



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CHRISTIANE DE PAULA RIBEIRO SILVA CAMPOS

ANÁLISE EM LARGA ESCALA DE REDES DE EXPRESSÃO
GÊNICA ASSOCIADAS À FOTOSSÍNTESE E SÍNTESE DE
PAREDE CELULAR EM CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM*
SP.) EM AMBIENTE DE CO₂ ELEVADO

Campinas

2025

CHRISTIANE DE PAULA RIBEIRO SILVA CAMPOS

**ANÁLISE EM LARGA ESCALA DE REDES DE EXPRESSÃO GÊNICA
ASSOCIADAS À FOTOSSÍNTESE E SÍNTESE DE PAREDE CELULAR
EM CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM* SP.) EM AMBIENTE DE CO₂
ELEVADO**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Genética e Biologia
Molecular, na área de Bioinformática.*

Orientador: PROF. DR. RENATO VICENTINI DOS SANTOS

Coorientadora: DR^a. LUANA WALRAVENS BERGAMO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA CHRISTIANE
DE PAULA RIBEIRO SILVA CAMPOS, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. RENATO
VICENTINI DOS SANTOS.

Campinas

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C157a Campos, Christiane de Paula Ribeiro Silva, 1999-
Análise em larga escala de redes de expressão gênica associadas à fotossíntese e síntese de parede celular em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) em ambiente de CO₂ elevado / Christiane de Paula Ribeiro Silva Campos. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Renato Vicentini dos Santos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Expressão gênica. 2. Relação fonte-dreno. 3. Troncos (Botânica). 4. Carboidratos - Metabolismo. 5. Dióxido de carbono. I. Vicentini, Renato, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Large-scale analysis of gene expression networks associated with photosynthesis and cell wall synthesis in sugarcane (*Saccharum* sp.) under high CO₂ environment

Palavras-chave em inglês:

Gene expression
Source-sink relationships
Stems (Botany)
Carbohydrate metabolism
Carbon dioxide

Área de concentração: Bioinformática

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Renato Vicentini dos Santos [Orientador]
Marcelo Falsarella Carazzolle
Douglas Silva Domingues

Data de defesa: 25-04-2025

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 2. Erradicação da fome
ODS: 12. Consumo e produção responsáveis
ODS: 7. Energia acessível e limpa

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1856-8107>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6803540625193073>

Prof. Dr. Renato Vicentini dos Santos

Prof. Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle

Prof. Dr. Douglas Silva Domingues

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de **Dissertação/Tese** e na Secretaria do **Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular** da Unidade **Instituto de Biologia**.

*Aos meus pais, Marilde Campos e
Raimundo Campos, responsáveis
pelo meu ser e estar, dedico este
trabalho e tudo que for assinado
por mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao meu orientador, Dr. Renato Vicentini, por ter acreditado em mim mesmo antes de me conhecer e enxergado meu potencial, com a paciência necessária para me ajudar a crescer;

À minha coorientadora, Dr. Luana Bergamo, pelo apoio e por tudo que me ensinou;

Aos meus pais, que são a razão eu ser quem sou e que abriram mão de estar ao meu lado para me ver realizar o meu sonho:

- Minha mãe, Marilde Campos, minha maior inspiração de vida e de força;
- Meu pai, Raimundo Campos, que sempre demonstrou pelo melhor exemplo o caminho a seguir.

Ao meu irmão, César Campos, que sempre caminhou junto comigo, e com quem eu tenho a sorte de compartilhar o desejo pela vida acadêmica, encontrando congruências mesmo em áreas tão diferentes;

À minha família:

- Minhas tias Francisca e Zeneide Campos, que sempre foram meu maior suporte em São Paulo;
- Meus tios Renato Campos e Maria do Socorro Jordão, por terem sido minha primeira base em Campinas, me recebendo tão bem e me oferecendo todo o apoio possível;
- Minhas avós, primas, tios, e todos os meus familiares que mesmo de longe torceram por mim;

Aos meus amigos:

- Lídia Cavalcante e Lucas Nascimento, presentes que a UNICAMP me deu e que deixaram essa caminhada mais leve e mais prazerosa;
- Elayne Ramos, que desde a graduação dividiu esse sonho comigo, que hoje podemos comemorar juntas.

À equipe da EMEF Aclamado, em especial aos diretores, Marcelo Silveira e Celma Marchetto, que organizaram meus horários e sempre fizeram o possível para que eu pudesse continuar com o mestrado.

E a todos que torceram por mim e que contribuíram, direta ou indiretamente, para que essa etapa fosse concluída.

Meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Número da bolsa concedida: 88887.682604/2022-00.

“E quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos
fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu”.

Erico Verissimo, Olhai os lírios do campo

RESUMO

Pesquisas com cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) já identificaram e caracterizaram um conjunto de genes envolvidos na partição de carbono e sinalização por açúcar, além daqueles relacionados à resposta a elevados níveis de CO₂ atmosférico. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelo cruzamento entre estas diferentes vias regulatórias e de sinalização e a sua diversificação nas plantas ainda precisam de ser mais elucidados para melhor compreender os padrões de crescimento e produção de biomassa. Estamos apenas começando a produzir dados detalhados de expressão genética necessários para compreender a rede de interações em nível molecular. Para fornecer uma visão sistêmica da resposta da cana-de-açúcar ao processo de maturação e ao equilíbrio fonte-dreno, bem como as relações entre esses processos e o aumento da oferta de CO₂, neste estudo foram realizadas análises de correlação da expressão gênica do transcriptoma da cana-de-açúcar. Genes envolvidos na maturação do colmo, metabolismo de carboidratos, relação fonte-dreno e resposta ao CO₂ foram avaliados em redes e sub-redes, com foco em genes que respondem ao CO₂ atmosférico. A rede de co-expressão gênica resultante da cana-de-açúcar consiste em 7.094 transcritos e 46.372 interações. A rede agrupada resulta em 81 agrupamentos de similaridade distintos na forma de *clusters*. Dos 34 genes de resposta ao CO₂ analisados, 13 estavam presentes na rede de co-expressão, correspondendo a 13 *clusters*. Deste grupo, três genes relacionados a resposta ao CO₂ também apresentaram resposta na relação fonte-dreno da cana-de-açúcar, pertencentes aos *clusters* c6, c13 e c25, respectivamente. Quanto à sua suposta identidade, o primeiro foi caracterizado como precursor de uma proteína induzida pela luz, o segundo como um gene ligado à resposta ao estresse da ferritina e o terceiro relacionado ao metabolismo de carboidratos do tipo xiloglucano endo-transglicosilase/hidrolase. Isso mostra que o aumento na quantidade de CO₂ atmosférico tem ligação com o metabolismo fonte-dreno e com a partição de carbono na cana-de-açúcar, pois quanto mais CO₂ disponível, maiores serão os níveis de fotossíntese da planta e, consequentemente, maior será sua disponibilidade de carbono. A análise de genes expressos diferencialmente em grande parte indicou que os genes fotossintéticos regulam negativamente os genes relacionados à parede celular. Por fim, foram estabelecidas as relações evolutivas das redes obtidas assim como a ontologia transcricional das redes gênicas de cana-de-açúcar. Juntos, é fornecida uma visão sistêmica do equilíbrio fonte-dreno e do processo de maturação da cana-de-açúcar, associado à sua resposta ao CO₂ atmosférico, o que pode ajudar a capturar a regulação de muitos componentes genéticos e antecipar uma maior capacidade na interpretação do processo genético e fisiológico desta espécie.

Palavras-chave: Co-expressão, fonte-dreno, desenvolvimento do colmo, dióxido de carbono.

ABSTRACT

Research on sugarcane (*Saccharum* sp.) has already identified and characterized a set of genes involved in carbon partitioning and sugar signaling, as well as those related to the response to elevated atmospheric CO₂ levels. However, the molecular mechanisms responsible for the crosstalk between these different regulatory and signaling pathways and their diversification in plants still need further elucidation to better understand the growth patterns and biomass production. We are only beginning to generate detailed gene expression data necessary to comprehend the network of interactions at the molecular level. To provide a systemic view of the sugarcane response to the maturation process and source-sink balance, as well as the relationships between these processes and increased CO₂ availability, this study conducted correlation analyses of sugarcane transcriptome gene expression. Genes involved in stem maturation, carbohydrate metabolism, source-sink balance, and CO₂ response were evaluated in networks and subnetworks, focusing on genes responsive to atmospheric CO₂. The resulting sugarcane gene co-expression network comprises 7,094 transcripts and 46,372 interactions. The clustered network yields 81 distinct similarity groupings in the form of clusters. Of the 34 CO₂-responsive genes analyzed, 13 were present in the co-expression network, corresponding to 13 clusters. From this group, three CO₂-responsive genes also showed a response in the sugarcane source-sink balance, belonging to clusters c6, c13, and c25, respectively. Regarding their putative identity, the first was characterized as a precursor of a light-induced protein, the second as a gene linked to ferritin stress response, and the third as related to carbohydrate metabolism of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase type. This demonstrates that increased atmospheric CO₂ levels are linked to source-sink metabolism and carbon partitioning in sugarcane, as higher CO₂ availability results in increased photosynthesis levels in the plant and, consequently, greater carbon availability. The analysis of differentially expressed genes largely indicated that photosynthetic genes negatively regulate genes related to the cell wall. Finally, the evolutionary relationships of the obtained networks were established, along with the transcriptional ontology of the sugarcane gene networks. Together, this provides a systemic view of the source-sink balance and maturation process in sugarcane associated with its response to atmospheric CO₂, which may help to elucidate the regulation of many genetic components and anticipate greater capabilities in interpreting the genetic and physiological processes of this species.

Keywords: Co-expression, source-sink, stalk development, carbon dioxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapas comparativos demonstrando a mudança na média de temperatura da superfície do planeta (a) e na média de precipitação (b) comparando os intervalos de tempo entre os anos 1986-2005 e a previsão entre 2081-2100. Fonte: IPCC, 2014.....	19
Figura 2: Diagrama ilustrado do processo do movimento e metabolismo da sacarose na cana-de-açúcar, da sua síntese, nas folhas, até o seu dreno, no colmo. Fonte: Wang et al., 2013.	23
Figura 3: Rede de co-expressão gênica de cana-de-açúcar. Os nós são conjuntos de sondas do Affymetrix GeneChip Sugarcane Array. As arestas indicam co-expressão significativa entre conjuntos de sondas acima de um limite rígido ($r \geq 0.8$).	36
Figura 4: Meta-rede de clusters de genes co-expressos gerados por HCCA. Os clusters são compostos por genes de balanço fonte-dreno, processo de maturação e resposta ao CO ₂ . Os clusters que apresentam genes responsivos para o aumento de CO ₂ estão marcados em azul.....	37
Figura 5: Conjunto de redes de correlação para os clusters com sondas responsivas para eCO₂. A cor azul representa sondas responsivas para eCO ₂ , o verde representa sondas responsivas no desenvolvimento do colmo, em vermelho estão as que respondem em análise de fonte-dreno no conjunto geral e em laranja estão as do conjunto menor de fonte-dreno. Sondas responsivas para eCO ₂ e fonte-dreno estão marcadas em roxo e aquelas que respondem ao desenvolvimento do colmo e fonte-dreno estão em marrom.	40
Figura 6: Diagrama de Venn comparando o conjunto de sondas vindas das análises de fonte-dreno (McCormick, Cramer, Watt, 2008), desenvolvimento do colmo (Casu et al., 2007) e resposta ao eCO ₂ (Souza et al., 2008).	46
Figura 7: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c03.....	48
Figura 8: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c06.....	49
Figura 9: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c07.....	50

Figura 10: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c13.	51
Figura 11: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c14.....	51
Figura 12: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c20.	52
Figura 13: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c25.	52
Figura 14: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c32.	53
Figura 15: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c34.	54
Figura 16: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c44.	54
Figura 17: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c45.	55
Figura 18: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c74.	56
Figura 19: Análises de expressão gênica (acima) e evolutiva (abaixo) para a rede de co-expressão do cluster c77.	56
Figura 20: Conjunto de redes baseadas nas sondas responsivas para CO ₂ criadas a partir da rede principal. As cores de cada nó seguem o mesmo padrão utilizado nas redes dos clusters.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das análises de co-expressão gênica obtida para cana-de-açúcar.....37

Tabela 2: Lista de genes de cana-de-açúcar responsivos à eCO₂ identificados por Souza et al. (2008) que possuem sondas presentes na rede de co-expressão, com seus respectivos clusters. Sondas correspondentes ao mesmo gene estão marcadas com um asterisco e grafadas na mesma cor.....38

Tabela 3: Principais termos funcionais de enriquecimento MapMan para clusters de HCCA compostos por genes significativamente regulados na resposta ao eCO₂. Os números em azul indicam genes regulados negativamente, enquanto os escritos em vermelho são regulados positivamente na análise. Em roxo estão aqueles cuja regulação é ao mesmo tempo positiva e negativa nos diferentes experimentos do trabalho que os analisou.43

SUMÁRIO

1.1 Avanços e desafios genômicos	16
1.2 CO ₂ e mudanças climáticas.....	17
1.3 Efeitos do CO ₂ nas plantas.....	20
1.4 Fonte-dreno e particionamento de carbono.....	22
1.5 Redes de co-expressão gênica	26
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Análise dos dados de expressão gênica em larga escala.....	31
3.3 Análise espaço-temporal da expressão gênica por topologia e comparação evolutiva de redes.....	33
3.4 Ontologia gênica, identificação de ortologia, anotação e enriquecimento funcional MapMan	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Caracterização inicial	34
4.2 Redes de co-expressão gênica e de <i>clusterização</i>	35
4.3 Sondas responsivas em eCO ₂ presentes na rede de co-expressão	37
4.4 Análise de <i>clusters</i> com transcritos responsivos em eCO ₂	38
4.5 Análise espaço-temporal e evolutiva da expressão gênica por topologia de rede	47
4.6 Redes derivadas de sondas responsivas em eCO ₂	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
Dado suplementar 1	77
Dado suplementar 2.....	78
Dado suplementar 3.....	81
Dado suplementar 4.....	85
Dado suplementar 5.....	86
Anexo 1	87

Anexo 2.....	88
--------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Avanços e desafios genômicos

Muitas características das culturas agrícolas são quantitativas, complexas e controladas pela interação entre múltiplos genes. O progresso recente no mapeamento genético, genômica funcional e sequenciamento de genomas produziu uma abundância de dados sobre *loci* de características quantitativas e a expressão de genes associados a essas características. O progresso no desenvolvimento de novas variedades de plantas cultivadas pode ser grandemente melhorado se as consequências fenotípicas das alterações puderem ser previstas com precisão a partir da composição genética (Hammer et al., 2006). O desenvolvimento de métodos preditivos precisos, capazes de escalar do genótipo para fenótipo, pode ser abordado através da biologia de sistemas juntamente com dados de genômica e expressão gênica para identificar causalidade entre componentes de diferentes vias e múltiplos fenótipos (Moore, 2005).

Um dos objetivos principais da genética vegetal é a descoberta de subsistemas moleculares subjacentes a características complexas (Ficklin, Feltus, 2011). A combinação de genômica, genética e métodos computacionais em nível de sistema fornece uma abordagem poderosa para a compreensão de sistemas biológicos complexos. De particular importância é a descoberta da interação gênica que leva a características agrícolas e econômicas desejáveis na família Poaceae (gramíneas). As Poaceae incluem culturas como arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum* spp.) e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), que são globalmente algumas das culturas mais importantes do ponto de vista agrícola e econômico. Compreender as interações complexas subjacentes às características agronômicas destas espécies é, portanto, de grande importância, em particular para ajudar nas melhorias das culturas para enfrentar os desafios para a alimentação humana, mas também para a compreensão básica de sistemas biológicos complexos. Em casos de espécies de gramíneas com genomas de poliploidia complexa, como a cana-de-açúcar, onde os recursos genômicos não progrediram tanto como em outras gramíneas (por exemplo, arroz, sorgo, milho), os métodos de genômica funcional translacional podem ser mais custosos, bem como estratégias eficazes para o

melhoramento das culturas e para desvendar as consequências funcionais da poliploidia (Ficklin, Feltus, 2011).

Agora que os dados de expressão genética foram gerados para várias espécies de plantas, eles podem ser explorados para descoberta de genes baseada em hipóteses para revelar respostas transcricionais em certos genótipos ou a estímulos externos, assim como para descobrir a expressão coordenada de diferentes genes (Usadel et al., 2009). Os dados desses tipos de análises apoiam a hipótese de que genes funcionalmente relacionados tendem a ser co-expressos transcricionalmente (Ruprecht et al., 2011). Genes com perfis de expressão altamente correlacionados no tempo ou em diversas condições experimentais podem ser agrupados e permitir a compreensão de grupos de genes que respondem de maneira semelhante a condições variadas e que podem, portanto, ser co-regulados. O objetivo final é compreender os sistemas biológicos com detalhes suficientes para permitir previsões precisas e quantitativas sobre o comportamento dos sistemas biológicos, incluindo previsões dos efeitos das modificações do sistema (Katagiri, 2003).

A representação de relações co-expressas como redes permite ao biólogo contextualizar mais prontamente seus genes ou proteínas de interesse (Mutwil et al., 2010). Redes de co-expressão de plantas foram construídas para *Arabidopsis thaliana* (Atias, Chor, Chamovitz, 2009; Burks et al., 2022; Mao et al., 2009; Mentzen et al., 2008; Mutwil et al., 2010; Persson et al., 2005; Wei et al., 2006), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Faccioli et al., 2005; Panahi, Shahi, 2024), arroz (Ficklin, Luo, Feltus, 2010; Lee et al., 2009; Zhang et al., 2022), choupo (*Populus* sp.) (Ogata, Suzuki, Shibata, 2009; Zhang, Yin, 2020), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Edwards et al., 2010; Mo et al., 2022) e milho (Ficklin, Feltus, 2011; Liu et al., 2021).

