

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
ESCOLA SUPERIOR DE AGRONOMIA “LUIZ DE QUEIROZ”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (LCB)**

**GIOVANA SILVESTRINI COTRIN
11780760**

**EFEITOS DA MODULAÇÃO NEGATIVA NA EXPRESSÃO DO GENE *APC5*
EM *Arabidopsis thaliana***

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à COC Ciências Biológicas como
parte dos requisitos de obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Nubia Barbosa Eloy

PIRACICABA
MAIO/2024

RESUMO

O processo de crescimento e desenvolvimento dos organismos multicelulares está diretamente ligado ao processo de divisão celular. Esse processo reúne diversas reações moleculares garantindo que a proliferação celular ocorra corretamente nos mais variados tecidos vegetais. Dentre as diferentes formas de regulação do ciclo celular, a ação dos complexos Ciclina-CDK é uma das mais bem caracterizadas e importantes para a dinâmica celular, cuja atividade é regulada por meio da modulação dos níveis das diferentes Ciclinas ao longo das fases do ciclo. A regulação dos complexos Ciclina-CDK é feita por reações proteolíticas igualmente bem reguladas e coordenadas pelo metabolismo celular, como a via ubiquitina-proteassoma 26S. Dentre os componentes desta via multienzimática, o Complexo Promotor da Anáfase/Ciclossomo (APC/C), uma enzima multimérica do tipo E3 ubiquitina ligase, desempenha papel essencial na regulação da maquinaria do ciclo por meio do reconhecimento de proteínas-alvo, como as Ciclinas, para degradação, permitindo seu funcionamento adequado. Em plantas, viu-se que o APC/C está envolvido em processos que transpassam sua função primária de regulação do ciclo celular. Processos como embriogênese, gametogênese, regulação do crescimento e sinalização hormonal foram alterados quando modulações no complexo foram feitas. Assim, o presente projeto tem como objetivo caracterizar fenotipicamente os efeitos da regulação negativa dos níveis de expressão, por meio de mutantes com inserção de T-DNA, do gene *APC5* de *Arabidopsis thaliana*, responsável por codificar a subunidade 5 do complexo.

Palavras-chave: Complexo Promotor da Anáfase/Ciclossoma (APC/C), Ciclo Celular, ubiquitinação, desenvolvimento vegetal.

1. Introdução e Justificativa

Ao longo da história da pesquisa agrônômica, o crescimento e desenvolvimento vegetal têm sido alvo de estudos visando aumentar a produtividade de culturas comerciais. Nas plantas, o crescimento envolve o aumento do número de células, da biomassa e do volume do vegetal (Hilty et al., 2020) e seu desenvolvimento apresenta características distintas quando comparado com dos animais. Ao concluir a fase embrionária, a maioria dos animais, exceto aqueles que passam por metamorfose, desenvolvem um embrião maduro que se assemelha, em tamanho reduzido, ao indivíduo adulto. Por outro lado, as plantas só desenvolvem seus órgãos verdadeiros (caule, raiz e folha) durante a fase pós-embriogênica (Radoeva et al. 2019). Também de forma contrária aos animais, as plantas possuem crescimento indeterminado ocasionado pela manutenção de células indiferenciadas que formam o tecido meristemático, as quais apresentam divisão e diferenciação constantes ao longo de todo seu ciclo de vida (Shi et al. 2016).

O crescimento vegetal é o processo integrado de divisão e expansão celular, no qual novas células são adicionadas ao corpo do organismo. Em eucariotos, o ciclo celular pode ser dividido em quatro fases distintas: as fases preparatórias G1, S e G2, e a fase de divisão celular, Mitose ou fase M. O processo necessita de uma regulação rigorosa, orquestrada por uma série de reações que proporcionam a correta progressão das fases do ciclo (Inzé & De Veylder, 2006, Eloy et al., 2012). Um dos processos fundamentais da regulação do ciclo celular está na ação coordenada de proteínas quinases conhecidas como CDKs (*cyclin-dependent kinases*), cujas atividades são reguladas por meio da associação com proteínas regulatórias denominadas Ciclinas (Morgan, 1995). Ao longo do ciclo celular, Ciclinas específicas, cada qual para as

diferentes fases, ativam as CDKs, permitindo que estas reconheçam os sítios específicos em seus substratos para fosforilação (De Veylder, Beeckman & Inzé, 2007).

