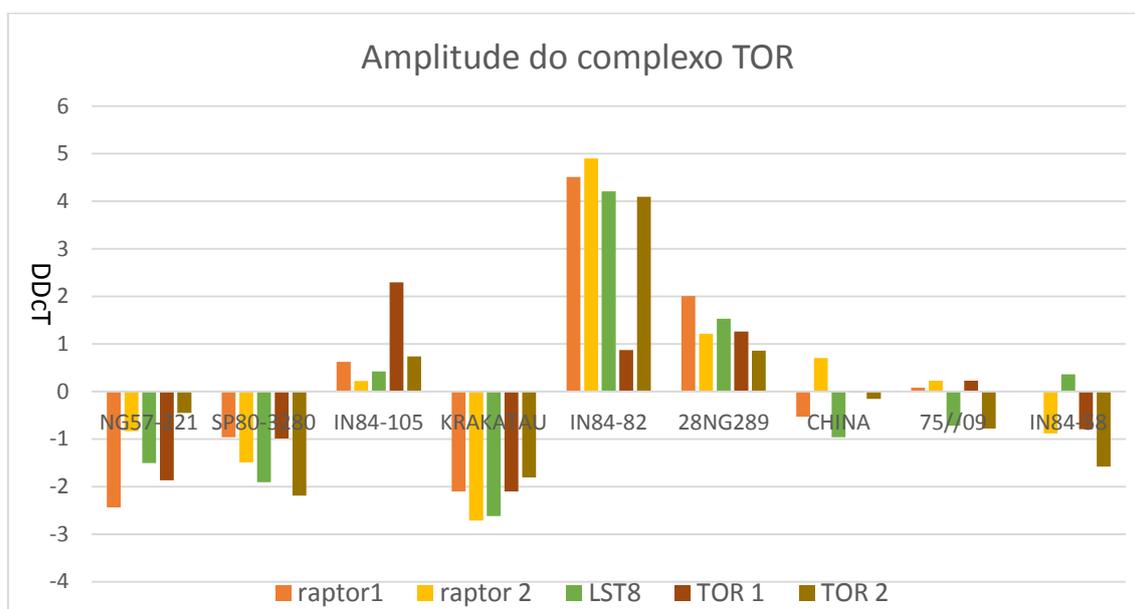


Figura 14: Diferença de transcrição das subunidades do complexo TOR entre horários. Amplitude de transcritos das subunidades de TOR entre horários de coleta.

Em apenas dois componentes principais, 89,16% da variabilidade de expressão das subunidades de TOR podem ser atribuídos, enquanto obtemos 90,99% plotando a variabilidade entre acessos com a mesma quantidade de componentes. (Figura 17). No segundo quartil da Figura 17A, IN84-82, 28NG289 e IN84-105 que tem complexo TOR mais transcrito no começo da manhã, estão associados principalmente à transcrição de *TOR* e *LST8* do ZT3. Estes mesmos genes, transcritos no ZT12, estão associados aos acessos, SP80-3280, NG57221, KRAKATAU e IN84-58, dois *S. officinarum* e dois *S.*

*spontaneum*, respectivamente. CHINA e 75/09 ficam retidos na origem, devido à alternância dos horários de maior transcrição das subunidades (Figura 17). Genótipos de HS com os maiores teores de açúcares, NG57221 e SP80-3280, têm transcrição de todo complexo TOR mais alta em ZT12. Ainda assim, KRAKATAU é o acesso com maior transcrição sincronizada, de todo complexo TOR, no fim do período luminoso (Tabela 8 e Figura 17A). A transcrição das subunidades de TOR, formando dois agrupamentos distintos no PCA, ressalta a correlação temporal entre as subunidades.

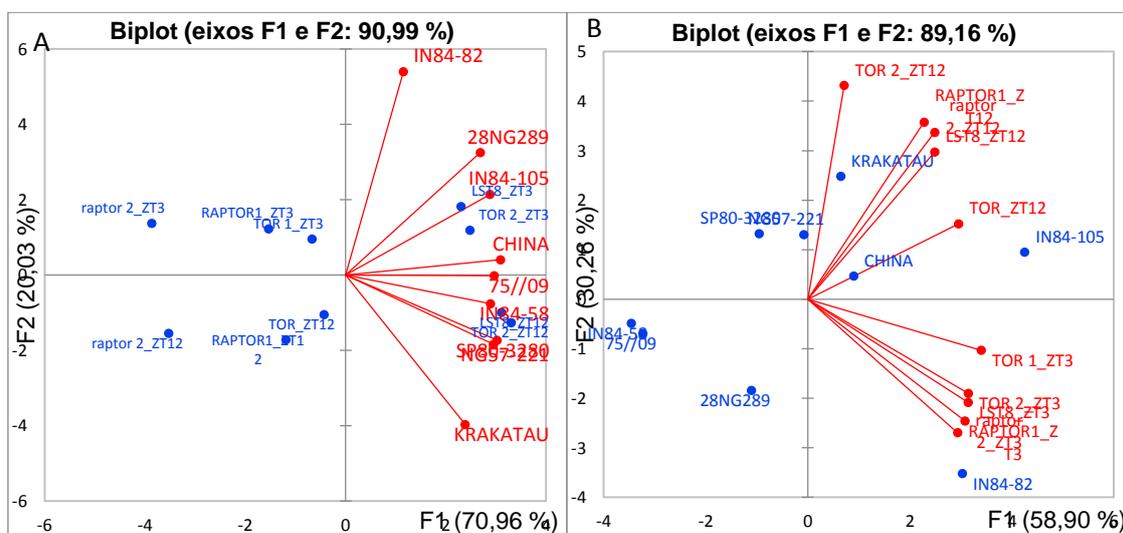


Figura 15: Distribuição dos acessos em transcrição do complexo TOR. A) Dispersão dos acessos. Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):70,96% e componente 2(F2):20,03% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TOR $\alpha$ \_ZT3, TOR $\alpha$ \_ZT12, TOR $\beta$ \_ZT3, TOR $\beta$ \_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12. B) Dispersão da transcrição das subunidades do complexo TOR no ZT3 e ZT12. Dois componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1): 58,98% e componente 2 (F2): 30,28% da variabilidade de dados, significância 5%. Variáveis ativas: RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TOR $\alpha$ \_ZT3, TOR $\alpha$ \_ZT12, TOR $\beta$ \_ZT3, TOR $\beta$ \_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12. Observações ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. (Figura suplementar 9)

A amplitude de expressão do complexo TOR se correlaciona com altura

A variedade IN84-105 destoa dentro do Grupo Manhã em transcritos da subunidade TOR, com mais transcritos de TOR $\alpha$  no ZT3 com provável perfil rítmico de transcrição desta subunidade, (fold-change, 4,9x). Além disso, IN84-105 tem a menor amplitude das demais subunidades, ou seja, sem provável característica de expressão

rítmica (Figura 16). Variedades com diferença de expressão entre os pontos coletados maior que 1.5Ct, NG57221, SP80-3280, KRAKATAU, IN84-82 e 28NG289, são mais altas que as variedades com baixa amplitude de expressão de mais de uma subunidade do complexo TOR, CHINA, 75//09, IN84-58 e IN84-105,  $p < 0,05$ , (Figura18). Sendo assim, encontramos correlação entre alta amplitude de expressão das subunidades de TOR, que sugere perfil de expressão regulado pelo relógio biológico, com maior altura das plantas.

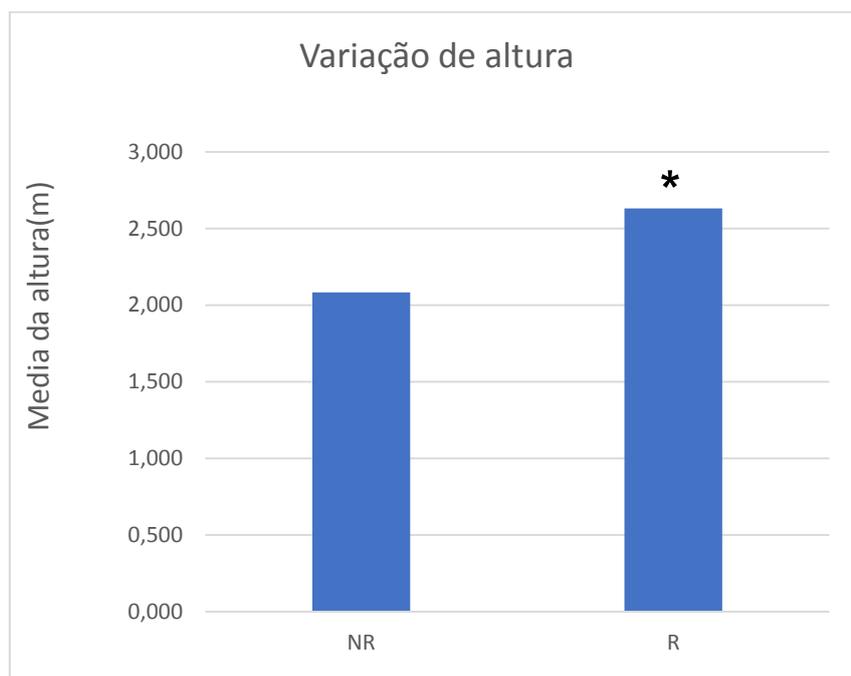


Figura 16: Variedades com expressão rítmica das diferentes subunidades do complexo TOR são mais altas. NR: variedades sem provável perfil rítmico, R: Provável perfil de transcrição rítmica(>2x) das subunidades do complexo TOR. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$

### *Subunidades de sensores energéticos diferencialmente expressas em grupos de partição de carbono contrastante*

A transcrição de LST8 é diferencialmente regulada em cana-de-açúcar, além de ser mais expressa em HS no ZT12, os mesmos acessos com alta amplitude de mais de uma subunidade do complexo TOR têm LST8 com alta amplitude, assim, também são mais altos que plantas com baixa amplitude desta subunidade. (Figura 19). Ainda assim, não encontramos diferença em outros dados agronômicos u quantidade de

amido entre acessos com diferença de horário de expressão desta subunidade. Neste contexto, LST8 parece estar relacionada a coexpressão das demais subunidades do complexo TOR, bem como a adaptações sobre o complexo necessárias para o acúmulo de açúcar no complexo *Saccharum*.

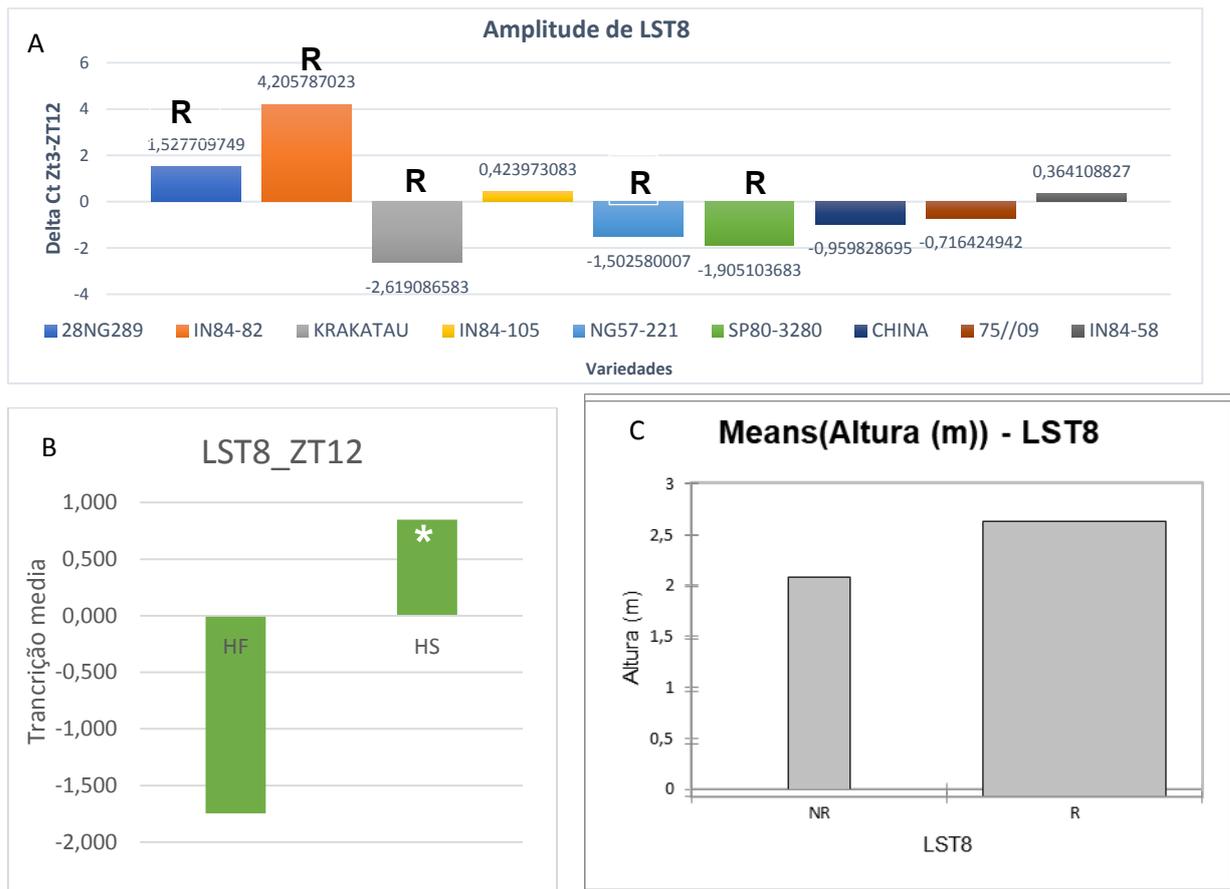


Figura 17: A transcrição da subunidade LST8 é relacionado ao acúmulo de açúcar e tem amplitude de expressão relacionada à altura dos acessos. A) Diferença de transcritos da subunidade LST8 entre acessos do complexo *Saccharum*. B) LST8 é mais expresso em variedades do grupo HS. C) Diferença de altura média entre os grupos de acessos divididos pela amplitude de LST8. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ .

Plantas do grupo PRR de relógio biológico, também apresentam mais transcritos das subunidades do complexo TOR no fim do período luminoso, ZT12, com exceção de TORa (Tabela 9). Estes resultados apontam para associações no mesmo momento do dia entre maior transcrição das subunidades do complexo TOR e genes

PRR, componentes de entrada do relógio biológico, em plantas que acumulam mais açúcar e produzem menos fibras.

*Tabela 9: Diferença da transcrição das subunidades do complexo TOR entre os grupos PRR e LHY. Teste ANOVA entre grupos separados pelo PCA de transcrição de componentes do relógio biológico, dados em negrito diferem significativamente entre os grupos. Intervalo de confiança 95%. Estatística de Welch*

PCA – GrupoPRR/GrupoLHY										
	ZT 3					ZT 12				
	RAPTOR1	Raptor 2	LST8	TORa	TORB	RAPTOR1	RAPTOR2	LST8	TORa	TORB
R <sup>2</sup>	0,017	0,001	0,010	0,040	0,002	0,768	0,652	0,849	0,378	0,585
F	0,123	0,005	0,071	0,289	0,011	23,175	13,127	39,221	4,248	9,856
Pr > F	0,737	0,948	0,798	0,608	0,921	<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	<b>0,000</b>	0,078	<b>0,016</b>

*utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ .*

A expressão da subunidade de SnRK1 não difere entre ZTs e nos grupos HS e HF. (Tabela 10). A subunidade ScKIN10 é mais expressa no grupo PRR, assim como os genes *PRR59*, *ScPRR95*, *PRR79*, e maioria das subunidades do complexo TOR (Figura 20).

*Tabela 10: A transcrição de ScKIN10 não difere entre horários e grupos de partição de carbono. Teste ANOVA entre manhã e tarde e entre grupos HS e HF. Dados em negrito diferem significativamente entre os grupos, significância 5%, estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ .*

	HS/HF	
	ZT 3	ZT 12
R <sup>2</sup>	0,000	0,265
F	0,001	2,527
Pr > F	0,980	0,156

	Manhã/tarde	
	ZT3	ZT12
R <sup>2</sup>	0,078	0,384
F	0,596	4,365
Pr > F	0,465	0,075

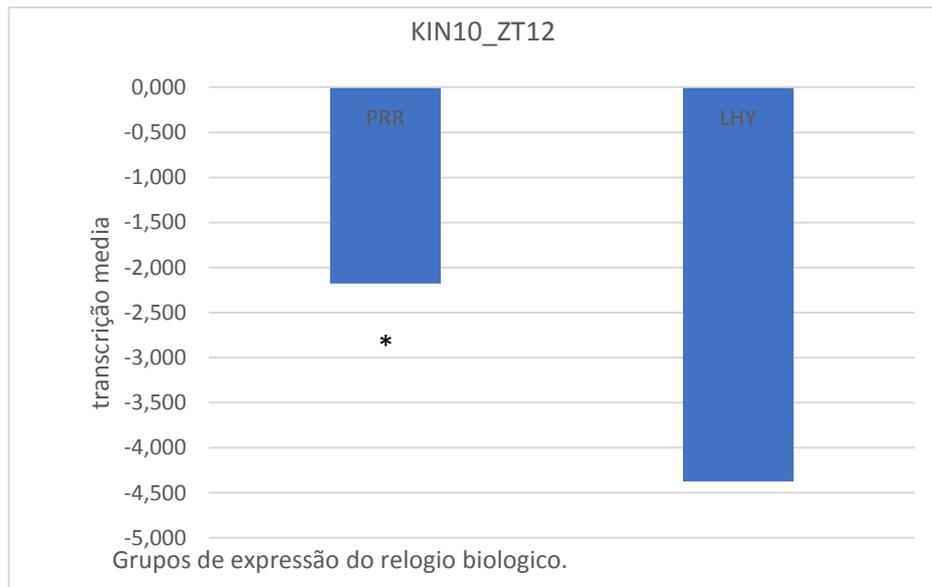


Figura 18: *Nível de Transcrição de KIN10 no começo da noite maior em PRR que LHY. Asteriscos (\*) correspondem aos acessos diferença significativa de transcritos entre os horários de coleta. Estatística de Welch utilizado como teste robusto de igualdade de média,  $p < 0,05$ .*

*Expressão de genes do relógio biológico e das proteínas alvos de TOR, em horários diferentes, destacam as variedades matinais IN84-82, IN84-105 e 28NG289*

As subunidades do complexo TOR, *LST8* e *TORb*, bem como os componentes de relógio biológico, *ScPRR73* e *ScPRR95*, dividem os acessos pelo horário de expressão. Maior expressão desses genes no ZT3, junto de maior expressão de *ScLHY*, associa IN84-82, IN84-105, 28NG289. Enquanto SP80-3280, 75/09, NG57221, IN84-58 e KRAKATAU tem maior expressão de *ScPRR73*, *ScPRR95*, *TORb* e *LST8* no ZT12, junto de maior expressão de *ScTOC1*. (Figura 21)

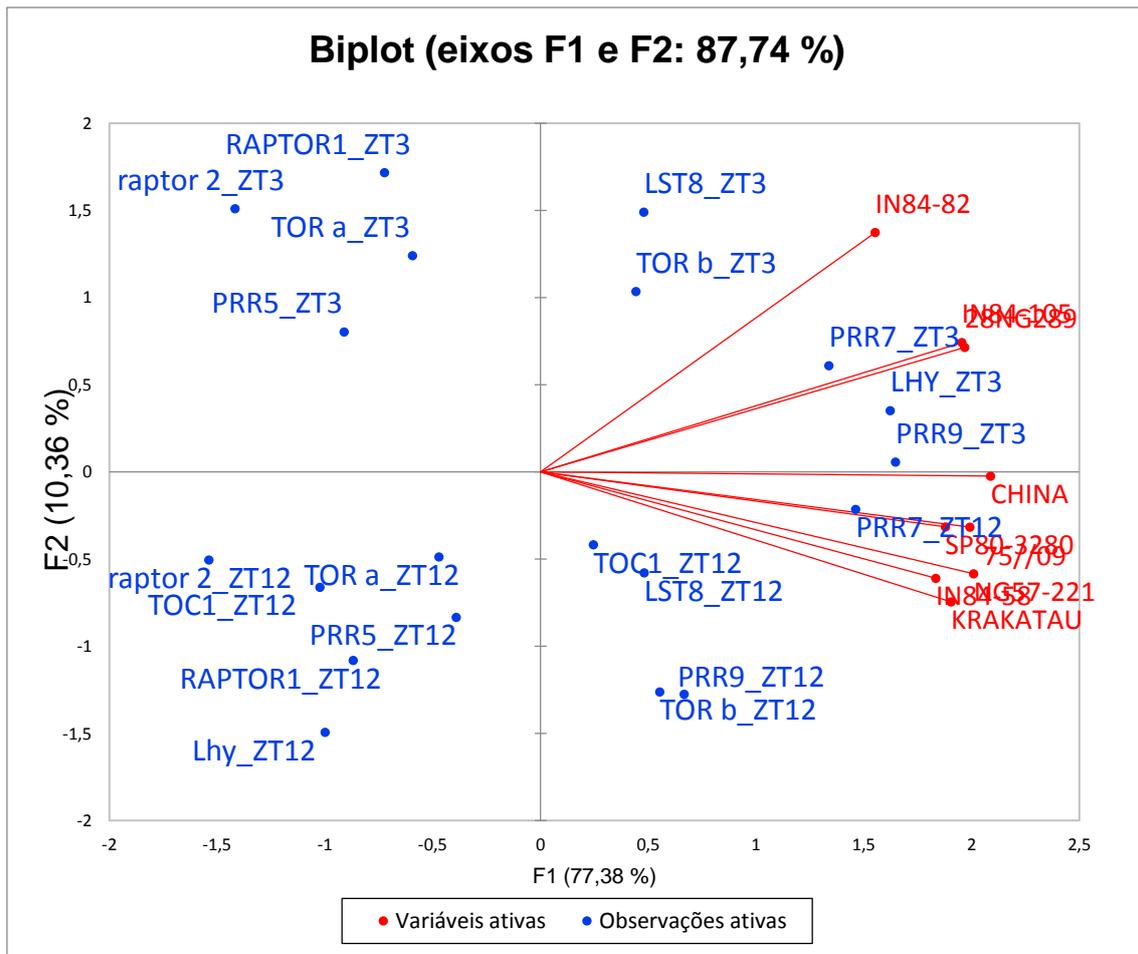


Figura 19: Dispersão dos acessos com dados de transcrição gênica do relógio biológico e sensores energéticos. Dois primeiros componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):77,38% e componente 2(F2):10,36% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_ZT3, LHY\_ZT12, TOC1\_ZT3 e TOC1\_ZT12, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORa\_ZT3, TORa\_ZT12, TORb\_ZT3, TORb\_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12.

Adicionando a expressão dos efetores de TOR, *TAP46*, *S6k1.1* e *S6k1.2*, em ambos os ZTs, a sincronização de subunidades de TOR e a amplitude de expressão dos componentes de relógio biológico se destacam, enquanto genes de proteínas alvos do complexo TOR se associam a expressão no ZT12. No segundo quartil do PCA abaixo, IN84-82, 28NG289 e IN84-105 estão dispostos em ordem decrescente de amplitudes de expressão de LHY (Figura 10). Esses genótipos têm expressão matinal do complexo TOR e no caso de IN84-82 e IN84-105, também expressão matinal dos genes *PRR59*, *73* e *95*. (Figura 15 e Figura 16). Os acessos presentes no terceiro quartil, mais próximos a origem de PC1, são os mesmos que apresentaram alternância de expressão das

subunidades do complexo TOR, CHINA e IN84-58, próximas a SP80-3280 e dos demais acessos que apresentaram complexo noturno. (Figura 22). NG57221 e KRAKATAU, são genótipos de expressão do complexo noturno (ZT12) e apresentam altas amplitudes, principalmente de transcritos dos PRR73 e 95, KIN10 e do complexo TOR. Apesar de pertencer aos grupos HF e LHY, o acesso ancestral de *Erianthus* sp, 75//09, aparece como o mais associado a expressão dos genes analisados no ZT12, principalmente em relação aos alvos de TOR, TAP46 e S6K1.2 no terceiro quartil. (Figura 22) A presença de IN84-58, KRAKATAU e 75//09 juntos a acessos que acumulam mais açúcares, bem como os genes S6k1.2 e TAP46, efetores de TOR, em ambos os ZTs associados a expressão de LST8 e TORb no ZT12, são evidências que sustentam a expressão desses genes no ZT12, diferente do que acontece com o fenômeno de maior transcrição no ZT3, onde há mais componentes de relógio biológico.