1.2 CO₂ e mudanças climáticas

As mudanças climáticas, principal força motriz do aquecimento global, são definidas como as mudanças nos padrões climáticos causada principalmente pelas emissões de gases de efeito estufa (GEE), que fazem com que o calor fique preso na atmosfera. Compreender o impacto dessas mudanças sobre os sistemas naturais e humanos, com seus riscos e vulnerabilidades, é um importante ponto de partida para entender o atual estado de emergência climática (Fawzy et al., 2020). As principais causas do efeito estufa são a utilização de minerais e combustíveis em indústrias que

emitem grande quantidade de dióxido de carbono (CO_2) e outros compostos; meios de transporte que emitem gases poluentes através da exaustão; e o desmatamento, que causa a liberação de CO_2 pela queima, além de impedir a absorção desse gás poluente pelas árvores, aumentando a sua quantidade no ar (Mikhaylov et al., 2020).

Desde a Revolução Industrial, caracterizada pela produção em massa e geração de eletricidade, a partir do século XVIII (um curto período de tempo comparado ao surgimento da vida), a humanidade já lançou enormes quantidades de gases de efeito estufa na atmosfera, já que a produção de energia dependia e ainda depende em grande parte da queima de combustíveis fósseis (Norby, Zak, 2011; Yoro, Daramola, 2020). Os principais GEEs são o CO_2 e o metano (CH_4), sendo o primeiro o principal responsável pelas alterações climáticas (Kweku et al., 2017; Maheshwari, Chandra, Jain, 2018).

De acordo com o Atlas Global do Carbono (2021), em 2019, as emissões de CO_2 atingiram mais de 35.000 megatoneladas (mt) (reduzindo ligeiramente em 2020 devido à pandemia naquele período), sendo que as emissões totais da humanidade ao longo da história já atingiram cerca de 2.000 gigatoneladas (gt), com perspectivas de crescimento. A Figura 1 mostra a mudança na média de temperatura da superfície do planeta e de precipitação comparando os intervalos entre os anos de 1986 a 2005 e a previsão de 2081 a 2100. Os dados de 2022 da Agência Internacional de Energia (IEA) mostraram que o crescimento global das emissões de gases com efeito de estufa nesse ano não foi tão elevado como alguns inicialmente temiam devido às perturbações causadas pela crise energética global, sendo este crescimento muito mais lento do que a recuperação de 2021 de mais de 6%. A crescente implantação de tecnologias de energia limpa, como energias renováveis, veículos elétricos e bombas de calor, ajudou a evitar 550 mt adicionais em emissões de CO_2 , embora ainda não sejam suficientes para resolver o problema no tempo necessário (IEA, 2022).

Dos 10 anos mais quentes desde 1880, cerca de nove ocorreram desde 2005 e, em 2019, as temperaturas em muitas partes do mundo foram mais altas do que a média; assim, para oferecer soluções ao problema do aquecimento global e das mudanças climáticas, diferentes países se uniram para assinar tratados que prometem sua lealdade para minimizar a emissão de CO_2 na atmosfera (Yoro, Daramola, 2020). Segundo dados do Painel Intergovernamental sobre Mudanças

Climáticas (IPCC), organizado por Pörtner et al., (2022), para que tenhamos a chance de manter ao alcance o limite de 1,5°C estabelecido pelo Acordo de Paris, o mundo deve alcançar o pico de emissões de GEE nos próximos três anos, e todas as trajetórias que limitam o aquecimento a 1,5°C (com ou sem excedente) também dependem da remoção de carbono da atmosfera. No entanto, nos ecossistemas terrestres, os efeitos dos serviços naturais de sequestro de carbono ligados à fertilização são limitados pela seca e pelo calor, e exacerbados por impactos não antropogênicos (Pörtner et al., 2022).

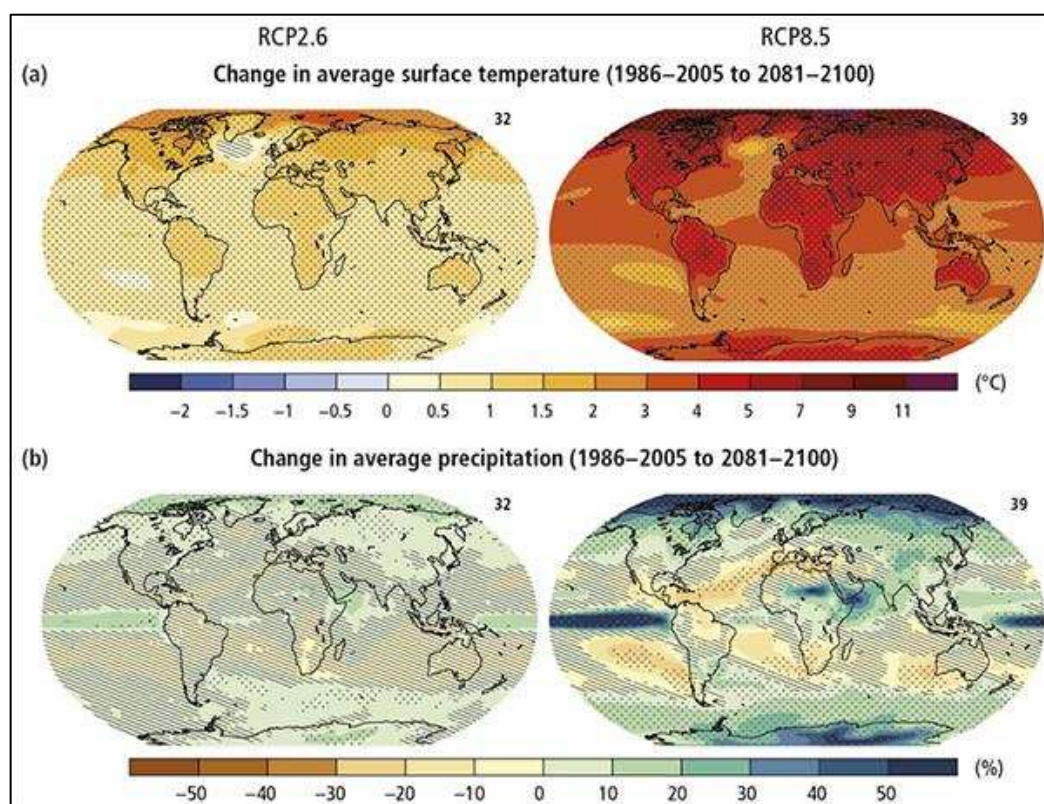


Figura 1: Mapas comparativos demonstrando a mudança na média de temperatura da superfície do planeta (a) e na média de precipitação (b) comparando os intervalos de tempo entre os anos 1986-2005 e a previsão entre 2081-2100. Fonte: IPCC, 2014.

A fenologia vegetal também depende da temperatura, e as mudanças climáticas trouxeram interesse na compreensão e modelagem dessas respostas, já que é importante compreender os mecanismos por trás das mudanças fenológicas para prever mudanças futuras deste tipo e seus impactos (Piao et al., 2019). Estas mudanças afetam diretamente a produção mundial de alimentos, e este cenário já tem potencial de modificar a produção global das dez maiores culturas e a produção de calorias alimentares consumíveis em países específicos e globalmente (Ray et al., 2019). Os efeitos das alterações climáticas na agricultura podem ser diretos, indiretos

e socioeconômicos e, considerando que os resultados das tensões abióticas sobre o rendimento das culturas são difíceis de calcular com precisão, acredita-se que estas tensões tenham uma influência substancial na indústria agrícola, dependendo a extensão dos danos à área total cultivada (Raza et al., 2019).

1.3 Efeitos do CO₂ nas plantas

No que diz respeito às plantas, sugere-se que o aumento do CO₂ tenha um efeito de “fertilização”, pois aumenta a condutância da fotossíntese, além de diminuir a evapotranspiração, auxiliando a planta no enfrentamento da seca, reduzindo a absorção de O₃ e melhorando a assimilação do carbono (C), mitigando, assim, as potenciais consequências das alterações deletérias causadas pelas alterações climáticas (Cassia et al., 2018). Contudo, os estímulos provocados pelo CO₂ elevado (eCO₂) podem ser suprimidos por outros estresses climáticos ou ambientais negativos, até porque o CO₂ é um gás com efeito de estufa, assim, o seu aumento traz também um aumento desses outros estresses (Xue et al., 2017).

A produção de raízes de mudas de pinheiro silvestre (*Pinus sylvestris* L.) foi significativamente maior sob eCO₂ em cerca de 122%, e estas foram mais espessas neste ambiente, com taxa de respiração e quantidade de nitrogênio (N) também aumentadas no tratamento (Janssens et al., 1998). O peso seco total das plantas de tulipa (*Liriodendron tulipifera* L.) expostas ao eCO₂ foi 173% maior e o peso seco apenas da raiz aumentou 99%, enquanto a área específica da folha caiu 21% nessas condições (O' Neill, Luxmoore, Norby, 1987). No algodoeiro (*Gossypium* sp.), o eCO₂ estimulou a proliferação radicular, o que resultou em maior poder de aproveitamento do volume ocupado do solo, possivelmente aumentando a disponibilidade de água e nutrientes e, conseqüentemente, a área da rizosfera (Rogers, Prior, O' Neill, 1992). O eCO₂ aumenta a oferta de fotoassimilados, estimulando o crescimento micorrízico, o que também pode aumentar o crescimento das plantas, pois aumenta a oferta de nutrientes, diminuindo a competição na micorriza e aumentando os fungos e a planta, que se ajudam mutuamente no crescimento (Lin, Zhang, Bai, 2000).

A relação planta-patógeno também pode ser alterada sob o eCO₂, com uma resistência mais forte contra patógenos virais ou (hemi)biotróficos e uma maior vulnerabilidade a patógenos necrófagos e herbívoros mastigadores, no entanto, os níveis de fitohormônios podem ser afetados por outros fatores e sugere-se que existe

uma relação mal definida entre a fertilização com N, os níveis atmosféricos de CO₂ e a resistência das plantas (Bazinet, Tang, Bede, 2022).

Diferentes espécies também podem responder de maneira diferente ao alto CO₂, por exemplo, este não teve efeitos significativos na biomassa da parte aérea ou na relação raiz/parte aérea em *Bothriochloa ischaemum* L., mas aumentou a biomassa da raiz e diminuiu a relação raiz/parte aérea em *Medicago sativa* L. (Xue et al., 2017). Nas gramíneas, os efeitos do eCO₂ nos atributos funcionais das raízes foram específicos da espécie, mas foram observadas tendências claras para o aumento da atividade da fosfatase em todas as espécies, levando a uma relação C:P mais baixa (Piñeiro et al., 2022).

A fisiologia da planta é outro fator que pode influenciar diretamente na sua resposta ao CO₂ elevado. Plantas com padrão C₄, como a cana-de-açúcar, já estão saturadas com CO₂ natural do ambiente, o que maximiza sua eficiência fotossintética em relação às C₃, portanto o eCO₂ nestes casos pode não estimular diretamente maior produtividade nessas espécies (Nelson, Cann, Mackie, 2010). O eCO₂ pode induzir aumentos na biomassa vegetal, sequestro de N, efeito *priming* da rizosfera e decomposição total da matéria orgânica do solo, e o aumento da decomposição total dessa matéria orgânica está positivamente relacionado ao sequestro de N pelas plantas em pastagens C₃ e C₄ sob e CO₂ (Nie, Pendall, 2016).

Sem a adição de N externo, o eCO₂ pode reduzir a disponibilidade de N para as plantas no longo prazo devido à maior absorção deste nutriente e sua imobilização pelos microrganismos, que crescem à medida que aumenta a rizodeposição, e assim, a resposta de crescimento das plantas sob condições climáticas adversas nem sempre pode ser sustentada (Dijkstra et al., 2013; Luo et al., 2004). Outros fatores, como o pH, também podem influenciar o crescimento das plantas sob eCO₂, como observado em estudo com gramíneas, onde esse crescimento foi reduzido em pH 4,3 e 5,9, mas aumentou em pH 7, enquanto as taxas de desnitrificação da rizosfera seguiram padrões semelhantes ao crescimento, sugerindo que ambos os fatores estão interligados (Hall, Paterson, Killham, 1998).

Sob altas concentrações de CO₂ há também um aumento na biomassa do colmo e de sacarose na cana-de-açúcar, porém, quando combinadas com altas temperaturas (esperadas com o aumento de CO₂), o efeito na biomassa de sacarose torna-se negativo (Sonkar et al., 2020). Altas concentrações de CO₂ atmosférico

também aumentaram a taxa fotossintética, a taxa de síntese de sacarose e o peso das plantas de cana-de-açúcar cultivadas neste ambiente, além de reduzir a condutância estomática e as taxas de transpiração e melhorar a eficiência do uso da água (Souza et al., 2008). Assim, os modelos de resposta da cana-de-açúcar às mudanças climáticas devem considerar as diferentes variáveis para representar os efeitos do CO₂ nesta cultura, uma vez que os resultados podem ser diversos, principalmente se associados a outras mudanças climáticas, o que mostra a necessidade de mais estudos para uma maior compreensão (Linnenluecke, Nucifora, Thompson, 2018).

1.4 Fonte-dreno e particionamento de carbono

As plantas se desenvolvem através da evolução de redes moleculares e metabólicas complexas e bem coordenadas que abrangem genes, metabólitos e respostas de aclimação e que modulam o crescimento, a fotossíntese, a manutenção osmótica e a homeostase dos carboidratos (Saddhe, Manuka, Penna, 2021). O seu crescimento é limitado por processos fisiológicos e de desenvolvimento: as taxas metabólicas determinam a absorção e armazenamento de recursos, enquanto a alocação desses recursos, a divisão e expansão celular e importantes transições de desenvolvimento têm efeitos sobre a sua utilização, e estes processos juntos podem ser compreendidos em interações fonte-dreno (White et al., 2016).

A capacidade e a eficiência de assimilação de carbono são componentes importantes do rendimento dos órgãos dreno e há variações de espécies na capacidade fotossintética e na fixação de C, que resultam em pressão de seleção, mas apesar dessa variação, na maioria das culturas a carga do floema é apoplásmica, e depende de um gradiente de concentração de açúcar entre o tecido fonte e o tecido dreno, fornecendo o fluxo de massa obrigatório para o desenvolvimento dos órgãos de armazenamento (Ferne et al., 2020). A Figura 2 mostra um diagrama do processo do movimento da sacarose e metabolismo na cana-de-açúcar da fonte até o dreno. Evidências mostram que os aumentos futuros na produtividade das culturas agrícolas dependem crucialmente de uma compreensão quantitativa da medida em que os tecidos fontes ou dreno limitam o crescimento e como isso muda durante o desenvolvimento das plantas (White et al., 2016).

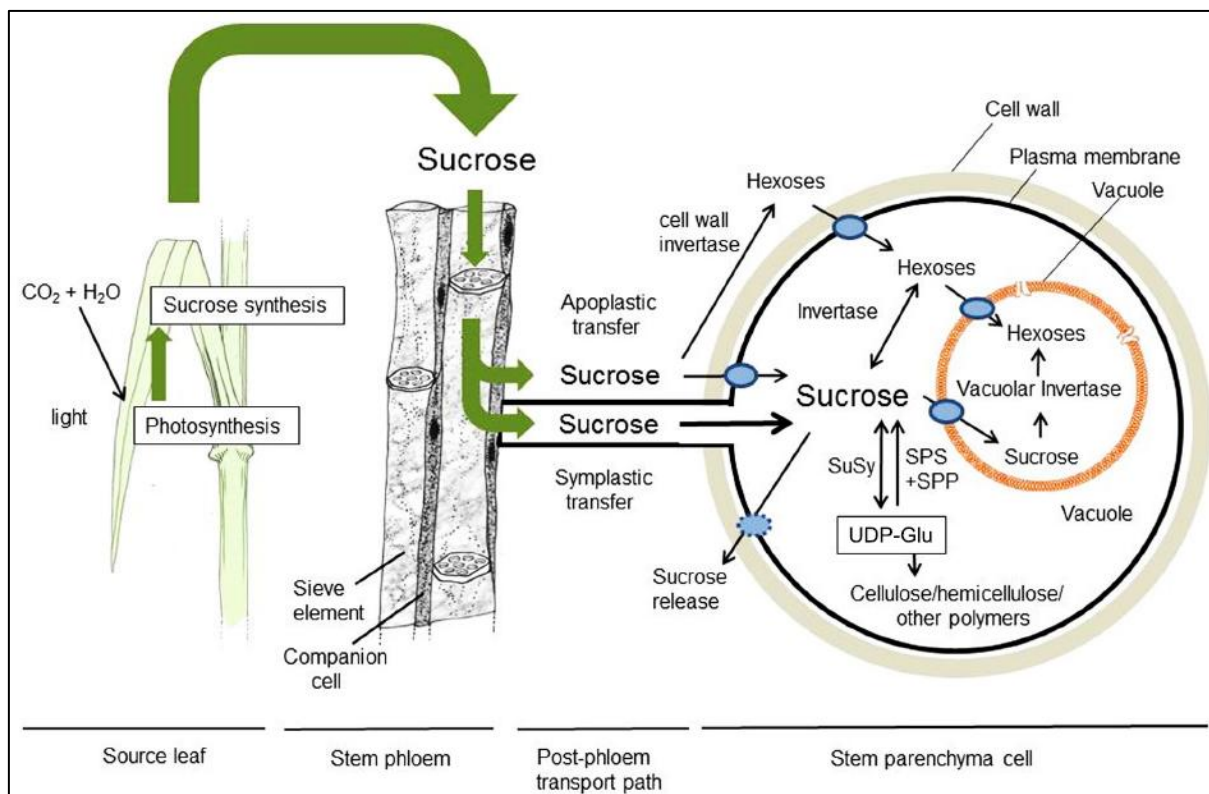


Figura 2: Diagrama ilustrado do processo do movimento e metabolismo da sacarose na cana-de-açúcar, da sua síntese, nas folhas, até o seu dreno, no colmo. Fonte: Wang et al., 2013.