A manutenção da progressão unidirecional e irreversível do ciclo celular é garantida pela proteólise de diferentes componentes regulatórios, como as diferentes Ciclinas que ativam as CDKs. Entre as vias proteolíticas dos eucariotos, a rota multienzimática do Sistema Ubiquitina-Proteassoma (*ubiquitin-proteasome system* - UPS) é uma das mais bem caracterizadas e conservadas entre estes organismos. Nesta via, os alvos de degradação são ligados a resíduos de ubiquitina, permitindo, assim, que sejam reconhecidos pelo Proteassoma 26S (Xu & Peng, 2006; Marshall & Vierstra, 2019).

A via possui três etapas, cada qual desempenhada por um tipo de enzima. A primeira etapa envolve a Enzima Ativadora de Ubiquitina (*ubiquitin-activating enzyme* - E1), que, em uma reação dependente de ATP, ativa a molécula de ubiquitina. Em seguida, a Enzima conjugadora de ubiquitina (*ubiquitin-conjugating enzyme* - E2) se liga a molécula de ubiquitina previamente ativada (E2-Ub). Por fim, a enzima ubiquitina ligase (*ubiquitin ligase enzyme* - E3), responsável pelo reconhecimento do substrato, interage com o complexo E2-Ub e catalisa a transferência de moléculas de ubiquitina para o substrato. Por meio da poliubiquitinação do substrato, o proteassoma 26S é capaz de reconhecer, especificamente seu alvo e degradá-lo (Willems & De Veylder; de Oliveira et al., 2022). Em plantas, as enzimas E3 ligases do tipo CRLs são as mais bem caracterizadas, já que a maioria dessas enzimas está relacionada ao crescimento e ao desenvolvimento vegetal, em especial a *Skp1-cullin-F-box* (SCF) e o Complexo Promotor da Anáfase/Ciclossomo (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* ou APC/C) (de Oliveira et al. 2022).

O APC/C é uma enzima multimérica, cujo número de subunidades varia de acordo com organismo. Em *Arabidopsis thaliana*, o complexo é composto por cerca de 14 subunidades: APC1, APC2, APC3a, APC3b, APC4, APC5, APC6, APC7, APC8, APC10, APC11, APC13, APC15 e CDC26 (Willems & De Veylder, 2022). Com exceção do APC3, todas as subunidades são codificadas por um único gene. Ainda, elas podem ser agrupadas em diferentes módulos de acordo com suas funções no complexo. APC2 e APC 11 são as subunidades catalíticas, responsáveis pela transferência da molécula de ubiquitina para o substrato, e por isso compõem o módulo catalítico. APC3, APC6, APC7 e APC8 possuem o domínio TPR (do inglês, *tetratricopeptide repeats*) e interagem com proteínas ativadoras do complexo, formando o módulo TPR (D'Andrea e Regan, 2003). APC13 e APC15 medeiam as interações com as subunidades TPR. Por fim, APC1, APC4 e APC5 formam o módulo plataforma, que fornece estabilidade ao complexo (Thornton et al., 2006; Eloy et al., 2015; Alfieri et al., 2017; Chang et al. 2015) (fig. 1).