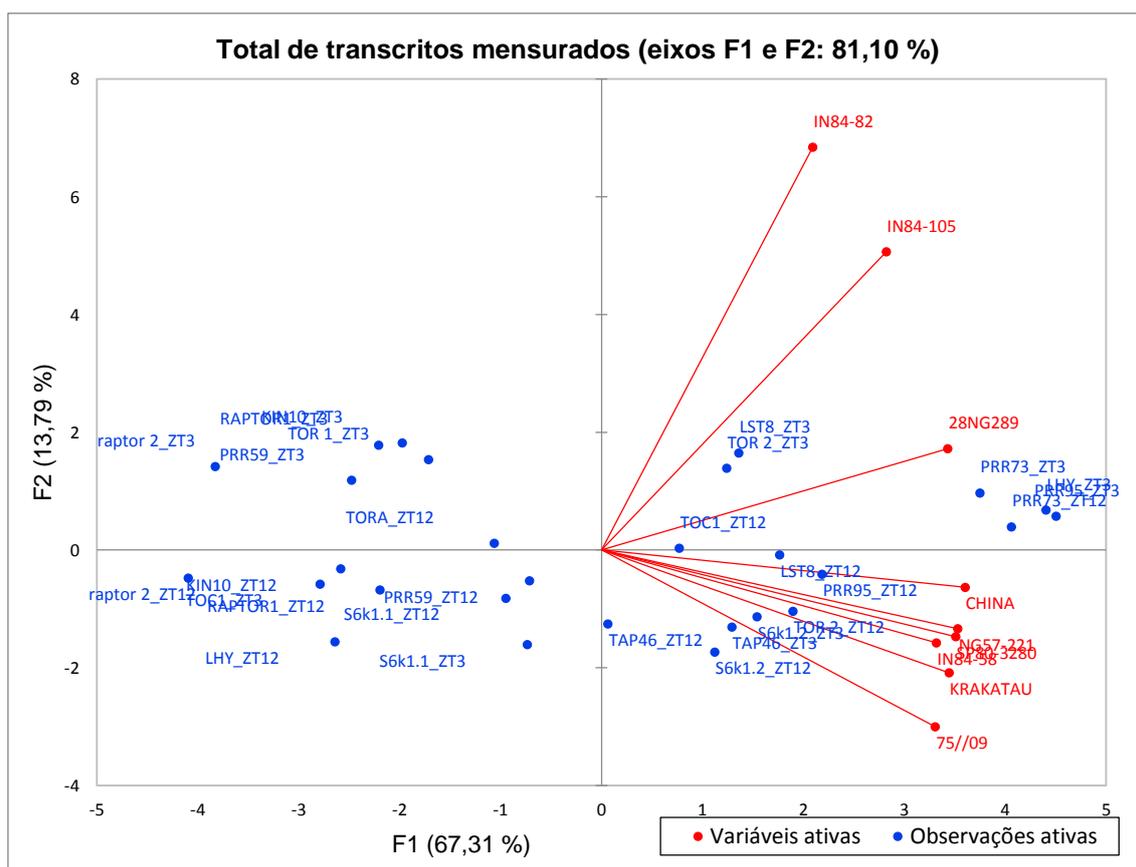


Figura 20: Dispersão dos acessos com dados de transcrição gênica do relógio biológico e sensores energéticos. Dois primeiros componentes principais estão representados no biplot, componente 1(F1):67,3% e componente 2(F2):13,8% da variedade de dados. Variáveis ativas: SP80-3280, NG57-221, IN58-58, Krakatau, 75//09, 28NG289, IN84-82, IN84-105, CHINA. Observações ativas: PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORa\_ZT3, TORa\_ZT12,

*TORB\_ZT3, TORB\_ZT3, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12, TAP46\_ZT3, TAP46\_ZT12, S6k1.1\_ZT3, S6k1.1\_ZT12, S6k1.2\_ZT3, S6k1.2\_ZT12. (Figura suplementar 10)*

#### 4.4 Correlações entre transcrição de componentes do relógio biológico, sensores energéticos e dados agronômicos

##### *Correlações entre nove variedades do complexo Saccharum*

Analisando os acessos em conjunto, há correlação positiva de LST8, RAPTOR1 e 2, TORa e TORb, entre si, mas se correlacionam de forma diferente com os genes do relógio biológico, KIN10 e de proteínas alvo deste complexo. PRR95 no ZT3 se correlaciona com os transcritos de TORa em ambos os ZTs, KIN10 e PRR73, transcritos que são correlacionados entre si. PRR73 não se correlaciona com TORb, RAPTOR2, TAP46 ou S6K1.1 mas possui significativa correlação positiva com RAPTOR1, TORa, LST8, PRR5 e S6K1.2.

Uma maior quantidade de amido no começo da manhã se correlaciona com a quantidade de transcritos de PRR59 no ZT12. PRR59, S6K1.1, RAPTOR2 e LST8 são transcritos com correlação positiva no ZT3. Em outras palavras, RAPTOR 1 e 2, TORb e LST8, se correlacionam com transcritos de PRR59 e S6K1.1, enquanto RAPTOR 1 e 2, TORa e LST8 se correlacionam com os transcritos de PRR73, 95 e KIN10, além de TAP46. S6K1.2, que codifica a proteína alvo do complexo TOR, tem correlação positiva com todos os genes, menos com o componente de relógio PRR95. A quantidade de transcritos de PRR73 no ZT3 também se correlaciona com maior quantidade mensurada de amido no ZT12 e transcritos de LST8 no começo da noite, ZT12. Maior quantidade de amido no ZT12 também se relaciona com maior quantidade de LST8 e PRR59, transcritos no ZT12.

No começo da noite, as relações que apareceram no ZT3 ficam mais específicas. Por exemplo, não há correlação entre TORa e TORb, produtos desenhados para o mesmo gene, TOR. Dentro do complexo TOR, os transcritos de TORa se correlaciona apenas com RAPTOR1, enquanto há correlação positiva entre de TORb, RAPTOR1 e 2 e LST8. Entre os demais genes, TORa se correlaciona com transcritos de KIN10 e PRR95, enquanto TORb, apenas com transcritos de PRR59, que por sua vez, não tem

correlação com TORa ou PRR95. Este componente do relógio biológico se correlaciona também com RAPTOR1 e 2 e LST8 do complexo TOR e KIN10. PRR73 não se correlaciona com nenhum dos transcritos para o gene TOR, apesar disso, tem correlação positiva com os demais PRRs, RAPTOR1 e 2, LST8 e KIN10. PRR95 e PRR73 se correlacionam com RAPTOR1 e KIN10, porém PRR95 se correlaciona também a transcritos de TORa, todas correlações positivas. Sendo assim, no ZT12, TORb, RAPTOR1 e 2 e LST8 se correlacionam com PRR59, PRR73 e KIN10. Além disso, ter maior quantidade de amido neste horário se correlaciona com maior quantidade de transcritos de PRR59 e LST8. Já os transcritos de TORa, RAPTOR1 e PRR95, mantêm correlações com KIN10 e PRR73.

Apesar de não haver correlações de transcritos dos alvos do complexo TOR com os sensores energéticos ou relógio biológico no começo da noite, ZT12, S6k1.2 se correlaciona com a expressão de TOC1. O produto da proteína S6K1, S6K1.1 no ZT12, tem correlação negativa com o número de perfilhos e positiva com indicadores de acúmulo de açúcar (Pol\_caldo, Pol\_cana, °BRIX) e amido no meio do dia, ZT7. A quantidade de transcrição da subunidade LST8 no ZT12 se correlaciona negativamente com o percentual de fibra dos acessos (Figura 23).

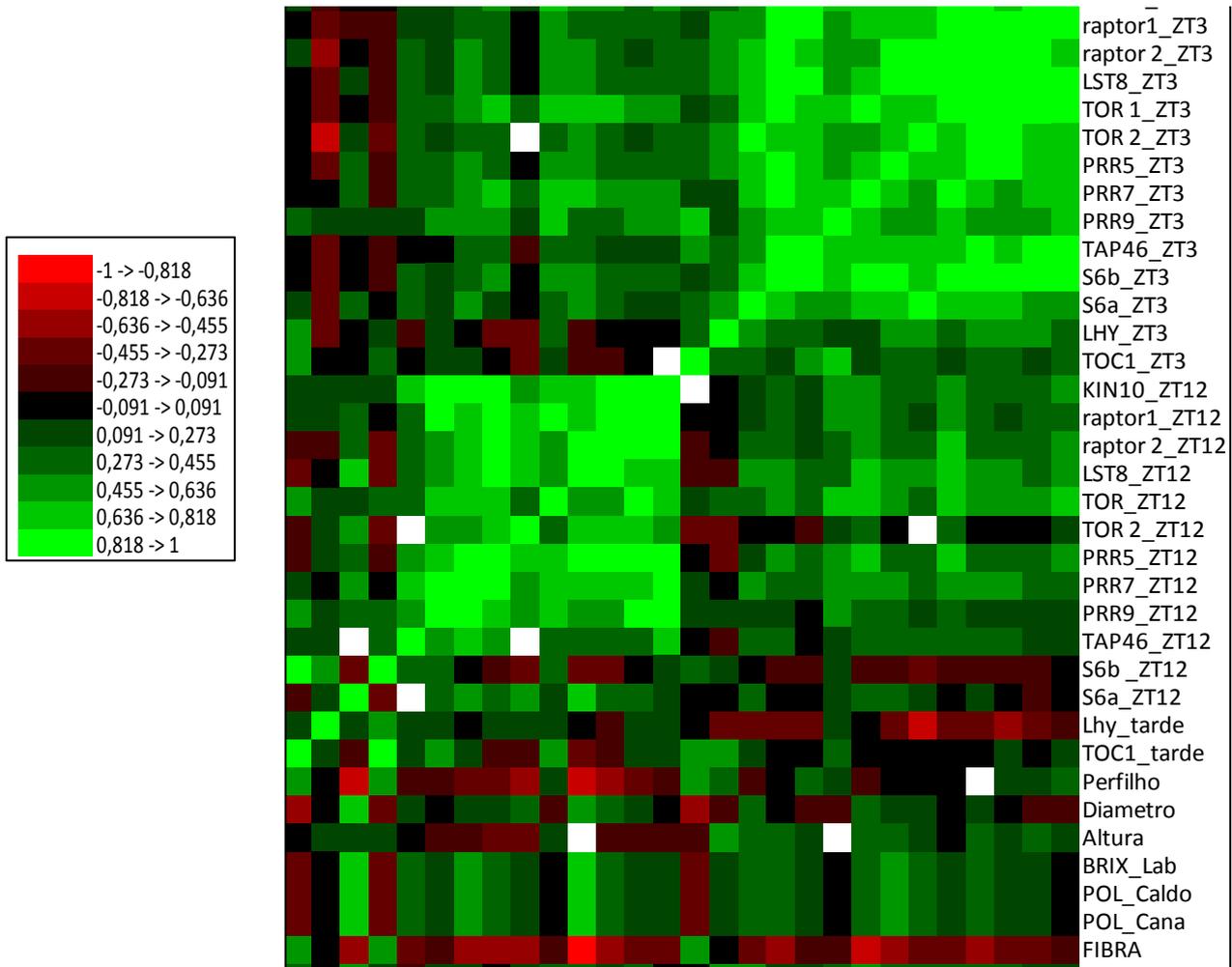


Figura 21: Correlação da transcrição dos genes analisados com dados agrônômicos de todos os acessos juntos. Total de correlações entre dados de transcrição genica mensurados, dados agrônômicos e de concentração de amido de todos os acessos analisados. Spearman. Significância 5%,  $p < 0,05$ .

### Correlações em grupos com partição de carbono distinta

Foram investigadas também as similaridades propostas pelos agrupamentos obtidos até aqui, tanto o previamente selecionado, HS e HF, como o dividido em transcrição de componentes do relógio biológico, PRR e LHY. No entanto, os grupos HS e LHY, não apresentaram correlações significativas (Figura suplementar).

Em HF, a altura é um caractere agrônômico correlacionado positivamente com a expressão de LHY no começo da manhã, ZT3, porém, genótipos maiores tendem a ter menos transcritos de TORb no fim do período luminoso, ZT12. A quantidade de transcritos de TORb no ZT12 também é inverso a expressão de SclHY no ZT3. Ainda no

começo da manhã, transcritos das subunidades do complexo TOR, ScRAPTOR1 e ScLST8 são correlacionados positivamente entre si e com S6k1.2, proteína alvo do complexo TOR, também transcrito no ZT3. Ainda assim, transcritos de S6k1.1 no ZT3, se correlacionam negativamente com o conteúdo de amido no amanhecer do segundo dia de coleta ZT27, também começo da manhã ( $R^2 > 0,75$ ,  $p < 0,05$ .) (Figura 22). No ZT3, a transcrição de ScKIN10 é positiva com o PRR73 enquanto a do gene PRR59 é positiva com TAP46, proteína alvo de TOR. Já no ZT12, há correlação positiva entre transcrição de KIN10 e PRR59, enquanto PRR73 se correlaciona com subunidades do complexo TOR, RAPTOR1 e TORa. De fato, no fim do período luminoso, quanto maior a transcrição dos genes correlacionados ScRAPTOR1, ScTOR e ScPRR73, mais amido mensurado neste horário, no ZT12 ( $R^2 > 0,75$ ,  $p < 0,05$ ). Neste grupo também há correlação positiva entre transcritos de S6k1.2 e TOC1, sendo que ambos se correlacionam com maior transcrição de PRR9 no ZT3 (Figura 24).

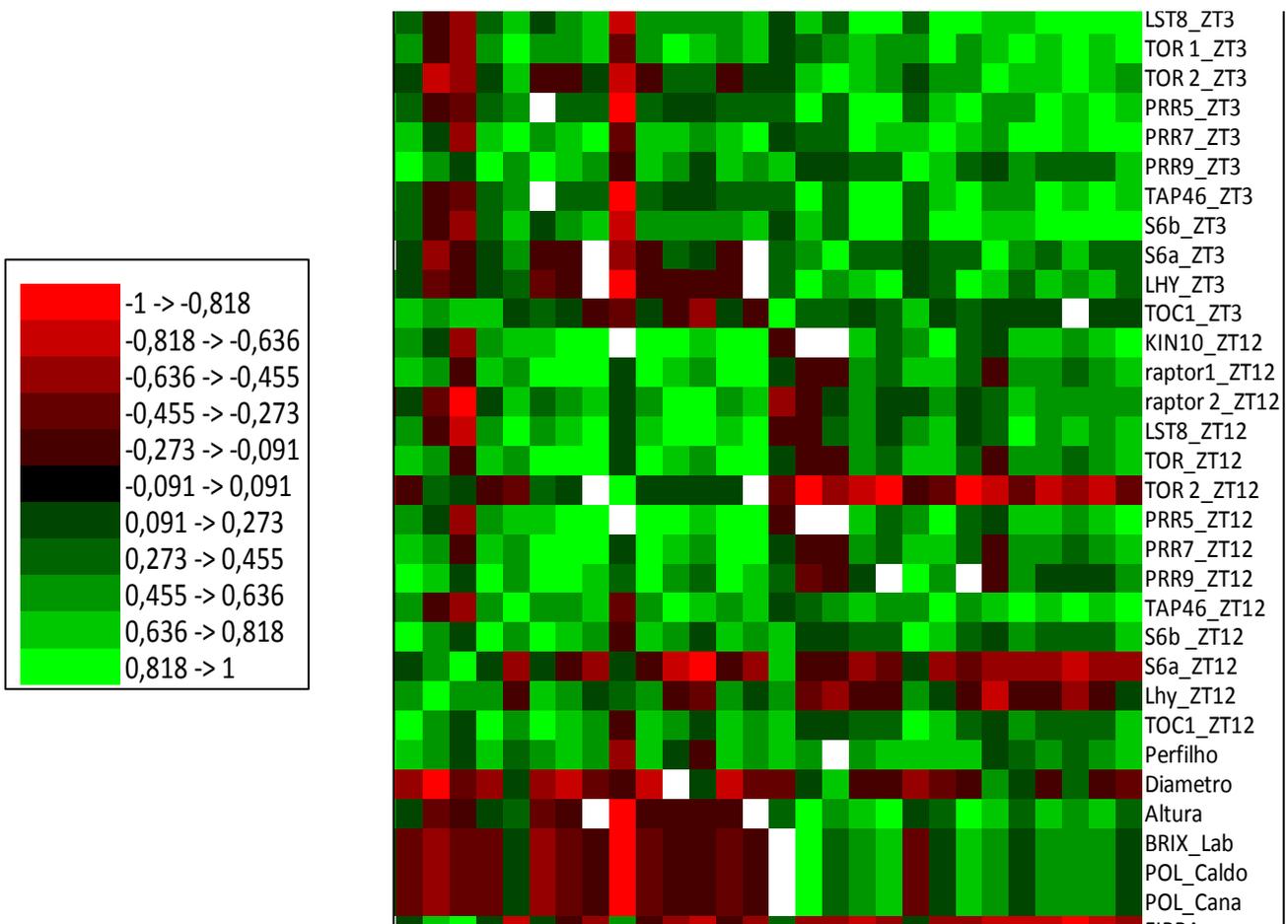
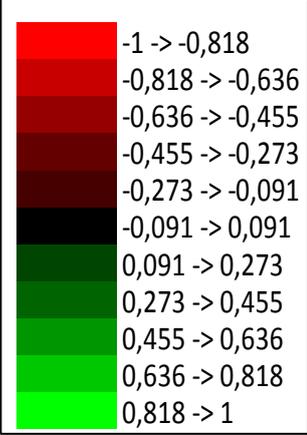
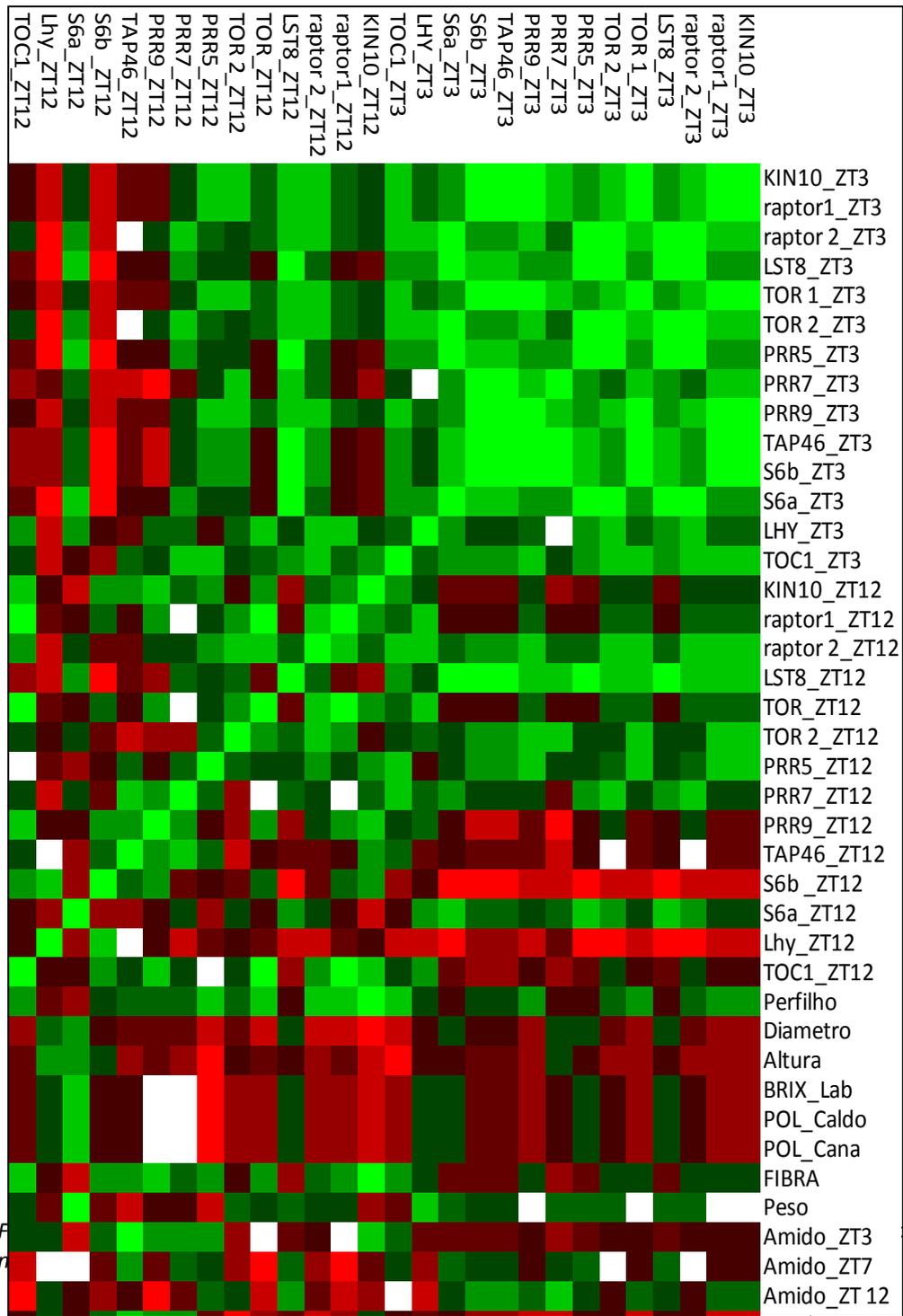


Figura 22: Correlações entre plantas do grupo HF. Total de correlações entre dados de transcrição gênica mensurados, dados agrônômicos e de concentração de amido dos acessos IN84-82, 75//09, IN84-58 e 28NG289, presentes no grupo previamente selecionado HF. Spearman. Significância 5%,  $p < 0,05$ .

No grupo PRR, quanto maior a transcrição da subunidade TORb no ZT12, menor a quantidade de amido residual no começo da manhã seguinte, ZT27. Há também correlações no começo da manhã do primeiro dia de coleta, ZT3, de transcrição da subunidade ScKIN10 com os genes correlacionados do complexo TOR, RAPTOR1, TORa e do relógio biológico, PRR95. Bem como RAPTOR2, TORb e LST8 com os correlacionados PRR59 e S6K1.1. Além de correlações entre a transcrição de dois alvos do complexo TOR, S6K1.1 com TAP46, todas correlações positivas,  $R^2 > 0,75$ ,  $p < 0,05$ . Neste grupo do relógio biológico, maior quantidade de transcritos das subunidades RAPTOR2 e TORb no começo da manhã, também se correlacionam com menor expressão de ScLHY no ZT12. Já no ZT12, TORa se correlaciona com RAPTOR1 novamente de forma positiva e a transcrição de LST8 é inversa a de S6k1.2. O percentual de fibras é positivamente correlacionado a transcrição de ScKIN10 ao fim do dia.

As correlações entre os diferentes produtos de RT-qPCR para o mesmo gene do complexo TOR parecem manter correlações específicas entre os acessos, indicando que os processos que atuam durante o período luminoso influenciam a transcrição dos genes analisados de forma diferente. Os acessos que investem em produção de carboidratos estruturais e crescimento vegetativo, têm maior expressão de LHY, gene matinal do relógio biológico, de forma que os acessos com maior expressão deste gene, no começo da manhã, tendem a ser mais altos que os demais. Além disso, neste grupo, plantas com maior expressão de ScLHY e altura, tem menos transcritos de TORb no começo da noite, ZT12 (Figura 25).

Ainda neste grupo, variedades com maior quantidade de amido no começo da noite, tendem a ter mais transcritos de TORa e RAPTOR1 no mesmo horário, ZT12, além de ScPRR73 também no ZT12. Já os genótipos que acumulam açúcares e KRAKATAU, no começo da manhã, tem associações de TORa e RAPTOR1 com ScKIN10 e ScPRR95 além de, LST8, PRR59 e S6K1.1. Neste grupo, RAPTOR 2 e TORb são correlacionados e quanto maior a transcrição destes genes no ZT3, menor a expressão de ScLHY no ZT12



gronômicos  
5%, p<0,05;

## 5. DISCUSSÃO

### *5.1 Resumo de resultados nos grupos distintos*

Durante esta dissertação, dividimos os genótipos em diversas categorias (Figura 26). Em HF, KRAKATAU, IN84-58, IN84-82, 75/09 e 28NG289, plantas com maior percentual de fibras e baixo acúmulo de sacarose, há menor produção de amido em relação a HS, porém um perfil de produção e degradação possivelmente rítmico, principalmente nos acessos IN84-82, *S. spontaneum* e 75/09, *S. spontaneum*. Estes acessos e o *S. robustum*, 28NG289, têm alta expressão de SclHY no começo da manhã. IN84-82, 28NG289 e o *S. officinarum* IN84-105 tem mais transcritos também no começo da manhã. B) Em HS, SP80-3280, IN84-105, NG57221 e CHINA, plantas com alto acúmulo de sacarose, mas baixa capacidade de produção de fibras, produzem mais amido que plantas HF em todos os horários de coleta, ainda que com um perfil possivelmente rítmico, principalmente nos acessos SP80-3280 e IN84-105. Estes acessos que acumulam açúcares se correlacionam com o acesso KRAKATAU de HF, em relação a expressão do relógio biológico e expressão das subunidades de TOR. NG57221 e SP80-3280 também se correlacionam com KRAKATAU em expressão sincronizada das subunidades de TOR do começo da noite.