Ao longo da vida da planta, um mesmo órgão pode passar de dreno a fonte e vice-versa, por exemplo, as folhas jovens começam como dreno de C, pois não conseguem assimilar nutrientes para seu crescimento, mas, à medida que se desenvolvem, vão assimilar o C que é exportado para outros órgãos, tornando-se fontes de C, além de um mesmo órgão também poder ser simultaneamente fonte de determinado nutriente, mas dreno de outro (Rodrigues et al., 2019). A força da fonte de fotoassimilados é ditada tanto pela taxa fotossintética como pela taxa de remobilização do fotoassimilado dos tecidos originais, no entanto, o rendimento de muitas culturas raramente atinge o seu potencial máximo de produção e a diferença de rendimento resultante é definida como a diferença entre o rendimento agrícola médio e o potencial de rendimento agrícola para uma área específica (Smith, Rao, Merchant, 2018).

As reservas de hidrato de carbono servem para amortecer desequilíbrios entre fonte e dreno que podem resultar de ajustes temporários na demanda por assimilados (por exemplo, defloração) ou deficiências na assimilação de C (por exemplo, desfolha) (Cai, Xie, Xu, 2021). O carbono desempenha um papel central no desenvolvimento das plantas, pois é um dos elementos mais abundantes e versáteis envolvidos no

metabolismo, razão pela qual a partição dos produtos primários da fotossíntese em diferentes reservatórios funcionais tem sido objeto de investigações há muitas décadas (Hartmann et al., 2020). A partição de carbono é, portanto, um processo crítico na distribuição da energia química convertida pela planta através da fotossíntese (Wang et al., 2013).

Algumas enzimas desempenham um papel crucial na partição C e nas relações fonte-dreno. A sacarose pode ser sintetizada em células fotossintéticas e de armazenamento pela ação sequencial de duas enzimas: sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose fosfato fosfatase (SPP) (Wang et al., 2013). Ambas participam da síntese da sacarose, a primeira converte a frutose-6-P e a UDP-glicose em sacarose-P, que é transformada em sacarose pela segunda; a sacarose sintase (SuSy) cliva a sacarose para gerar UDP-glicose e frutose, enquanto o transporte da sacarose para os órgãos de drenagem ocorre através do floema, e sua entrada nas células do dreno pode ser mediada por transportadores de açúcar de membrana (Calderan-Rodrigues et al., 2021).

A enzima SuSy desempenha um papel essencial na manutenção da sacarose e do carbono em geral, conforme indicado por um estudo em cana-de-açúcar onde todo o carbono que não estava na sacarose refletiu a quebra líquida da sacarose que entrou no entrenó, o que é indicativo de hidrólise por invertases e clivagem pela sacarose sintase (Botha et al., 2023). As características e funções vasculares do transportador de sacarose, juntamente com o mecanismo transitório de armazenamento de amido e a atividade da invertase e SuSy, podem potencialmente ser direcionadas para a dinâmica fonte-dreno, favorecendo o acúmulo de biomassa em culturas forrageiras ou o maior rendimento de grãos em cereais (Mathan, Singh, Ranjan, 2021).

Sabe-se que vários transportadores de açúcar também regulam a partição de carboidratos e as principais etapas de transdução de sinal envolvidas na percepção de estresses bióticos e abióticos, como SWEETs, SUTs e MSTs, que estão envolvidos no carregamento e descarregamento de açúcar, bem como no transporte de longa distância, além de orquestrar processos oxidativos e osmóticos e tolerância e resistência ao estresse (Saddhe, Manuka, Penna, 2021). O estudo dos transportadores de sacarose (STs) é uma alternativa promissora para atingir o potencial de armazenamento deste açúcar (Calderan-Rodrigues et al., 2021). A

expressão desses transportadores parece estar intimamente ligada ao acúmulo de biomassa pela planta, como mostra estudo de transcriptoma com diferentes variedades de cana-de-açúcar. Neste estudo, houve diversos perfis de expressão para genes que codificam transportadores de açúcar da mesma família; embora o SUT4 tenha sido regulado positivamente no grupo de baixa biomassa, o SUT1 foi altamente expresso nos genótipos de alta biomassa, enquanto os genes que codificam para SWEETs foram regulados negativamente no grupo de baixa biomassa (Correr et al., 2020).

A cana-de-açúcar, como uma gramínea C4 utilizada principalmente para a produção de açúcar e etanol, possui um sistema fonte-dreno único: gradualmente acumula grandes quantidades de carbono na forma de sacarose em seus colmos através de um caminho complexo (Calderan-Rodrigues et al., 2021). Os colmos armazenam o fotossintato como sacarose, que é um dissacarídeo solúvel, e pode atingir concentrações excepcionalmente altas, de até 650mM ou 18% do peso fresco do colmo em variedades comerciais (Wang et al., 2013; Welbaum, Meinzer, 1990).

Durante a maturação da cana-de-açúcar, o destino do C assimilado muda de componentes insolúveis e respiratórios para sacarose, um soluto de armazenamento osmoticamente ativo (Wang et al., 2013; Whittaker, Botha, 1997). Ao longo do desenvolvimento da planta, a sacarose sintetizada nas folhas fotossintéticas da cana-de-açúcar é translocada através do floema para os entrenós do colmo, incluindo os entrenós imaturos, o dreno de crescimento meristemático, e os entrenós maduros, o dreno de armazenamento (Wang et al., 2013).

O acúmulo de sacarose nos colmos de cana-de-açúcar é controlado por uma complexa rede de genes envolvidos na hidrólise, ressíntese e transporte da sacarose, na biossíntese da parede celular e nas respostas ao estresse abiótico, e as invertases, SWEET13, SuSy1, SuSy3, CAD1 e CAD6 estão provavelmente relacionadas aos processos de partição de C em colmos apicais (Hosaka, 2021). Correr et al. (2020), trabalhando com cana-de-açúcar, mostraram que a classe de enzimas SuSy pode estar envolvida na síntese de sacarose nas folhas, de forma semelhante à SPS e SPP.

Dois caminhos para abordar esta questão em plantas parecem promissores: uma melhor caracterização do mecanismo subjacente às relações alteradas na fonte-dreno em mutantes de desenvolvimento que permite a engenharia racional do

rendimento das culturas, e estratégias de modelagem aplicadas à escala da planta como um todo como o uso de um banco de testes para combinações e intervenções metabólicas (Fernie et al., 2020). Estas relações são complexas e a consideração deve começar a centrar-se na natureza dinâmica da rede para compreender plenamente a plasticidade do desenvolvimento da produção, particularmente sob condições ambientais em mudança, onde a água e elementos como o carbono e o nitrogênio governam os fluxos e, portanto, a dinâmica de fonte-dreno (Smith, Rao, Merchant, 2018).

1.5 Redes de co-expressão gênica

Entre os modelos mais amplamente utilizados para inferência de redes reguladoras gênicas estão as de correlação ou co-expressão (Dobra et al., 2004; Friedman et al., 2000; Friedman, 2004; Segal et al., 2003; Toh, Horimoto, 2002; Yeung, Tegnér, Collins, 2002). Nestas redes a relação de interdependência entre os genes em um complexo sistema de interação e regulação pode ser prevista por meio de métodos estatísticos e computacionais, gerando uma representação da influência recíproca de genes. Uma rede de co-expressão conecta pares de genes (nós) que são significativamente co-expressos através de diferentes condições. Assim, o primeiro passo para a criação de uma rede é a obtenção da correlação entre cada um dos pares de genes analisados em uma tabela de correlação. O segundo passo é escolher um valor de corte acima do qual todos os pares de genes são conectados. As redes de co-expressão são de grande interesse biológico, uma vez que genes co-expressos provavelmente são controlados pelos mesmos mecanismos de regulação da transcrição, e assim provavelmente têm funções relacionadas ou são membros de uma mesma via metabólica ou complexo proteico (Weirauch, 2011).

Essas redes exibem propriedades estruturais distintas em comparação com outras redes biológicas, como as redes de interação proteína-proteína (PPI). Por exemplo, estudos sobre *Saccharomyces cerevisiae* indicam que a alta correlação de expressão gênica não implica necessariamente em interações físicas entre proteínas, sugerindo que as redes de co-expressão refletem mais as redes regulatórias gênicas do que os PPIs (Xulvi-Brunet, Li, 2009). A hibridização e o fluxo gênico também podem alterar significativamente esse tipo de rede, pois a mistura entre populações leva à expressão gênica correlacionada devido ao desequilíbrio de ligação, em vez de

relações funcionais. Isso destaca a importância de considerar a história evolutiva ao interpretar esses resultados em populações naturais (Rogini, Bolnick, 2025). Esse tipo de análise também se mostrou eficaz na previsão de funções gênicas, conforme demonstrado em *Aspergillus niger*, onde mais de 70% dos genes foram representados em uma rede de coexpressão recém-gerada. Essa rede superou os modelos anteriores, mostrando seu potencial na elucidação de fenômenos complexos de regulação gênica (Schäpe et al., 2023).

Um estudo sobre *Lens ervoides* investigou as redes de coexpressão de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) resistentes e suscetíveis e identificou redes envolvidas na resistência contra patógenos, associando módulos com altos coeficientes de correlação com processos metabólicos, além disso, hospedeiros resistentes mostraram uma coexpressão mais forte de genes R, o que pode aumentar a resistência (Cao, Banniza, 2024). Em *Amorphophallus*, a rede de co-expressão foi usada para explorar mecanismos de resistência contra a doença da podridão mole, identificando seis módulos correlacionados com a resistência, e genes-chave foram identificados como potenciais reguladores da resistência (Gao et al., 2022). No trigo, a análise da rede de co-expressão foi usada para estudar a pistilodia, encontrando módulos associados à doença e descobrindo que genes centrais e fatores de transcrição, como HB e BES1, desempenham papéis importantes na sua regulação (Chen et al., 2022).

Um estudo sobre arroz usou co-expressão para investigar os mecanismos moleculares da tolerância ao frio, chegando em 26 módulos de coexpressão, 12 altamente correlacionados com estresse ou recuperação pelo frio, além de genes envolvidos na regulação hormonal, autofagia e metabolismo do açúcar foram identificados como chave nessa resposta (Zeng et al., 2022). Um estudo no milho identificou 12 módulos relacionados à tolerância a baixas temperaturas, com genes envolvidos em vias como regulação do ciclo celular e sinalização de auxina (Yu et al., 2023). Um estudo sobre a planta do chá (*Camellia sinensis*) usou essas redes para investigar os mecanismos regulatórios da biossíntese de flavonóides, chegando em módulos associados à biossíntese de catequina, teanina e cafeína (Tai et al., 2018). Na soja, uma rede de co-expressão em grande escala foi construída usando dados de RNA-seq de 15 tecidos e encontrou módulos associados a processos como fotossíntese, gliconeogênese e resposta ao estresse biótico, com genes centrais

envolvidos na regulação da transcrição e nas vias metabólicas (Almeida-Silva et al., 2020).

O método HRR (Hierarchical Random Rewiring) para construir redes de coexpressão gênica envolve uma abordagem sistemática para compreender as relações complexas entre genes com base em seus dados de expressão. Esse método incorpora modelos evolutivos que consideram tanto a duplicação quanto os genes *de novo*, que são essenciais para entender a integração de novos genes em redes ancestrais (Gu et al., 2019). Assim, é possível identificar estruturas modulares hierárquicas dentro de redes de coexpressão gênica, que são indicativas de diferentes funções gênicas em vários níveis, finalizando com testes estatísticos usados para validar as relações hierárquicas entre os módulos, fornecendo informações sobre a organização funcional da rede (Zhang, 2012).

Já o método HCCA (Hierarchical Clustering of Coexpression Analysis) é utilizado para agrupamento em redes de coexpressão gênica, aproveitando as relações entre os genes para identificar módulos funcionais. Essa técnica permite a detecção de grupos sobrepostos de genes que podem participar de vários processos biológicos, aprimorando a compreensão das interações gênicas (Wang et al., 2010). Além disso, ele pode integrar diversos conjuntos de dados de microarranjos para formar uma rede de consenso, que reflete a proximidade funcional dos genes e atenua os vieses de dados ausentes (Bhattacharyya, Bandyopadhyay, 2009).

O software Planet engloba várias ferramentas projetadas para analisar e visualizar interações gênicas em diferentes espécies com o intuito de construir redes de coexpressão gênica. Essa ferramenta serve como uma plataforma abrangente para análises comparativas de redes de coexpressão em plantas, facilitando a previsão das funções dos genes e a transferência de conhecimento entre as espécies (Mutwil et al., 2011; Proost, Mutwil, 2016). Outras ferramentas, como o DAPFinder e o DAPview também fornecem funcionalidades para construir e comparar redes de coexpressão gênica, particularmente na distinção de associações gene-gene entre fenótipos (Skinner et al., 2011). Além disso, o CoexpNetViz permite que os pesquisadores utilizem seus próprios dados de expressão gênica para gerar redes de coexpressão multiespécies, aprimorando as capacidades de análise comparativa na pesquisa de plantas (Tzfadia et al., 2016).

Neste estudo, fornecemos ao leitor os fundamentos das redes regulatórias transcricionais, com ênfase na co-expressão em cana-de-açúcar. Começamos com uma visão geral das pesquisas e abordagens técnicas, seguida por um exame das redes regulatórias da cana-de-açúcar envolvidas no equilíbrio fonte-dreno e no processo de maturação, com foco em como os genes responsivos em eCO₂ se comportam nesse meio. Finalmente, exploramos as redes específicas desses genes responsivos para analisar suas principais ligações e enriquecimentos funcionais, comparando também com a resposta em outras espécies de interesse.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral foi identificar transcritos envolvidos no balanço fonte-dreno e nos diferentes estágios de desenvolvimento de cana-de-açúcar que estejam altamente relacionados a genes responsivos em ambientes de CO₂ elevado, caracterizando assim suas interrelações e enriquecimentos funcionais.

Finalmente, os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Estabelecer as redes de co-expressão durante o desenvolvimento dos colmos e no balanço fonte-dreno pelo método correlação e separar em grupos pelo método de clusterização;
2. Identificar os transcritos responsivos (desenvolvimento e fonte-dreno) em cada uma das redes obtidas;
3. Identificar os transcritos que respondem em eCO₂ em cana-de-açúcar nas redes de co-expressão obtidas;
4. Analisar os grupos de redes, e suas dinâmicas transcricionais, para cada gene de interesse em eCO₂;
5. Analisar o enriquecimento funcional para cada rede;
6. Comparar evolutivamente as redes obtidas com outras redes relacionadas em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise dos dados de expressão gênica em larga escala

Dados brutos do Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) publicados por Casu et al. (2007) e McCormick, Cramer, Watt (2008) foram obtidos do Gene Expression Omnibus (GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), com número de acesso GEO GSE5021 e GSE11934, respectivamente. Também foram utilizados os dados brutos de Souza et al. (2008), estudo feito em colaboração com nosso grupo de pesquisa. No primeiro estudo (Casu et al., 2007) os autores conseguiram identificar 119 transcritos que foram diferencialmente expressos no colmo da cana-de-açúcar (meristema, entrenós 1–3, 8 e 20) durante o desenvolvimento da variedade de cana-de-açúcar Q117 cultivada no campo. Na análise de McCormick, Cramer, Watt (2008), os autores manipularam os níveis de açúcar nas folhas, em *Saccharum* sp. híbrido cv. N19, cultivado em campo, com doze meses de idade, por anelamento das folhas a frio (5°C) por 80 horas para examinar os mecanismos em que o acúmulo de açúcar nas folhas afeta a atividade fotossintética. Esse estudo identificou genes que respondem ao anelamento a frio (56 h), onde muitos deles (74) estão envolvidos em vias metabólicas primárias e secundárias. Diminuição da expressão de genes relacionados à fotossíntese e aumento da expressão de genes envolvidos na partição assimilada, síntese da parede celular, metabolismo do fosfato e estresse também foram observados. Já no terceiro estudo (Souza et al., 2008), foram analisados os efeitos do CO₂ elevado na fotossíntese, no desenvolvimento e no metabolismo de carboidratos em *Saccharum* sp. Esse estudo mostrou aumento de 30% na fotossíntese das plantas do experimento, além de aumento de aproximadamente 40% no teor de biomassa e sacarose, baixas taxas de condutância estomática e uso mais eficiente da água. O trabalho também identificou 33 genes com expressão diferencial nas folhas de plantas que cresceram em alta concentração de CO₂ (13 reprimidos e 20 induzidos), sendo os genes induzidos relacionados principalmente à fotossíntese e ao desenvolvimento. O dado suplementar 1 traz uma tabela que compara os principais métodos utilizados nos três trabalhos analisados. Os genes que aparecem expressos diferencialmente no artigo de Souza et al. (2008) foram usados no presente como isca para investigar redes do desenvolvimento e da relação fonte-dreno em bases de dados geradas a partir de artigos de Casu et al. (2007) e McCormick, Cramer, Watt (2008).

Os dados em formato CEL foram normalizados aplicando-se Robust Multiarray Analysis (RMA) (Irizarry, 2003), utilizando o *software* RMAExpress (Bolstad et al., 2003), com posterior normalização por gene, para a mediana. Todas as sondas correspondentes a sequências controle foram removidas da análise de rede, e os níveis de expressão normalizados foram então adequados para a análise de co-expressão.