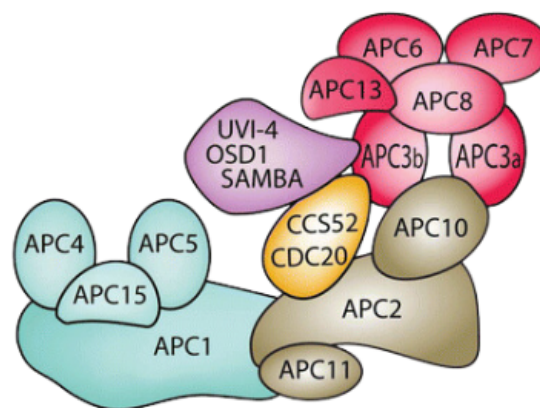


Figura 1. Ilustração didática do Complexo Promotor da Anáfase/Ciclossomo, apresentando suas subunidades e sua localização. Fonte: Eloy et al, 2015.

O nome do complexo APC/C remete à primeira função descrita para o complexo: promover a anáfase a partir da ubiquitinação das Securinas em animais. Durante o ciclo celular, as Securinas inibem a enzima Separase, responsável pela quebra da coesão entre as cromátides-irmãs, a partir da degradação da Coesina na região dos centrômeros. Uma vez ativado, o APC/C é capaz de reconhecer a Securina e marcá-la para degradação, permitindo, assim, a ação da Separase e, conseqüentemente, a perda da coesão entre as cromátides-irmãs (Castro et. al. 2005).

O APC/C catalisa as reações de ubiquitinação por meio do reconhecimento e recrutamento de substratos que apresentam o motivo conhecido como *Destruction box* (D-BOX), caracterizado pela sequência de resíduos de aminoácidos RxxLxxxxN (Willems & de Veylder, 2022; Glotzer et al., 1991; Pflieger & Kirschner, 2000). O processo de reconhecimento do substrato é controlado por moléculas ativadoras ou inibidoras, que regulam o processo de ubiquitinação via modulação da atividade do APC/C. Dentre os ativadores do complexo, podemos citar o CELL DIVISION CYCLE 20 (CDC20) e o CELL CYCLE SWITCH 52 (CCS52/CDH1), que mudam a conformação da proteína para permitir a ligação com o E2. A exemplo de inibidores conhecidos tem-se o ULTRAVIOLET-B-INSENSITIVE 4 (UVI4) e seu homólogo, OMISSION OF SECOND DIVISION 1 (OSD1)/GIGAS CELL1 (GIG1), os quais inibem a função do complexo ao interagir e alterar a conformação proteica de ativadores como CCS52A1, CDC20.1, CDC20.5, CCS52A1, CCS52A2 e CCS52B (Peters, 2002, McLean et al., 2011; Heyman & De Veylder, 2012; Saleme et al., 2021; Oliveira, Silva & Eloy, 2022).

As subunidades do APC/C individualmente são essenciais para a viabilidade do organismo, uma vez que indivíduos que possuem um dos genes do APC/C deletados, com exceção da subunidade 3 que possui duas isoformas (*APC3a* e *APC3b*), não são

capazes de completar seu desenvolvimento (Xu, 2019). Desde a sua descoberta, diferentes trabalhos científicos utilizam o APC/C e suas subunidades como objeto de estudo para elucidar processos moleculares e fisiológicos do desenvolvimento e crescimento vegetal. Estudos com as subunidades em arroz, tomate e *A. thaliana* já demonstraram a influência do complexo em processos como diferenciação celular dos meristemas do caule e da raiz (Lin et al., 2020; Schwedersky et al., 2021), embriogênese (Wang et al. 2013), gametogênese masculina e feminina (Eloy et al., 2011; 2012; Zheng et al., 2011; Wang et al., 2012; Schwedersky et al., 2021, Saleme, Rocha & Eloy, 2021), regulação hormonal (Lin et al., 2020) e perfilhamento (Lin et al., 2012; 2020).