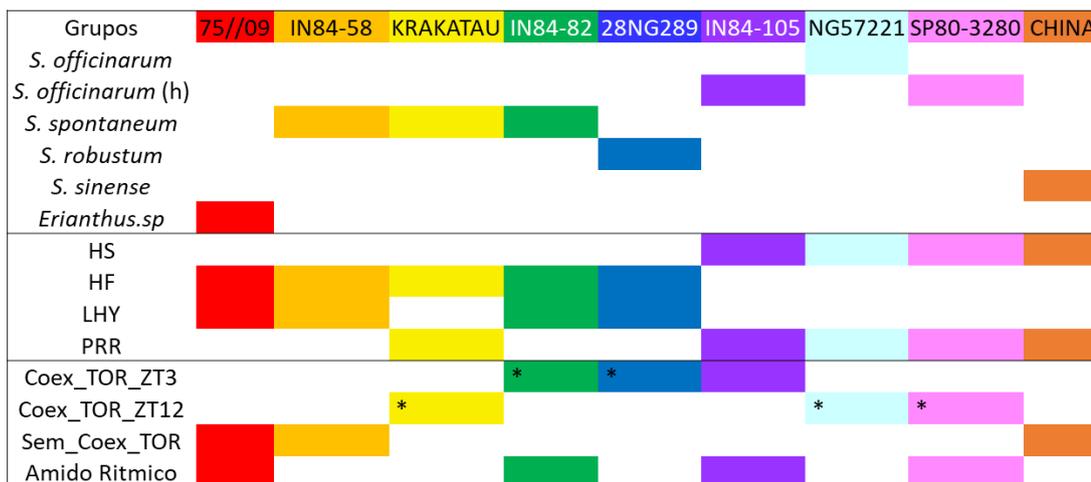


Figura 24: Esquema dos achados de metabolismo de amido, maquinaria do relógio biológico e sensores energéticos.

### Grupos distintos com índice fisiológico de funcionamento do relógio biológico

A cana-de-açúcar convencional é selecionada para alta concentração de sacarose, enquanto canas energia têm como principais características agrônômicas o alto percentual de fibras, perfilho e alto rendimento (DINIZ et al., 2019)(SANTCHURN et al., 2013; SILVEIRA et al., 2016). Sendo assim, estas canas têm relação inversa entre manter os açúcares acumulados e maior utilização de fotoassimilados para crescimento vegetativo incorporando açúcares em biomassa. Os grupos com acessos ancestrais de cana de açúcar convencional e cana energia, respectivamente HS e HF, representam estas partições de carbono contrastantes (Tabela 3 e Figura 6). Acessos do grupo HS são genótipos ancestrais selecionados pela alta produção de açúcar, dos gêneros *S. sinense* *S. officinarum* *sp* e *Saccharum* híbridos. O acesso NG57-221 é o que apresenta os maiores percentuais de açúcares e fibras dentre elas. SP80-3280 é um antigo cultivar comercial, selecionado para produção de açúcar. Já IN84-105 é a mais pesada e com mais perfilhamento e toneladas por hectare entre as *S. officinarum* estudadas. Apesar de possuir menos açúcares acumulados do que as demais *S. officinarum*, tem maior quantidade de perfilho, característica presente em maior quantidade nos acessos de HF e canas-energias. Alelos associados a perfilhamento podem ser obtidos por hibridizações de cultivares comerciais *Saccharum* *sp*. com genótipos *S. spontaneum* e *S. robustum*. Outras características destes cruzamentos é a fixação de alelos que contribuem para

maior tolerância a stress, bióticos e abióticos, maior percentual de fibras e biomassa. (AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, 1983, FERREIRA et al., 2016).

O acesso *S. spontaneum* mais associado a produção de perfilho, IN84-82, se destaca no grupo HF. IN84-58, KRAKATAU, 75//09 e 28NG289, também fazem parte de HF, agrupados pelo alto percentual de fibras e baixo teor de açúcares (Figura 5). Genótipos de IN84-82, KRAKATAU e IN84-58, foram identificados anteriormente pela alta capacidade de produção de fibras, >17%, característica recomendada para hibridização em prol de melhoramento de canas-energia (Silveira et al., 2016, (SILVEIRA et al., 2015). Assim como a utilização de plantas do gênero *Erianthus*, como o acesso 75//09, que melhora a diversidade genética dos acessos (MEENA et al., 2020).

O amido é a principal molécula de reserva energética das plantas (FIGUEIRA; CARVALHO; SATO, 2011). Desenvolver plantas capazes de alta produção de amido sem comprometer o crescimento vegetativo é um caminho para produção de biocombustíveis de primeira geração ainda mais sustentáveis. (SMITH, 2008). A concentração de amido é também importante dado fisiológico para seleção de canas de açúcar mais produtivas. Corroborando a seleção destes acessos em prol de maior acúmulo de açúcares e baixa produção de fibras, os acessos do grupo HS possuem mais açúcares em reserva do que as plantas do grupo HF em todos os horários de coleta (Figura 8). Em genótipos de milho, o amido residual do começo da manhã se correlaciona positivamente com a taxa de crescimento das plantas, um indício fisiológico que regular a utilização de açúcares de reserva favorece o desenvolvimento e, portanto, a produtividade, em plantas comerciais (LIANG et al., 2019). Em *Arabidopsis*, o relógio biológico regula o metabolismo de amido, permitindo altas amplitudes nos ritmos de síntese e degradação de amido (GRAF et al., 2010, HAYDON et al., 2013).

O acesso SP80-3280 (*S. officinarum* híbrido) possui perfis rítmicos da expressão de genes relacionados a síntese, desramificação e degradação de amido detectados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (HOTTA; JR; SOUZA, 2013). Esta reserva energética acumula nas folhas durante a fase luminosa (ZT0-ZT12) utilizando açúcares foto assimilados, e é utilizado como fonte de energia para o metabolismo durante a noite (ZT12-ZT24). (GRAF et al., 2010). Com diferenças de amplitudes, este foi o perfil reportado em acessos de todas as espécies analisadas. (Figura 7). O ocorrido de IN84-58

e NG57221 apresentarem mais amido residual, ZT27, que no começo da noite, ZT12, é resultado de uma alta variabilidade nos dados, e possivelmente uma baixa amplitude, uma vez que não há como produzir amido durante a noite (Figueira et al., 2011). Conseguimos identificar uma alta variação na concentração de amido entre horários de coleta em apenas quatro acessos, indicando que a otimização pelo relógio biológico não acontece de forma uniforme no complexo Saccharum. Ainda assim, a provável presença de regulação nas altas amplitudes aponta para um relógio biológico funcional e atuante nestes acessos. A ocorrência de altas variações apenas em acessos híbridos de *S.officinarum*, SP80-3280 e IN84-105 do grupo HS, é também um indício de que essa característica seja selecionada através de hibridizações em prol de melhoramento vegetal. Plantas elite, comerciais de cana-energia, têm a habilidade de crescer durante a noite, diferente de cana-de-açúcar (DE ABREU et al., 2020), processo que, provavelmente, necessita de regulação otimizada da dinâmica de amido, em prol de manter reservas de energia para crescimento mesmo produzindo menos amido em geral. Ainda assim, mais evidências são necessárias para confirmar a real amplitude da dinâmica de amido dos acessos analisados.

*Grupos de cana de açúcar com diferentes relógios biológicos e partição de carbono contrastante*

Além do metabolismo de amido, algumas das vantagens competitivas de plantas que possuem o relógio biológico mais sincronizado com o ambiente é maior eficiência fotossintética, eficiência hídrica, acúmulo de biomassa e sobrevivência (DODD et al., 2005). Em cana-de-açúcar comercial (SP80-3280 e RB855453), o relógio biológico controla a expressão rítmica de diferentes genes (>30%), expressos em diferentes órgãos (folha, entrenó 1&2 e entrenó 5), e com distintas intensidades. (HOTTA et al., 2013; DANTAS et al., 2021, 2020 ). Em particular, em folhas coletadas em campo, 60% do transcriptoma possui perfil rítmico, regulado tanto pelo relógio biológico quanto pelos ritmos ambientais (DANTAS et al., 2020).

O mecanismo de funcionamento da principal alça de regulação do relógio biológico vegetal é composto pelos fatores de transcrição LHY, mais expresso no começo do dia e TOC1 (PRR1), mais expresso no começo da noite (HAYDON et al., 2013). Os genes ScLHY, ScTOC1, ScPRR59, ScPRR73 e ScPRR95, componentes do

relógio biológico de cana-de-açúcar, foram caracterizados pelo nosso grupo pesquisa em trabalhos anteriores, em genótipos de RB855453 e SP80-3280, *S. officinarum* comercial (HOTTA et al., 2013, DANTAS et al., 2020). Os pontos escolhidos para a coleta neste trabalho ressaltam as diferenças de expressão dos genes ScLHY e ScTOC1, durante o dia (DANTAS et al., 2019, 2020). Em consequência, encontramos estes genes diferencialmente expressos em todos os genótipos, porém com diferenças de amplitudes (Figura 10 e Figura 11).

As diferenças de amplitude encontradas podem ser relevantes para futuras investigações, uma vez que a expressão dos genes centrais do relógio biológico refletem na amplitude dos outputs regulados por estes genes. (HALL et al., 2003). Os níveis de transcrição dos ponteiros centrais, ScLHY e ScTOC1, não parecem estar associados à partição de carbono preferencial das diferentes espécies, ao menos diretamente, uma vez que não encontramos diferença de expressão significativa entre os grupos previamente definidos, HS e HF (Tabela 4). Ainda assim, quando analisamos a transcrição da alça central junto a outros genes da alça matinal, temos que acessos presentes em HF estão mais associados à alta expressão de LHY no começo do dia (ZT3), enquanto os acessos que compõe HS estão associados a uma maior transcrição dos genes Pseudo-Response Regulators (PRR) 59, 73 e 95 no fim do período luminoso (ZT12) (Figura 12). Ter maior expressão de componentes de entrada do relógio biológico, como os genes ScPRR59, 73 e 95, em momentos energéticos distintos do dia, pode influenciar amplamente o fenótipo das plantas, uma vez que estes genes têm relação com diferentes processos de crescimento vegetal. Na espécie modelo *Arabidopsis thaliana*, AtPRR5, 7 e 9 favorecem a expressão de subunidades do complexo TOR em meristema de raiz, ajustam temporalmente o crescimento regulando a expressão de genes PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), além de atuar sobre a função mitocondrial e sinalização energética (FRANK et al., 2018; LI et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

Em *Arabidopsis*, AtPRR9 tem expressão induzida pela luz e por AtLHY. Em contrapartida, o acúmulo de proteínas AtPRR9 e AtPRR7 inibem AtLHY no fim da manhã (NAKAMICHI, 2020). Ainda assim, encontramos PRR9 mais expresso no ZT12 que no ZT3 no acesso ancestral da espécie *S. officinarum*, NG57-221. Esse acesso é o

único a apresentar mais transcritos dos genes PRR59, 73 e 95 no ZT12 (Figura 12). Ainda na espécie modelo, AtLHY é descrito como forte inibidor de AtPRR5, se ligando à região promotora do gene. Esta repressão rítmica direciona a expressão do gene AtPRR5 para o fim do período luminoso, onde o fator de transcrição inibe a expressão de genes PIF, promotores de crescimento (NAKAMICHI et al., 2012; ZHANG et al., 2020). Ainda assim, os acessos matinais IN84-105 e IN84-82 têm mais transcritos dos genes PRR59, 73 e 95 no começo da manhã, apesar de ambos apresentarem alta amplitude de LHY (Figura 12). Ainda não há estudos que detalhem o funcionamento da regulação dos PRR em monocotiledôneas.

Em trabalhos anteriores com cana-de-açúcar, foi verificado que os três genes PRR coincidem o pico de expressão entre os ZT6-10. (HOTTA et al., 2013; DANTAS et al., 2020). Sendo assim, apesar de diferentes padrões de expressão encontrados, os horários de coleta estão em regiões intermediárias do período de expressão dos genes ScPRR59, 73 e 95 em cana-de-açúcar, o que possivelmente explica as baixas diferenças de níveis de transcrição gênica encontradas e ressalta as altas amplitudes, principalmente de ScPRR95, como novo alvo para futura elucidação.

Os diferentes níveis de transcrição de componentes do relógio biológico entre os acessos (Figuras 12 e 13), podem ser também uma consequência de variações alélicas de dentro do complexo *Saccharum*, seja por quantidade de alelos sendo transcritos e/ou por diferentes elementos cis-regulatórios. Variações alélicas em PRR37, selecionadas acidentalmente durante a domesticação do sorgo, adaptaram cultivares para dias curtos, incluindo sorgos doces, selecionados para acumularem açúcar (KLEIN et al., 2015). É possível que as diferenças de expressão entre os acessos *S. officinarum* ancestral e híbridos possam servir como um exemplo disso. Plantas híbridas que passaram por cruzamentos com *S. spontaneum* (SP80-3280 e IN84-105), têm correlação com IN84-82 e IN84-58, além de *Erianthus* sp. e CHINA, que ou são fruto de *S. spontaneum*, ou têm alta correlação com essa espécie. Enquanto o representante ancestral da espécie *S. officinarum*, NG57-221, é o único a não se correlacionar a nenhum outro acesso (Figura 13A).

Considerando os resultados obtidos, além de componentes diferentes, sugerimos a existência de distintos relógios biológicos nestes acessos do complexo

Saccharum: um grupo marcado pela maior expressão dos genes PRR59 73 e 95 no ZT12, e outro grupo com alta amplitude de transcritos do gene LHY. Estes grupos, que nomeamos respectivamente, grupo PRR e grupo LHY, também apresentam partições de carbono distintas.

*Co-expressão e alta amplitude das subunidades do complexo TOR ocorrem em momentos distintos do dia*

Estudos de regulação do complexo em Arabidopsis e arroz correlacionam a expressão do gene TOR, maior subunidade do complexo, com o crescimento de órgãos e células.(DEPROST et al., 2007; DOBRENEL et al., 2011; DONG et al., 2015; VAN LEENE et al., 2019). Luz, hexoses, aminoácidos e nitrogênio são indutores da via de Target Of Rapamycin (TOR) em plantas. (ENGANTI et al., 2018; LIU et al., 2021). Esta subunidade possui alta homologia de sequências de nucleotídeo e aminoácidos entre espécies da família Poaceae. No entanto, as outras subunidades são menos estudadas, principalmente em plantas comerciais (SAPRE; TIWARI; THAKUR, 2018). As eficientes reações de amplificação que obtivemos para sequências das subunidades do complexo TOR nas diferentes espécies do complexo Saccharum (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *Erianthus sp.*) ressaltam esta alta similaridade. Ainda assim, as regiões homólogas identificadas no genoma de SP80-3280, podem, ou não, refletir o número de cópias de cada alelo neste e nos demais genótipos. (SOUZA et al., 2019). Por exemplo, em genótipos R570, Saccharum *officinarum* híbrido, foram encontrados seis haplótipos para o gene TOR, quatro de provável origem *S.officinarum* e dois de *S. spontaneum*, ainda assim, nem todos haplótipos aparecem expressos. (VILELA et al., 2017). Em SP80-3280, identificamos 4 prováveis haplótipos do gene TOR, porém, nenhum com expressão detectada em experimentos anteriores. (tabela 7).

O aumento da concentração endógena de açúcares, favorece uma maior produção de energia e indução da expressão e atividade do complexo TOR. (DONG et al., 2015; FORZANI; MEYER, 2019; INGARGIOLA et al., 2020). Ainda assim, as subunidades do complexo TOR mantêm correlações em momentos energéticos distintos nos diferentes acessos(Figura 14 e Figura 15). Os acessos que possuem diferença significativa de transcritos das subunidades de TOR entre horários, KRAKATAU e IN84-

82, são ambos da espécie *S. spontaneum*, porém têm pico de transcritos das subunidades ocorrendo em horários alternados. (Tabela 8, Figura 14 e 15). Ambos os acessos foram identificados anteriormente em estudos de seleção de progenitores para cana-energia. (SILVEIRA et al., 2015, 2016). KRAKATAU é um acesso ancestral da espécie *S. spontaneum* utilizado como “testemunha fixadora de nitrogênio”, devido à capacidade de fixação biológica e acúmulo de nitrogênio nas folhas, característica intrínseca dessa ancestral de cana-energia. (URQUIAGA et al., 2003)

A crescente ilha vulcânica de Anak Krakatau, que emerge do mar após sucessivas erupções vulcânicas, teve plantas da espécie *S. spontaneum* como pioneiras na sucessão ecológica. As repetidas erupções cobriram em até 5.0 m o solo ilha de cinzas vulcânicas, que além da destruição da explosão, dificultaram o retorno da vegetação (WHITTAKER; BUSH; RICHARDS, 1989). Ainda assim, rizomas desta planta pioneira de *S. spontaneum* têm resistência ao soterramento por cinzas vulcânicas (SUZUKI, 1984). Apesar dos rizomas soterrados sofrerem com deficiência de nutrientes, as cinzas vulcânicas são fundamentais para que haja sucessão ecológica em áreas afetadas, pois agem como fonte de nitrogênio a essas plantas pioneiras, fazendo com que cana de açúcar tivessem papel fundamental na sucessão ecológica de Anak Krakatau. (SHOJI; TAKAHASHI, 2002; TURNER, 1992). Sendo assim, é possível que a capacidade para acúmulo de nitrogênio tenha sido selecionada em genótipos KRAKATAU ancestrais e mantida em programas de melhoramento. Nossos resultados de expressão gênica de relógio biológico (Figura 13) e das subunidades do complexo TOR (Figura 14, Figura 15) podem ser um sinal bioquímico para corroborar esta hipótese, agrupando o acesso KRAKATAU junto a acessos cujo complexo TOR viabiliza fenótipos de acúmulo de sacarose, ao invés de outras *S. spontaneum* ancestrais que compartilham maior semelhança fenotípica, (Figura 5 e Figura 6). Além de sugerir processos relacionados entre estas vias para fenótipos que acumulam nitrogênio e açúcares. Diferentes compostos do metabolismo de nitrogênio, Amônio(NH<sub>4</sub>), Nitrato(NO<sub>3</sub>) e Glutamina(Gln), induzem a atividade de TOR pelo mesmo mecanismo, através da proteína ROP2.(LIU et al., 2021). Ainda assim, esta resposta não acontece a nível transcricional nas subunidades do complexo TOR. ROP2 também ativa a via de TOR através da sinalização de auxina. (SCHEPETILNIKOV et al., 2017). Mais estudos

específicos neste genótipo são necessários para confirmar as relações propostas, uma vez que a influência do nitrogênio no aparato fotossintético das folhas de cana-de-açúcar parece ser específico em cada genótipo. (BASSI; MENOSSI; MATTIELLO, 2018)

A indução da transcrição de genes do complexo TOR durante o período luminoso é um processo que parece acontecer de forma acentuada no acesso IN84-82 (*S. spontaneum*), além dos demais acessos que apresentaram todo complexo TOR mais transcrito no começo da manhã (ZT3) (28NG289, *S. robustum* e IN84-105, *S. officinarum*) (Figura 13). O acesso IN84-105, que apresenta alto percentual de açúcares, foi selecionado para o grupo HS e se agrupa aos demais *S. officinarum* em expressão de componentes do relógio biológico, no grupo PRR. (Figura 13). No grupo manhã, este acesso tem a menor diferença de transcritos das subunidades do complexo TOR, entre os horários de coleta (Figura 15). IN84-105 se correlaciona ainda mais com o ZT3 quando incluímos no PCA, as medições de relógio biológico (Figura 19), e se mantém relacionado ao ZT3 quando incluímos os efetores do complexo TOR. (Figura 20) Os outros acessos que também possuem transcrição matinal do complexo TOR acumulam menos açúcar que IN84-105, fazendo parte dos grupos HF e LHY, e têm mais transcritos das subunidades do complexo TOR com pico no ZT3.

A expressão de *AtTOR* em arroz induz a expressão das proteínas regulatórias *OsRAPTOR1b* e *OsLst8*, causando aumento de biomassa e rendimento (BAKSHI et al., 2017). Corroborando a sinergia entre as subunidades do complexo TOR e o possível envolvimento regulatório de LST8 em plantas do complexo Saccharum, LST8 aparece com alta amplitude nos mesmos acessos que apresentaram alta amplitude de mais de uma subunidade do complexo TOR, e correlação das subunidades, independente do horário. (Figura 16, 17). Em *Arabidopsis*, a expressão de LST8 é fundamental para o ajuste do metabolismo em resposta ao aumento do período luminoso, esse aumento também significa maior duração de assimilação de açúcares pela fotossíntese. Silenciamento do gene *Lst8-1* favorece o carregamento de floema e impede o acúmulo de açúcares, fenômeno que desregula a adaptação ao aumento da produção de energia com aumento do período luminoso de *arabidopsis*. (AZZOPARDI et al., 2012). Neste contexto, regular a presença da subunidade LST8 de forma acentuada em determinado momento do dia, pode ser uma via de integração da produção de energia

com sinalização energética, bem como pode ser um caminho de relacionar o relógio biológico com a sinalização do estado energético celular. KRAKATAU, que possivelmente tem diferenças das demais *S.spontaneum* em relação ao metabolismo de nitrogênio, tem perfil de LST8 e das demais subunidades do complexo TOR mais parecido com acessos de HS que das demais de HF, resultados que apontam para importância desta via independente da partição de carbono desejada. Dado o papel regulatório de LST8 em arabidopsis e as diferenças de horário de expressão nos grupos de cana-de-açúcar com co-expressão do complexo TOR, deve-se investigar o papel desta subunidade em processos de alocação e utilização de açúcares foto-assimilados, bem como identificar alvos responsáveis por esta diferença de sinalização do estado energético.

Processos de regulação pós-transcricioanal devem ser considerados, principalmente levando em conta as características de complexos proteicos de TOR e SnRK1, onde a quantidade de subunidades disponíveis em determinado momento do dia, bem como a qualidade dessas subunidades, são determinantes para o funcionamento das vias. (DONG et al., 2015),(BELDA-PALAZÓN et al., 2020).

Sendo assim, acessos matinais parecem ter mais transcritos do complexo TOR neste horário, de forma relacionada à menor capacidade de acumular sacarose, além de apresentar mais características de crescimento vegetativo como produção de fibras e alto perfilhamento. A expressão matinal de subunidades do complexo TOR é um novo fenômeno a ser elucidado, uma vez que em meristema de raízes de arabidopsis a subunidade quinase TOR tem perfil de expressão rítmica no ZT12, promovida pela expressão de genes do relógio biológico. (LI et al., 2019). Um caminho para elucidar o ZT3 ser o momento do dia mais capaz de induzir transcrição do complexo TOR quando comparado ao fim do período luminoso, pode ser considerar que no ZT12, a maior parte dos carboidratos já foi metabolizado durante o dia em crescimento e/ou esta conjugada em amido. (GRAF et al., 2010).Assim, a interação entre componentes de relógio biológico e transcrição das subunidades do complexo TOR no ZT12 também deve ser alvo de futuras investigações em plantas do complexo Saccharum, bem como se a indução no ZT3 está ligada a produção de energia favorecida pela fase clara da fotossíntese.

Este estudo é pioneiro na análise de transcritos de subunidades dos complexos enzimáticos de TOR e Snrk1 em plantas do complexo Saccharum, bem como reportar que possivelmente essas plantas ancestrais de cana de açúcar e cana-energia tem contraste também na sinalização do estado energético, em momentos do dia próximos a transição energética. Nossos resultados podem evoluir os estudos visando o melhoramento de características específicas para o acúmulo de açúcar e para maior produção de fibras, através de diferenças do complexo TOR e relógio biológico associadas a partição de carbono. Ressalta também a necessidade de novos estudos para identificar quais elementos que regulam a presença de subunidades do complexo TOR fora de espécies modelo como Arabidopsis. Variedades híbridas elite, plantas de cana-de-açúcar e cana-energia de alta performance, podem servir como modelo para descrição destes distintos caminhos regulatórios.