3.2 Construção de rede de co-expressão

Redes de co-expressão gênica foram construídas a partir dos arquivos pré-processados usando a versão autônoma do *software* PlaNet (Mutwil et al., 2011) que utiliza a correlação de Pearson para construir matriz de correlação entre genes. Para visualização das relações de expressão, foi utilizado o HRR entre quaisquer dois genes como medida (Mutwil et al., 2011), visto que associações baseadas em classificação produzem análises robustas de co-expressão (Obayashi, Kinoshita, 2009). Utilizamos o valor de HRR que otimizou a relevância biológica (corte de HRR de 30) das redes.

Uma rede de co-expressão em larga escala foi gerada pelo Heuristic Cluster Chiseling Algorithm, HCCA, (Mutwil et al., 2011). Para particionar a rede em *clusters*, usamos o HCCA com 3 passos de distância do nó semente e tamanhos de *cluster* desejados variando de 40 a 400. Finalmente, conectamos os *clusters* com base em relações de co-expressão mútua para formar uma rede de *clusters*, onde quaisquer dois *clusters* na meta-rede são conectados se as somas dos pesos das bordas compartilhadas entre eles forem significativas e a pontuação de conectividade exceder 0,02, de acordo com Mutwil et al. (2010). Finalmente, o pacote Cytoscape (Shannon et al., 2003) foi utilizado para calcular o layout do modelo das redes. Os *clusters* resultantes (disponíveis em <http://sysbiol.ib.unicamp.br/SugarcaneNetwork>) apresentam genes co-expressos, presumivelmente envolvidos em processos biológicos relacionados.

A partir da rede de co-expressão principal, foram construídas redes de vizinhança para sondas marcadas como responsivas para eCO₂ no trabalho de Souza et al. (2008). Para essa construção, foram testados diferentes métodos: redes com até segundos vizinhos totais, redes com até terceiros vizinhos totais, redes com até segundos vizinhos filtradas (mantendo os primeiros vizinhos, mas apenas os segundos vizinhos com HRR<10) e redes com até terceiros vizinhos filtradas

(mantendo os primeiros vizinhos, mas apenas os segundos e terceiros vizinhos com $HRR < 10$). As análises de enriquecimento MapMan foram realizadas para todas as redes geradas em todos os testes. Por fim, foram escolhidas para análise mais aprofundadas as redes com até três vizinhos totais.

3.3 Análise espaço-temporal da expressão gênica por topologia e comparação evolutiva de redes

As redes gênicas da cana-de-açúcar responsivas ao processo de maturação e à relação fonte-dreno foram submetidas à análise da expressão gênica sobre a topologia da rede, através do software ViaComplex (Castro et al., 2009) e do pacote *levi* do software R. A comparação evolutiva das redes foi realizada comparando a topologia das redes de cana-de-açúcar, *Arabidopsis thaliana*, e *Oryza sativa*, utilizando os dados de co-expressão obtidos do portal PlaNet (Mutwil et al., 2011). A visualização em Hive Plots das relações evolutivamente conservadas nas redes de co-expressão dessas espécies de plantas foi realizada com software JHIVE (<https://hiveplot.com>).

3.4 Ontologia gênica, identificação de ortologia, anotação e enriquecimento funcional MapMan

Em estudo de nosso grupo (Vicentini et al., 2012) conduzimos a classificação ortológica da atual coleção EST de cana-de-açúcar disponível ao público. Utilizando esta classificação foi possível associar os transcritos analisados a seus ortólogos no conjunto de dados dos proteomas de Viridiplantae (*Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Selaginella moellendorffii*, e *Physcomitrella patens*). A anotação funcional dos transcritos foi feita com termos de categorias MapMan (Thimm et al., 2004) usando BLASTx (e-value $\leq 10^{-5}$). O enriquecimento do MapMan foi calculado selecionando termos anotados, em cada rede, que mostram um enriquecimento ou esgotamento significativo (teste de Fisher p-value ≤ 0.05) em relação a toda a anotação do MapMan do conjunto de cana-de-açúcar obtido do site do MapMan. Tanto os dados das redes de co-expressão quanto as anotações e enriquecimento funcionais estão disponíveis em <http://sysbiol.ib.unicamp.br/SugarcaneNetwork>. As análises de conjunto foram realizadas através do software Venny 2.1 (Oliveros, 2015, <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização inicial

Neste estudo foram utilizados dados provenientes dos trabalhos de Casu et al. (2007) e McCormick, Cramer, Watt (2008), que analisaram o desenvolvimento do colmo e a relação fonte-dreno na folha da cana-de-açúcar, respectivamente. Na análise de Casu et al. (2007) foram identificados um total de 124 sondas correspondentes à 119 transcritos expressos diferencialmente durante o desenvolvimento do colmo. Esses transcritos foram caracterizados principalmente como membros da superfamília celulose sintase, sendo estes das famílias celulose sintase A e (CesA) e celulose sintase-like (Csl), exibindo uma expressão coordenada durante o desenvolvimento do colmo. Além disso, também foi determinado que outros transcritos envolvidos no metabolismo e lignificação da parede celular foram co-expressos com membros das famílias dos genes CesA e Csl.

Já na análise feita por McCormick, Cramer, Watt (2008) com o aumento de sacarose na folha, um conjunto de 407 sondas de cana-de-açúcar foi expresso diferencialmente, advindos de um total de 8.236 conjuntos de sondas comparados entre o experimento e o controle. Os autores então identificaram 143 sondas em seis categorias para análises adicionais, com a intenção de focar os resultados da matriz em eventos relacionados aos carboidratos foliares e ao status fotossintético. As categorias foram: metabolismo de carboidratos, fotossíntese (reações de luz e escuridão); sinalização de açúcar, transporte e metabolismo de P_i , metabolismo mitocondrial, metabolismo da parede celular e resposta ao estresse. Dentro desses grupos, um total de 74 transcritos foram representadas por McCormick, Cramer, Watt (2008).

Além dos dados de ambos os trabalhos, nós também utilizamos dados provenientes da análise de Souza et al. (2008) acerca da resposta da cana-de-açúcar à altos níveis de CO_2 atmosférico. Esse trabalho, feito também através de análises de *microarray*, indicou um total de 33 genes expressos diferencialmente em pelo menos uma das amostras analisadas. Ao agruparem esses genes em categorias funcionais, analisando com foco em indução e repressão, os genes que foram induzidos estão nas categorias de fotossíntese, metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios e

ácidos nucleicos, enquanto os reprimidos foram classificados como fatores de transcrição e genes de resposta ao estresse.

4.2 Redes de co-expressão gênica e de *clusterização*

As sondas Affymetrix vindas dos trabalhos de Casu et al. (2007) e McCormick, Cramer, Watt (2008) foram utilizadas para a criação de uma rede de co-expressão gênica pelo método de correlação (Figura 3). Apesar da utilização dados de ambos os estudos na construção dessa rede, não é todo o conjunto de sondas encontrado nessas análises que está presente na rede final. Isso acontece, pois uma rede de co-expressão só pode ser gerada através de uma similaridade entre os níveis de expressão de dois ou mais genes, ou seja, acima de um certo limite de similaridade, genes e pares de genes formam uma lista de nós e arestas correspondentes a partir dos quais a rede é construída (Serin et al., 2016). Assim, apenas os conjuntos gênicos que apresentaram correlação na expressão compõem a nossa rede final.

Importante antes diferenciarmos o conceito de sonda e gene, que serão bastante debatidos em nossas análises. Os genes são partes do código genético, considerados a unidade básica de herança, que contém as informações necessárias para especificar as características de cada indivíduo (Green, 2024). Já as sondas são fragmentos de DNA, escolhidos para registrar a expressão de determinados genes, de modo que um conjunto de sondas pode estar associado à apenas um gene (Liu et al., 2003). Isso significa que algumas das sondas analisadas nesse trabalho podem corresponder a um mesmo gene na prática.

A rede total possui 7.960 nós e 46.372 arestas ligando esses nós. Nessa rede, os nós indicam as sondas utilizadas, enquanto as arestas mostram as relações entre os genes. Posteriormente, os genes identificados com expressão diferencial na análise da cana-de-açúcar em altas concentrações de CO₂ que aparecerem no conjunto que compõe essa rede serão analisados separadamente em detalhes.

A partir da rede de co-expressão em cana-de-açúcar apresentada na Figura 3, o agrupamento dos genes co-expressos foi obtido através do método HCCA (Mutwil et al., 2011). Esse método agrupa os genes com níveis de expressão mais correlacionados (Murad, 2013). Ao todo, foram encontrados 81 *clusters*, correspondentes às 7.960 sondas, e interligados por 195 arestas (Figura 4). Para cada

cluster foi realizada uma análise de enriquecimento funcional pelo MapMan (Dado Suplementar 2).

A Tabela 1 faz um resumo das características da rede de co-expressão de cana-de-açúcar. As sondas utilizadas na formação da rede foram organizadas em 653 termos de anotação MapMan.

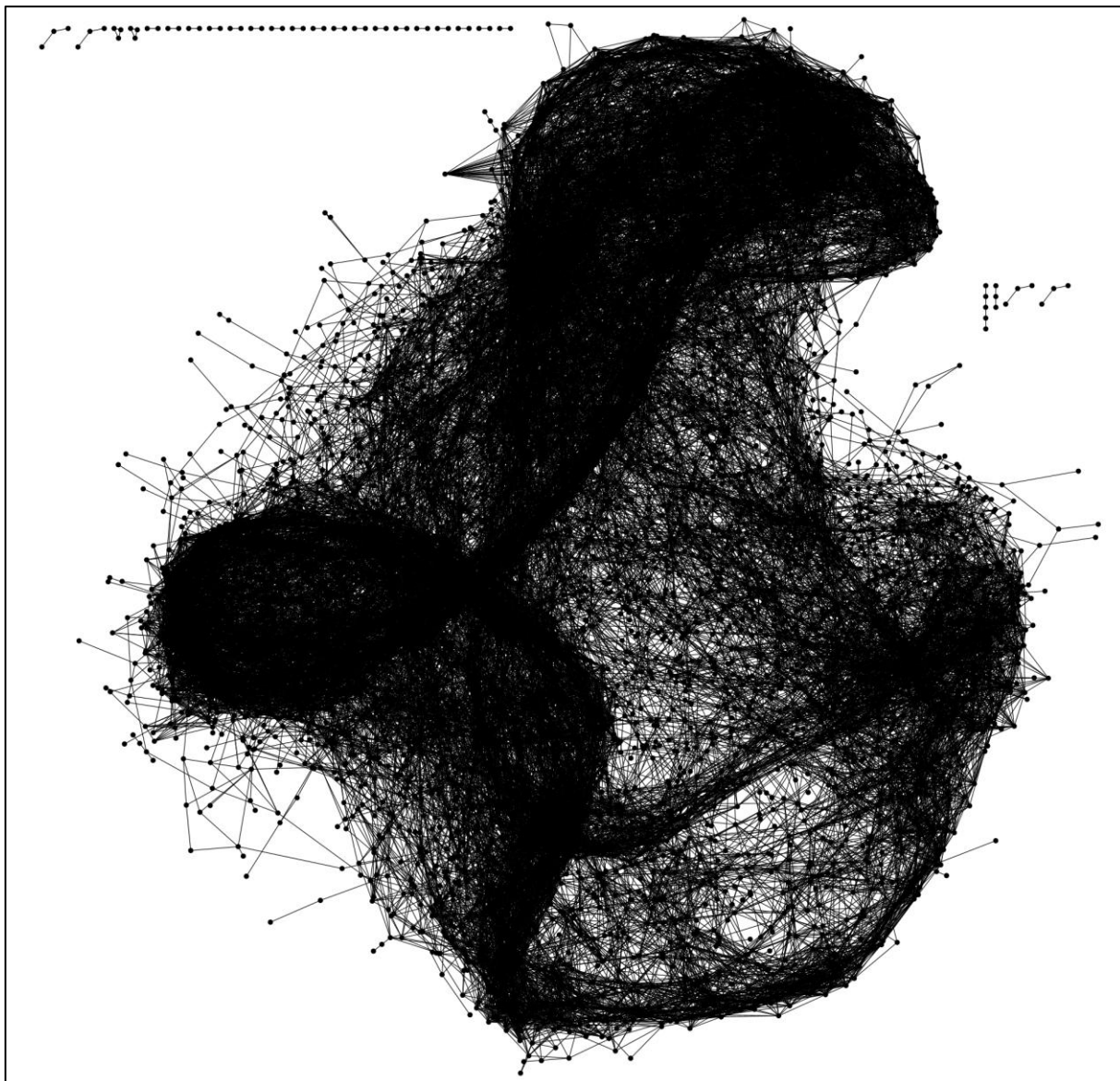


Figura 3: Rede de co-expressão gênica de cana-de-açúcar. Os nós são conjuntos de sondas do Affymetrix GeneChip Sugarcane Array. As arestas indicam co-expressão significativa entre conjuntos de sondas acima de um limite rígido ($r \geq 0.8$).

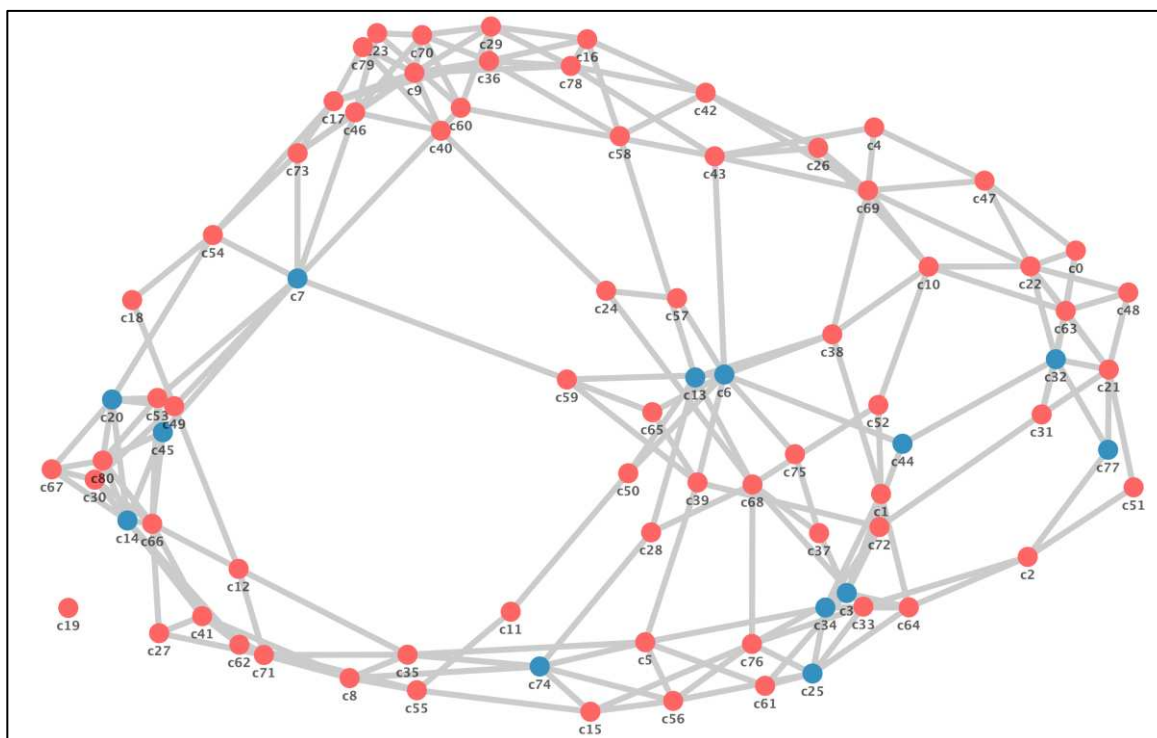


Figura 4: Meta-rede de *clusters* de genes co-expressos gerados por HCCA. Os *clusters* são compostos por genes de balanço fonte-dreno, processo de maturação e resposta ao CO₂. Os *clusters* que apresentam genes responsivos para o aumento de CO₂ estão marcados em azul.

Conjuntos de sondas na rede de co-expressão	7.960
Arestas na rede	46.372
<i>Clusters</i> HCCA	81
Termos funcionais do MapMan anotados	653
Nº de genes significativamente regulados relatados neste estudo	526
<i>Clusters</i> de HCCA com genes significativamente regulados	69

Tabela 1: Características das análises de co-expressão gênica obtida para cana-de-açúcar.

4.3 Sondas responsivas em eCO₂ presentes na rede de co-expressão

Dos 33 genes responsivos para eCO₂ cana-de-açúcar identificados por Souza et al., (2008), foram separados aqueles associados à uma ou mais sondas Affymetrix presentes na rede para compor nossas análises. Ao todo, 13 genes responsivos à eCO₂ foram correspondentes à 21 sondas presentes na rede de co-expressão. Com relação aos *clusters*, 13 destes apresentam uma ou mais sondas que responderam ao aumento de CO₂, sendo estes os *clusters* c03, c06, c07, c13, c14, c20, c25, c32, c34, c44, c45, c74 e c77. A Tabela 2 traz a lista completa de sondas responsivas à eCO₂ do trabalho de Souza et al. (2008) que fazem parte da rede de co-expressão, com seus respectivos genes correspondentes e o *cluster* ao qual a sonda pertence.