A partir do que foi exposto, conclui-se que o ciclo celular e toda maquinaria envolvida neste processo tem um papel-chave no crescimento e desenvolvimento das plantas. Portanto, entender a forma como este processo é orquestrado é importante para estudos em biologia vegetal e a posterior aplicação agrônômica.. Como mencionado anteriormente, a alteração dos genes que codificam suas subunidades resulta em fenótipos expressivos, os quais podem ser aplicados em culturas comerciais para a análise de características favoráveis. No contexto atual, estudos acerca do aumento da produtividade vegetal são essenciais considerando o sobrecarregamento do setor agrícola potencializado pelo crescimento populacional acelerado e as mudanças climáticas.

Com isso, o presente trabalho busca estudar a subunidade 5 do APC/C, a qual não apresenta estudos prévios publicados, para caracterizar fenotipicamente plantas com a modulação negativa do gene *APC5* em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo específico

O projeto de pesquisa tem como objetivo caracterizar os efeitos da modulação negativa do gene *APC5* em *Arabidopsis thaliana*, por meio de ensaios comparativos entre linhagens mutantes SALK e plantas selvagens do tipo Col-0.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar os padrões de expressão gênica em linhagens mutantes SALK e selvagens.
- Caracterizar fenotipicamente as linhagens mutantes, e associá-los à possível redução nos níveis de *APC5*.
- Analisar a influência do gene *APC5* na gametogênese de *A. thaliana*.

3. Materiais e métodos

3.1. Condições de crescimento

As linhagens mutantes utilizadas serão crescidas *in vivo* e *in vitro* sob condições controladas. O crescimento *in vivo* será a 22° C, sob fotoperíodo longo com 16h de luz ($\approx 120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) e 8h de escuro, com 60% de umidade relativa. No crescimento *in vivo*, as sementes serão semeada em vasos de 100ml com substrato comercial (turfa) (*Jiffy Growing Solutions*, Oslo, NO) acrescido de vermiculita expandida, na proporção de 3:1, respectivamente. Para o cultivo *in vitro*, as sementes serão crescidas em meio de cultivo “*Murashige and Skoog*” (MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962) de meia força com 10 g L⁻¹ de sacarose e 9 g L⁻¹ de ágar. As placas *in vitro* serão mantidas sob as mesmas condições anteriormente explicitadas.

3.2. Escolha e obtenção das linhagens de trabalho

As linhagens mutantes com perda de função foram escolhidas e obtidas por meio do banco de germoplasma do *National Arabidopsis Stock Center* (NASCC). Duas linhagens SALK, variedades de *A. thaliana* geneticamente modificadas por meio da inserção aleatória de T-DNA, para o gene *APC5* (At1g06590) foram selecionadas. A primeira, SALK_022047, possui uma inserção de 610-910 bp na região promotora do gene (a *downstream* do ATG) e a segunda, SALK_024997, possui uma inserção de 561-861 bp localizada no 9º íntron do gene em questão.

3.2.1. Extração de DNA genômico

As diferentes linhagens de *A. thaliana* utilizadas neste trabalho terão seus DNAs extraídos para que possam ser utilizados em análises específicas. Para isso, o método CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) será realizado com folhas de plantas com 15 dias após a semeadura.

3.2.1. Reação de PCR para genotipagem das linhagens SALK

Com o DNA genômico extraído, este será utilizado como molde para a reação em cadeia da polimerase, PCR (*Polymerase chain reaction*) a fim de determinar o genótipo dos indivíduos analisados.

Duas reações, com objetivos diferentes serão feitas: PCR WT e PCR T-DNA. A primeira utiliza primers específicos para as bordas esquerda e direita da região selvagem (SALK_022047_LP e SALK_022047_RP, respectivamente (tabela 1), a fim de amplificar a sequência original do gene *APC5*. A segunda, por sua vez, utiliza o primer LBb1.3 (tabela 1), que se anela a borda esquerda do fragmento de T-DNA inserido, junto ao primer SALK_022047_RP, que se anela à direita do gene selvagem,

amplificando, assim, o T-DNA inserido. As reações serão realizadas utilizando o kit “GoTaq® Green Master Mix”. A mesma reação será realizada para a linhagem SALK_024997, utilizando primers específico para a região de inserção desta linhagem (tabela 1).