### *5.2 Resumo das correlações de expressão gênica*

Ilustramos as correlações significativas obtidas entre todos os acessos juntos (Figura 27) e nos grupos de plantas com partição de carbono contrastante, PRR, separado por expressão de componentes de relógio biológico, e HF, separado pelos dados agrônômicos dos genótipos (Figura 28). Embora haja poucas correlações diferentes entre os distintos horários de coleta com os nove acessos juntos, nos grupos PRR e HF, as correlações entre componentes do complexo TOR são mais específicas por horário, bem como com genes PRRs. O mesmo componente de relógio biológico, ScLHY, se mostrou com alta correlação negativa com a subunidade TOR, ainda que em horários distintos. Medições de amido também mantem correlações com subunidades de TOR de forma distinta entre os grupos. As diferenças sugerem diferentes caminhos regulatórios envolvendo os mesmos componentes.

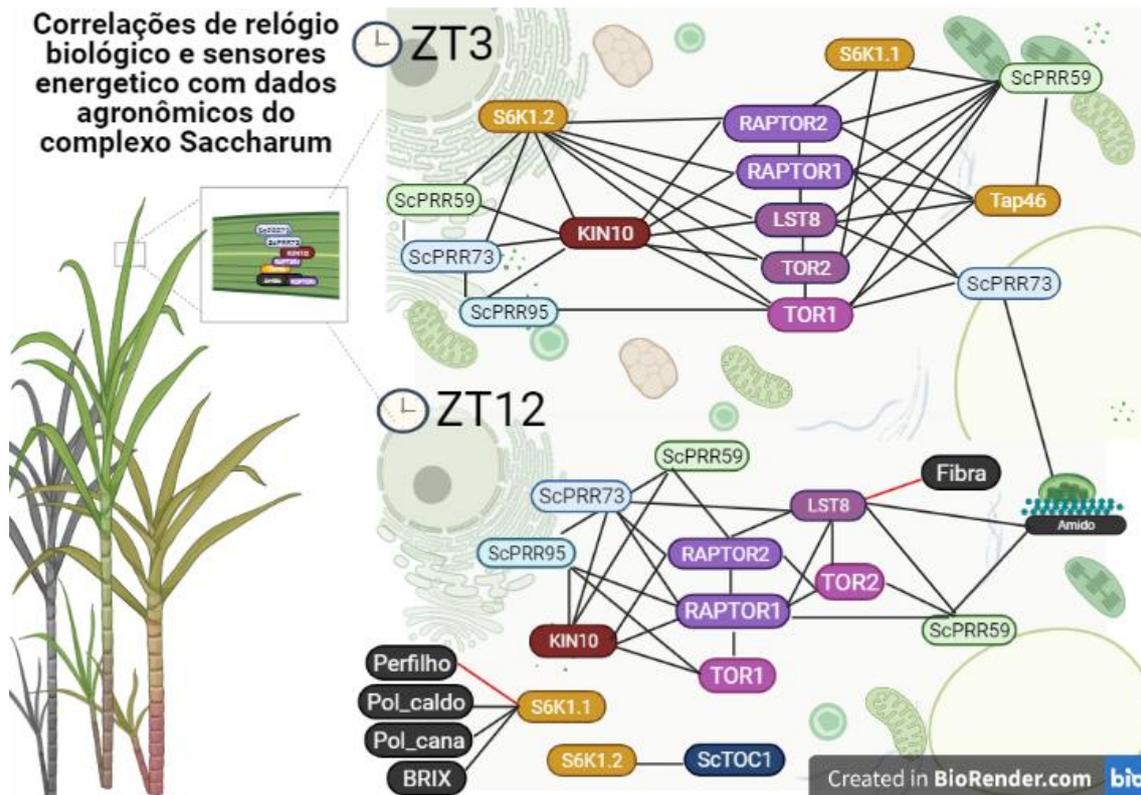


Figura 25: Resumo das correlações significativas entre transcritos de componentes do relógio biológico e da via de sinalização dos sensores dos estados energéticos TOR e Kin10 com dados agrônômicos nos 9 acessos do complexo Saccharum. A partir de amostras de folha +1, quantificamos transcritos dos genes PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TOR1\_ZT3, TOR1\_ZT12, TOR2\_ZT3, TOR2\_ZT12, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12, TAP46\_ZT3, TAP46\_ZT12, S6k1.1\_ZT3, S6k1.1\_ZT12, S6k1.2\_ZT3, S6k1.2\_ZT12 em tempo real nos dois horários de coleta, ZT3 e ZT12. Linhas pretas correspondem a correlações positivas entre os genes. Linhas vermelhas correspondem a correlações negativas entre os genes. Estão representadas apenas as correlações  $p < 0,05$ , Spearman.

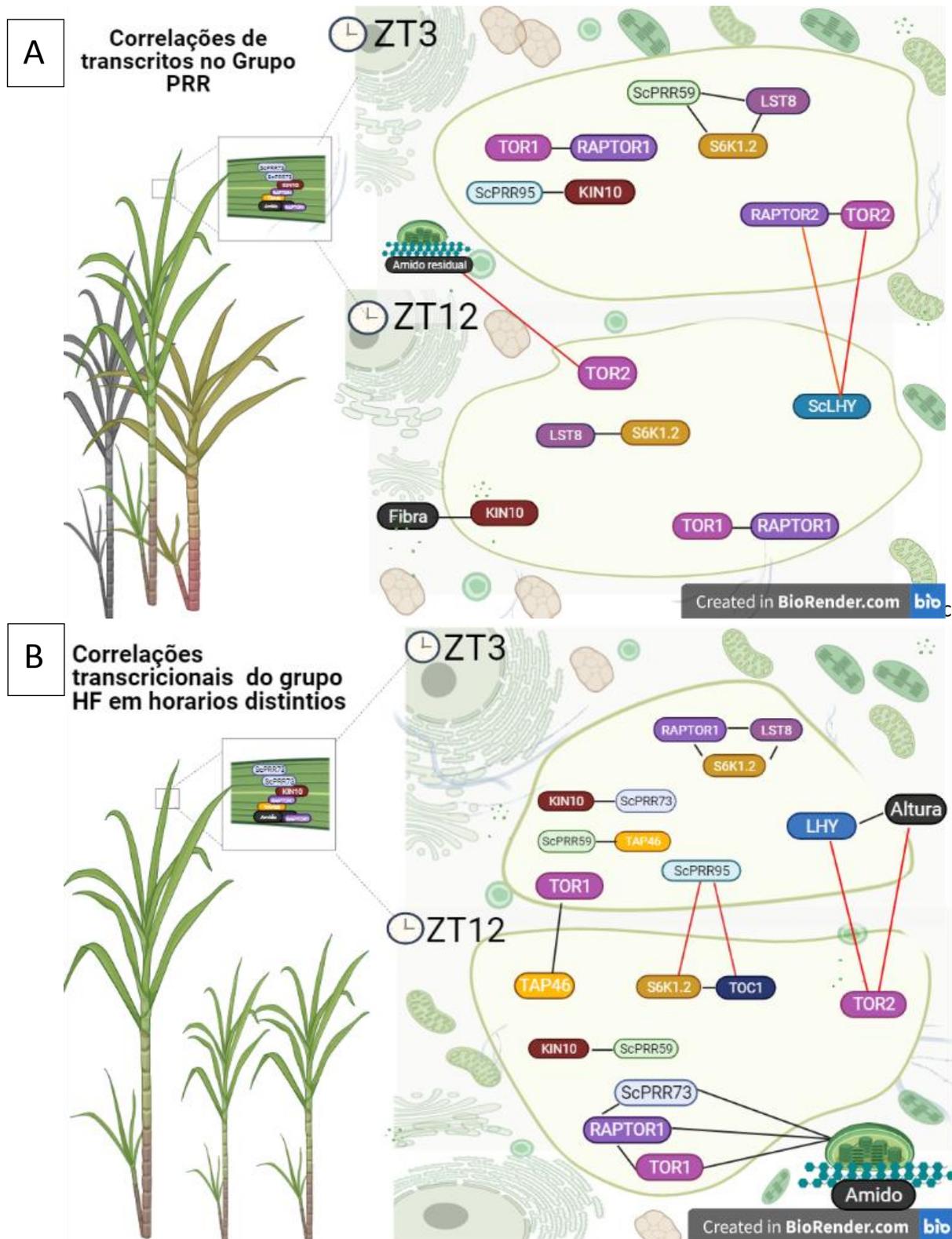


Figura 26: Resumo das correlações significativas entre transcritos de componentes do relógio biológico e da via de sinalização dos sensores dos estados energéticos TOR e Kin10 com dados agrônômicos nos grupos com partição de carbono contrastante. A) Grupo PRR, KRAKATAU, SP80-3280, NG57221, IN84-105 e CHINA. B) Grupo HF: IN84-82, IN84-58, 75//09, KRAKATAU e 28NG289. A partir de amostras de folha +1, quantificamos transcritos dos genes PRR59\_ZT3, PRR59\_ZT12, PRR73\_ZT3, PRR73\_ZT12, PRR95\_ZT3, PRR95\_ZT12, LHY\_manha, LHY\_tarde, TOC1\_manha e TOC1\_tarde, RAPTOR1\_ZT3, RAPTOR1\_ZT12, RAPTOR2\_ZT3, RAPTOR2\_ZT12, TORA\_ZT3, TORA\_ZT12, TORB\_ZT3, TORB\_ZT3, LST8\_ZT3, LST8\_ZT12, TAP46\_ZT3, TAP46\_ZT12, S6k1.1\_ZT3, S6k1.1\_ZT12, S6k1.2\_ZT3, S6k1.2\_ZT12 em

tempo real nos dois horários de coleta, ZT3 e ZT12. Ilustração feita por mim na ferramenta BioRender.com. Linhas pretas correspondem a correlações positivas entre os genes. Linhas vermelhas correspondem a correlações negativas entre os genes. Estão representadas apenas as correlações  $p < 0,05$ , Spearman.

*Componentes de relógio biológico e sensores dos estados energéticos, revelam mecanismos relacionados as partições de carbono contrastante*

Em *Arabidopsis*, durante o período luminoso, os genes *AtPRR5* e *AtPRR7* interagem com a região promotora de PIFs, impedindo que estes fatores de transcrição estimulem o crescimento.(ZHANG et al., 2020). Também em *Arabidopsis*, os genes *AtPRR5*, *AtPRR7* e *AtPRR9* regulam a expressão rítmica do gene *TOR*, que tem pico no ZT12 e é abolida em mutantes destes componentes de relógio (LI et al., 2019), dois processos que colocam os componentes de relógio biológico como reguladores da expressão de proteínas promotoras de crescimento. Sendo assim, a diferença de crescimento entre plantas que acumulam açúcar e as que investem mais em produção de fibras pode estar relacionada à maior expressão diurna de *ScLHY*, e assim, ter menos *ScPRRs* durante o período luminoso, inibidores deste gene matinal e de PIFs. Plantas do grupo HS e KRAKATAU, têm maior presença de genes *ScPRR59*, *73* e *95* no ZT12.(Tabela 9). Portanto, possivelmente, possuem maior inibição de *ScLHY* e ainda, possível direcionamento da expressão do complexo TOR para o ZT12 quando comparado a plantas dos grupos LHY e HF. O resultado de plantas do grupo HS com maior expressão de *LST8* no ZT12 (Figura 17), bem como o agrupamento dos efetores de TOR com transcrição no ZT12, corrobora uma possível expressão do complexo TOR neste momento do dia em plantas que acumulam açúcar. A correlação positiva entre transcritos de *S6K1.1* no ZT12 e os dados agrônômicos referentes ao acúmulo de açúcares (positiva para açúcares e negativa para o número de perfilho) (Figura 21 e 25), são resultados que indicam que a via de *S6K1* também atua no complexo *Saccharum*, principalmente no ZT12.

No grupo de acessos HF (Figura 22 e 26), plantas que também são agrupadas pela expressão do ponteiro matinal *ScLHY* no começo da manhã, tendem a ser maiores em altura e ter menos transcrição de *TORb* no ZT12. Enquanto plantas PRR (Figura 23 e 26), além de ter correlações de *RAPTOR1* e *TORa* em ambos os horários, têm mais

TORb e RAPTOR2 no ZT3, que se correlacionam negativamente com expressão de LHY no ZT12, sugerindo uma sinergia do complexo TOR com LHY e/ou genes PRR, inibidores de LHY. Em soja, plantas mutantes de todos os quatro alelos para o gene *GmLHY* desenvolvem menos altura que o controle, um fenótipo recuperado após tratamento com o fito hormônio giberelina, além disso, mutações alelo específicas desenvolvem respostas diferentes à seca, tornando plantas de sojas mais resistentes a seca, e com maior crescimento de raiz durante o stress hídrico com o *knockout* de dois dos quatro alelos. (CHENG et al., 2019; WANG et al., 2021).

Há muito se sabe que a capacidade de fotossíntese de plantas ancestrais *S. spontaneum*, três dos quatro acessos de HF, é subutilizada, podendo realizar até 30% mais fotossíntese comparado a híbridos *Saccharum* spp, produzidas para alto acúmulo de açúcar, uma vez que o acúmulo de sacarose inibe a fotossíntese em acessos comerciais. (Irvine, 1975, MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2008). Além disso, cana-energia comerciais, que investem mais em produção de fibras e crescimento vegetativo que acúmulo de açúcares, como HF e LHY, têm maior crescimento e mais rápido em relação a cana-de-açúcar comerciais, selecionadas pelo acúmulo de açúcares, como plantas do grupo HS. (DE ABREU et al., 2020). Essa diferença de crescimento e capacidade fotossintética pode estar associado a importante presença de LHY nestas plantas mais fibrosas com mais características de crescimento vegetativo. Assim como a presença de maior expressão das subunidades do complexo TOR durante o período luminoso, com alta amplitude de expressão. Arroz com a expressão interrompida de *RAPTOR2* ou atividade do complexo TOR reduzida têm menor capacidade fotossintética por deficiências estruturais na composição das membranas de tilacóides, mesmo fenótipo que plantas deficientes de proteína S6K1. (SUN et al., 2016). Em arábido, *AtLHY* também promove a expressão do complexo fotossintético e assimilação de açúcares, assim como o complexo TOR. (HAYDON et al., 2013b, INGARGIOLA et al., 2020, DODD et al., 2005). A transcrição de *KIN10* se mostrou altamente correlacionado com as subunidades do complexo TOR quando analisamos todos os acessos juntos, resultado que não se repete nos grupos divididos. (Figura18). No grupo PRR (Figura23 e 26), a transcrição de *KIN10* no ZT12, se correlaciona com a quantidade de fibras deste grupo. A atividade de *KIN10* induzida pelo escuro é fundamental para quebra de amido, remobilizando

reservas e viabilizando hexoses para crescimento durante a noite (BAENA-GONZÁLEZ et al., 2007). Porém, SnRK1 também é necessário para a inibição de TOR pelo hormônio ABA, processo fundamental para parada de crescimento, o que evita gasto de energia enquanto há resposta a stress. (BELDA-PALAZÓN et al., 2020).

Assim, nossos resultados trazem primeiras evidências de correlação entre subunidades do complexo TOR e relógio biológico, como entre LHY e TORb, e ambos relacionados à altura das plantas, principalmente nas plantas do grupo HF, assim como em plantas que acumulam açúcar e KRAKATAU, onde as correlações das subunidades do complexo TOR sugerem sinergia com PRRs, inibidores de LHY.

## 6. CONCLUSÕES

1. Genótipos de cana-de-açúcar, tanto com alta relação sacarose/fibra (Grupo HS), quanto com uma relação baixa (Grupo HF), podem ter alta amplitude de metabolismo de amido;
2. Possivelmente, a otimização do metabolismo de amido pelo relógio biológico não acontece de forma uniforme no complexo Saccharum.
3. As variedades têm perfil distinto de expressão dos componentes de relógio biológico analisados;
4. As diferenças de quantidade de transcritos dos componentes de relógio biológico analisados nos permite identificar dois grupos de plantas: um que possui alta amplitude de LHY (grupo LHY) e um que possui alta amplitude de PRRs (grupo PRR);
5. Os grupos LHY e PRR possuem padrões contrastantes partição de carbono e expressão das subunidades dos sensores energéticos TOR, positivo e Snrk1, negativo.
6. Identificamos três perfis de expressão das subunidades do complexo TOR entre as variedades do complexo Saccharum. Plantas com coexpressão nos ZTs analisados e sem coexpressão em apenas um dos horários.
7. A amplitude de expressão das subunidades de TOR acontece de forma distinta entre os acessos, possivelmente relacionado a altura das plantas. Essa característica aparece principalmente em plantas de HF que não acumulam açúcar e investem em fibras, bem como em LST8
8. Embora seja uma análise inicial das interações entre as vias propostas, baseado apenas em transcrição gênica, as diferentes correlações dos grupos HF e PRR, revelam que as pressões regulatórias atuando sob as vias analisadas são diferentes entre cana-de-açúcar com capacidade de acumular açúcar e as que utilizam o carbono para produzirem mais fibras.
9. *LST8*, *TORb*, *ScPRR95*, *ScLHY* e *S6K1* são genes cuja expressão acontece de forma distinta entre os acessos e correlacionado com a diferença de partição de carbono entre as variedades analisadas. Alvos com potencial biotecnológico importante para análises futuras!
10. Os fatores de transcrição componentes do relógio biológico, principalmente *ScLHY*, separam as variedades de *High Fiber*, enquanto as subunidades dos sensores do estado energético, tanto de TOR quanto Snrk1, bem como os genes PRR59, 73 e 95, se associam as variedades de *High Sugar* e KRAKATAU, apenas no ZT12.

## 7. RÉFERENCIAS

- ALI, A. et al. Genetic diversity and population structure analysis of *Saccharum* and *Erianthus* genera using microsatellite (SSR) markers. **Scientific Reports**, v. 9, 23 jan. 2019.
- AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE. **Plant breeding reviews**. New York: Wiley, 1983.
- AMTHOR, J. S. Efficiency of Lignin Biosynthesis: a Quantitative Analysis. **Annals of Botany**, v. 91, n. 6, p. 673–695, maio 2003.
- AZZOPARDI, M. et al. Mutations in the *Arabidopsis* Homolog of LST8/G $\beta$ L, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days. **The Plant Cell**, v. 24, n. 2, p. 463, 1 fev. 2012.
- BAENA-GONZÁLEZ, E. et al. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. **Nature**, v. 448, n. 7156, p. 938–942, ago. 2007a.
- BAENA-GONZÁLEZ, E. et al. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. **Nature**, v. 448, n. 7156, p. 938–942, ago. 2007b.
- BAENA-GONZÁLEZ, E.; HANSON, J. Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 35, p. 152–157, fev. 2017.
- BARRETO, F. Z. Caracterização fenotípica e molecular do painel brasileiro de genótipos de cana-de-açúcar. 20 jun. 2016.
- BELDA-PALAZÓN, B. et al. A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. **Nature Plants**, v. 6, n. 11, p. 1345–1353, nov. 2020.
- BIHMIDINE, S. et al. Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 177, 2013.
- BRASILEIRO, B. P. et al. Genetic diversity in sugarcane varieties in Brazil based on the Ward-Modified Location Model clustering strategy. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 1650–1660, 2014.
- BRUNKARD, J. O. et al. TOR dynamically regulates plant cell-cell transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 9, p. 5049–5058, 3 mar. 2020.
- CALDANA, C. et al. The magic “hammer” of TOR: the multiple faces of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 8, p. 2217–2225, 15 abr. 2019.
- CARVALHO-NETTO, O. V. et al. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 20, dez. 2014.
- CHANTRANUPONG, L.; WOLFSON, R. L.; SABATINI, D. M. Nutrient-sensing mechanisms across evolution. **Cell**, v. 161, n. 1, p. 67–83, 26 mar. 2015.

- DANIELS, J.; DANIELS, C. A. Geographical, historical and cultural aspects of the origin of the Indian and Chinese sugarcane *Saccharum barberi* and *Saccharum sinense*. **Sugarcane breeders' newsletter**, 1975.
- DANTAS, L. L. B. Alternative Splicing of Circadian Clock Genes Correlates With Temperature in Field-Grown Sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 15, 2019.
- DANTAS, L. L. DE B. et al. Rhythms of Transcription in Field-Grown Sugarcane Are Highly Organ Specific. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6565, dez. 2020.
- DE ABREU, L. G. F. et al. Energy cane vs sugarcane: Watching the race in plant development. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112868, 15 nov. 2020.
- DEPROST, D. et al. An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 4, p. 844–850, 28 jan. 2005.
- D'HONT, A. et al. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. p. 7, [s.d.].
- D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J. C. Oligoclonal interspecific origin of “North Indian” and “Chinese” sugarcane. **Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology**, v. 10, n. 3, p. 253–262, 2002.
- DILLON, S. L. et al. Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and *Saccharum* (Andropogoneae). **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 975–989, out. 2007.
- DINIZ, A. L. et al. Genomic resources for energy cane breeding in the post genomics era. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1404–1414, 1 jan. 2019.
- DINIZ, A. L. et al. Amino Acid and Carbohydrate Metabolism Are Coordinated to Maintain Energetic Balance during Drought in Sugarcane. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9124, jan. 2020.
- DOBRENEL, T. et al. TOR Signaling and Nutrient Sensing. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p. 261–285, 2016.
- DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5734, p. 630–633, 22 jul. 2005.
- DONG, P. et al. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 7 set. 2015.
- FARRÉ, E. M.; LIU, T. The PRR family of transcriptional regulators reflects the complexity and evolution of plant circadian clocks. **Current Opinion in Plant Biology**, Cell Signalling and Gene Regulation. v. 16, n. 5, p. 621–629, 1 out. 2013.
- FERREIRA, S. S. et al. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane. **Plant Molecular Biology**, v. 91, p. 15–35, 2016.

- FICHTNER, F. et al. Sugar and Nitrate Sensing: A Multi-Billion-Year Story. **Trends in Plant Science**, 3 dez. 2020.
- FIGUEIRA, J. DE A.; CARVALHO, P. H.; SATO, H. H. Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, p. 11, 2011.
- FIGUEROA, C. M.; LUNN, J. E. A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. **Plant Physiology**, v. 172, n. 1, p. 7–27, set. 2016.
- FORZANI, C.; MEYER, C. Exploring the nine realms of TOR. **Nature Plants**, v. 5, n. 3, p. 251–252, mar. 2019.
- FRANK, A. et al. Circadian Entrainment in Arabidopsis by the Sugar-Responsive Transcription Factor bZIP63. **Current Biology**, v. 28, n. 16, p. 2597–2606.e6, 20 ago. 2018.
- FUKUSHIMA, A. et al. Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 17, p. 7251–7256, 28 abr. 2009.
- GABRIELSSON, B. Molecular biology of circadian rhythms A. Sehgal (Ed.), J. Wiley & Sons, 283 pp., ISBN 0471418242 (2004). **Cell Biochemistry and Function**, v. 23, n. 4, p. 293–293, 2005.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808–810, 9 fev. 2007.
- GRAF, A. et al. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9458–9463, 18 maio 2010.
- GRIVET, L. et al. A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 2, p. 009, 31 dez. 2004.
- HAYDON, M. J. et al. Photosynthetic entrainment of the Arabidopsis thaliana circadian clock. **Nature**, v. 502, n. 7473, p. 689–692, 31 out. 2013a.
- HAYDON, M. J. et al. Photosynthetic entrainment of the Arabidopsis thaliana circadian clock. **Nature**, v. 502, n. 7473, p. 689–692, 31 out. 2013b.
- HOTTA, C. T. et al. The Biotechnology Roadmap for Sugarcane Improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 75–87, 1 jun. 2010.
- HOTTA, C. T.; JR, M. Y. N.; SOUZA, G. M. Circadian Rhythms of Sense and Antisense Transcription in Sugarcane, a Highly Polyploid Crop. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71847, 6 ago. 2013.
- INGARGIOLA, C. et al. The Plant Target of Rapamycin: A Conduc TOR of Nutrition and Metabolism in Photosynthetic Organisms. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1285, nov. 2020.
- JAISWAL, D. et al. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. **NATURE CLIMATE CHANGE**, v. 7, p. 8, 2017.
- JANSE VAN RENSBURG, H. C.; VAN DEN ENDE, W.; SIGNORELLI, S. Autophagy in Plants: Both a Puppet and a Puppet Master of Sugars. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 14, 22 jan. 2019.