Gene	Sonda	Cluster
SCCCLR1072G07.g*	Sof.4193.2.S1_at	3
SCEPRZ1010F07.g	Sof.3557.1.S1_a_at	6
SCACLR2007B05.g	Sof.2957.1.S1_at	6
SCCCLR2002F08.g	Sof.3124.1.S1_s_at	7
SCCCRZ2C01H04.g*	Sof.3446.2.S1_at	13
SCCCRZ2C01H04.g*	Sof.3446.2.S1_s_at	13
SCCCRZ2C01H04.g*	Sof.3446.2.S1_x_at	13
SCCCRZ2C01H04.g*	Sof.3446.3.S1_a_at	13
SCCCRZ2C01H04.g*	Sof.3446.3.S1_x_at	13
SCQSRT1034D03.g	Sof.3182.1.S1_at	14
SCEZLR1031A03.g	Sof.4943.1.S1_at	20
SCVPRT2079H06.g	Sof.4519.1.S1_at	20
SCCCLR1072G07.g*	Sof.4193.1.S1_at	25
SCBFLR1046C09.g	Sof.3569.1.S1_at	25
SCCCLR1072G07.g*	Sof.4193.3.A1_at	32
SCCCCL3005E10.b	Sof.2388.1.S1_at	34
SCAGLR1043E03.g	Sof.1525.1.S1_at	44
SCVPRT2075B03.g	Sof.1877.1.A1_at	45
SCCCLR1079A02.g*	Sof.5198.1.S1_a_at	74
SCCCLR1079A02.g*	Sof.5198.3.S1_a_at	74
SCCCLR1079A02.g*	Sof.5198.3.S1_at	77

Tabela 2: Lista de genes de cana-de-açúcar responsivos à eCO₂ identificados por Souza et al. (2008) que possuem sondas presentes na rede de co-expressão, com seus respectivos *clusters*. Sondas correspondentes ao mesmo gene estão marcadas com um asterisco e grafadas na mesma cor.

4.4 Análise de *clusters* com transcritos responsivos em eCO₂

Para cada *cluster* com sondas responsivas em alto CO₂ foi criada uma rede de correlação menor, contendo todas as sondas pertencentes ao *cluster* em questão, com base na rede maior já construída na Figura 3. A Figura 5 traz as 13 redes correspondentes a cada um dos *clusters*. Na parte inferior de cada rede está o enriquecimento do MapMan para o *cluster* que gerou a rede. Ao lado de cada rede estão o número de nós e o número de arestas desta. Em cada rede, os nós marcados em azul correspondem às sondas responsivas em eCO₂, o verde representa sondas

que respondem à análise de desenvolvimento do colmo, e em vermelho e laranja estão as sondas responsivas à análise de fonte-dreno, sendo que as em vermelho fazem parte do conjunto geral de sondas, enquanto as que possuem cor laranja fazem parte do conjunto específico desse trabalho. Os nós marcados com cor roxa representam sondas que respondem tanto no trabalho de CO₂ elevado quanto na análise de fonte-dreno, e aquelas com cor marrom respondem tanto para fonte-dreno quanto no desenvolvimento do colmo. Nós falaremos melhor sobre essas sondas em comum entre duas análises posteriormente.

Os *clusters* com as maiores redes são c06 (254 nós), c25 (207 nós) e c03 (195 nós), enquanto aqueles com as menores redes são c44 (74 nós), c32 (83 nós) e c74 (85 nós). As redes dos *clusters* c32 e c77 possuem apenas uma sonda responsiva para eCO₂ e nenhuma outra que responda às análises de fonte-dreno ou desenvolvimento do colmo. O enriquecimento do *cluster* c32 está ligado ao metabolismo secundário de flavonoides antocianinas, enquanto o enriquecimento da sonda de CO₂ dessa rede é relacionado ao fator de iniciação translacional eIF-4A.

O metabolismo secundário dos flavonoides, incluindo as antocianinas, pode ser regulado por vários fatores. No geral, a regulação da biossíntese de antocianinas envolve uma rede complexa de processos, com o complexo MBW e os fatores de iniciação da tradução desempenhando papéis importantes (Zhang et al., 2008). Além da participação de alguns fatores de transcrição e fatores de iniciação translacional, proteínas ribossômicas e genes relacionados ao complexo proteico SKP1-CUL1-F-box também desempenham um papel na regulação translacional e pós-tradução da biossíntese de antocianinas (Aizza, Dornelas, 2015). O fator de iniciação da tradução eIF-4A em si nas plantas está envolvido na regulação da síntese proteica e desempenha um papel no controle do início da tradução quando a fotossíntese varia (Dutt et al., 2015), o que pode explicar sua regulação diferenciada em eCO₂.

Já o enriquecimento do c77 é ligado ao desenvolvimento de embriogênese tardia, enquanto a sonda de eCO₂ que pertence a esse *cluster* se relaciona com a enzima Cafeoil-CoA 3-O-metiltransferase 1 (CCoAOMT1). Essa enzima está envolvida na biossíntese de lignina e foi estudada em várias espécies de plantas. Assim, a CCoAOMT1 pode estar relacionada ao processo de embriogênese pois a biossíntese de lignina e a lignificação da parede celular são etapas críticas na formação de embriões vegetais (Park et al., 2011). A clonagem de um ortólogo de

CCoAomt de *Hibiscus cannabinus* L. também demonstrou sua expressão em vários tecidos e órgãos durante o desenvolvimento (Ghosh et al., 2012). A mudança na regulação da enzima CCoAOMT1 em eCO₂ pode ter acontecido pois essa enzima pode desempenhar um papel no aumento da fotossíntese e na resistência ao estresse, reações comuns da planta nessas condições (Zhao et al., 2021).

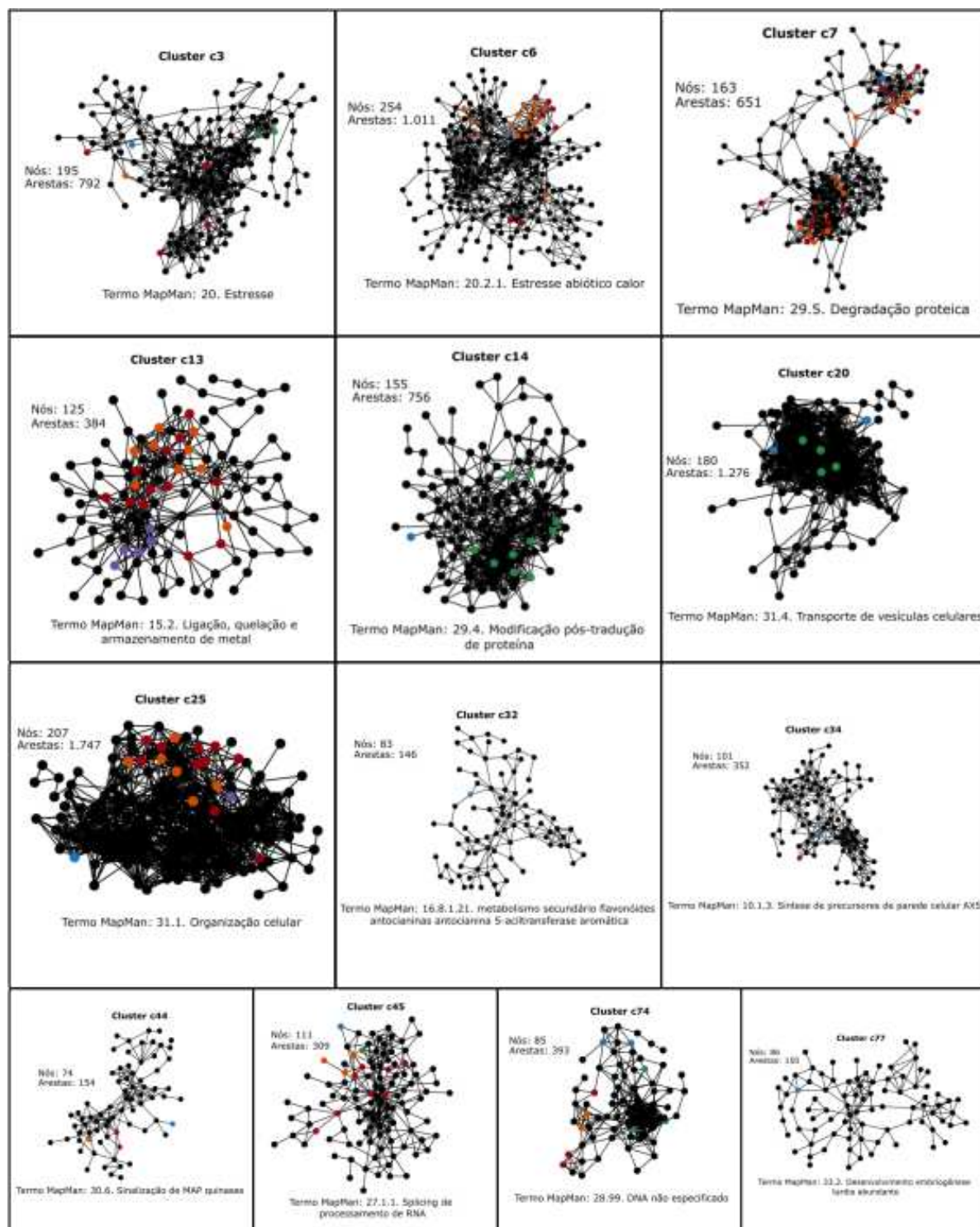


Figura 5: Conjunto de redes de correlação para os *clusters* com sondas responsivas para eCO₂. A cor azul representa sondas responsivas para eCO₂, o verde representa sondas responsivas

no desenvolvimento do colmo, em vermelho estão as que respondem em análise de fonte-dreno no conjunto geral e em laranja estão as do conjunto menor de fonte-dreno. Sondas responsivas para eCO₂ e fonte-dreno estão marcadas em roxo e aquelas que respondem ao desenvolvimento do colmo e fonte-dreno estão em marrom.

Por outro lado, os *clusters* c07, c13 e c6 são os que possuem mais sondas responsivas das três análises, com 30, 26 e 24 sondas responsivas em cada *cluster*, respectivamente. O *cluster* c07 possui enriquecimento ligado à degradação de proteínas, e a sonda responsiva para alto CO₂ presente nessa rede é enriquecida como proteína ligada à dormência. O processo de dormência das sementes é bastante complexo e envolve uma série de reações, entre elas a degradação e formação de proteínas. Por exemplo, o hormônio giberelina presta um papel crucial na germinação das sementes, e uma proteína chamada DELLA pode interagir com o receptor celular de giberelinas, impedindo a germinação, assim, a degradação dessa proteína é um dos processos que induzem a germinação da semente (Pawłowski, Staszak, 2016; Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Já foi relatado que a presença de CO₂ elevado no meio pode influenciar nos padrões de dormência das sementes. A taxa de germinação pode ser promovida pelo CO₂ aplicado exogenamente, mas as sementes que não germinem na presença de CO₂ podem entrar em uma fase secundária de dormência, o que também acontece em certas condições de estresse (Aanderud et al., 2015; Debska et al., 2013).

O enriquecimento do *cluster* c13 está relacionado à ligação, quelação e armazenamento de metal, enquanto o gene correspondente às cinco sondas presentes nesse *cluster* (SCCCRZ2C01H04.g) tem enriquecimento relacionado à ferritina. As ferritinas são proteínas de armazenamento de ferro essenciais para o metabolismo celular, com funções na suplementação desse metal e na entrega de nutrientes (Chang, Lv, Zhao, 2023). A ferritina nas plantas também desempenha um papel na fisiologia vegetal, incluindo armazenamento de ferro e proteção contra o estresse oxidativo, pois são responsáveis por reservar ferro de uma forma segura e biodisponível (Briat et al., 2010; Lima, 2007). A mudança na expressão de um gene ligado à ferritina sob alto CO₂ pode ser explicada, pois nos vegetais o ferro é um elemento chave necessário para a fixação de CO₂ e produção de biomassa, e em indivíduos sem essa proteína pode ocorrer a diminuição da fixação de CO₂, sugerindo que a cadeia fotossintética de transferência de elétrons é menos eficientemente utilizada pelas enzimas do ciclo de Calvin na ausência de ferritinas (Briat et al., 2010).

Já no *cluster* c6, o enriquecimento está ligado ao estresse abiótico por calor, e ambas as sondas responsivas para eCO₂ presentes nesse *cluster* são relacionadas à uma proteína induzida por luz. O estresse abiótico, particularmente o estresse térmico, pode exercer um impacto significativo na fotossíntese nas plantas, e, conseqüentemente, nas proteínas envolvidas nesse processo. O estresse térmico está relacionado a um declínio na capacidade fotossintética, afetando o crescimento das plantas e a produtividade da cultura (Swami, Munjal, Deswal, 2021). Além disso, os locais sensíveis ao calor no aparato fotossintético, como o complexo de evolução de oxigênio do fotossistema II e da enzima Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase (RuBisCO), também podem ser diretamente afetados por esse estresse (Muhammad et al., 2021).

Utilizando então os dados provenientes das análises de fonte-dreno, desenvolvimento de colmo e efeitos do eCO₂ na cana, foi montada uma tabela com a quantidade de sondas responsivas, além do termo de enriquecimento do MapMan para cada um dos *clusters* criados. Essa tabela completa pode ser encontrada como dado suplementar deste trabalho (Dado suplementar 3). Na tabela 3 estão apresentados esses dados apenas para os *clusters* que possuem sondas responsivas para o aumento de CO₂, que é o foco de nossa análise.

Ao todo, a tabela conta com os 13 *clusters* com sondas responsivas para eCO₂, sendo que o *cluster* c13 foi o que apresentou o maior número de sondas responsivas nessa análise (cinco no total), enquanto todos os outros apresentaram uma ou duas sondas responsivas. Apesar de possuir o maior número de sondas responsivas, é importante destacar que as cinco sondas que respondem ao alto CO₂ do *cluster* c13 na verdade correspondem a um único gene, como consta na tabela 2. Esse também é o *cluster* com a maior proporção de sondas responsivas no geral (24,8%), seguido dos *clusters* c07 (17,79%) e c74 (11,76%). O principal termo enriquecido desse *cluster* diz respeito à ligação, quelação e armazenamento de metal, como já mencionado. Já para o *cluster* c07, o enriquecimento está ligado à degradação de proteína, dado também já mencionado. Por fim, para o c74 a função foi associada ao DNA em geral. Com relação ao enriquecimento dos *clusters* responsivos em geral, os principais termos presentes, que aparecem em mais de um *cluster*, são a modificação e degradação de proteína, estresse e organização e transporte celular (tabela 3).

<i>Cluster</i>	Top termo MapMan	Genes no <i>cluster</i>	Genes responsivos	Prop. (%)	P- value	Fonte- dreno	Des. do colmo	eCO ₂
c03	Estresse	196	8	4.08	0.0	2 , 3	2	1
c6	Estresse calor abiótico	254	25	9.84	0.0	4 , 19		1 , 1
c07	Degradação de proteínas	163	29	17.79	0.0	28		1
c13	Ligação, quelação e armazenamento de metal	125	31	24.8	0.0	26		5
c14	Modificação pós- tradução de proteína	155	11	7.09	0.0		10	1
c20	Transporte de vesículas celulares	180	6	3.33	0.0		4	1 , 1
c25	Organização celular	207	19	9.18	0.0	16 , 1		1 , 1
c32	Metabolismo secundário flavonóides antocianinas.	83	1	1.2	0.01			1
c34	Síntese de precursores de parede celular AXS	101	2	1.98	0.027	1		1
c44	Sinalização de MAP quinases	74	4	5.40	0.0	3		1
c45	Emenda de processamento de RNA	111	13	11.71	0.003	11	1	1
c74	DNA não especificado	85	10	11.76	0.012	5	2 , 1	2
c77	Desenvolvimento embriogênese tardia abundante	86	1	1.16	0.0			1

Tabela 3: Principais termos funcionais de enriquecimento MapMan para *clusters* de HCCA compostos por genes significativamente regulados na resposta ao eCO₂. Os números em azul indicam genes regulados negativamente, enquanto os escritos em vermelho são regulados positivamente na análise. Em roxo estão aqueles cuja regulação é ao mesmo tempo positiva e negativa nos diferentes experimentos do trabalho que os analisou.

A modificação e degradação de proteínas aparece como um dos principais termos enriquecidos nos *clusters* com genes responsivos para alto CO₂. A degradação de proteínas nas plantas pode ser influenciada por níveis elevados de dióxido de carbono atmosférico. Já foi observado que a exposição de plantas à CO₂ elevado pode resultar em aumento do estresse oxidativo e carbonilação de proteínas nas plantas (Ishihara et al., 2021). Além disso, técnicas de meta-análise revelaram que as principais culturas alimentares, incluindo arroz e trigo, têm menores concentrações de proteína quando cultivadas sob condições elevadas de CO₂ (Taub, Miller, Allen, 2008). Essas descobertas sugerem que o aumento das concentrações de CO₂ na atmosfera provavelmente diminuirá a concentração de proteína de muitos alimentos vegetais humanos, afetando sua qualidade nutricional (Nimmo et al., 1990).

A resposta ao estresse é outro termo enriquecido com maior frequência nos *clusters* com genes responsivos. Já foi reportado em algumas análises que o CO₂ elevado pode mitigar os impactos negativos do estresse nas plantas. No geral, essa condição desempenha um papel significativo na mitigação dos impactos negativos do estresse, promovendo a assimilação de carbono, reduzindo os danos oxidativos e melhorando o crescimento. Em alguns casos, altos níveis de CO₂ podem promover a assimilação de carbono, aumentar os níveis de ácidos graxos (FA) e reduzir o dano oxidativo em plantas sob essas condições (Xi et al., 2023). Além disso, o alto CO₂ pode melhorar o crescimento das plantas e atuar reduzindo a toxicidade de metais pesados como o vanádio (V) (Alsherif, AbdElgawad, 2023). A indução da biossíntese de glucosinolato alifático (GL) foi identificada como o principal efeito do eCO₂ em folhas estressadas pela seca, o que também contribui para o efeito mitigador do estresse do eCO₂ (AbdElgawad et al., 2023).