As reações serão feitas em termociclador T100 (BioRad) utilizando a seguinte programação: 1 ciclo a 95°C por dois minutos para a primeira desnaturação, seguida por 35 ciclos sequenciais de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. O fragmento de DNA amplificado por PCR foi separado em gel de agarose 1% para verificar o tamanho correto do produto da reação. A presença ou a ausência de bandas da região selvagem ou bandas do T-DNA indicam o genótipo dos indivíduos, assim como mostrado na figura 3.

Primer	Forward	Reverse
SALK_022047	AATGCAAACGGAGATCTTGTG	TTAGCTGAAAATGCAATTGCC
SALK_024997	ATTCATTCTCCCGAGAGCTTC	TACCCCAGATTCTCACGACAG
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	

Tabela 1: Primers utilizados para genotipar mutantes SALK_022047 e SALK_024997, sendo os primeiros anelados à região onde o TDNA será inserido, utilizados para amplificar a região sem o T-DNA e o segundo, quando utilizado junto ao salk_022047_rv, amplifica o TDNA, se inserido.

3.3. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para análises de expressão gênica, RT-qPCR (colocar significado), será realizado em cada linhagem selecionada, três réplicas biológicas, constituídas por um pool de seis plantas crescida *in vitro*, serão coletadas. As coletas serão feitas em três tempos diferentes, para cobrir a fase inicial do desenvolvimento: 8, 12 e 16 dias após a estratificação.

Após a coleta, o material será imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para ser utilizado na extração de RNA via TRIzol®, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen Corporation, CA, Estados Unidos). Para eliminar o DNA genômico residual, os transcritos serão tratados com “*RNase-free DNase*” seguindo o protocolo do fabricante (GE Healthcare).

A partir dos transcritos extraídos, uma fita de DNA complementar (cDNA) será sintetizada com o kit “*SuperScript™ III First-Strand Synthesis System*” (Invitrogen Corporation, CA, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a análise de expressão ,serão utilizados os primers referentes a região do gene *APC5* e a dois genes endógenos, UBI10 e GADPH, os quais são mostrados na tabela 2. O cDNA será amplificado no sistema “*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*” em placas de 96 poços com “*SYBR™ Green PCR Master Mix*” (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando três réplicas técnicas para cada amostra.

Primer	Forward	Reverse
AT1G06590_APC5	CAGCAAATGTGGCACACTCC	GCAAAACGAGATGCTTGCCA
UBI10	CACACTCCACTTGGTCTTGCGT	TGGTCTTCCGGTGAGAGTTCA
GADPH	TCCGTGTTCCAACCGTTGAT	GCCTTGGCATCGAAAATGCT

Tabela 2: Tabela de Primers referentes ao qPCR

3.4. Análise da Viabilidade dos óvulos das plantas knockout and knockdown

Com a finalidade de avaliar a influência do gene *APC5* na gametogênese das plantas mutantes SALK_022047, será realizada uma análise nos frutos de *A. thaliana* homocigota para a inserção do T-DNA, verificado pela genotipagem especificada no

tópico 4.2. Com o auxílio do estereoscópio Leica M165 FC equipado com o LAS AF *software* (*Leica Application Suite Advance Fluorescence*) (*Leica Microsystems, Alemanha*) as siliquas serão abertas e fotografadas. Dessa maneira, pretende-se verificar a viabilidade das sementes a partir da contagem do número de óvulos fecundados viáveis e abortados para a posterior comparação com siliquas de indivíduos selvagens.