- JOSSIER, M. et al. SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 59, n. 2, p. 316–328, 2009.
- KLEIN, R. R. et al. Allelic variants in the PRR37 gene and the human-mediated dispersal and diversification of sorghum. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 128, n. 9, p. 1669–1683, set. 2015.
- KLINE, K. L. et al. Reconciling food security and bioenergy: priorities for action. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 3, p. 557–576, mar. 2017.
- KOMOR, E. The physiology of sucrose storage in sugarcane. In: GUPTA, A. K.; KAUR, N. (Eds.). . **Developments in Crop Science. Carbohydrate Reserves in Plants**. [s.l.] Elsevier, 2000. v. 26p. 35–53.
- LI, B. et al. PRR5, 7 and 9 positively modulate TOR signaling-mediated root cell proliferation by repressing TANDEM ZINC FINGER 1 in *Arabidopsis*. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 10, p. 5001–5015, 4 jun. 2019.
- LIANG, X.-G. et al. Seasonal and diurnal patterns of non-structural carbohydrates in source and sink tissues in field maize. **BMC Plant Biology**, v. 19, 21 nov. 2019.
- MARTÍNEZ-BARAJAS, E.; COELLO, P. Review: How do SnRK1 protein kinases truly work? **Plant Science**, v. 291, p. 110330, fev. 2020.
- MARTINS, M. C. M. et al. Feedback Inhibition of Starch Degradation in *Arabidopsis* Leaves Mediated by Trehalose 6-Phosphate. **Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 1142–1163, 1 nov. 2013.
- MASON, P. J. et al. Variation in sugarcane biomass composition and enzymatic saccharification of leaves, internodes and roots. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 201, 9 dez. 2020.
- MATSUOKA, S. et al. Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
- MEENA, M. R. et al. Biomass potential of novel interspecific and intergeneric hybrids of *Saccharum* grown in sub-tropical climates. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21560, 9 dez. 2020.
- MELLONI, M. N. G. Efficiency of Different Antimitotics in Cytological Preparations of Sugarcane. **Sugar Tech**, p. 7, 2016.
- MOORE, P. H. Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem. **Functional Plant Biology**, v. 22, n. 4, p. 661–679, 1995.
- MOORE, P. H.; PATERSON, A. H.; TEW, T. Sugarcane: The Crop, the Plant, and Domestication. In: **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1–17.
- MUKHERJEE, S. K. Origin and Distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, v. 119, n. 1, p. 55–61, 1 set. 1957.
- NAKAHATA, Y. et al. Circadian Control of the NAD<sup>+</sup> Salvage Pathway by CLOCK-SIRT1. **Science**, v. 324, n. 5927, p. 654–657, 1 maio 2009.

- NAKAMICHI, N. et al. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the Arabidopsis Circadian Clock. **The Plant Cell**, v. 22, n. 3, p. 594–605, 1 mar. 2010.
- NAKAMICHI, N. et al. Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 17123–17128, 16 out. 2012.
- PAPINI-TERZI, F. S. et al. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC genomics**, v. 10, p. 120, 21 mar. 2009.
- PARK, M.-J. et al. LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulates photoperiodic flowering via the circadian clock in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v. 16, 20 maio 2016.
- SALEM, M. A. et al. Protocol: a fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. **Plant Methods**, v. 12, 10 nov. 2016.
- SALEM, M. A. et al. RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance. **Plant Physiology**, v. 177, n. 2, p. 565–593, jun. 2018.
- SÁNCHEZ-VILLARREAL, A.; DAVIS, A. M.; DAVIS, S. J. AKIN10 activity as a cellular link between metabolism and circadian-clock entrainment in Arabidopsis thaliana. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 3, 3 abr. 2018.
- SANTCHURN, D. et al. From sugar industry to cane industry: Evaluation and simultaneous selection of different types of high biomass canes. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, 1 jan. 2013.
- SAPRE, S.; TIWARI, S.; THAKUR, V. V. Phylogenetic analysis of target of rapamycin (TOR) kinase gene of some selected plants species. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 11, p. 476–480, 25 set. 2018.
- SEKI, M. et al. Adjustment of the Arabidopsis circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8305, dez. 2017.
- SFORÇA, D. A. et al. Gene Duplication in the Sugarcane Genome: A Case Study of Allele Interactions and Evolutionary Patterns in Two Genic Regions. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.
- SHOJI, S.; TAKAHASHI, T. Environmental and agricultural significance of volcanic ash soils. **Global Environmental Research**, v. 6, 1 jan. 2002.
- SILVEIRA, L. C. I. DA et al. Genetic diversity and coefficient of kinship among potential genitors for obtaining cultivars of energy cane1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 358–368, jun. 2015.
- SILVEIRA, L. C. I. DA et al. Selection in energy cane families. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 298–306, dez. 2016.
- SMITH, A. M. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 546–558, 2008.

SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C. Quantification of starch in plant tissues. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1342–1345, ago. 2006.

SOUZA, G. M. et al. Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. **GigaScience**, v. 8, n. 12, p. giz129, 1 dez. 2019.

SOUZA, G. M.; FILHO, R. M. Industrial Biotechnology and Biomass: What Next for Brazil's Future Energy and Chemicals? **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 24–25, 15 out. 2015.

STEIN, L. R.; IMAI, S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 23, n. 9, p. 420–428, set. 2012.

SUN, L. et al. Ribosomal protein S6 kinase1 coordinates with TOR-RAPTOR2 to regulate thylakoid membrane biosynthesis in rice. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1861, n. 7, p. 639–649, jul. 2016.

SUZUKI, E. Ecesic pattern of *Saccharum spontaneum* L. on Anak Krakatau Island, Indonesia. 1984.

**Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana* - Caldana - 2013 - The Plant Journal - Wiley Online Library.** Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tbj.12080>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

TIESSEN, A.; PADILLA-CHACON, D. Subcellular compartmentation of sugar signaling: links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2013.

TURNER, B. The colonisation of Anak Krakatau: interactions between wild sugar cane, *Saccharum spontaneum*, and the antlion, *Myrmeleon frontalis*. **Journal of Tropical Ecology**, v. 8, n. 4, p. 435–449, nov. 1992.

URQUIAGA, S. et al. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR. p. 4, 2003.

VAN LEENE, J. et al. Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. **Nature Plants**, v. 5, n. 3, p. 316–327, mar. 2019.

VILELA, M. DE M. et al. Analysis of Three Sugarcane Homo/Homeologous Regions Suggests Independent Polyploidization Events of *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 266–278, 12 jan. 2017.

WACLAWOVSKY, A. J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263–276, 2010.

WANG, Y. et al. Attenuated TOR signaling lengthens circadian period in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 15, n. 2, p. 1710935, 1 fev. 2020.

WEBB, A. A. R. et al. Continuous dynamic adjustment of the plant circadian oscillator. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 550, 1 fev. 2019.

- WELBAUM, G. E.; MEINZER, F. C. Compartmentation of Solutes and Water in Developing Sugarcane Stalk Tissue. **Plant Physiology**, v. 93, n. 3, p. 1147–1153, 1 jul. 1990.
- WHITTAKER, R.; BUSH, M.; RICHARDS, K. Plant Recolonization and Vegetation Succession on the Krakatau Islands, Indonesia. **Ecological Monographs**, v. 59, p. 59–123, 1 jun. 1989.
- YANG, H. et al. Enhanced sugar accumulation and regulated plant hormone signalling genes contribute to cold tolerance in hypoploid *Saccharum spontaneum*. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 507, 22 jul. 2020a.
- YANG, M. et al. Accumulation of high-value bioproducts *in planta* can improve the economics of advanced biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 15, p. 8639–8648, 14 abr. 2020b.
- ZHANG, J. et al. Recent polyploidization events in three *Saccharum* founding species. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 1, p. 264–274, 1 jan. 2019.
- ZHANG, N. et al. Metabolite-mediated TOR signaling regulates the circadian clock in *Arabidopsis*. **PLANT BIOLOGY**, p. 3, [s.d.].
- ZHANG, Y. et al. Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. **Plant Physiology**, v. 149, n. 4, p. 1860–1871, 1 abr. 2009.
- ZHANG, Y. et al. Central clock components modulate plant shade avoidance by directly repressing transcriptional activation activity of PIF proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 6, p. 3261–3269, 11 fev. 2020.
- ALI, A. et al. Genetic diversity and population structure analysis of *Saccharum* and *Erianthus* genera using microsatellite (SSR) markers. **Scientific Reports**, v. 9, 23 jan. 2019.
- AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE. **Plant breeding reviews**. New York: Wiley, 1983.
- AMTHOR, J. S. Efficiency of Lignin Biosynthesis: a Quantitative Analysis. **Annals of Botany**, v. 91, n. 6, p. 673–695, maio 2003.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 1 ago. 2004.
- AZZOPARDI, M. et al. Mutations in the *Arabidopsis* Homolog of LST8/GβL, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days. **The Plant Cell**, v. 24, n. 2, p. 463, 1 fev. 2012.
- BAENA-GONZÁLEZ, E. et al. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. **Nature**, v. 448, n. 7156, p. 938–942, ago. 2007.
- BAENA-GONZÁLEZ, E.; HANSON, J. Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 35, p. 152–157, fev. 2017.

- BAKSHI, A. et al. Ectopic expression of Arabidopsis Target of Rapamycin (AtTOR) improves water-use efficiency and yield potential in rice. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42835, 23 fev. 2017.
- BARRETO, F. Z. Caracterização fenotípica e molecular do painel brasileiro de genótipos de cana-de-açúcar. 20 jun. 2016.
- BASSI, D.; MENOSSI, M.; MATTIELLO, L. Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2327, 2 fev. 2018.
- BELDA-PALAZÓN, B. et al. A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. **Nature Plants**, v. 6, n. 11, p. 1345–1353, nov. 2020.
- BIHMIDINE, S. et al. Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 177, 2013.
- BRASILEIRO, B. P. et al. Genetic diversity and coefficient of parentage between clones and sugarcane varieties in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9005–9018, 2014.
- BRUNKARD, J. O. et al. TOR dynamically regulates plant cell-cell transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 9, p. 5049–5058, 3 mar. 2020.
- CALDANA, C. et al. The magic “hammer” of TOR: the multiple faces of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 8, p. 2217–2225, 15 abr. 2019.
- CARVALHO-NETTO, O. V. et al. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 20, dez. 2014.
- CHANTRANUPONG, L.; WOLFSON, R. L.; SABATINI, D. M. Nutrient-sensing mechanisms across evolution. **Cell**, v. 161, n. 1, p. 67–83, 26 mar. 2015.
- CHENG, Q. et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmLHY genes alters plant height and internode length in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 562, 18 dez. 2019.
- DANIELS, J.; DANIELS, C. A. Geographical, historical and cultural aspects of the origin of the Indian and Chinese sugarcane *Saccharum barberi* and *Saccharum sinense*. **Sugarcane breeders' newsletter**, 1975.
- DANTAS, L. L. B. et al. Alternative Splicing of Circadian Clock Genes Correlates With Temperature in Field-Grown Sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 23 dez. 2019.
- DANTAS, L. L. DE B. et al. Rhythms of Transcription in Field-Grown Sugarcane Are Highly Organ Specific. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6565, dez. 2020.
- DE ABREU, L. G. F. et al. Energy cane vs sugarcane: Watching the race in plant development. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112868, 15 nov. 2020.
- DEPROST, D. et al. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. **EMBO Reports**, v. 8, n. 9, p. 864–870, set. 2007.

- D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J. C. Oligoclonal interspecific origin of "North Indian" and "Chinese" sugarcanes. **Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology**, v. 10, n. 3, p. 253–262, 2002.
- DILLON, S. L. et al. Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 975–989, out. 2007.
- DINIZ, A. L. et al. Genomic resources for energy cane breeding in the post genomics era. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1404–1414, 1 jan. 2019.
- DINIZ, A. L. et al. Amino Acid and Carbohydrate Metabolism Are Coordinated to Maintain Energetic Balance during Drought in Sugarcane. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9124, jan. 2020.
- DOBRENEL, T. et al. Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 2, p. 477–481, 22 mar. 2011.
- DOBRENEL, T. et al. TOR Signaling and Nutrient Sensing. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p. 261–285, 2016.
- DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5734, p. 630–633, 22 jul. 2005.
- DONG, P. et al. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 7 set. 2015.
- ENGANTI, R. et al. Phosphorylation of Ribosomal Protein RPS6 Integrates Light Signals and Circadian Clock Signals. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2018.
- FARRÉ, E. M.; LIU, T. The PRR family of transcriptional regulators reflects the complexity and evolution of plant circadian clocks. **Current Opinion in Plant Biology**, Cell Signalling and Gene Regulation. v. 16, n. 5, p. 621–629, 1 out. 2013.
- FERREIRA, S. S. et al. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane. **Plant Molecular Biology**, v. 91, n. 1–2, p. 15–35, maio 2016.
- FICHTNER, F. et al. Sugar and Nitrate Sensing: A Multi-Billion-Year Story. **Trends in Plant Science**, 3 dez. 2020.
- FIGUEIRA, J. DE A.; CARVALHO, P. H.; SATO, H. H. Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, p. 11, 2011.
- FIGUEROA, C. M.; LUNN, J. E. A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. **Plant Physiology**, v. 172, n. 1, p. 7–27, set. 2016.
- FORZANI, C.; MEYER, C. Exploring the nine realms of TOR. **Nature Plants**, v. 5, n. 3, p. 251–252, mar. 2019.
- FRANK, A. et al. Circadian Entrainment in Arabidopsis by the Sugar-Responsive Transcription Factor bZIP63. **Current Biology**, v. 28, n. 16, p. 2597–2606.e6, 20 ago. 2018.

- FUKUSHIMA, A. et al. Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 17, p. 7251–7256, 28 abr. 2009.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808–810, 9 fev. 2007.
- GRAF, A. et al. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9458–9463, 18 maio 2010.
- GRIVET, L. et al. A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 2, p. 009, 31 dez. 2004.
- HAYDON, M. J. et al. Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. **Nature**, v. 502, n. 7473, p. 689–692, 31 out. 2013.
- HOTTA, C. T. et al. The Biotechnology Roadmap for Sugarcane Improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 75–87, 1 jun. 2010.
- HOTTA, C. T.; JR, M. Y. N.; SOUZA, G. M. Circadian Rhythms of Sense and Antisense Transcription in Sugarcane, a Highly Polyploid Crop. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71847, 6 ago. 2013.
- INGARGIOLA, C. et al. The Plant Target of Rapamycin: A Conduc TOR of Nutrition and Metabolism in Photosynthetic Organisms. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1285, nov. 2020.
- JACOBSEN, K. R. et al. Developmental Changes in the Anatomy of the Sugarcane Stem in Relation to Phloem Unloading and Sucrose Storage. **Botanica Acta**, v. 105, n. 1, p. 70–80, 1992.
- JAISWAL, D. et al. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. **NATURE CLIMATE CHANGE**, v. 7, p. 8, 2017.
- JANSE VAN RENSBURG, H. C.; VAN DEN ENDE, W.; SIGNORELLI, S. Autophagy in Plants: Both a Puppet and a Puppet Master of Sugars. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 14, 22 jan. 2019.
- JOSSIER, M. et al. SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 59, n. 2, p. 316–328, 2009.
- KLINE, K. L. et al. Reconciling food security and bioenergy: priorities for action. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 3, p. 557–576, mar. 2017.
- KOMOR, E. The physiology of sucrose storage in sugarcane. In: GUPTA, A. K.; KAUR, N. (Eds.). . **Developments in Crop Science**. Carbohydrate Reserves in Plants. [s.l.] Elsevier, 2000. v. 26p. 35–53.
- LI, B. et al. PRR5, 7 and 9 positively modulate TOR signaling-mediated root cell proliferation by repressing TANDEM ZINC FINGER 1 in *Arabidopsis*. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 10, p. 5001–5015, 4 jun. 2019.
- LIANG, X.-G. et al. Seasonal and diurnal patterns of non-structural carbohydrates in source and sink tissues in field maize. **BMC Plant Biology**, v. 19, 21 nov. 2019.

- LIU, Y. et al. Diverse nitrogen signals activate convergent ROP2-TOR signaling in Arabidopsis. **Developmental Cell**, v. 56, n. 9, p. 1283–1295.e5, 3 maio 2021.
- MARTÍNEZ-BARAJAS, E.; COELLO, P. Review: How do SnRK1 protein kinases truly work? **Plant Science**, v. 291, p. 110330, fev. 2020.
- MARTINS, M. C. M. et al. Feedback Inhibition of Starch Degradation in Arabidopsis Leaves Mediated by Trehalose 6-Phosphate. **Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 1142–1163, 1 nov. 2013.
- MASON, P. J. et al. Variation in sugarcane biomass composition and enzymatic saccharification of leaves, internodes and roots. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 201, 9 dez. 2020.
- MATSUOKA, S. et al. Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
- MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 17, p. 1817–1829, nov. 2008.
- MCKIBBIN, R. S. et al. Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 409–418, 2006.
- MEENA, M. R. et al. Biomass potential of novel interspecific and intergeneric hybrids of *Saccharum* grown in sub-tropical climates. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21560, 9 dez. 2020.
- MOORE, P. H. Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem. **Functional Plant Biology**, v. 22, n. 4, p. 661–679, 1995.
- MOORE, P. H.; PATERSON, A. H.; TEW, T. Sugarcane: The Crop, the Plant, and Domestication. In: **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1–17.
- MUKHERJEE, S. K. Origin and Distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, v. 119, n. 1, p. 55–61, 1 set. 1957.
- NAKAHATA, Y. et al. Circadian Control of the NAD<sup>+</sup> Salvage Pathway by CLOCK-SIRT1. **Science**, v. 324, n. 5927, p. 654–657, 1 maio 2009.
- PAPINI-TERZI, F. S. et al. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC genomics**, v. 10, p. 120, 21 mar. 2009.
- PARK, M.-J. et al. LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulates photoperiodic flowering via the circadian clock in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v. 16, 20 maio 2016.
- PFÄFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509–515, 1 mar. 2004.
- SALEM, M. A. et al. Protocol: a fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. **Plant Methods**, v. 12, 10 nov. 2016.
- SALEM, M. A. et al. RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance. **Plant Physiology**, v. 177, n. 2, p. 565–593, jun. 2018.

- SÁNCHEZ-VILLARREAL, A.; DAVIS, A. M.; DAVIS, S. J. AKIN10 activity as a cellular link between metabolism and circadian-clock entrainment in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 3, 3 abr. 2018.
- SANTCHURN, D. et al. From sugar industry to cane industry: Evaluation and simultaneous selection of different types of high biomass canes. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, 1 jan. 2013.
- SAPRE, S.; TIWARI, S.; THAKUR, V. V. Phylogenetic analysis of target of rapamycin (TOR) kinase gene of some selected plants species. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 11, p. 476–480, 25 set. 2018.
- SCHEPETILNIKOV, M. et al. GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 7, p. 886–903, 3 abr. 2017.
- SEKI, M. et al. Adjustment of the *Arabidopsis* circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8305, dez. 2017.
- SHOJI, S.; TAKAHASHI, T. Environmental and agricultural significance of volcanic ash soils. **Global Environmental Research**, v. 6, 1 jan. 2002.
- SILVEIRA, L. C. I. DA et al. Genetic diversity and coefficient of kinship among potential genitors for obtaining cultivars of energy cane1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 358–368, jun. 2015.
- SILVEIRA, L. C. I. DA et al. Selection in energy cane families. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 298–306, dez. 2016.
- SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 33, 6 out. 2006.
- SMITH, A. M. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 546–558, 2008.
- SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C. Quantification of starch in plant tissues. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1342–1345, ago. 2006.
- SOUZA, G. M. et al. Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. **GigaScience**, v. 8, n. 12, p. giz129, 1 dez. 2019.
- STEIN, L. R.; IMAI, S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 23, n. 9, p. 420–428, set. 2012.
- SUZUKI, E. Ecesic pattern of *Saccharum spontaneum* L. on Anak Krakatau Island, Indonesia. 1984.
- TIESSEN, A.; PADILLA-CHACON, D. Subcellular compartmentation of sugar signaling: links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2013.
- TURNER, B. The colonisation of Anak Krakatau: interactions between wild sugar cane, *Saccharum spontaneum*, and the antlion, *Myrmeleon frontalis*. **Journal of Tropical Ecology**, v. 8, n. 4, p. 435–449, nov. 1992.

- URQUIAGA, S. et al. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR. p. 4, 2003.
- VAN LEENE, J. et al. Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. **Nature Plants**, v. 5, n. 3, p. 316–327, mar. 2019.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, p. 1–11, 1 jan. 2002.
- VILELA, M. DE M. et al. Analysis of Three Sugarcane Homo/Homeologous Regions Suggests Independent Polyploidization Events of *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 266–278, 12 jan. 2017.
- WACLAWOVSKY, A. J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263–276, 2010.
- WANG, K. et al. Two homologous *LHY* pairs negatively control soybean drought tolerance by repressing the abscisic acid responses. **New Phytologist**, v. 229, n. 5, p. 2660–2675, mar. 2021.
- WANG, Y. et al. Attenuated TOR signaling lengthens circadian period in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 15, n. 2, p. 1710935, 1 fev. 2020.
- WEBB, A. A. R. et al. Continuous dynamic adjustment of the plant circadian oscillator. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 550, 1 fev. 2019.
- WELBAUM, G. E.; MEINZER, F. C. Compartmentation of Solutes and Water in Developing Sugarcane Stalk Tissue. **Plant Physiology**, v. 93, n. 3, p. 1147–1153, 1 jul. 1990.
- WHITTAKER, R.; BUSH, M.; RICHARDS, K. Plant Recolonization and Vegetation Succession on the Krakatau Islands, Indonesia. **Ecological Monographs**, v. 59, p. 59–123, 1 jun. 1989.
- XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, 31 jan. 2012.
- YANG, M. et al. Multiple Regulatory Levels Shape Autophagy Activity in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.
- ZHANG, J. et al. Recent polyploidization events in three *Saccharum* founding species. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 1, p. 264–274, 1 jan. 2019.
- ZHANG, N. et al. Metabolite-mediated TOR signaling regulates the circadian clock in *Arabidopsis*. **PLANT BIOLOGY**, p. 3, [s.d.].
- ZHANG, Y. et al. Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. **Plant Physiology**, v. 149, n. 4, p. 1860–1871, 1 abr. 2009.
- ZHANG, Y. et al. Central clock components modulate plant shade avoidance by directly repressing transcriptional activation activity of PIF proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 6, p. 3261–3269, 11 fev. 2020.