A organização e transporte celular também estão entre os termos mais enriquecidos nos *clusters* analisados na tabela 3, o que é explicado pois a elevada concentração atmosférica de CO₂ pode afetar a organização e o transporte celular nas plantas. A exposição à altos níveis de CO₂ é capaz de induzir mudanças na divisão celular, expansão e taxas de ciclagem, levando até à alterações na estrutura da planta no nível do órgão (Sharma, Sinha, Bhatnagar, 2014). O cloroplasto é particularmente afetado pelo alto teor de CO₂, com acúmulo de amido e distorção dos tilacóides (Gamage et al., 2018). O aumento da fotossíntese sob alto CO₂ precisa ser acompanhado por um aumento no número de mitocôndrias para atender às demandas

de energia celular (Kaldenhoff, 2012). Estudos também mostraram alterações ultraestruturais em peroxissomos, retículo endoplasmático, complexo golgiense e citoesqueleto devido ao enriquecimento de CO₂ (Pritchard et al., 1999).

Com o objetivo de comparar os conjuntos de sondas responsivas dos três trabalhos analisados, as 407 sondas provenientes do trabalho que analisa a relação fonte-dreno (McCormick, Cramer, Watt, 2008), 124 vindas da análise de desenvolvimento do colmo (Casu et al., 2007) e 21 que respondem ao CO₂ elevado (Souza et al., 2008) foram organizadas em um diagrama de Venn (Figura 6). O diagrama mostra que das 21 sondas responsivas para eCO₂, sete também fazem parte do conjunto de sondas da análise de fonte-dreno. Além disso, nove das 407 sondas de fonte-dreno são compartilhadas com o conjunto de 124 sondas vindas da análise do desenvolvimento do colmo. A presença de sondas em comum entre as análises de eCO₂ e fonte-dreno é esperada, pois esta é a que apresenta o maior número de sondas responsivas entre as três. Além disso, existe uma relação bastante próxima conhecida entre o aumento de CO₂ no ambiente e o aumento da taxa fotossintética na planta por conta da maior disponibilidade de gás carbônico na atmosfera (Wang, Wang, Liu, 2022).

As sete sondas em comum entre a resposta ao CO₂ e a análise de fonte-dreno correspondem a três genes pertencentes aos *clusters* c6, c13 e c25. As cinco sondas do *cluster* c13 em comum entre os dois trabalhos são as mesmas que aparecem na Tabela 2, e que fazem desse *cluster* o que possui a maior quantidade de sondas que respondem ao aumento de CO₂. A sonda pertencente ao *cluster* c25 que é compartilhada entre as análises de fonte-dreno e aumento de CO₂, no trabalho de McCormick, Cramer, Watt (2008) faz parte do subconjunto selecionado pelos autores focado em eventos relacionados aos carboidratos foliares e ao status fotossintético. Com relação ao enriquecimento desses genes, segundo Souza et al. (2008), o gene cuja sonda pertence ao *cluster* c6 aparece como precursor de uma proteína induzida por luz, o que corresponde às sondas do *cluster* c13 está ligado à produção de ferritina (como já discutido anteriormente) e o correspondente à sonda do *cluster* c25 foi relacionado à enzima xiloglucano endo-transglicosilase/hidrolase (XTH).

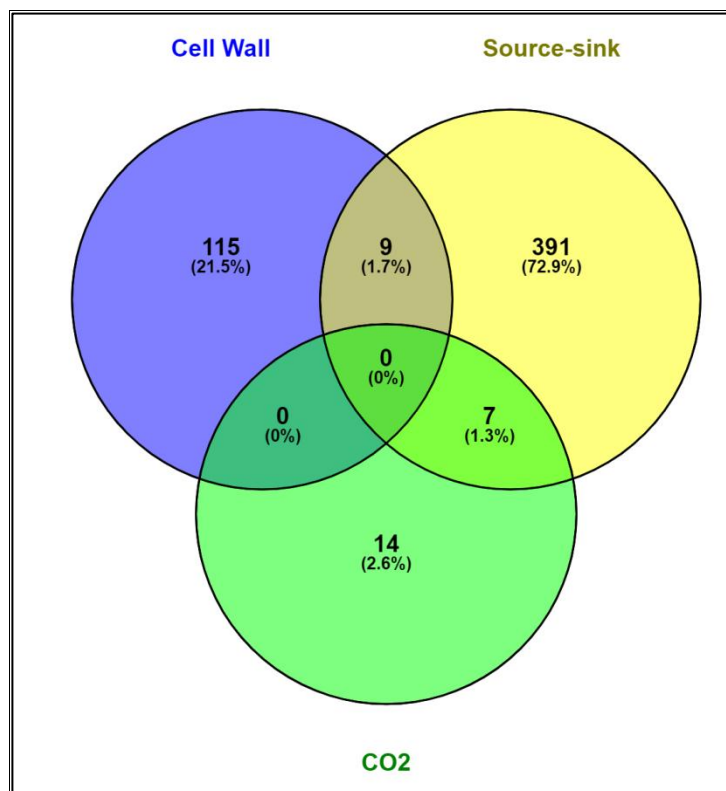


Figura 6: Diagrama de Venn comparando o conjunto de sondas vindas das análises de fonte-dreno (McCormick, Cramer, Watt, 2008), desenvolvimento do colmo (Casu et al., 2007) e resposta ao eCO₂ (Souza et al., 2008).

A produção de uma proteína induzida por luz pela sonda do *cluster* c6 em comum entre os trabalhos de CO₂ elevado e fonte-dreno faz sentido, pois quanto maior o gás carbônico disponível no ambiente, maior a produção fotossintética da planta, o que ativa proteínas induzidas por luz. As referências mostram que proteínas induzidas pela luz nas plantas podem ser afetadas por níveis elevados de CO₂ e essa resposta pode variar dependendo da espécie vegetal e das condições ambientais. Sabemos que níveis elevados de CO₂ podem induzem mudanças na abundância de proteínas envolvidas na fotossíntese e no metabolismo antioxidante nas plantas (Basso et al., 2022). A alta intensidade de luz também pode aumentar os níveis de proteínas envolvidas na fotossíntese e no metabolismo antioxidante, provavelmente devido ao estresse oxidativo (Yu et al., 2014).

A enzima XTH, relacionada ao gene do *cluster* c25 compartilhado entre os trabalhos de alto CO₂ e fonte-dreno está envolvida na regulação da extensibilidade da parede celular e das respostas ao estresse, desempenhando um papel na resistência das plantas ao estresse abiótico. Estudos demonstram que esses genes estão associados ao estresse hídrico no trigo (Han et al., 2023), ao estresse por cádmio em *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich. (Ma et al., 2022) e à abscisão de frutos na lichia (*Litchi*

chinensis Sonn.) (Hrmova, Stratilová, Stratilová, 2022). Além disso, a expressão diferencial de genes relacionados à biossíntese de carboidratos na cana-de-açúcar, como glicose-6-fosfato desidrogenase e xiloglucano endo-transglicosilase/hidrolase sob condições de CO₂ elevado (Souza et al., 2008) pode explicar a provável regulação de mecanismos relacionados ao controle do crescimento e o consequente acúmulo de biomassa em plantas C4 (Silva, Alves, Zingaretti, 2020).

Finalmente, no que diz respeito às nove sondas compartilhadas entre os trabalhos de análise de fonte-dreno e desenvolvimento do colmo, três são pertencentes ao *cluster* c33 e duas fazem parte do *cluster* c63, enquanto os *clusters* c10, c21, c26 e c52 possuem uma sonda desse conjunto. A análise de enriquecimento dessas sondas mostra que três delas estão relacionadas com proteínas histonas, mas há outras funções, como peroxidase, anexina, precursor de fitossulfocina-alfa 1, proteínas semelhante à fasciclina e de ligação lipídica e subunidade catalítica da celulose sintase 11. A lista completa das sondas em comum com os trabalhos de CO₂ e fonte-dreno e entre os trabalhos de fonte-dreno e desenvolvimento do colmo, com as informações dos genes e enriquecimento funcional, está disponível como dado suplementar desse estudo (Dado suplementar 4). Como o nosso objetivo principal é analisar apenas os genes que respondem ao alto CO₂ na rede geral, nós focaremos os resultados nesse conjunto de sondas.

4.5 Análise espaço-temporal e evolutiva da expressão gênica por topologia de rede

As redes criadas a partir dos *clusters* com sondas responsivas para CO₂ foram então submetidas à análise da expressão gênica sobre a topologia da rede e análise de conservação evolutiva. Os resultados de ambas as análises para cada uma das redes de *clusters* serão apresentados e discutidos individualmente. A análise de expressão aparece sempre em duas imagens, sendo em "A" referente à expressão do conjunto gênico no desenvolvimento do colmo e em "B" referente ao balanço fonte-dreno. Já a análise de conservação evolutiva é apresentada em C e gera uma imagem contendo três pares de eixos, sendo dois referentes à rede em cana-de-açúcar (eixos a1 e a1'), dois à *Arabidopsis thaliana* (eixos a2 e a2') e dois ao arroz (eixos a3 e a3'). A Figura 7 mostra ambas as análises para a rede do *cluster* c03.

As análises de expressão desse *cluster* para desenvolvimento do colmo mostra um padrão de expressão de rede mediano, com a expressão levemente aumentada

na extremidade direita da topologia da rede. Já a expressão para fonte-dreno apresenta um perfil de expressão mais reprimido em quase toda a rede, com essa expressão aumentada também a direita da topologia. Analisando a anotação dos transcritos que compõe a rede do *cluster* c03, podemos destacar aqueles ligados à síntese do metabolismo de aminoácidos, metabolismo secundário de isoprenoides e modificação pós-traducional da proteína quinase, todos com nível de expressão mediano durante o desenvolvimento do colmo, porém reprimido no balanço fonte-dreno. Por outro lado, um transcrito relacionado com a síntese do metabolismo de aminoácidos da família do aspartato metionina cistationina gama-sintase se mostrou reprimido em ambas as análises.

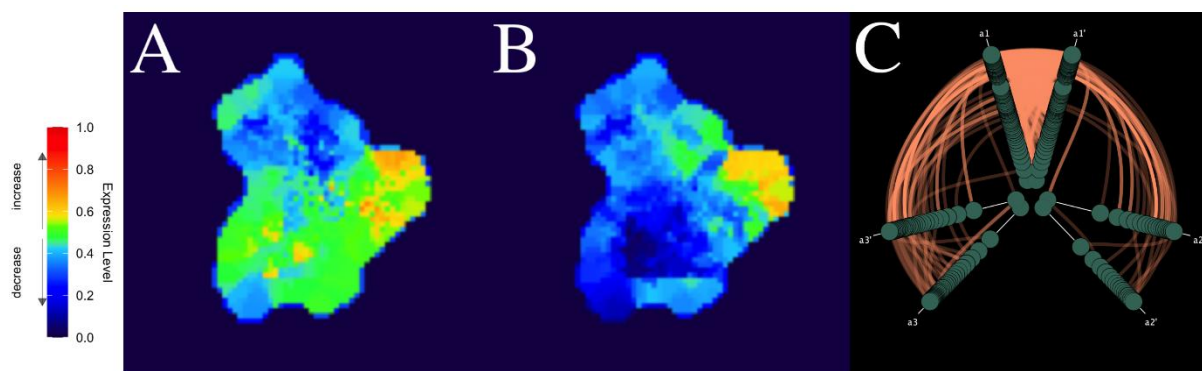


Figura 7: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster* c03.

Focando na análise evolutiva desse *cluster* em comparação com *Arabidopsis* e arroz, podemos notar que esta se encontra bem conservada, porém com um nível de conservação levemente mais alto quando comparada cana (eixos a1 e a1') com arroz (eixos a3 e a3') do que com *Arabidopsis* (eixos a2 e a2'), o que pode indicar que as relações trazidas nessa rede são mais relacionadas com o metabolismo de gramíneas do que de grupos maiores de plantas.

A Figura 8 apresenta as análises de expressão em desenvolvimento do colmo e fonte-dreno para o *cluster* c06, além da comparação evolutiva da rede desse mesmo *cluster* com as redes de *Arabidopsis* e arroz. Os enriquecimentos de alguns transcritos dessa rede foram identificados, dentre eles: S transferases (GSTs); cofator e metabolismo da vitamina e tiamina; regulação da transcrição do RNA (AP2/EREBP, família de proteínas de ligação ao elemento responsivo ao etileno APETALA2); oxidases - cobre, flavona; regulação da transcrição do RNA (família de fatores de transcrição bZIP) e regulação da transcrição de RNA (família de fatores de transcrição

pseudo ARR). Dentre genes identificados, apenas um já estava marcada como responsivo para fonte-dreno, o que mostra que mesmo não havendo respondido diretamente às análises realizadas, esses transcritos podem ter funções importantes no metabolismo.

Ao analisarmos as redes de expressão desse *cluster* para desenvolvimento do colmo e fonte-dreno, notamos que a topologia apresenta um padrão de expressão mediano, presente na região mais central de ambas as redes, onde esses transcritos estão localizados. A análise evolutiva dessa rede em comparação com *Arabidopsis* e arroz demonstra um padrão evolutivo bem conservado para ambas as espécies, o que indica funções que se mantêm tanto em espécies mais próximas (como cana e arroz) como mais distantes (como cana e *Arabidopsis*).

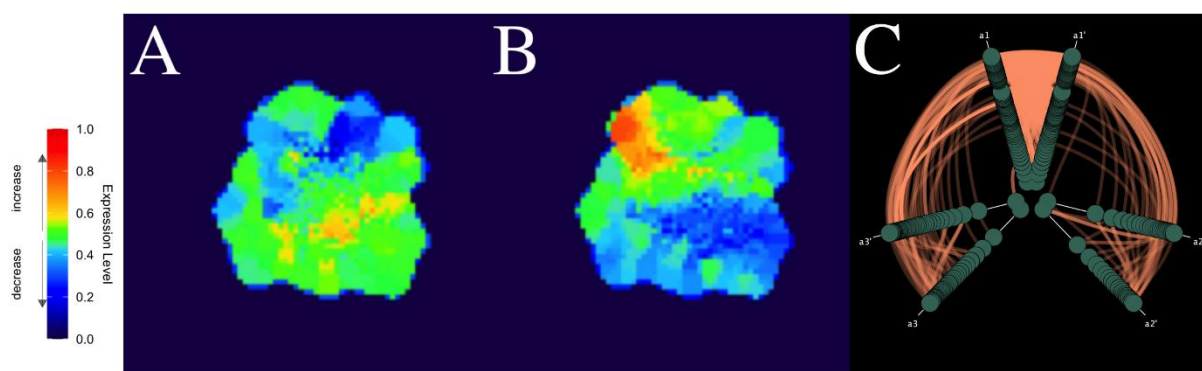


Figura 8: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster* c06.

As análises de expressão no desenvolvimento do colmo e fonte-dreno, bem como a análise evolutiva da rede de co-expressão do *cluster* c07, estão apresentados na Figura 9. O padrão de expressão desse *cluster* é bastante contrastante, sendo que a rede aparece quase totalmente em repressão para o desenvolvimento do colmo, enquanto é altamente expressa para fonte-dreno. A análise evolutiva é bem similar entre as redes de *Arabidopsis* e arroz em comparação com a rede de cana, mostrando que esse conjunto gênico é relativamente conservado entre essas espécies.

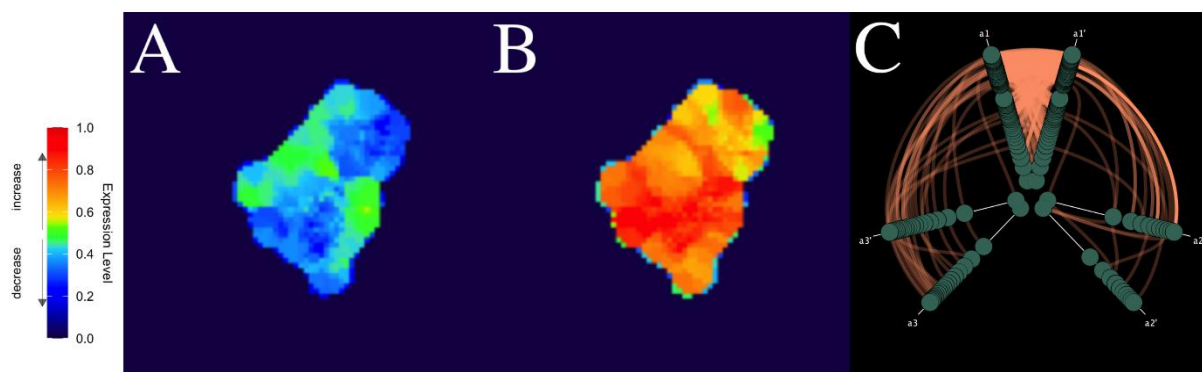


Figura 9: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster* c07.

Quatro transcritos próximos ao gene responsivo a eCO₂ presente nessa rede foram selecionados para análise do enriquecimento, sendo um destes também responsivo para fonte-dreno. Os padrões de enriquecimento desses transcritos foram a degradação do metabolismo de CHO amido D enzima, ciclo celular peptidilprolil isomerase, metabolismo lipídico síntese de AG e alongamento de AG ACP oxoacil redutase. Todos esses genes seguem o padrão de expressão da rede, com alta expressão para fonte-dreno, o que indica que estas podem desempenhar um papel importante nesse processo.