3.4. Cruzamento recíproco com as plantas heterozigotas do Salk_024997

Com a finalidade de observar se o *knockdown* do gene interfere na gametogênese feminina ou masculina, será analisada a taxa de transmissão do T-DNA a partir de um cruzamento recíproco (Eloy et al, 2011). Para isso, iremos cruzar de maneira recíproca dois indivíduos: uma planta mutante SALK_024997 que carrega o fragmento de TDNA e uma planta selvagem ($\text{♀SALK}_{024997} \times \text{♂WT}$ e $\text{♀WT} \times \text{♂SALK}_{024997}$), identificadas através da análise genotípica detalhada no item 4.1. Neste cruzamento, a planta SALK será tanto o doador de pólen, em uma das direções do cruzamento, quanto o receptor do pólen no cruzamento recíproco.

Após completar o ciclo reprodutivo, as sementes F1 resultantes dos cruzamentos serão semeadas conforme as condições mencionadas no tópico 4.1. O material genético de aproximadamente 100 plantas de cada cruzamento será coletado para uma nova análise genotípica, de forma a examinar a transferência do fragmento de TDNA.

4. Análise de resultados

4.1. Genotipagem de indivíduos mutantes

A partir da realização de duas reações de PCR será possível investigar a constituição dos alelos no *locus* At1g06590, identificando a presença ou ausência do fragmento de T-DNA. Para os experimentos com a linhagem SALK_022047, serão

obtidos indivíduos homocigotos, enquanto para SALK_024997 serão utilizados indivíduos heterocigotos devido a inviabilidade de obtenção de homocigotos, uma vez que o silenciamento do gene é letal e a inserção dentro de um íntron interfere na expressão gênica, inviabilizando o desenvolvimento desses indivíduos. A localização pode ser vista nas figuras 2 e 3.

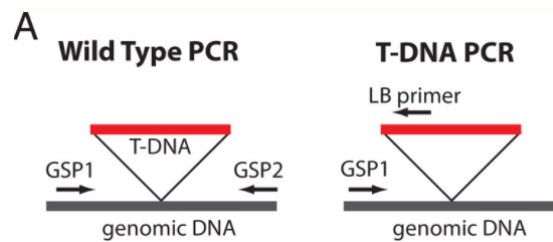


Figura 2: Ilustração referente aos dois tipos de PCR realizados indicando o genótipo dos indivíduos.

Fonte: O'MALLEY, BARRAGAN & ECKER; 2015.

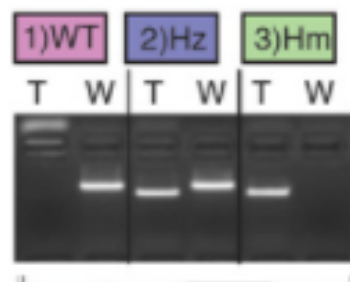


Figura 3: Imagem indicando a caracterização fenotípica de um indivíduo, sendo que a presença das duas bandas selvagens (W) e de TDNA (T) indicam indivíduos heterocigotos, a presença apenas da banda W refere-se à indivíduos selvagens enquanto a amplificação apenas da banda T indica indivíduos homocigotos. Fonte: O'MALLEY, BARRAGAN & ECKER; 2015.

5.2. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Os níveis de expressão serão validados por meio de análises de curva de *melting* dos primers, seguida pela normalização em relação à expressão média dos genes de referência UBI10 e GAPDH. Esse procedimento de normalização envolve a

metodologia $\Delta\Delta Ct$, o qual é calculado a partir da diferença entre o valor do Ct do gene alvo e o valor médio do Ct dos genes de referência (ΔCt). Subsequentemente, o $\Delta\Delta Ct$ será determinado subtraindo o valor de ΔCt da amostra controle do valor de cada amostra experimental, como mostra a fórmula abaixo:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gene } APC5) - Ct(\bar{x} \text{ média dos genes endógenos})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{controle}) - \Delta Ct$$

5.3. Análise da Viabilidade das sementes

A partir da contagem do número de óvulos em siliquis de indivíduos selvagens e mutantes homocigotos, será realizada uma análise por meio do teste t entre as duas amostras. O teste será realizado utilizando o cálculo da média e do desvio padrão do número de óvulos viáveis e óvulos abortados, para definir o valor de t e confirmar a significância dos resultados.