## Figuras suplementares

## Figura suplementar 1: Variedades e dados agronômicos



28NG289

Origem	Índia
Espécie	<i>S. robustum</i>
Grupos	HF, LHY
TOR	Manhã
Peso	81,09
Perfilho	160,50
Diametro	15,49
Altura	2,56
BRIX_Lab	15,90
POL_Caldo	11,54
POL_Cana	8,64
FIBRA	20,06
TPH	8,21



SP80-3280

Origem	Brasil
Espécie	<i>S. officinarum</i>
Grupos	HS, PRR
TOR	Noturno
Peso (Kg)	133,5363
Perfilho	78,125
Diâmetro	28,7055
Altura (m)	2,810375
BRIX_Lab	21,2875
POL_Caldo	19,0992
POL_Cana	16,14001
FIBRA	12,13897
TPH	25,51768



KRAKATAU

Origem	Indonésia
Espécie	<i>S. spontaneum</i>
Grupos	HF, PRR
TOR	Noturno
Peso	173,26
Perfilho	195,63
Diametro	19,62
Altura	2,27
BRIX_Lab	18,54
POL_Caldo	14,29
POL_Cana	11,57
FIBRA	17,33
TPH	29,26



NG57-221

Origem	Nova Guiné
Espécie	<i>S. officinarum</i>
Grupos	HS, PRR
TOR	Noturno
Peso	154,2175
Perfilho	82,14286
Diametro	25,95908
Altura	2,726722
BRIX_Lab	22,2
POL_Caldo	20,01952
POL_Cana	16,67855
FIBRA	12,9417
TPH	30,47124



IN84-82

Origem	Indonésia
Espécie	<i>S. spontaneum</i>
Grupos	HF, LHY
TOR	Manhã
Peso	158,93
Perfilho	331,88
Diametro	14,74
Altura	2,83
BRIX_Lab	14,94
POL_Caldo	9,07
POL_Cana	6,81
FIBRA	21,76
TPH	12,95



IN84-105

Origem	Indonésia
Espécie	<i>S. officinarum</i>
Grupos	HS, PRR
TOR	Manhã
Peso	213,7388
Perfilho	146,5
Diametro	24,95138
Altura	2,302625
BRIX_Lab	21,25
POL_Caldo	18,57847
POL_Cana	15,65218
FIBRA	12,29347
TPH	39,51509



IN84-58

<b>Origem</b>	Indonésia
<b>Espécie</b>	<i>S. spontaneum</i>
<b>Grupos</b>	HF, LHY
<b>TOR</b>	Assíncrono
<b>Peso(kg)</b>	84,78
<b>Perfilho</b>	317,63
<b>Diâmetro(cm)</b>	11,85
<b>Altura(m)</b>	2,26
<b>BRIX_Lab</b>	14,78
<b>POL_Caldo</b>	7,88
<b>POL_Cana</b>	5,30
<b>FIBRA</b>	24,64
<b>TPH</b>	5,48



CHINA

<b>Origem</b>	China
<b>Espécie</b>	<i>S. sinense</i>
<b>Grupos</b>	HS, PRR
<b>TOR</b>	Assíncrono
<b>Peso</b>	55,89875
<b>Perfilho</b>	147,375
<b>Diametro</b>	15,68378
<b>Altura</b>	1,547375
<b>BRIX_Lab</b>	19,4875
<b>POL_Caldo</b>	16,4151
<b>POL_Cana</b>	13,11285
<b>FIBRA</b>	15,26429
<b>TPH</b>	8,679756



75//09

<b>Origem</b>	-
<b>Espécie</b>	<i>Erianthus sp.</i>
<b>Grupos</b>	HF, LHY
<b>TOR</b>	Assíncrono
<b>Peso</b>	88,15
<b>Perfilho</b>	157,75
<b>Diametro</b>	17,95
<b>Altura</b>	2,22
<b>BRIX_Lab</b>	12,51
<b>POL_Caldo</b>	6,98
<b>POL_Cana</b>	5,01
<b>FIBRA</b>	23,59
<b>TPH</b>	5,55

Figura suplementar 2: Distribuição dos acessos selecionados e seus dados agronômicos

## Análise de Componentes Principais (ACP)

Tipo de ACP: Correlação

Normalização: (n)

**Análise de Componentes Principais:**

Autovalores:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Autovalor	5,662	1,658	0,919	0,398	0,216	0,105	0,027	0,014	0,001
Variabilidade (%)	62,907	18,418	10,217	4,423	2,404	1,166	0,296	0,160	0,009
% acumulada	62,907	81,325	91,542	95,965	98,369	99,535	99,832	99,991	100,000

Cossenos quadrados das observações:

	F1	F2	F3	F4	F5
75//09 ERIANTHUS	<b>0,620</b>	0,015	0,276	0,032	0,057
75//09 ERIANTHUS	<b>0,550</b>	0,104	0,219	0,116	0,006
75//09 ERIANTHUS	<b>0,601</b>	0,041	0,289	0,034	0,025
IN84-82	<b>0,769</b>	0,184	0,024	0,011	0,000
IN84-82	<b>0,528</b>	0,386	0,057	0,001	0,010
IN84-82	<b>0,690</b>	0,103	0,005	0,002	0,190
IN84-58	<b>0,872</b>	0,007	0,000	0,001	0,067
IN84-58	<b>0,918</b>	0,038	0,027	0,009	0,002
IN84-58	<b>0,888</b>	0,075	0,001	0,015	0,017
KRAKATAU	<b>0,780</b>	0,004	0,193	0,009	0,002
KRAKATAU	<b>0,847</b>	0,015	0,041	0,069	0,021
KRAKATAU	<b>0,782</b>	0,067	0,039	0,077	0,001
CHINA	0,004	<b>0,958</b>	0,027	0,000	0,007
CHINA	0,036	<b>0,557</b>	0,045	0,013	0,332
CHINA	0,002	<b>0,934</b>	0,023	0,015	0,025
IN84-105	<b>0,641</b>	0,257	0,001	0,093	0,001
IN84-105	<b>0,829</b>	0,014	0,018	0,127	0,004
IN84-105	<b>0,666</b>	0,245	0,000	0,083	0,005
NG57-221	<b>0,845</b>	0,101	0,045	0,004	0,002
NG57-221	<b>0,843</b>	0,062	0,091	0,001	0,002
NG57-221	<b>0,753</b>	0,086	0,120	0,016	0,024
SP80-3280	<b>0,452</b>	0,039	0,411	0,023	0,025

SP80-3280	<b>0,741</b>	0,035	0,217	0,000	0,001
SP80-3280	<b>0,520</b>	0,052	0,359	0,023	0,003
28NG289	<b>0,665</b>	0,015	0,172	0,005	0,129
28NG289	<b>0,802</b>	0,006	0,094	0,000	0,042
28NG289	0,121	0,021	0,077	<b>0,566</b>	0,095
IN84-82	0,056	<b>0,576</b>	0,225	0,096	0,035
IN84-82	0,099	<b>0,609</b>	0,119	0,128	0,021
IN84-82	0,175	<b>0,666</b>	0,062	0,026	0,055
IN84-58	<b>0,657</b>	0,061	0,226	0,024	0,000
IN84-58	<b>0,587</b>	0,088	0,187	0,088	0,001
IN84-58	<b>0,710</b>	0,017	0,150	0,007	0,088
KRAKATAU	<b>0,917</b>	0,015	0,016	0,003	0,001
KRAKATAU	<b>0,814</b>	0,002	0,000	0,033	0,145
KRAKATAU	<b>0,820</b>	0,034	0,000	0,004	0,129
IN84-105	<b>0,792</b>	0,069	0,078	0,058	0,000
IN84-105	<b>0,685</b>	0,009	0,191	0,088	0,001
IN84-105	<b>0,894</b>	0,036	0,014	0,050	0,001
NG57-221	<b>0,806</b>	0,174	0,000	0,011	0,007
NG57-221	<b>0,954</b>	0,012	0,018	0,003	0,012
NG57-221	<b>0,871</b>	0,004	0,045	0,060	0,009
SP80-3280	<b>0,840</b>	0,013	0,077	0,066	0,000
SP80-3280	<b>0,750</b>	0,191	0,011	0,020	0,004
SP80-3280	<b>0,940</b>	0,045	0,001	0,003	0,006
28NG289	0,210	<b>0,333</b>	0,157	0,027	0,083
28NG289	0,002	0,230	<b>0,497</b>	0,135	0,127
28NG289	<b>0,443</b>	0,074	0,160	0,207	0,001
CHINA	0,004	<b>0,812</b>	0,176	0,001	0,004
CHINA	0,009	<b>0,936</b>	0,041	0,004	0,004
CHINA	0,007	<b>0,696</b>	0,284	0,004	0,007
75//09 ERIANTHUS	<b>0,914</b>	0,000	0,019	0,051	0,013
75//09 ERIANTHUS	<b>0,777</b>	0,031	0,004	0,168	0,008
75//09 ERIANTHUS	0,355	<b>0,511</b>	0,000	0,043	0,054

*Valores em negrito correspondem para cada observação ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior*

## Distribuição dos acessos selecionados e seus dados agronômicos

Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (CAH)

Similaridade: Coeficiente de correlação de Pearson

Método de aglomeração: Unweighted pair-group average

Resultados por classe:		
Classe	1	2
Objetos	27	27
Soma dos	27	27
Variância	3,499	5,957
Distância	0,826	1,239
Distância	1,719	2,311
Distância	2,870	3,371
75//09 ERIANT	CHINA	
75//09 ERIANT	CHINA	
75//09 ERIANT	CHINA	
	IN84-82	IN84-105
	IN84-82	IN84-105
	IN84-82	IN84-105
	IN84-58	NG57-221
	IN84-58	NG57-221
	IN84-58	NG57-221
	KRAKATAL	SP80-3280
	KRAKATAL	SP80-3280
	KRAKATAL	SP80-3280
	28NG289	28NG289
	28NG289	IN84-105
	IN84-82	IN84-105
	IN84-82	IN84-105
	IN84-82	NG57-221
	IN84-58	NG57-221
	IN84-58	NG57-221
	IN84-58	SP80-3280
	KRAKATAL	SP80-3280
	KRAKATAL	SP80-3280
	KRAKATAL	28NG289
	28NG289	28NG289
75//09 ERIANT	CHINA	
75//09 ERIANT	CHINA	
75//09 ERIANT	CHINA	

Figura suplementar 3: curva padrão de consumo indireto de hexoses.

Consumo indireto de glicose por glicose-6-fosfato desidrogenase obtido através da absorbância de luminosidade referente a oxidação de NADPH.

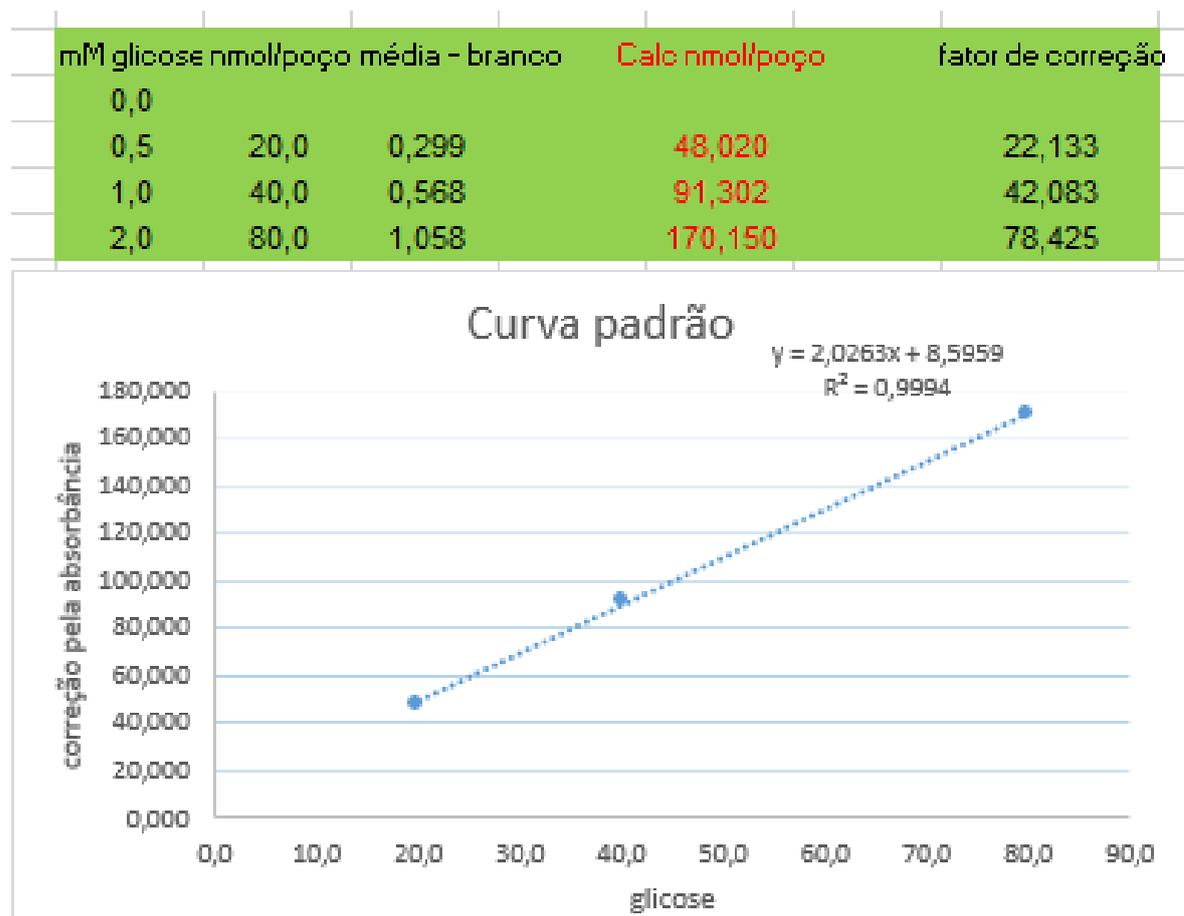


Figura suplementar 4: Lista de primers utilizados.

Primers de componentes do relógio biológico, subunidades do complexo TOR e para genes constitutivos utilizados como padrão. Em negrito os feitos por mim.

Gene	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
<b>ScTOR1</b>	CCGTCTTTACTGCCACAAT	GACCTGCTAGCTCGACCAAC
<b>ScTOR2</b>	TCATGCTCACACGGTTGTCA	TCACCAAGTTGATTGACGGC
<b>ScRAPTOR 1a</b>	CTGAGACACCTACAACCTGA	CCAGAGTTTCCCAAGGCATA
<b>ScRAPTOR 2</b>	CAAATTCCTGGAAGGCAAAA	GGAACAGACCATGAGGGAGA
<b>ScLST8</b>	CTGACAGTCATGTGGGATGG	TGCAGTTTGTGCAGAGGTTT
KIN10	CGGTAATTCCTCAAAGGATTGC	CCAGCGGTCAGGCAGAAG
ScLHY	CCACCACGGCCTAAAAGAAA	TGGTTTTGTTGACTTGTCATTTGG
ScTOC1	TTCTGCCTGAATTTGGCAAGTG	GGCATCGAGCACACCAATGC
ScPRR73	CAAGTAATTCACCCCAAATCAGAGATA	TCCCATAGATTCATCTTTATTCTCCTTAT
ScPRR59	GACCCAGTTTTCCAACCCAAT	CCCTCCGTGCTACTGTCCAA
ScPRR95	CACCGATGGCATCCCTATTC	TCTTGCCACATGGATGTTTTG
<b>TAP46</b>	TGGCAGCACAAGTTTTTCAG	CATCATCTCGGTGGTCCTTT
<b>S6k1a</b>	TTGATGAGTGCTGGACGAAC	GAACCCACAAAGTTGCTGT
<b>S6k1b</b>	TCATCAACCGATCCCATTCT	TTGGTCCCCTTCCTTTTCTT
GAPDH	CACGGCCACTGGAAGCA	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC

ATPs	GGGCAGAAGGTGTTTGATATGTC	ATCCAAAAGGCTGTTAGAATTCAAG
TUB	CGACATTGAGAGGCCCAACT	GGGAAGCAGTAAGTGATGAGATCA

Figura suplementar 5: Distribuição dos acessos pela transcrição de ScLHY e ScTOC1.

#### Análise de Componentes Principais (ACP)

Tipo de ACP: Correlação

Normalização: (n)

Cossenos quadrados das variáveis:

	F1	F2	F3
Autovalores:			
	F1	F2	F3
Autovalor	8,306	0,521	0,174
Variabilidade (%)	92,285	5,785	1,930
% acumulada	92,285	98,070	100,000
IN84-105		<b>0,966</b>	0,020
NG57-221		<b>0,988</b>	0,003
SP80-3280		<b>0,549</b>	0,450
28NG289		<b>0,993</b>	0,007
IN84-82		<b>0,975</b>	0,009
IN84-58		<b>0,990</b>	0,002
KRAKATAU		<b>0,882</b>	0,004
CHINA		<b>0,969</b>	0,021
75//09		<b>0,993</b>	0,005

Valores em negrito correspondem para cada variável ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Figura suplementar 6: Dispersão entre os acessos e transcrição dos genes PSEUDO-RESPONSE

Cossenos quadrados das observações:

	F1	F2	F3
LHY_ZT3		<b>0,994</b>	0,003
LHY_ZT12		<b>0,844</b>	0,154
TOC1_ZT3		<b>0,893</b>	0,069
TOC1_ZT12		0,104	<b>0,478</b>

Valores em negrito correspondem para cada observação ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

REGULATORS (PRR) 95, 73 e 59.

Tipo de correlação: Spearman

Matriz de correlação (Spearman (n)):

Variáveis	raptor1_ZT3	raptor1_ZT12	raptor 2_ZT3	raptor 2_ZT12	LST8_ZT3	LST8_ZT12	TOR 1_ZT3	TOR1_ZT12	TOR 2_ZT3
raptor1_ZT3	<b>1</b>	0,143	<b>0,943</b>	0,200	<b>0,943</b>	0,371	<b>0,943</b>	0,600	<b>0,886</b>
raptor1_ZT12	0,143	<b>1</b>	0,200	<b>0,829</b>	0,200	<b>0,886</b>	0,314	0,657	0,371
raptor 2_ZT3	<b>0,943</b>	0,200	<b>1</b>	0,257	<b>1,000</b>	0,314	<b>0,886</b>	0,657	<b>0,943</b>
raptor 2_ZT12	0,200	<b>0,829</b>	0,257	<b>1</b>	0,257	<b>0,886</b>	0,429	0,314	0,486
LST8_ZT3	<b>0,943</b>	0,200	<b>1,000</b>	0,257	<b>1</b>	0,314	<b>0,886</b>	0,657	<b>0,943</b>
LST8_ZT12	0,371	<b>0,886</b>	0,314	<b>0,886</b>	0,314	<b>1</b>	0,543	0,543	0,486
TOR 1_ZT3	<b>0,943</b>	0,314	<b>0,886</b>	0,429	<b>0,886</b>	0,543	<b>1</b>	0,543	<b>0,943</b>
TOR1_ZT12	0,600	0,657	0,657	0,314	0,657	0,543	0,543	<b>1</b>	0,600
TOR 2_ZT3	<b>0,886</b>	0,371	<b>0,943</b>	0,486	<b>0,943</b>	0,486	<b>0,943</b>	0,600	<b>1</b>

Os valores em negrito são diferentes de 0 com um nível de significância  $\alpha=0,05$

Análise de Componentes Principais (ACP)

Tipo de ACP: Correlação pearson

Normalização: (n)

**Análise de Componentes Principais:**

Autovalores:

	F1	F2	F3	F4	F5
Autovalor	7,866	0,738	0,272	0,103	0,021
Variabilidade (%)	87,403	8,201	3,017	1,147	0,233
% acumulada	87,403	95,603	98,620	99,767	100,000

Cossenos quadrados das variáveis:

	F1	F2	F3	F4	F5
IN84-105	<b>0,895</b>	0,081	0,004	0,018	0,002
NG57-221	<b>0,665</b>	0,303	0,008	0,023	0,001
SP80-3280	<b>0,926</b>	0,023	0,036	0,014	0,001
28NG289	<b>0,845</b>	0,034	0,112	0,008	0,000
IN84-82	<b>0,818</b>	0,145	0,035	0,001	0,000
IN84-58	<b>0,980</b>	0,000	0,016	0,004	0,000
KRAKATAU	<b>0,839</b>	0,128	0,018	0,013	0,002
CHINA	<b>0,960</b>	0,025	0,000	0,002	0,013
75//09	<b>0,938</b>	0,000	0,042	0,019	0,000

Valores em negrito correspondem para cada variável ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Cossenos quadrados das observações:

	F1	F2	F3	F4	F5
PRR5_ZT3	<b>0,950</b>	0,030	0,015	0,004	0,000
PRR5_ZT12	<b>0,930</b>	0,000	0,038	0,031	0,000
PRR7_ZT3	<b>0,731</b>	0,188	0,063	0,011	0,007
PRR7_ZT12	<b>0,902</b>	0,049	0,025	0,014	0,011
PRR9_ZT3	<b>0,938</b>	0,014	0,038	0,010	0,000
PRR9_ZT12	0,095	<b>0,870</b>	0,022	0,004	0,009

Valores em negrito correspondem para cada observação ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Figura suplementar 7: Distinção de dois grupos com base na Transcrição de genes componentes do relógio biológico.

Matriz de correlação (Spearman (n)):

Variáveis	IN84-105	NG57-221	SP80-3280	28NG289	IN84-82	IN84-58	KRAKATAU	CHINA	75//09
IN84-105	<b>1</b>	<b>0,733</b>	<b>0,855</b>	<b>0,855</b>	<b>0,915</b>	<b>0,758</b>	<b>0,782</b>	<b>0,903</b>	<b>0,697</b>
NG57-221	<b>0,733</b>	<b>1</b>	<b>0,685</b>	<b>0,770</b>	<b>0,721</b>	<b>0,697</b>	<b>0,842</b>	<b>0,806</b>	<b>0,685</b>
SP80-3280	<b>0,855</b>	<b>0,685</b>	<b>1</b>	<b>0,721</b>	<b>0,685</b>	<b>0,673</b>	<b>0,830</b>	<b>0,879</b>	0,588
28NG289	<b>0,855</b>	<b>0,770</b>	<b>0,721</b>	<b>1</b>	<b>0,927</b>	<b>0,855</b>	<b>0,782</b>	<b>0,855</b>	<b>0,818</b>
IN84-82	<b>0,915</b>	<b>0,721</b>	<b>0,685</b>	<b>0,927</b>	<b>1</b>	<b>0,903</b>	<b>0,782</b>	<b>0,842</b>	<b>0,879</b>
IN84-58	<b>0,758</b>	<b>0,697</b>	<b>0,673</b>	<b>0,855</b>	<b>0,903</b>	<b>1</b>	<b>0,879</b>	<b>0,806</b>	<b>0,988</b>
KRAKATAU	<b>0,782</b>	<b>0,842</b>	<b>0,830</b>	<b>0,782</b>	<b>0,782</b>	<b>0,879</b>	<b>1</b>	<b>0,927</b>	<b>0,867</b>
CHINA	<b>0,903</b>	<b>0,806</b>	<b>0,879</b>	<b>0,855</b>	<b>0,842</b>	<b>0,806</b>	<b>0,927</b>	<b>1</b>	<b>0,770</b>
75//09	<b>0,697</b>	<b>0,685</b>	0,588	<b>0,818</b>	<b>0,879</b>	<b>0,988</b>	<b>0,867</b>	<b>0,770</b>	<b>1</b>

Os valores em negrito são diferentes de 0 com um nível de significância  $\alpha=0,05$

Análise de Componentes Principais (ACP)

Tipo de ACP: Correlação Pearson

Normalização: (n)

**Análise de Componentes Principais:**

Autovalores:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Autovalor	7,659	0,525	0,382	0,250	0,108	0,053	0,015	0,009	0,000
Variabilidade (%)	85,097	5,829	4,244	2,774	1,197	0,591	0,170	0,095	0,001

% acumulada 85,097 90,926 95,171 97,945 99,142 99,733 99,904 99,999 100,000

Cossenos quadrados das variáveis:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
IN84-105	<b>0,898</b>	0,012	0,066	0,003	0,013	0,004	0,003	0,001	0,000
NG57-221	<b>0,832</b>	0,031	0,086	0,024	0,003	0,023	0,001	0,000	0,000
SP80-3280	<b>0,735</b>	0,109	0,022	0,123	0,007	0,003	0,000	0,000	0,000
28NG289	<b>0,869</b>	0,002	0,016	0,051	0,061	0,000	0,001	0,000	0,000
IN84-82	<b>0,877</b>	0,052	0,064	0,003	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000
IN84-58	<b>0,856</b>	0,103	0,009	0,025	0,001	0,001	0,002	0,003	0,000
KRAKATAU	<b>0,854</b>	0,010	0,109	0,002	0,006	0,019	0,001	0,000	0,000
CHINA	<b>0,891</b>	0,071	0,000	0,012	0,015	0,003	0,007	0,000	0,000
75//09	<b>0,846</b>	0,135	0,009	0,007	0,001	0,000	0,000	0,003	0,000

Valores em negrito correspondem para cada variável ao fator para o qual o cosseno quadrado é o maior

Cossenos quadrados das observações:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
LHY_ZT3	<b>0,888</b>	0,084	0,001	0,010	0,008	0,009	0,000	0,000	0,000
LHY_ZT12	<b>0,894</b>	0,002	0,007	0,088	0,003	0,006	0,000	0,000	0,000
TOC1_ZT3	<b>0,922</b>	0,060	0,001	0,000	0,010	0,003	0,002	0,001	0,000
TOC1_ZT12	0,218	<b>0,408</b>	0,208	0,075	0,021	0,057	0,012	0,001	0,000
PRR5_ZT3	<b>0,857</b>	0,008	0,087	0,036	0,007	0,005	0,000	0,000	0,000
PRR5_ZT12	<b>0,788</b>	0,143	0,002	0,000	0,052	0,008	0,003	0,004	0,000
PRR7_ZT3	<b>0,801</b>	0,045	0,127	0,005	0,010	0,003	0,005	0,003	0,000
PRR7_ZT12	<b>0,899</b>	0,082	0,012	0,001	0,000	0,000	0,005	0,001	0,000
PRR9_ZT3	<b>0,945</b>	0,004	0,003	0,028	0,017	0,001	0,000	0,001	0,000
PRR9_ZT12	0,032	0,302	<b>0,557</b>	0,056	0,035	0,013	0,005	0,000	0,000

Valores em negrito correspondem para cada observação ao fator para o qual o cosseno quadrado é o maior

Figura suplementar 8: Distribuição dos acessos em transcrição do complexo TOR

Análise de Componentes Principais (ACP)

Tipo de ACP: Correlação pearson

Normalização: (n)