Na Figura 10 estão as redes de expressão para desenvolvimento do colmo e fonte-dreno para o *cluster* c13, além da análise evolutiva da rede desse mesmo *cluster*. Com relação ao padrão de expressão, pode-se notar que este foi mais evidente no contexto de desenvolvimento do colmo, com níveis de expressão mais altos na região central da rede. Esses níveis são menores para fonte-dreno, mas ainda assim há uma expressão mediana para essa análise. Observando o padrão evolutivo, este é bastante similar entre cana e as duas espécies comparadas, se mantendo conservado para ambas as redes. Para análise mais profunda, selecionamos quatro genes dessa rede, com enriquecimento ligado ao metabolismo de aminoácidos síntese alanina, síntese de proteína ribossomal, degradação de proteínas ubiquitina e metabolismo C1. Desses quatro genes, apenas o primeiro foi identificado como responsivo para fonte-dreno.

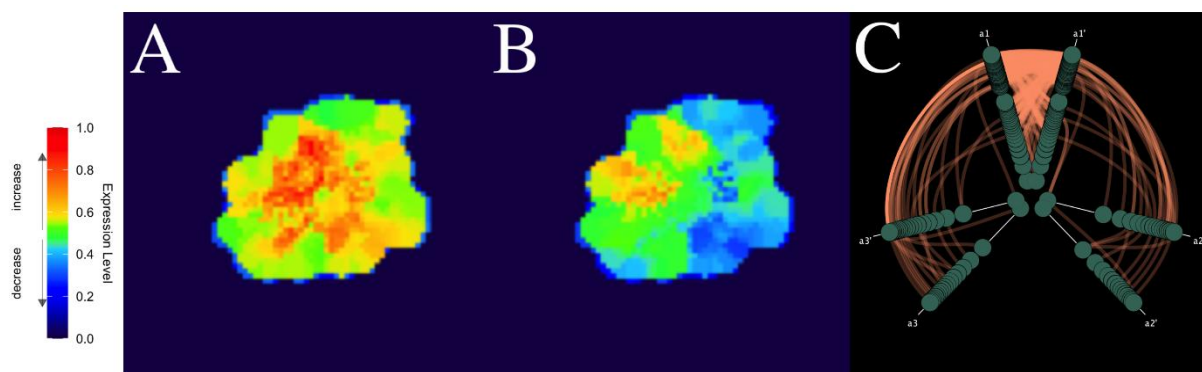


Figura 10: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster* c13.

Os resultados das análises de expressão gênica para colmo e fonte-dreno e da análise de expressão gênica referentes ao *cluster* c14 estão apresentados na Figura 11. As análises de expressão se mostraram bastante opostas, com a expressão dessa rede durante o desenvolvimento do colmo relativamente baixa, enquanto os níveis de expressão da mesma rede para fonte-dreno são muito elevados. A análise evolutiva possui um padrão de relativa conservação entre a rede principal e as redes de *Arabidopsis* e arroz. Dentre os transcritos presentes na rede desse *cluster*, há enriquecimentos ligados ao transporte de nucleotídeos cíclicos, fotorrespiração, modificação pós-traducional de proteína e transporte de p- e v-ATPases.

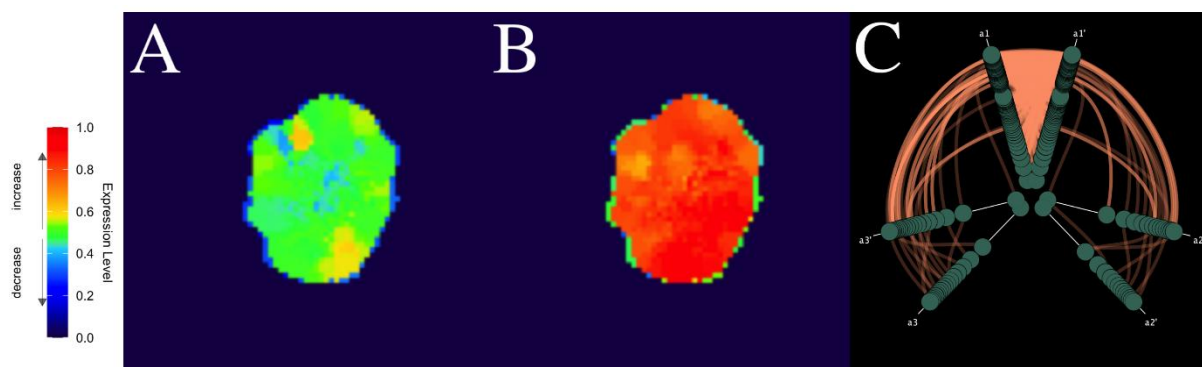


Figura 11: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster* c14.

A Figura 12 apresenta os resultados das análises de expressão gênica e evolutiva referentes ao *cluster* c20. Com relação à expressão gênica, nota-se que há um contraste entre o padrão de expressão da rede de desenvolvimento de colmo e a que se refere ao padrão fonte-dreno. A primeira demonstra níveis de expressão mais baixos e uniformes na rede inteira, enquanto a segunda apresenta expressão bastante alta também em toda a rede. Observando a análise de evolução da rede em comparação com a rede em *Arabidopsis* e arroz é possível perceber que boa parte

das sondas são conservadas entre as espécies, com padrão de conservação similar entre as duas. Dois genes dessa rede foram identificados nesta análise, ligados à regulação de RNA na transcrição família de fatores de resposta à auxina (ARF) e transporte de metabólito na membrana mitocondrial.

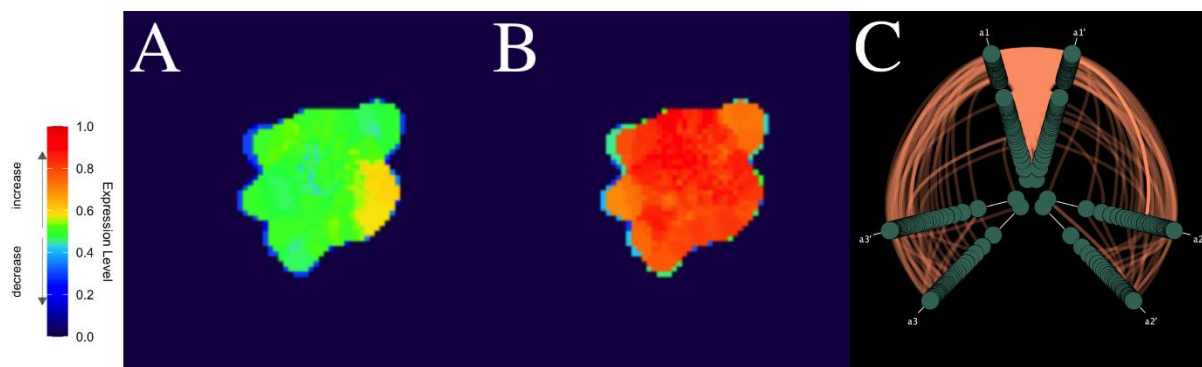


Figura 12: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster c20*.

Na Figura 13 estão os resultados das análises de expressão gênica e evolutiva da rede de co-expressão correspondente ao *cluster c25*. A expressão dessa rede durante o desenvolvimento do colmo e no padrão fonte-dreno são divergentes. Em ambas as redes os níveis de expressão são em geral medianos, porém, para o desenvolvimento do colmo a expressão é maior na região superior da rede, enquanto para fonte-dreno essa expressão é mais alta na região esquerda da rede. A análise de evolução da rede desse *cluster* apresenta um padrão bastante conservado, para ambas as espécies comparadas com cana. Transcritos com níveis de expressão importantes presentes nessa rede com enriquecimento ligado à regulação do RNA da família do fator de transcrição homeobox (HB), metabolismo hormonal brassinosteroide e via secretora de direcionamento de proteína foram identificados para análise mais aprofundada.

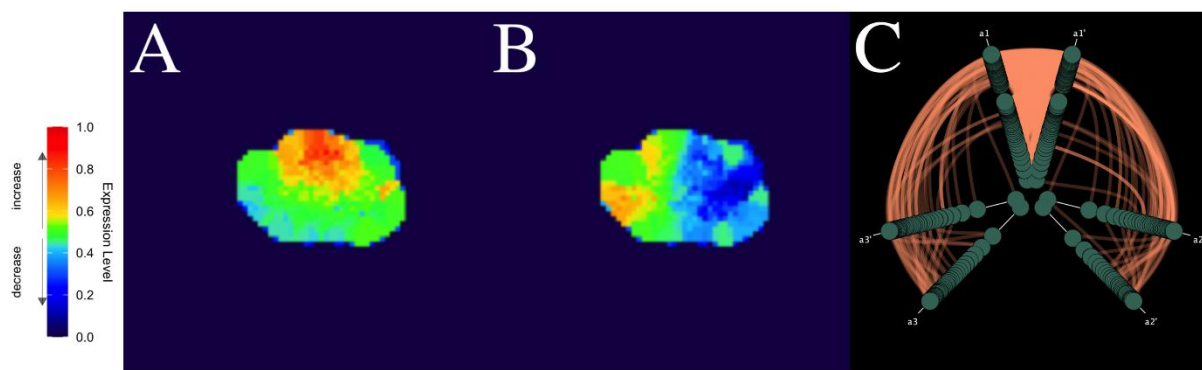


Figura 13: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster c25*.

Os resultados das análises de expressão gênica e evolutiva referentes à rede de co-expressão do *cluster* c32 estão apresentados na Figura 14. Com relação à expressão gênica, a rede se mostra divergente quando comparamos essa expressão para o desenvolvimento do colmo e fonte-dreno. Na primeira, a expressão se mantém mediana em toda a rede, enquanto na segunda esta é bastante baixa, mostrando que a rede inteira é reprimida nesse cenário. A análise evolutiva por sua vez traz resultados que mostram um padrão de conservação muito pequeno entre a rede analisada e suas correspondentes para arroz e *Arabidopsis*, com pouquíssimos genes conservados em ambas as espécies. Isso talvez ocorra por conta do tamanho geral da rede do *cluster* em questão, que é bem menor em número de arestas do que as redes dos outros *clusters* analisados, o que reduz as chances de conservação na comparação. Além disso, essa rede possui apenas um transcrito responsivo, ligado à resposta em eCO₂, o que também pode ajudar a explicar esse resultado. Ainda assim, o resultado dessa análise indica que as funções relacionadas com essa rede de co-expressão são mais presentes na própria cana, não apresentando as mesmas funções nas espécies comparadas. Para análise mais aprofundada nesse *cluster*, foram escolhidos genes com funções ligadas ao metabolismo de degradação de carboidratos, organização e transformação de ácido tricarboxílico (TCA) e D-arabino-heptulose 7-fosfato sintase (DAHPS).

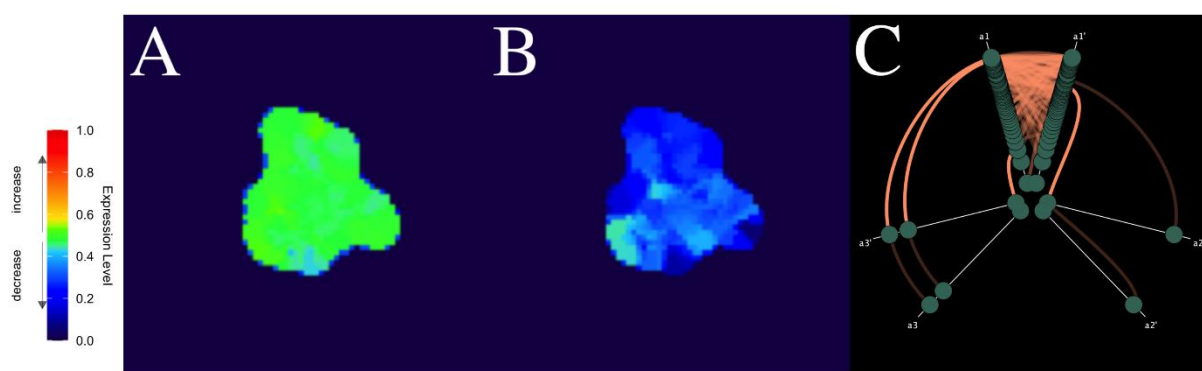


Figura 14: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster* c32.

A Figura 15 apresenta os resultados das análises de expressão e evolutiva para o *cluster* c34. A respeito da expressão gênica, esta aparece em níveis médios para o desenvolvimento do colmo, sendo mais alta na parte inferior da rede. Em fonte-dreno, a expressão é mais baixa, mantendo-se mediana na região superior da rede. A análise evolutiva mostra um padrão de conservação bem mais evidente entre cana e arroz

(a1 e a3), e com pouca conservação entre cana e *Arabidopsis*. Isso é esperado, já que existe uma proximidade evolutiva maior entre a cana e o arroz, ambos da família Poaceae, do que entre essa mesma espécie e *Arabidopsis*. Seleccionamos três genes localizados topologicamente na parte inferior da rede para análise mais profunda, ligados à degradação de proteínas ubiquitina, regulação da transcrição do RNA família dedo de zinco e síntese do precursor da parede celular.

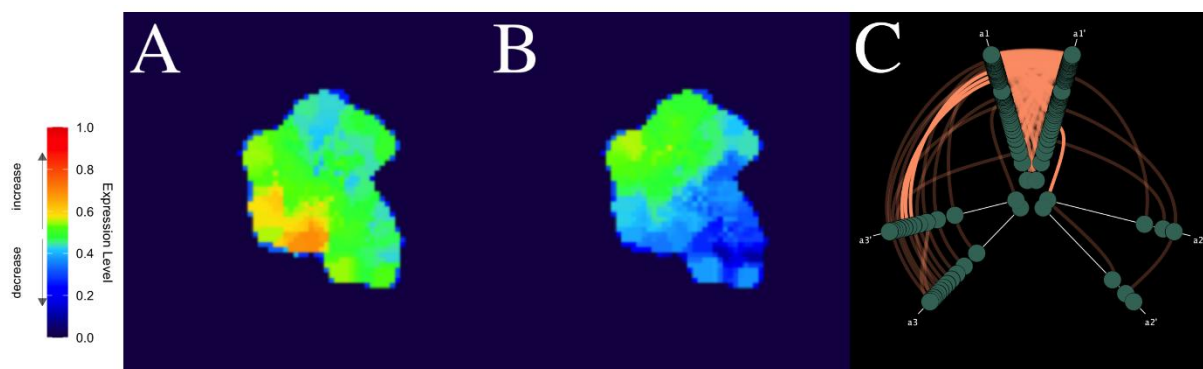


Figura 15: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster c34*.

Na Figura 16 são apresentados os resultados das análises da rede do *cluster c44* para expressão gênica e evolutiva. Os níveis de expressão dessa rede em geral se mantiveram baixos, tanto para desenvolvimento do colmo quanto para fonte-dreno, exibindo um leve aumento no primeiro cenário em alguns pontos da rede. Isso indica que esse conjunto gênico está sendo reprimido nos experimentos analisados. A análise de evolução apresentou baixos índices de conservação entre as espécies, com esse índice sendo um pouco maior entre cana e arroz, pela proximidade das espécies. Dentre os genes que compõe a rede desse *cluster* estão aqueles ligados à transportadores ABC e síntese de proteína ribossômica.

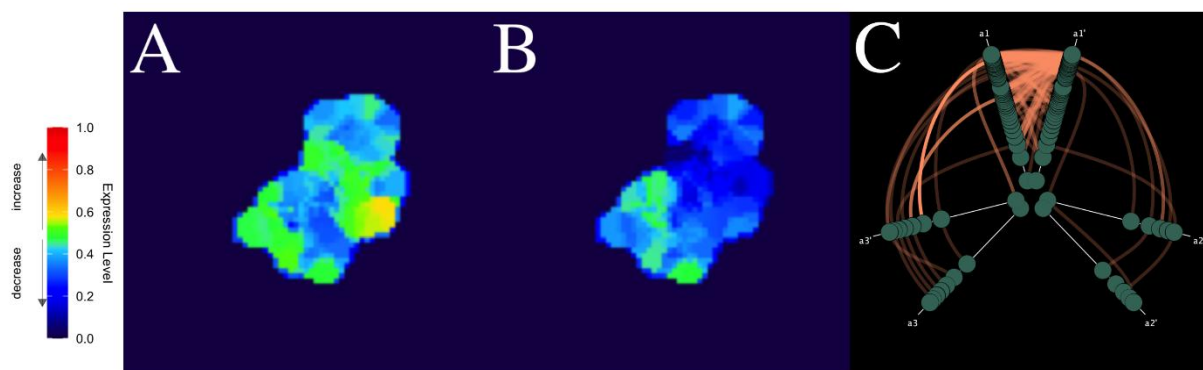


Figura 16: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster c44*.

As informações sobre as análises de expressão gênica e evolutiva que se referem a rede de co-expressão do *cluster* c45 estão apresentadas na Figura 17. A expressão dessa rede é bastante divergente nos dois cenários, sendo que transcritos aparecem reprimidos no desenvolvimento do colmo, mas altamente induzidos no balanço fonte-dreno. A análise de conservação evolutiva dessa rede em comparação com *Arabidopsis* e arroz também traz divergências, com um padrão de conservação muito baixo em comparação com a primeira espécie, mas bastante expressivo na comparação com a segunda. Três transcritos localizados na região central da rede serão discutidos separadamente, sendo apenas um marcado como expressiva em fonte-dreno. Suas anotações estão relacionadas com o metabolismo e degradação lipídica, nucleotídeos de transporte cíclico ou canais regulados por cálcio e fotossistema de reação à luz.