5.4. Cruzamento Recíproco

A análise será feita a partir da comparação do genótipo de plantas autofecundadas com aquelas obtidas a partir da sementeira das sementes F1 oriundas do cruzamento recíproco para análise e transmissão do fragmento de TDNA, sendo que os resultados serão interpretados de acordo com as tabelas abaixo.

Efeitos na Gametogênese Masculina	
Tipo de cruzamento	Porcentagem aproximada
Autofecundação	45 ~50
♀ SALK_024997 x ♂ WT	45 ~50
♀ WT x ♂ SALK_024997	0

Efeitos na Gametogênese Feminina	
Tipo de cruzamento	Porcentagem aproximada
Autofecundação	45 ~50
♀ SALK_024997 x ♂ WT	0
♀ WT x ♂ SALK_024997	45 ~50

Tabela 3: Tabelas referentes aos resultados esperados referentes à influência na gametogênese feminina ou (b) masculina a partir do cruzamento recíproco.

5. Plano de Trabalho e cronograma

Atividade	MÊS 1	MÊS 2	MÊS 3	MÊS 4	MÊS 5	MÊS 6
Genotipagem Salk_022047	X					
Genotipagem Salk_024997	X					
RT-qPCR		X	X			
Análise de síliquas				X		
Cruzamento Recíproco					X	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	X	X	X	X	X	X
ESCRITA				X	X	X

7. Referências Bibliográficas

ALFIERI, C.; ZHANG, S.; BARFORD, D. **Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C)**. Open Biology, v. 7, n. 11, p. 170204, nov. 2017.

BREUNINGER, H.; LENHARD, M. **Control of tissue and organ growth in plants**. Curr Top Dev Biol v. 91, p. 185-220, 2010

CASTRO, A. et al. **The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle**. Oncogene, v. 24, n. 3, p. 314–325, jan. 2005.

CHANG, L. et al. **Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination**. Nature, v. 522, n. 7557, p. 450–454, jun. 2015.

D'ANDREA, L. **TPR proteins: the versatile helix.** Trends in Biochemical Sciences, v. 28, n. 12, p. 655–662, dez. 2003.

DE VEYLDER, L.; BEECKMAN, T.; INZÉ, D. **The ins and outs of the plant cell cycle.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 8, n. 8, p. 655–665, ago. 2007.

ELOY N.B. et al. **The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development.** Plant J v. 68, p.351-363, 2011

ELOY, N. B. et al. **SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 10, p. 3853-3858, 2012.

ELOY, N.B.; LIMA, M.F.; FERREIRA, P.C.; INZÉ, D. **The Role of the anaphase-promoting complex/cyclosome in plant growth.** Critical Reviews in Plant Sciences v. 34, p.487-505, 2015

GLOTZER, M.; MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. **Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.** Nature v. 349, p.132-138, 1991

HILTY, J. et al. **Plant growth: the What, the How, and the Why.** New Phytologist, v. 232, n. 1, p. 25–41, 7 ago. 2021.

INZÉ, D.; DE VEYLDER L. **Cell cycle regulation in plant development.** Annu Rev Genet v. 40, p.77- 105, 2006

LIN, Q. et al. **Rice APC/CTE controls tillering by mediating the degradation of MONOCULM 1.** Nature Communications, v. 3, n. 1, jan. 2012.

LIN, Q. et al. **The APC/C^{TE} E3 Ubiquitin Ligase Complex Mediates the Antagonistic Regulation of Root Growth and Tillering by ABA and GA.** The Plant Cell, v. 32, n. 6, p. 1973–1987, 7 abr. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real–Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method.** Methods, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LI, Y.; LI, S.; WU, H. **Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and Autophagy Two Main Protein Degradation Machineries in Response to Cell Stress.** Cells, v. 11, n. 5, p. 851, 1 mar. 2022.

LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. **Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR.** Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos (INFOTECA-E), Sobral, 2014.

MARROCCO K.; BERGDOLL, M.; ACHARD, P.; CRIQUI, M.C.; GENSCHIK, P. **Selective proteolysis sets the tempo of the cell cycle.** Current Opinion Plant Biology v. 13, p.631-639, 2010

MORGAN, D. O. **Principles of CDK regulation.** Nature, v. 374, n. 6518, p. 131–134, mar. 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.** Physiologia Plantarum, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

OLIVEIRA, P. N.; SILVA, L. F. C.; ELOY, N. B. **The role of APC/C in cell cycle dynamics, growth and development in cereal crops.** Frontiers in plant science, v. 13, 2022.

O'MALLEY, R. C.; BARRAGAN, C. C.; ECKER, J. R. **A User's Guide to the Arabidopsis T-DNA Insertional Mutant Collections.** Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 1284, p. 323, 11 mar. 2015.

PETERS, J.-M. **The Anaphase-Promoting Complex.** Molecular Cell, v. 9, n. 5, p. 931–943, maio 2002.

RADOEVA, T. et al. **Evolution, Initiation, and Diversity in Early Plant Embryogenesis.** Developmental Cell, v. 50, n. 5, p. 533–543, set. 2019.

ROJAS, C.A. et al. **Overexpression of the Arabidopsis anaphase promoting complex subunit CDC27a increases growth rate and organ size.** Plant Molecular Biology, v.3 p.307-318, 2009

SALEME, M.L.S.; ROCHA, I.A., ELOY, N.B. **The Role of Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) in Plant Reproduction.** Frontiers in plant science, v. 12, p. 642934, 2021. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.642934>

SCHWEDERSKY, R.P. et al. **The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Subunit 11 and Its Role in Organ Size and Plant Development.** Frontiers in Plant Science, v. 12, p. 563760, 2021. doi: 10.3389/fpls.2021.563760.

SHI, B. et al. **Two-Step Regulation of a Meristematic Cell Population Acting in Shoot Branching in Arabidopsis.** PLOS Genetics, v. 12, n. 7, p. e1006168, 11 jul. 2016.

THORNTON, B. R. **An architectural map of the anaphase-promoting complex.** Genes & Development, v. 20, n. 4, p. 449–460, 15 fev. 2006.

VAN LEENE, J et al. **Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in Arabidopsis thaliana.** Mol Syst Biol v. 6 p.397, 2010

WANG, Y. et al. **The Arabidopsis APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for both female gametogenesis and embryogenesis.** The Plant Journal, v. 69, n. 2, p. 227–240, 21 out. 2011.


WANG, Y. et al. **The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Subunit 1 is Critical for Both Female Gametogenesis and Embryogenesis.** Journal of integrative plant biology, v. 55, n. 1, p. 64–74, 1 jan. 2013.

WILLEMS, A.; DE VEYLDER, L. **The Plant Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome.** Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 38, n. 1, p. 25–48, 6 out. 2022.

XU, R. Y. et al. **The Arabidopsis anaphase-promoting complex/cyclosome subunit 8 is required for male meiosis.** New phytologist, v. 224, n. 1, p. 229–241, 24 jul. 2019.

Folha de assinatura da orientadora

Piracicaba, ____ de maio de 2024

Documento assinado digitalmente
 NUBIA BARBOSA ELOY
Data: 23/05/2024 15:41:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador

Nubia Barbosa Eloy



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP), Ad Referendum, **CERTIFICOU** a Prof^a. Dr^a. **Nubia Barbosa Eloy**, Departamento de Ciências Biológicas, pelo período de **19/07/2021 à 18/07/2024**.

Piracicaba, 19 de julho de 2021.

Prof^a. Dr^a. Wanessa Melchert Mattos
Presidente da CEAP/ESALQ/USP