**Análise de Componentes Principais:**

Autovalores:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Autovalor	6,386	1,803	0,396	0,216	0,089	0,063	0,034	0,012	0,002
Variabilidade	70,960	20,034	4,398	2,397	0,984	0,696	0,375	0,137	0,018

(%)

% acumulada	70,960	90,994	95,392	97,789	98,774	99,469	99,845	99,982	100,000
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------

Cossenos quadrados das variáveis:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
IN84-105	<b>0,789</b>	0,123	0,002	0,040	0,037	0,007	0,002	0,000	0,000
NG57-221	<b>0,828</b>	0,091	0,039	0,011	0,010	0,005	0,015	0,000	0,000
SP80-3280	<b>0,870</b>	0,080	0,024	0,000	0,001	0,023	0,001	0,001	0,001
28NG289	<b>0,688</b>	0,284	0,000	0,004	0,001	0,017	0,002	0,003	0,000
IN84-82	0,127	<b>0,782</b>	0,019	0,067	0,000	0,002	0,003	0,000	0,000
IN84-58	<b>0,796</b>	0,016	0,125	0,057	0,004	0,001	0,000	0,002	0,000
KRAKATAU	<b>0,541</b>	0,423	0,008	0,009	0,009	0,002	0,004	0,004	0,000
CHINA	<b>0,910</b>	0,004	0,062	0,012	0,004	0,001	0,004	0,003	0,000
75//09	<b>0,837</b>	0,000	0,118	0,015	0,024	0,003	0,003	0,000	0,000

Valores em negrito correspondem para cada variável ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Cossenos quadrados das observações:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
raptor1_ZT3	<b>0,519</b>	0,332	0,038	0,077	0,004	0,028	0,000	0,001	0,001
raptor1_ZT12	0,302	<b>0,628</b>	0,003	0,026	0,001	0,006	0,030	0,004	0,000
raptor 2_ZT3	<b>0,862</b>	0,109	0,002	0,007	0,019	0,000	0,001	0,001	0,000
raptor 2_ZT12	<b>0,818</b>	0,157	0,001	0,017	0,002	0,003	0,000	0,002	0,000
LST8_ZT3	<b>0,575</b>	0,358	0,048	0,004	0,001	0,009	0,004	0,000	0,000
LST8_ZT12	<b>0,787</b>	0,080	0,114	0,017	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
TOR 1_ZT3	0,210	<b>0,432</b>	0,014	0,094	0,205	0,035	0,004	0,006	0,000
TOR1_ZT12	0,079	<b>0,473</b>	0,042	0,349	0,000	0,023	0,034	0,000	0,001
TOR 2_ZT3	<b>0,753</b>	0,173	0,041	0,001	0,005	0,020	0,002	0,004	0,000
TOR 2_ZT12	<b>0,777</b>	0,113	0,101	0,002	0,002	0,004	0,001	0,001	0,000

Valores em negrito correspondem para cada observação ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

### Análise de Componentes Principais:

Autovalores:

	F1	F2	F3
Autovalor	5,890	3,026	0,565
Variabilidade (%)	58,899	30,260	5,647
% acumulada	58,899	89,159	94,806

Cossenos quadrados das variáveis:

	F1	F2	F3
raptor1_ZT3	<b>0,666</b>	0,288	0,002

raptor1_ZT12	0,401	<b>0,507</b>	0,052
raptor 2_ZT3	<b>0,733</b>	0,240	0,002
raptor 2_ZT12	<b>0,478</b>	0,451	0,010
LST8_ZT3	<b>0,763</b>	0,172	0,000
LST8_ZT12	<b>0,478</b>	0,351	0,003
TOR 1_ZT3	<b>0,892</b>	0,042	0,049
TOR1_ZT12	<b>0,674</b>	0,092	0,197
TOR 2_ZT3	<b>0,765</b>	0,143	0,051
TOR 2_ZT12	0,039	<b>0,740</b>	0,199

Valores em negrito correspondem para cada variável ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Cossenos quadrados das observações:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
IN84-105	<b>0,853</b>	0,043	0,094	0,007	0,001	0,001	0,000	0,000
NG57-221	0,002	<b>0,573</b>	0,222	0,039	0,143	0,001	0,020	0,000
SP80-3280	0,259	<b>0,500</b>	0,002	0,147	0,028	0,057	0,003	0,002
28NG289	0,229	<b>0,634</b>	0,037	0,041	0,024	0,007	0,028	0,000
IN84-82	0,409	<b>0,552</b>	0,037	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000
IN84-58	<b>0,917</b>	0,018	0,001	0,049	0,000	0,014	0,000	0,000
KRAKATAU	0,052	<b>0,772</b>	0,084	0,056	0,022	0,014	0,000	0,000
CHINA	<b>0,496</b>	0,135	0,000	0,294	0,001	0,009	0,053	0,011
75//09	<b>0,878</b>	0,040	0,059	0,002	0,003	0,012	0,004	0,001

Valores em negrito correspondem para cada observação ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Figura suplementar 9: - Dispersão dos acessos com dados de transcrição gênica do relógio biológico e sensores energéticos.

#### Análise de Componentes Principais (ACP)

Tipo de ACP: Correlação Pearson

Normalização: (n)

#### Análise de Componentes Principais:

Autovalores:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Autovalor	6,593	0,939	0,482	0,287	0,232	0,181	0,130	0,088	0,069
Variabilidade (%)	73,253	10,435	5,352	3,190	2,580	2,006	1,446	0,974	0,764
% acumulada	73,253	83,688	89,040	92,230	94,810	96,816	98,263	99,236	100,000

Cossenos quadrados das variáveis:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
IN84-105	<b>0,656</b>	0,195	0,063	0,000	0,054	0,013	0,000	0,007	0,012
NG57-221	<b>0,805</b>	0,058	0,016	0,041	0,037	0,005	0,011	0,004	0,022
SP80-3280	<b>0,774</b>	0,032	0,039	0,055	0,027	0,064	0,000	0,008	0,001
28NG289	<b>0,764</b>	0,085	0,012	0,047	0,049	0,002	0,025	0,014	0,002
IN84-82	<b>0,567</b>	0,354	0,022	0,022	0,000	0,000	0,001	0,031	0,004
IN84-58	<b>0,787</b>	0,007	0,082	0,054	0,008	0,030	0,012	0,019	0,000
KRAKATAU	<b>0,758</b>	0,113	0,036	0,026	0,005	0,028	0,012	0,000	0,023
CHINA	<b>0,833</b>	0,007	0,027	0,011	0,040	0,011	0,069	0,000	0,000
75//09	<b>0,647</b>	0,089	0,185	0,030	0,012	0,028	0,001	0,004	0,004

Valores em negrito correspondem para cada variável ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Cossenos quadrados das observações:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
KIN10_ZT3	<b>0,602</b>	0,341	0,004	0,006	0,016	0,000	0,001	0,006	0,025
KIN10_ZT12	<b>0,808</b>	0,032	0,109	0,025	0,010	0,002	0,000	0,012	0,002
raptor1_ZT3	<b>0,636</b>	0,305	0,023	0,000	0,006	0,003	0,019	0,001	0,008
raptor1_ZT12	<b>0,716</b>	0,093	0,090	0,040	0,019	0,002	0,032	0,002	0,006
raptor 2_ZT3	<b>0,840</b>	0,126	0,003	0,005	0,003	0,012	0,001	0,009	0,001
raptor 2_ZT12	<b>0,911</b>	0,013	0,025	0,000	0,018	0,004	0,022	0,007	0,000
LST8_ZT3	0,211	<b>0,631</b>	0,028	0,066	0,036	0,015	0,004	0,009	0,002
LST8_ZT12	0,390	0,061	<b>0,447</b>	0,090	0,000	0,001	0,005	0,004	0,003
TOR 1_ZT3	<b>0,533</b>	0,348	0,015	0,011	0,043	0,037	0,002	0,009	0,004
TOR1_ZT12	<b>0,626</b>	0,025	0,111	0,128	0,028	0,000	0,020	0,023	0,040
TOR 2_ZT3	0,326	<b>0,447</b>	0,021	0,043	0,000	0,037	0,030	0,008	0,088
TOR 2_ZT12	<b>0,427</b>	0,211	0,005	0,055	0,129	0,013	0,012	0,131	0,017
PRR5_ZT3	<b>0,751</b>	0,107	0,001	0,001	0,013	0,007	0,053	0,001	0,066
PRR5_ZT12	<b>0,446</b>	0,101	0,211	0,024	0,049	0,070	0,008	0,011	0,079
PRR7_ZT3	<b>0,903</b>	0,046	0,024	0,005	0,012	0,007	0,000	0,000	0,003
PRR7_ZT12	<b>0,954</b>	0,004	0,032	0,004	0,003	0,000	0,002	0,001	0,000
PRR9_ZT3	<b>0,956</b>	0,002	0,000	0,004	0,024	0,000	0,010	0,005	0,000
PRR9_ZT12	<b>0,434</b>	0,198	0,104	0,173	0,060	0,006	0,000	0,000	0,025
TAP46_ZT3	0,306	<b>0,544</b>	0,043	0,034	0,004	0,020	0,014	0,013	0,023
TAP46_ZT12	0,047	0,270	0,009	0,009	<b>0,506</b>	0,011	0,006	0,132	0,010
S6k1.1_ZT3	0,132	<b>0,305</b>	0,014	0,278	0,009	0,170	0,078	0,011	0,002
S6k1.1_ZT12	<b>0,305</b>	0,026	0,047	0,048	0,298	0,196	0,012	0,061	0,006
S6k1.2_ZT3	0,293	<b>0,435</b>	0,041	0,053	0,014	0,114	0,016	0,016	0,019
S6k1.2_ZT12	0,096	<b>0,358</b>	0,341	0,073	0,009	0,021	0,053	0,032	0,017
LHY_ZT3	<b>0,917</b>	0,020	0,045	0,006	0,005	0,000	0,006	0,001	0,000
LHY_ZT12	<b>0,682</b>	0,121	0,021	0,020	0,047	0,093	0,008	0,006	0,002
TOC1_ZT3	<b>0,762</b>	0,000	0,104	0,067	0,004	0,002	0,053	0,006	0,003
TOC1_ZT12	0,061	0,034	0,314	<b>0,325</b>	0,020	0,145	0,038	0,044	0,020

Valores em negrito correspondem para cada observação ao fator para o qual o coseno quadrado é o maior

Figura suplementar 10: - Representação numérica das correlações testadas entre os transcritos de relógio biológico e sensores energéticos nos grupos contrastantes.



## Grupo LHY.

Variáveis	KIN10_ZT3	raptor1_ZT3	raptor2_ZT3	LST8_ZT3	TOR1_ZT3	TOR2_ZT3	PRR5_ZT3	PRR7_ZT3	PRR9_ZT3	TAP46_ZT3	S6b_ZT3	S6a_ZT3	LHY_ZT3	TOC1_ZT3	KIN10_ZT12	raptor1_ZT12	raptor2_ZT12	LST8_ZT12	TOR_ZT12	TOR2_ZT12	PRR5_ZT12	PRR7_ZT12	PRR9_ZT12	TAP46_ZT12	S6b_ZT12	S6a_ZT12	Lhy_ZT12	TOC1_ZT12
KIN10_ZT3	1	1,000	0,700	0,600	1,000	0,700	0,600	0,700	1,000	0,900	0,900	0,600	0,300	0,800	0,100	0,300	0,800	0,700	0,300	0,700	0,700	0,200	-0,400	-0,300	-0,700	0,100	-0,700	
raptor1_ZT3	1,000	1	0,700	0,600	1,000	0,700	0,600	0,700	1,000	0,900	0,900	0,600	0,300	0,800	0,100	0,300	0,800	0,700	0,300	0,700	0,700	0,200	-0,400	-0,300	-0,700	0,100	-0,700	
raptor2_ZT3	0,700	0,700	1	0,900	0,700	1,000	0,900	0,300	0,700	0,600	0,600	0,900	0,700	0,800	0,100	0,300	0,700	0,700	0,300	0,200	0,300	0,700	0,100	0,000	-0,700	0,500	-1,000	
LST8_ZT3	0,600	0,600	0,900	1	0,600	0,900	1,000	0,500	0,600	0,700	0,700	1,000	0,500	0,600	-0,300	-0,100	0,400	0,900	-0,100	0,100	0,100	0,600	-0,200	-0,100	-0,900	0,700	-0,900	
TOR1_ZT3	1,000	1,000	0,700	0,600	1	0,700	0,600	0,700	1,000	0,900	0,900	0,600	0,300	0,800	0,100	0,300	0,800	0,700	0,300	0,700	0,700	0,200	-0,400	-0,300	-0,700	0,100	-0,700	
TOR2_ZT3	0,700	0,700	1,000	0,900	0,700	1	0,900	0,300	0,700	0,600	0,600	0,900	0,700	0,800	0,100	0,300	0,700	0,700	0,300	0,200	0,300	0,700	0,100	0,000	-0,700	0,500	-1,000	
PRR5_ZT3	0,600	0,600	0,900	1,000	0,600	0,900	1	0,500	0,600	0,700	0,700	1,000	0,500	0,600	-0,300	-0,100	0,400	0,900	-0,100	0,100	0,100	0,600	-0,200	-0,100	-0,900	0,700	-0,900	
PRR7_ZT3	0,700	0,700	0,300	0,500	0,700	0,300	0,500	1	0,700	0,900	0,900	0,500	0,000	0,200	-0,600	-0,200	0,300	0,800	-0,200	0,700	0,200	-0,300	-0,900	-0,700	-0,800	0,400	-0,300	
PRR9_ZT3	1,000	1,000	0,700	0,600	1,000	0,700	0,600	0,700	1	0,900	0,900	0,600	0,300	0,800	0,100	0,300	0,800	0,700	0,300	0,700	0,700	0,200	-0,400	-0,300	-0,700	0,100	-0,700	
TAP46_ZT3	0,900	0,900	0,600	0,700	0,900	0,600	0,700	0,900	0,900	1	1,000	0,700	0,100	0,600	-0,300	-0,100	0,500	0,900	-0,100	0,600	0,500	0,100	-0,700	-0,400	-0,900	0,300	-0,600	
S6b_ZT3	0,900	0,900	0,600	0,700	0,900	0,600	0,700	0,900	0,900	1,000	1	0,700	0,100	0,600	-0,300	-0,100	0,500	0,900	-0,100	0,600	0,500	0,100	-0,700	-0,400	-0,900	0,300	-0,600	
S6a_ZT3	0,600	0,600	0,900	1,000	0,600	0,900	1,000	0,500	0,600	0,700	0,700	1	0,500	0,600	-0,300	-0,100	0,400	0,900	-0,100	0,100	0,100	0,600	-0,200	-0,100	-0,900	0,700	-0,900	
LHY_ZT3	0,300	0,300	0,700	0,500	0,300	0,700	0,500	0,000	0,300	0,100	0,100	0,500	1	0,300	0,100	0,700	0,700	0,200	0,700	0,300	-0,200	0,300	0,400	-0,300	-0,200	0,600	-0,700	
TOC1_ZT3	0,800	0,800	0,800	0,600	0,800	0,800	0,600	0,200	0,800	0,600	0,600	0,600	0,300	1	0,500	0,300	0,700	0,500	0,300	0,200	0,800	0,700	0,100	0,300	-0,500	-0,100	-0,800	
KIN10_ZT12	0,100	0,100	0,100	-0,300	0,100	0,100	-0,300	-0,600	0,100	-0,300	-0,300	-0,300	0,100	0,500	1	0,600	0,400	-0,500	0,600	-0,100	0,600	0,400	0,700	0,600	0,500	-0,700	-0,100	
raptor1_ZT12	0,300	0,300	0,300	-0,100	0,300	0,300	-0,100	-0,200	0,300	-0,100	-0,100	-0,100	0,700	0,300	0,600	1	0,800	-0,300	1,000	0,500	0,200	0,000	0,500	-0,200	0,300	-0,100	-0,300	
raptor2_ZT12	0,800	0,800	0,700	0,400	0,800	0,700	0,400	0,300	0,800	0,500	0,500	0,400	0,700	0,700	0,400	0,800	1	0,300	0,800	0,700	0,500	0,200	0,100	-0,300	-0,300	0,100	-0,700	
LST8_ZT12	0,700	0,700	0,700	0,900	0,700	0,700	0,900	0,800	0,700	0,900	0,900	0,900	0,200	0,500	-0,500	-0,300	0,300	1	-0,300	0,300	0,200	0,300	-0,600	-0,300	-1,000	0,600	-0,700	
TOR_ZT12	0,300	0,300	0,300	-0,100	0,300	0,300	-0,100	-0,200	0,300	-0,100	-0,100	-0,100	0,700	0,300	0,600	1,000	0,800	-0,300	1	0,500	0,200	0,000	0,500	-0,200	0,300	-0,100	-0,300	
TOR2_ZT12	0,700	0,700	0,200	0,100	0,700	0,200	0,100	0,700	0,700	0,600	0,600	0,100	0,300	0,200	-0,100	0,500	0,700	0,300	0,500	1	0,300	-0,500	-0,500	-0,800	-0,300	0,100	-0,200	
PRR5_ZT12	0,700	0,700	0,300	0,100	0,700	0,300	0,100	0,200	0,700	0,500	0,500	0,100	-0,200	0,800	0,600	0,200	0,500	0,200	0,200	0,300	1	0,300	-0,100	0,300	-0,200	-0,600	-0,300	
PRR7_ZT12	0,200	0,200	0,700	0,600	0,200	0,700	0,600	-0,300	0,200	0,100	0,100	0,600	0,300	0,700	0,400	0,000	0,200	0,300	0,000	-0,500	0,300	1	0,500	0,700	-0,300	0,100	-0,700	
PRR9_ZT12	-0,400	-0,400	0,100	-0,200	-0,400	0,100	-0,200	-0,900	-0,400	-0,700	-0,700	-0,200	0,400	0,100	0,700	0,500	0,100	-0,600	0,500	-0,500	-0,100	0,500	1	0,600	0,600	-0,200	-0,100	
TAP46_ZT12	-0,300	-0,300	0,000	-0,100	-0,300	0,000	-0,100	-0,700	-0,300	-0,400	-0,400	-0,100	-0,300	0,300	0,600	-0,200	-0,300	-0,300	-0,200	-0,800	0,300	0,700	0,600	1	0,300	-0,500	0,000	
S6b_ZT12	-0,700	-0,700	-0,700	-0,900	-0,700	-0,700	-0,900	-0,800	-0,700	-0,900	-0,900	-0,200	-0,500	0,500	0,300	-0,300	-1,000	0,300	-0,300	-0,200	-0,300	0,600	0,300	1	-0,600	0,700		
S6a_ZT12	0,100	0,100	0,500	0,700	0,100	0,500	0,700	0,400	0,100	0,300	0,300	0,700	0,600	-0,100	-0,700	-0,100	0,100	0,600	-0,100	0,100	-0,600	0,100	-0,200	-0,500	-0,600	1	-0,500	
Lhy_ZT12	-0,700	-0,700	-1,000	-0,900	-0,700	-1,000	-0,900	-0,300	-0,700	-0,600	-0,600	-0,900	-0,700	-0,800	-0,100	-0,300	-0,700	-0,700	-0,300	-0,200	-0,300	-0,700	-0,100	0,000	0,700	-0,500	1	
TOC1_ZT12	-0,100	-0,100	0,100	-0,300	-0,100	0,100	-0,300	-0,600	-0,100	-0,500	-0,500	-0,300	0,600	0,100	0,700	0,900	0,500	-0,600	0,900	0,100	0,000	0,100	0,800	0,100	0,600	-0,200	-0,100	

Variáveis	Perfilho	Diametro	Altura	BRIX_Lab	POL_Cald	POL_Can	FIBRA	Peso	Amido_ZT3	Amido_ZT7	Amido_ZT12	Amido_ZT27
KIN10_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
raptor1_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
raptor2_ZT3	0,160	0,040	0,640	0,360	0,360	0,360	0,640	0,160	0,640	0,040	0,160	0,640
LST8_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
TOR1_ZT3	0,160	0,040	0,640	0,360	0,360	0,360	0,640	0,160	0,640	0,040	0,160	0,640
TOR2_ZT3	0,160	0,040	0,640	0,360	0,360	0,360	0,640	0,160	0,640	0,040	0,160	0,640
PRR5_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
PRR7_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
PRR9_ZT3	0,640	0,360	0,160	0,040	0,040	0,040	0,160	0,640	0,160	0,360	0,640	0,160
TAP46_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
S6b_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
S6a_ZT3	0,040	0,160	0,160	0,000	0,000	0,000	0,160	0,640	1,000	0,160	0,040	1,000
LHY_ZT3	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
TOC1_ZT3	0,640	0,360	0,160	0,040	0,040	0,040	0,160	0,640	0,160	0,360	0,640	0,160
KIN10_ZT12	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
raptor1_ZT12	1,000	0,640	0,640	0,160	0,160	0,160	0,000	0,160	0,040	0,640	1,000	0,040
raptor2_ZT12	0,000	0,160	0,360	0,640	0,640	0,640	1,000	0,040	0,160	0,160	0,000	0,160
LST8_ZT12	0,160	0,040	0,640	0,360	0,360	0,360	0,640	0,160	0,640	0,040	0,160	0,640
TOR_ZT12	1,000	0,640	0,640	0,160	0,160	0,160	0,000	0,160	0,040	0,640	1,000	0,040
TOR2_ZT12	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
PRR5_ZT12	0,640	0,160	1,000	0,640	0,640	0,640	0,360	0,040	0,160	0,160	0,640	0,160
PRR7_ZT12	1,000	0,640	0,640	0,160	0,160	0,160	0,000	0,160	0,040	0,640	1,000	0,040
PRR9_ZT12	0,640	0,360	0,160	0,040	0,040	0,040	0,160	0,640	0,160	0,360	0,640	0,160
TAP46_ZT12	0,160	0,040	0,640	0,360	0,360	0,360	0,640	0,160	0,640	0,040	0,160	0,640
S6b_ZT12	0,640	0,360	0,160	0,040	0,040	0,040	0,160	0,640	0,160	0,360	0,640	0,160
S6a_ZT12	0,000	0,160	0,360	0,640	0,640	0,640	1,000	0,040	0,160	0,160	0,000	0,160
Lhy_ZT12	0,360	0,640	0,000	0,160	0,160	0,160	0,640	0,160	0,040	0,640	0,360	0,040
TOC1_ZT12	0,640	0,360	0,160	0,040	0,040	0,040	0,160	0,640	0,160	0,360	0,640	0,160

Variáveis	KIN10_ZT 3	raptor1_Z T3	raptor 2_ZT3	LST8_ZT3	TOR 1_ZT3	TOR 2_ZT3	PRR5_ZT3	PRR7_ZT3	PRR9_ZT3	TAP46_ZT 3	S6b_ZT3	S6a_ZT3	LHY_ZT3	TOC1_ZT 3	KIN10_ZT 12	raptor1_Z T12	raptor 2_ZT12	LST8_ZT1 2	TOR_ZT1 2	TOR 2_ZT12	PRR5_ZT1 2	PRR7_ZT1 2	PRR9_ZT1 2	TAP46_ZT 12	S6b _ZT12	S6a_ZT12	Lhy_ZT12	T
KIN10_ZT:	1	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
raptor1_Z:	1,000	1	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
raptor2_Z:	0,640	0,640	1	0,640	1,000	1,000	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,160	0,640	0,640	1,000	0,160	0,640	0,640	0,160	0,040	1,000	0,040	0,640	0,160	
LST8_ZT3:	1,000	1,000	0,640	1	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
TOR1_ZT3:	0,640	0,640	1,000	0,640	1	1,000	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,160	0,640	0,640	1,000	0,160	0,640	0,640	0,160	0,040	1,000	0,040	0,640	0,160	
TOR2_ZT3:	0,640	0,640	1,000	0,640	1,000	1	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,160	0,640	0,640	1,000	0,160	0,640	0,640	0,160	0,040	1,000	0,040	0,640	0,160	
PRR5_ZT3:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
PRR7_ZT3:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
PRR9_ZT3:	0,160	0,160	0,040	0,160	0,040	0,040	0,160	0,160	1	0,160	0,160	0,160	0,160	1,000	0,160	0,640	0,160	0,040	0,640	0,160	0,160	0,640	1,000	0,040	1,000	0,160	0,640	
TAP46_ZT:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
S6b_ZT3:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
S6a_ZT3:	0,160	0,160	0,640	0,160	0,640	0,640	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160	1	0,160	0,160	0,160	0,040	0,160	0,640	0,040	0,160	0,160	0,040	0,160	0,640	0,160	0,160	0,040	
LHY_ZT3:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
TOC1_ZT3:	0,160	0,160	0,040	0,160	0,040	0,040	0,160	0,160	1,000	0,160	0,160	0,160	0,160	1	0,160	0,640	0,160	0,040	0,640	0,160	0,160	0,640	1,000	0,040	1,000	0,160	0,640	
KIN10_ZT1:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
raptor1_Z:	0,640	0,640	0,160	0,640	0,160	0,160	0,640	0,640	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	1	0,000	0,160	1,000	0,640	0,640	1,000	0,640	0,160	0,640	0,000	0,360	
raptor2_Z:	0,360	0,360	0,640	0,360	0,640	0,640	0,360	0,360	0,160	0,360	0,360	0,160	0,360	0,160	0,360	0,000	1	0,640	0,000	0,360	0,360	0,000	0,160	0,640	0,160	1,000	0,640	
LST8_ZT12:	0,640	0,640	1,000	0,640	1,000	1,000	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,160	0,640	1	0,160	0,640	0,640	1,000	0,640	0,160	0,040	1,000	0,040	0,640	0,160
TOR_ZT12:	0,640	0,640	0,160	0,640	0,160	0,160	0,640	0,640	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	1,000	0,000	0,160	1	0,640	0,640	1,000	0,640	0,160	0,640	0,000	0,360	
TOR2_ZT1:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1	1,000	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
PRR5_ZT1:	1,000	1,000	0,640	1,000	0,640	0,640	1,000	1,000	0,160	1,000	1,000	0,160	1,000	0,160	1,000	0,640	0,360	0,640	0,640	1,000	1	0,640	0,160	0,640	0,160	0,360	0,000	
PRR7_ZT1:	0,640	0,640	0,160	0,640	0,160	0,160	0,640	0,640	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	1,000	0,000	0,160	1,000	0,640	0,640	1	0,640	0,160	0,640	0,000	0,360	
PRR9_ZT1:	0,160	0,160	0,040	0,160	0,040	0,040	0,160	0,160	1,000	0,160	0,160	0,160	0,160	1,000	0,160	0,640	0,160	0,040	0,640	0,160	0,160	0,640	1	0,040	1,000	0,160	0,640	
TAP46_ZT:	0,640	0,640	1,000	0,640	1,000	1,000	0,640	0,640	0,040	0,640	0,640	0,640	0,040	0,640	0,160	0,640	0,640	1,000	0,160	0,640	0,640	0,160	0,040	1	0,040	0,640	0,160	
S6b_ZT12:	0,160	0,160	0,040	0,160	0,040	0,040	0,160	0,160	1,000	0,160	0,160	0,160	0,160	1,000	0,160	0,640	0,160	0,040	0,640	0,160	0,160	0,640	1,000	0,040	1	0,160	0,640	
S6a_ZT12:	0,360	0,360	0,640	0,360	0,640	0,640	0,360	0,360	0,160	0,360	0,360	0,160	0,360	0,160	0,360	0,000	1,000	0,640	0,000	0,360	0,360	0,000	0,160	0,640	0,160	1	0,640	
Lhy_ZT12:	0,000	0,000	0,160	0,000	0,160	0,160	0,000	0,000	0,640	0,000	0,000	0,040	0,000	0,640	0,000	0,360	0,640	0,160	0,360	0,000	0,000	0,360	0,640	0,160	0,640	0,640	1	
TOC1_ZT1:	0,160	0,160	0,040	0,160	0,040	0,040	0,160	0,160	1,000	0,160	0,160	0,160	0,160	1,000	0,160	0,640	0,160	0,040	0,640	0,160	0,160	0,640	1,000	0,040	1,000	0,160	0,640	

Grupo PRR.

Variáveis	KIN10_ZT3	raptor1_ZT3	raptor2_ZT3	LST8_ZT3	TOR1_ZT3	TOR2_ZT3	PRR5_ZT3	PRR7_ZT3	PRR9_ZT3	TAP46_ZT3	S6b_ZT3	S6a_ZT3	LHY_ZT3	TOC1_ZT3	KIN10_ZT12	raptor1_ZT12	raptor2_ZT12	LST8_ZT2	TOR_ZT2	TOR_ZT12	PRR5_ZT2	PRR7_ZT2	PRR9_ZT2	TAP46_ZT12	S6b_ZT12	S6a_ZT12	Lhy_ZT12	TOC1_ZT12	
KIN10_ZT3	0,083333	0,083	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,333	0,083	0,083	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083	0,750	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,083	0,917	0,333	0,917	
raptor1_ZT3	0,083	0,083333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,333	0,083	0,083	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083	0,750	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,083	0,917	0,333	0,917	
raptor2_ZT3	0,333	0,333	0,083333	0,083	0,333	0,083	0,083	0,750	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,417	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,083	0,750	
LST8_ZT3	0,333	0,333	0,083	0,083333	0,333	0,083	0,083	0,750	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,417	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,083	0,750	
TOR1_ZT3	0,083	0,083	0,333	0,333	0,083333	0,333	0,333	0,333	0,083	0,083	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083	0,750	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,083	0,917	0,333	0,917	
TOR2_ZT3	0,333	0,333	0,083	0,083	0,333	0,083333	0,083	0,750	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,417	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,083	0,750	
PRR5_ZT3	0,333	0,333	0,083	0,083	0,333	0,083	0,083333	0,750	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,417	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,083	0,750	
PRR7_ZT3	0,333	0,333	0,750	0,750	0,333	0,750	0,750	0,083333	0,333	0,333	0,333	0,750	0,917	1,000	0,417	0,917	0,750	0,333	0,917	0,083	0,750	0,417	0,333	0,333	0,333	0,750	0,750	0,750	0,750
PRR9_ZT3	0,083	0,083	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,083333	0,083	0,083	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083	0,750	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,083	0,917	0,333	0,917	
TAP46_ZT3	0,083	0,083	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,083	0,083333	0,083	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083	0,750	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,083	0,917	0,333	0,917	
S6b_ZT3	0,083	0,083	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,083	0,083	0,083333	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083	0,750	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,083	0,917	0,333	0,917	
S6a_ZT3	0,333	0,333	0,083	0,083	0,333	0,083	0,083	0,750	0,333	0,333	0,083333	0,083333	0,333	0,333	0,750	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,417	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,083	0,750	
LHY_ZT3	0,750	0,750	0,333	0,333	0,750	0,333	0,333	0,917	0,750	0,750	0,750	0,333	0,750	0,333	0,083333	0,750	0,917	0,083	0,333	0,750	0,083	1,000	0,917	0,750	0,750	0,333	0,333	0,333	0,333
TOC1_ZT3	0,417	0,417	0,333	0,333	0,417	0,333	0,333	1,000	0,417	0,417	0,417	0,333	0,750	0,083333	0,333	0,750	0,333	0,417	0,750	1,000	0,333	0,333	0,750	0,750	0,417	0,917	0,333	0,917	
KIN10_ZT1	1,000	1,000	0,750	0,750	1,000	0,750	0,750	0,417	1,000	1,000	1,000	0,750	0,917	0,333	0,083333	0,917	0,333	0,083333	0,917	1,000	0,917	0,417	0,417	0,750	0,083	0,917	0,333	0,333	0,333
raptor1_ZT1	0,750	0,750	0,333	0,333	0,750	0,333	0,333	0,917	0,750	0,750	0,750	0,333	0,083	0,750	0,917	0,083333	0,333	0,750	0,083	0,917	1,000	0,917	0,750	0,750	0,750	0,333	0,333	0,333	0,333
raptor2_ZT1	0,333	0,333	0,083	0,083	0,333	0,083	0,083	0,750	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,333	0,083333	0,333	0,333	0,750	0,417	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,083	0,750	
LST8_ZT12	0,083	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083333	0,750	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,750
TOR_ZT12	0,750	0,750	0,333	0,333	0,750	0,333	0,333	0,917	0,750	0,750	0,750	0,333	0,083	0,750	0,917	0,083	0,333	0,750	0,083333	0,917	1,000	0,917	0,750	0,750	0,750	0,333	0,333	0,333	0,333
TOR2_ZT12	0,333	0,333	0,750	0,750	0,333	0,750	0,750	0,083	0,333	0,333	0,333	0,750	0,917	1,000	0,417	0,917	0,750	0,333	0,917	0,083333	0,750	0,417	0,333	0,333	0,333	0,750	0,750	0,750	0,750
PRR5_ZT12	0,333	0,333	0,417	0,417	0,333	0,417	0,417	0,750	0,333	0,333	0,333	0,417	1,000	0,333	0,750	1,000	0,417	0,333	1,000	0,750	0,083333	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,417	0,750	
PRR7_ZT12	1,000	1,000	0,750	0,750	1,000	0,750	0,750	0,417	1,000	1,000	1,000	0,750	0,917	0,333	0,083	0,917	0,750	1,000	0,917	0,417	0,750	0,083333	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,750	
PRR9_ZT12	0,750	0,750	0,917	0,917	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,750	0,750	0,917	0,750	0,750	0,333	0,750	0,917	0,750	0,333	0,917	0,750	0,333	0,083333	0,417	0,750	1,000	0,917	0,333	
TAP46_ZT12	0,750	0,750	0,917	0,917	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,750	0,750	0,917	0,750	0,750	0,333	0,750	0,917	0,750	0,333	0,917	0,333	0,417	0,083333	0,750	0,333	0,917	1,000		
S6b_ZT12	0,083	0,083	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,083	0,083	0,083	0,333	0,750	0,417	1,000	0,750	0,333	0,083	0,750	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,083333	0,917	0,333	0,917	1,000	
S6a_ZT12	0,917	0,917	0,750	0,750	0,917	0,750	0,750	0,417	0,917	0,917	0,750	0,333	0,917	0,333	0,750	0,333	0,917	0,333	0,750	0,750	1,000	0,333	0,333	0,917	0,083333	0,917	0,333	0,917	
Lhy_ZT12	0,333	0,333	0,083	0,083	0,333	0,083	0,083	0,750	0,333	0,333	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,333	0,083	0,333	0,333	0,750	0,417	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,083333	0,750	
TOC1_ZT12	0,917	0,917	0,750	0,750	0,917	0,750	0,750	0,417	0,917	0,917	0,917	0,750	0,333	0,917	0,750	0,333	0,917	0,750	0,333	0,917	0,750	0,333	1,000	0,917	0,417	0,750	0,083333	0,083333	
Perfilho	0,417	0,417	0,333	0,333	0,417	0,333	0,333	1,000	0,417	0,417	0,417	0,333	0,750	0,083	0,333	0,750	0,333	0,417	0,750	1,000	0,333	0,333	0,750	0,750	0,417	0,917	0,333	0,917	
Diametro	0,417	0,417	0,333	0,333	0,417	0,333	0,333	1,000	0,417	0,417	0,417	0,333	0,750	0,083	0,333	0,750	0,333	0,417	0,750	1,000	0,333	0,333	0,750	0,750	0,417	0,917	0,333	0,917	
Altura	0,417	0,417	0,333	0,333	0,417	0,333	0,333	1,000	0,417	0,417	0,417	0,333	0,750	0,083	0,333	0,750	0,333	0,417	0,750	1,000	0,333	0,333	0,750	0,750	0,417	0,917	0,333	0,917	
BRIX_Lab	0,333	0,333	0,417	0,417	0,333	0,417	0,417	0,750	0,333	0,333	0,333	0,417	1,000	0,333	0,750	1,000	0,417	0,333	1,000	0,750	0,083	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,417	0,750	
POL_Caldi	0,333	0,333	0,417	0,417	0,333	0,417	0,417	0,750	0,333	0,333	0,333	0,417	1,000	0,333	0,750	1,000	0,417	0,333	1,000	0,750	0,083	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,417	0,750	
POL_Cana	0,333	0,333	0,417	0,417	0,333	0,417	0,417	0,750	0,333	0,333	0,333	0,417	1,000	0,333	0,750	1,000	0,417	0,333	1,000	0,750	0,083	0,750	0,917	0,917	0,333	0,750	0,417	0,750	
FIBRA	1,000	1,000	0,750	0,750	1,000	0,750	0,750	0,417	1,000	1,000	1,000	0,750	0,917	0,333	0,083	0,917	0,750	1,000	0,917	0,417	0,750	0,083	0,333	0,333	1,000	0,750	0,750	0,750	
Peso	0,917	0,917	0,750	0,750	0,917	0,750	0,750	0,417	0,917	0,917	0,917	0,750	0,333	0,917	0,750	0,333	0,917	0,750	0,333	0,917	0,750	0,333	1,000	0,917	0,333	0,917	0,083	0,750	
Amido_ZT3	0,750	0,750	0,917	0,917	0,75																								

Grupo HF

Variáveis	KIN10_ZT3	raptor1_ZT3	raptor2_ZT3	LST8_ZT3	TOR1_ZT3	TOR2_ZT3	PRR5_ZT3	PRR7_ZT3	PRR9_ZT3	TAP46_ZT3	S6b_ZT3	S6a_ZT3	LHY_ZT3	TOC1_ZT3	KIN10_ZT12	raptor1_ZT12	raptor2_ZT12	LST8_ZT12	TOR_ZT12	TOR2_ZT12	PRR5_ZT12	PRR7_ZT12	PRR9_ZT12	TAP46_ZT12	S6b_ZT12	S6a_ZT12	Lhy_ZT12	
KIN10_ZT3	1	0,900	0,800	0,900	0,900	0,500	0,700	1,000	0,700	0,700	0,900	0,300	0,400	0,200	0,900	0,800	0,600	0,800	0,800	-0,400	0,900	0,800	0,600	0,900	0,700	0,700	-0,500	0,100
raptor1_ZT3	0,900	1	0,900	1,000	0,800	0,700	0,900	0,900	0,400	0,900	1,000	0,400	0,700	0,100	0,700	0,500	0,600	0,600	0,500	-0,700	0,700	0,500	0,200	0,800	0,400	0,400	-0,600	-0,200
raptor2_ZT3	0,800	0,900	1	0,900	0,900	0,900	0,700	0,800	0,300	0,700	0,900	0,700	0,600	0,000	0,600	0,300	0,600	0,700	0,300	-0,600	0,600	0,300	0,100	0,900	0,300	0,300	-0,700	-0,500
LST8_ZT3	0,900	1,000	0,900	1	0,800	0,700	0,900	0,900	0,400	0,900	1,000	0,400	0,700	0,100	0,700	0,500	0,500	0,600	0,500	-0,700	0,700	0,500	0,200	0,800	0,400	0,400	-0,600	-0,200
TOR1_ZT3	0,900	0,800	0,900	0,800	1	0,700	0,500	0,900	0,600	0,500	0,800	0,600	0,300	0,100	0,800	0,600	0,700	0,900	0,600	-0,300	0,800	0,600	0,500	1,000	0,600	0,600	-0,600	-0,200
TOR2_ZT3	0,500	0,700	0,900	0,700	0,700	1	0,600	0,500	0,100	0,600	0,700	0,900	0,700	0,100	0,200	-0,100	0,300	0,400	-0,100	-0,700	0,200	-0,100	-0,200	0,700	0,100	0,100	-0,500	-0,700
PRR5_ZT3	0,700	0,900	0,700	0,900	0,500	0,600	1	0,700	0,300	1,000	0,900	0,300	0,900	0,300	0,400	0,300	0,100	0,200	0,300	-0,900	0,400	0,300	0,000	0,500	0,300	0,300	-0,300	-0,100
PRR7_ZT3	1,000	0,900	0,800	0,900	0,900	0,500	0,700	1	0,700	0,700	0,900	0,300	0,400	0,200	0,900	0,800	0,600	0,800	0,800	-0,400	0,900	0,800	0,600	0,900	0,700	0,700	-0,500	0,100
PRR9_ZT3	0,700	0,400	0,300	0,400	0,600	0,100	0,300	0,700	1	0,300	0,400	0,200	0,100	0,700	0,600	0,800	0,100	0,500	0,800	-0,100	0,600	0,800	0,900	0,600	1,000	0,200	0,600	
TAP46_ZT3	0,700	0,900	0,700	0,900	0,500	0,600	1,000	0,700	0,300	1	0,900	0,300	0,900	0,300	0,400	0,300	0,100	0,200	0,300	-0,900	0,400	0,300	0,000	0,500	0,300	0,300	-0,300	-0,100
S6b_ZT3	0,900	1,000	0,900	1,000	0,800	0,700	0,900	0,900	0,400	0,900	1	0,400	0,700	0,100	0,700	0,500	0,500	0,600	0,500	-0,700	0,700	0,500	0,200	0,800	0,400	0,400	-0,600	-0,200
S6a_ZT3	0,300	0,400	0,700	0,400	0,600	0,900	0,300	0,300	0,200	0,300	0,400	1	0,500	0,300	0,000	-0,200	0,100	0,300	-0,200	-0,500	0,000	-0,200	-0,100	0,600	0,200	0,200	-0,200	-0,600
LHY_ZT3	0,400	0,700	0,600	0,700	0,300	0,700	0,900	0,400	0,100	0,900	0,700	0,500	1	0,400	0,000	-0,100	-0,200	-0,100	-0,100	-1,000	0,000	-0,100	-0,300	0,300	0,100	0,100	-0,100	-0,300
TOC1_ZT3	0,200	0,100	0,000	0,100	0,100	0,100	0,300	0,200	0,700	0,300	0,100	0,300	0,400	1	-0,100	0,200	-0,600	-0,200	0,200	-0,400	-0,100	0,200	0,400	0,100	0,700	0,700	0,500	
KIN10_ZT12	0,900	0,700	0,600	0,700	0,800	0,200	0,400	0,900	0,600	0,400	0,700	0,000	0,000	-0,100	1	0,900	0,800	0,900	0,900	0,000	1,000	0,900	0,700	0,800	0,600	0,600	-0,600	0,200
raptor1_ZT12	0,800	0,500	0,300	0,500	0,600	-0,100	0,300	0,800	0,800	0,300	0,500	-0,200	-0,100	0,200	0,900	1	0,500	0,700	1,000	0,100	0,900	1,000	0,900	0,600	0,800	0,800	-0,200	0,600
raptor2_ZT12	0,600	0,500	0,600	0,500	0,700	0,300	0,100	0,600	0,100	0,100	0,500	-0,100	-0,200	-0,600	0,800	0,500	1	0,900	1,000	0,200	0,800	0,500	0,300	0,700	0,100	0,100	-0,900	-0,300
LST8_ZT12	0,800	0,600	0,700	0,600	0,900	0,400	0,200	0,800	0,500	0,200	0,600	0,300	-0,100	-0,200	0,900	0,700	0,900	1	0,700	0,100	0,900	0,700	0,600	0,900	0,500	0,500	-0,700	-0,100
TOR_ZT12	0,800	0,500	0,300	0,500	0,600	-0,100	0,300	0,800	0,800	0,300	0,500	-0,200	-0,100	0,200	0,900	1,000	0,500	0,700	1	0,100	0,900	1,000	0,900	0,600	0,800	0,800	-0,200	0,600
TOR2_ZT12	-0,400	-0,700	-0,600	-0,700	-0,300	-0,700	-0,900	-0,400	-0,100	-0,900	-0,700	-0,500	-1,000	-0,400	0,000	0,100	0,200	0,100	0,100	1	0,000	0,100	0,300	-0,300	-0,100	0,100	0,300	
PRR5_ZT12	0,900	0,700	0,600	0,700	0,800	0,200	0,400	0,900	0,600	0,400	0,700	0,000	0,000	-0,100	1,000	0,900	0,800	0,900	0,900	0,000	1	0,900	0,700	0,800	0,600	0,600	-0,600	0,200
PRR7_ZT12	0,800	0,500	0,300	0,500	0,600	-0,100	0,300	0,800	0,800	0,300	0,500	-0,200	-0,100	0,200	0,900	1,000	0,500	0,700	1,000	0,100	0,900	1	0,900	0,600	0,800	0,800	-0,200	0,600
PRR9_ZT12	0,600	0,200	0,100	0,200	0,500	-0,200	0,000	0,600	0,900	0,000	0,200	-0,100	-0,300	0,400	0,700	0,900	0,300	0,600	0,900	0,300	0,700	0,900	1	0,500	0,900	0,100	0,700	
TAP46_ZT12	0,900	0,800	0,900	0,800	1,000	0,700	0,500	0,900	0,600	0,500	0,800	0,600	0,300	0,100	0,800	0,600	0,700	0,900	0,600	-0,300	0,800	0,600	0,500	1	0,600	0,600	-0,600	-0,200
S6b_ZT12	0,700	0,400	0,300	0,400	0,600	0,100	0,300	0,700	1,000	0,300	0,400	0,200	0,100	c	0,600	0,800	0,100	0,500	0,800	-0,100	0,600	0,800	0,900	0,600	1	0,200	0,600	
S6a_ZT12	-0,500	-0,600	-0,700	-0,600	-0,600	-0,500	-0,300	-0,500	0,200	-0,300	-0,600	-0,200	-0,100	0,700	-0,600	-0,200	-0,900	-0,700	-0,200	0,100	-0,600	-0,200	0,100	-0,600	0,200	1	0,600	
Lhy_ZT12	0,100	-0,200	-0,500	-0,200	-0,200	-0,700	-0,100	0,100	0,600	-0,100	-0,200	-0,600	-0,300	0,500	0,200	0,600	-0,300	-0,100	0,600	0,300	0,200	0,600	0,700	-0,200	0,600	0,600	1	
TOC1_ZT12	0,700	0,400	0,300	0,400	0,600	0,100	0,300	0,700	1,000	0,300	0,400	0,200	0,100	0,700	0,600	0,800	0,100	0,500	0,800	-0,100	0,600	0,800	0,900	0,600	1,000	0,200	0,600	

Variáveis	Perfilho	Diametro	Altura	BRX_Lab	POL_Cald o	POL_Can a	FIBRA	Peso	Amido_Z T3	Amido_Z T7	Amido_Z T12	Amido_Z T27
KIN10_ZT3	0,700	-0,300	0,400	0,200	0,200	0,200	-0,600	0,300	-0,100	0,300	0,800	-0,300
raptor1_ZT3	0,600	-0,100	0,700	0,600	0,600	0,600	-0,800	0,100	-0,300	0,400	0,500	-0,400
raptor2_ZT3	0,300	0,300	0,600	0,500	0,500	0,500	-0,900	0,300	-0,500	0,000	0,300	-0,700
LST8_ZT3	0,600	-0,100	0,700	0,600	0,600	0,600	-0,800	0,100	-0,300	0,400	0,500	-0,400
TOR1_ZT3	0,400	0,100	0,300	0,100	0,100	0,100	-0,700	0,500	-0,300	-0,100	0,600	-0,600
TOR2_ZT3	0,100	0,600	0,700	0,600	0,600	0,600	-0,800	0,400	-0,800	-0,100	-0,100	-0,900
PRR5_ZT3	0,700	-0,200	0,900	0,800	0,800	0,800	-0,600	0,000	-0,400	0,700	0,300	-0,300
PRR7_ZT3	0,700	-0,300	0,400	0,200	0,200	0,200	-0,600	0,300	-0,100	0,300	0,800	-0,300
PRR9_ZT3	0,800	-0,500	0,100	-0,300	-0,300	-0,300	0,100	0,700	-0,100	0,300	0,800	-0,200
TAP46_ZT3	0,700	-0,200	0,900	0,800	0,800	0,800	-0,600	0,000	-0,400	0,700	0,300	-0,300
S6b_ZT3	0,600	-0,100	0,700	0,600	0,600	0,600	-0,800	0,100	-0,300	0,400	0,500	-0,400
S6a_ZT3	0,000	0,700	0,500	0,300	0,300	0,300	-0,500	0,700	-0,900	-0,300	-0,200	-1,000
LHY_ZT3	0,500	0,100	0,100	0,900	0,900	0,900	-0,500	0,100	-0,700	0,600	-0,100	-0,500
TOC1_ZT3	0,700	-0,300	0,400	0,000	0,000	0,000	0,400	0,700	-0,500	0,500	0,200	-0,300
KIN10_ZT12	0,500	-0,400	0,000	-0,100	-0,100	-0,100	-0,500	0,100	0,300	0,100	0,900	0,000
raptor1_ZT12	0,700	-0,700	-0,100	-0,300	-0,300	-0,300	-0,100	0,200	0,400	0,300	1,000	0,200
raptor2_ZT12	-0,100	0,100	-0,200	-0,100	-0,100	-0,100	-0,700	-0,100	0,300	-0,400	0,500	-0,100
LST8_ZT12	0,200	0,000	-0,100	-0,200	-0,200	-0,200	-0,600	0,300	0,100	-0,300	0,700	-0,300
TOR_ZT12	0,700	-0,700	-0,100	-0,300	-0,300	-0,300						