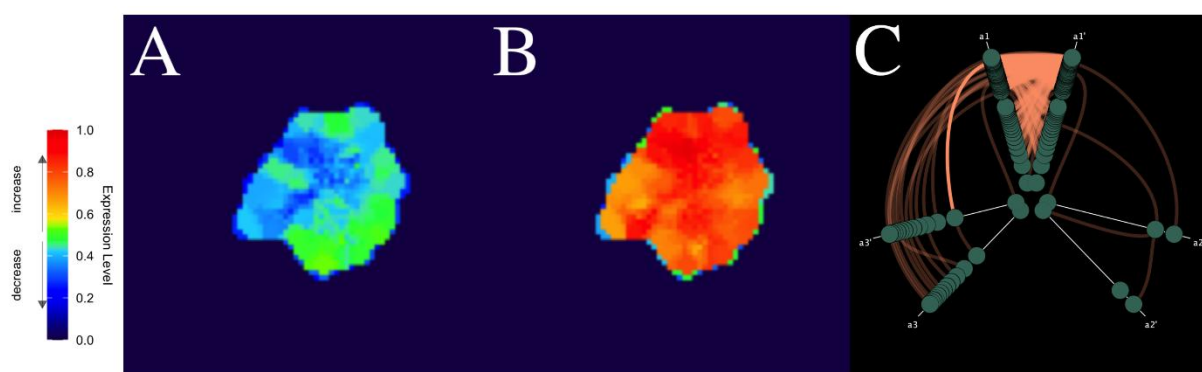


Figura 17: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster* c45.

Na Figura 18 são apresentados os resultados das análises de expressão gênica e conservação evolutiva para a rede de co-expressão do *cluster* c74. A expressão dessa rede varia entre média e alta para o desenvolvimento do colmo e fonte-dreno, sendo mais alta no último. No entanto, essa expressão não é uniforme, aparecendo mais alta na parte esquerda da rede para colmo, e com esse padrão mudando para fonte-dreno, onde essa expressão fica bem maior na região direita da rede. Com relação à análise evolutiva, a rede desse *cluster* se mostrou conservada para ambas as espécies analisadas em comparação com cana, sem grandes divergências. Os transcritos selecionados para análise nesse *cluster* estão localizados na região superior da rede, com expressão mediana, e dos três, apenas um é responsivo para o desenvolvimento do colmo. Suas funções estão relacionadas com o metabolismo

secundário de fenilpropanoides e biossíntese de lignina, degradação da parede celular e metabolismo secundário de flavonoides.

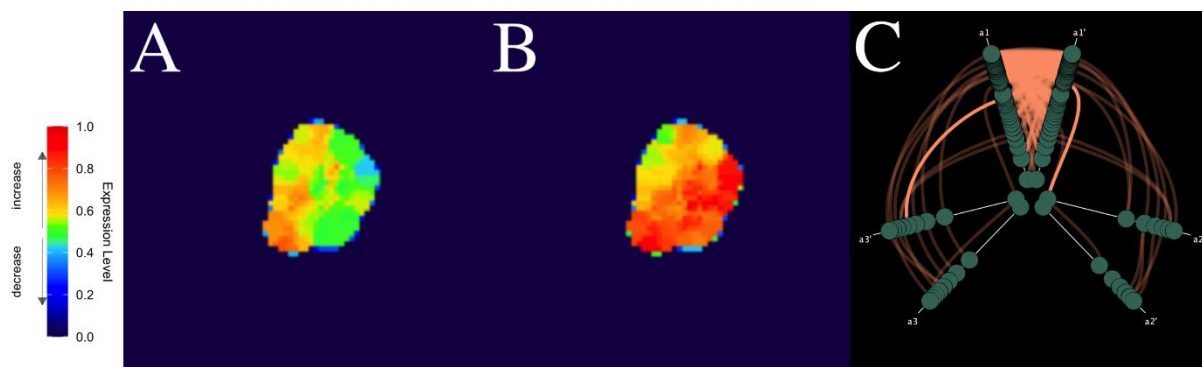


Figura 18: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster c74*.

Por último, é apresentado os dados para o *cluster c77*, sendo que as análises para expressão gênica e conservação evolutiva desse *cluster* estão apresentadas na Figura 19. A expressão da rede desse *cluster* é homogênea em ambos os cenários, no entanto esta fica mediana em fonte-dreno, enquanto está bem mais baixa para o desenvolvimento do colmo. A análise evolutiva se mostrou com baixo nível de conservação na comparação de ambas as espécies com cana, indicando que esse conjunto gênico é mais presente em cana. Para análise específica, foram selecionadas três genes com enriquecimento ligado ao metabolismo central de aminoácidos aspartato aminotransferase, metabolismo hormonal síntese-degradação de auxina e transporte de elétrons mitocondrial.

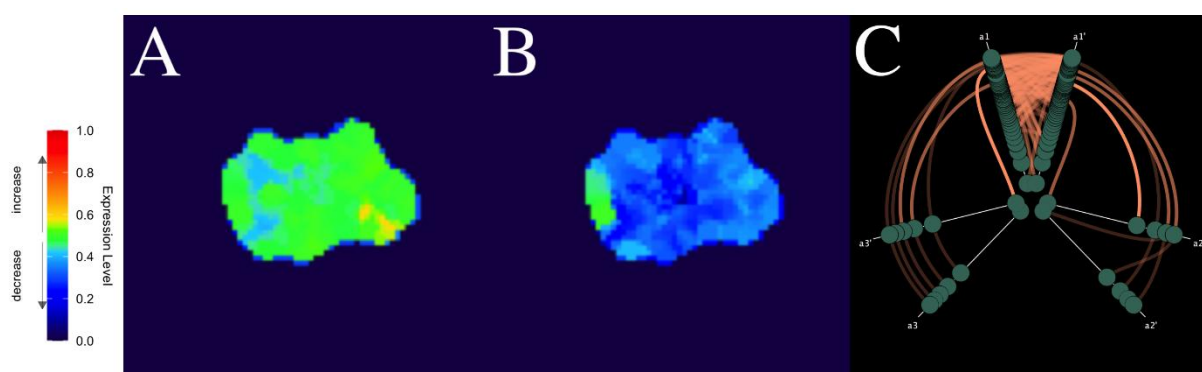


Figura 19: Análises de expressão gênica (A e B) e evolutiva (C) para a rede de co-expressão do *cluster c77*.

4.6 Redes derivadas de sondas responsivas em eCO₂

Para cada gene responsivo em eCO₂ identificada por Souza et al. (2008) que faz parte da rede de co-expressão foi criada uma rede específica, com foco nos nós

vizinhos imediatos de cada sonda alvo. Com o objetivo de encontrar o melhor parâmetro para a criação dessa rede, alguns métodos foram testados. Foram testadas redes com dois vizinhos diretos da sonda de interesse, três vizinhos diretos e três vizinhos com filtro de ranqueamento, e para cada uma dessas redes foi realizada uma análise de enriquecimento. Por fim, foram escolhidas as redes com três vizinhos diretos para analisar mais a fundo. A Figura 20 apresenta as três redes derivadas das sondas responsivas para eCO₂ e fonte-dreno, pertencentes aos *clusters* c06, c13 e c25. As redes das demais sondas responsivas estão disponíveis como dado suplementar (Dado suplementar 5). No caso específico das cinco sondas responsivas de ambas as análises do *cluster* c13, foi escolhida apenas uma das redes para representá-las, já que as cinco são muito parecidas entre si. O padrão de cores dos nós é o mesmo utilizado nas redes dos *clusters*.

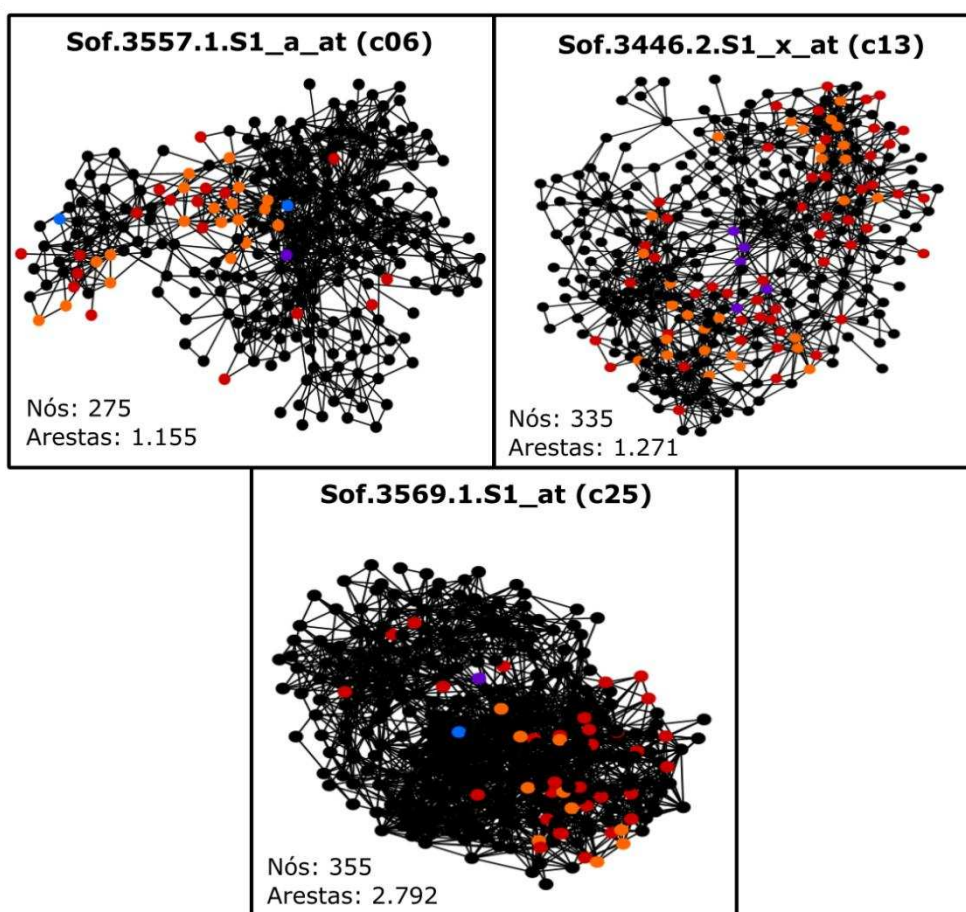


Figura 20: Conjunto de redes baseadas nas sondas responsivas para CO₂ criadas a partir da rede principal. As cores de cada nó seguem o mesmo padrão utilizado nas redes dos *clusters*.

Buscando entender melhor os principais enriquecimentos de cada rede, nós comparamos os termos MapMan enriquecidos para cada parâmetro de rede criado,

observando quais termos aparecem com mais recorrência, independentemente do tipo de rede. A rede baseada na sonda Sof.3557.1.S1_a_at, do *cluster* c6 possui 275 nós no total, com 40 desses sendo sondas responsivas. Dessas, 18 são referentes a análises de fonte-dreno total e 19 do subconjunto dessas análises, duas são responsivas apenas em eCO₂ e uma é compartilhada entre as análises de eCO₂ e fonte-dreno. Entre os principais termos enriquecidos para essa rede, que aparecem em todas as redes testadas para essa sonda, estão proteínas do fotossistema de reação à luz, síntese de tetrapirrol, diversas glutathione S-transferases, regulação da transcrição de RNA para uma família de proteínas de ligação ao elemento responsivo ao etileno e estresse de calor. O estresse abiótico por calor é o mesmo enriquecimento para o *cluster* c6, já discutido previamente.

A presença do enriquecimento para proteínas relacionadas ao fotossistema em uma rede baseada numa sonda responsiva à eCO₂ e fonte-dreno pode ser explicada pois o fotossistema II (PSII) está envolvido na assimilação de CO₂ impulsionada pela luz, levando à formação de metanol e oxigênio (Li et al., 2023). Essa descoberta mostra o potencial de assimilação simultânea de CO₂ e transferência de elétrons no PSII (Gan et al., 2023). Além do PSII, outros sistemas movidos a luz também participam da redução de CO₂, incluindo sistemas fotocatalíticos, que usam materiais em pó como catalisadores (Pawar, Mahardika, Kang, 2022).

A síntese de tetrapirrol e a tolerância ao estresse abiótico também aparecem como termos enriquecidos comuns para essa rede. Os tetrapirróis desempenham um papel crítico em vários processos nas plantas, incluindo fotossíntese e respiração (Larkin, 2016). A biossíntese desse composto é um processo crucial em organismos fotossintéticos pois produz metabólitos essenciais para várias reações, como a síntese de clorofila, e a regulação pós-tradução deste desempenha um papel significativo na garantia do fluxo adequado de metabólitos através da via durante o crescimento fotoperiódico (Fölsche, Grossmann, Richter, 2022). A participação importante do tetrapirrol nos processos fotossintéticos mostra que este pode ser afetado em plantas que cresçam em ambientes com CO₂ elevado.

Além disso, o tetrapirrol também está implicado na tolerância ao estresse abiótico. Eles são sintetizados em plastídeos e estão envolvidos em mecanismos de sinalização que podem atuar na expressão gênica (Kobayashi et al., 2009). A sinalização plastídio-núcleo dependente de tetrapirrol interage com um mecanismo

distinto de sinalização de plastídeo para núcleo que pode afetar diversos processos vegetais, incluindo o desenvolvimento e a tolerância ao estresse abiótico (Tanaka, Tanaka, 2007). A sinalização desse composto também pode atuar na tolerância ao estresse por afetar o acúmulo de amido (Saha, Moulin, Smith, 2009). Foi demonstrado que a via biossintética do tetrapirrol, particularmente o ramo heme, pode estar envolvida na mediação da sinalização intracelular do estresse hídrico e na estimulação da desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) sob estresse hídrico (Yadav, Rathore, Mishra, 2020). O monóxido de carbono (CO), produzido pela degradação do heme, atua como um gasotransmissor e também desempenha um papel crucial, entre outras coisas, na resposta das plantas aos estresses abióticos, pois o CO alivia esse estresse, regulando os sistemas antioxidantes e fotossintéticos, o equilíbrio iônico e o transporte (Larkin, 2016).

A glutathione S-transferases (GSTs) é outro termo enriquecido para a rede da sonda correspondente ao *cluster* c6 na Figura 20. Em plantas, essa enzima pode estar envolvida em diversos eventos intracelulares, como metabolismos primário e secundário e metabolismo do estresse, atuando principalmente na aclimação aos estresses abióticos, como sal, temperatura e seca (Hernández, Hernández, 2020; Sasan et al., 2011). Alguns estudos mostram um envolvimento dos GSTs nos metabolismos primário e secundário, que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Hernández, Hernández, 2020; Vaish et al., 2020). Além disso, a resposta dos GSTs à estressores, incluindo o estresse oxidativo, também pode afetar a fotossíntese (Kumar, Trivedi, 2018). A presença de diferentes enriquecimentos ligados ao estresse abiótico na rede dessa sonda nos ajuda a confirmar o enriquecimento do próprio *cluster*, também ligado ao estresse. Assim, é possível que os GSTs influenciem, ao menos indiretamente, a fotossíntese vegetal, e que sua expressão seja diferenciada em ambientes com alto CO₂, além de também ter uma possível relação com o metabolismo fonte-dreno.

A regulação da transcrição de RNA para a família de proteínas de ligação ao elemento responsivo ao etileno (AP2/ERF) também apareceu como um termo enriquecido na rede da sonda do *cluster* c6 em comum entre as duas análises. Essa é uma superfamília de fatores de transcrição específicos de plantas, envolvida no crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse, desempenhando papéis essenciais em processos vegetais, incluindo o amadurecimento dos frutos (Cui et al.,

2022). A família AP2/ERF também é conhecida por interagir com outras proteínas e participar de redes de sinalização de fitohormônios (como o etileno) e modificações epigenéticas durante o amadurecimento dos frutos (Zhai et al., 2022). A participação dessa proteína na resposta à estresses e no desenvolvimento da planta pode ser um indício que explica o enriquecimento para esse termo em uma rede focada em uma sonda que responde à CO₂ elevado e relacionada em processos de fonte-dreno na cana.

Ainda olhando para as sondas responsivas para mais de uma análise, temos a rede da sonda Sof.3446.2.S1_x_at do *cluster* c13, representando as cinco sondas desse *cluster* que respondem em eCO₂ e na análise de fonte-dreno. Essa rede foi escolhida por ser a maior entre as cinco, com maior número de nós. Ao todo, são 335 nós ligados por 1.271 arestas, contendo 84 sondas responsivas. Dessas, 50 correspondem às análises gerais de fonte-dreno, 29 também provém do conjunto menor dessa análise e cinco são responsivas tanto em eCO₂ quanto para análises de fonte-dreno. Entre os principais termos enriquecidos para essa rede estão o metabolismo de um carbono (C1), metabolismos de aminoácidos (síntese e degradação), metabolismo de carboidratos (síntese e degradação de amido), síntese de proteína ribossômicas, degradação proteica (cisteína protease) e ligação, quelação e armazenamento de metal. Esse último inclusive é o enriquecimento do *cluster* c13, já discutido anteriormente, de onde essa sonda faz parte.

O metabolismo C1 vegetal pode estar envolvido em vários processos, como fotorrespiração, metabolismo de nitrogênio e aminoácidos, metilação e biossíntese de metabólitos e biopolímeros (Jardine et al., 2017). Esse metabolismo dos compostos C1 em plantas superiores inclui metanol, formaldeído e metabolismo do ácido fórmico, com mecanismos complexos ainda pouco estudados (Xu et al., 2009). O CO₂ elevado também pode afetar o metabolismo C1 em plantas, no girassol (*Helianthus annuus* L.), por exemplo, concentrações elevadas de CO₂ podem causar senescência precoce, afetando as principais enzimas do metabolismo do nitrogênio (De la Mata et al., 2013). Em determinadas situações, inclusive, é possível que a via C1 seja capaz de aumentar a concentração de CO₂ nos cloroplastos, atuando também no processo fotossintético (Jardine et al., 2017). Esses dados mostram que há uma ligação entre esse enriquecimento e o aumento do CO₂, bem como a fotossíntese e a relação fonte-dreno da planta.

O metabolismo dos aminoácidos também aparece como termo enriquecido dessa rede e é um processo vegetal essencial, envolvido na homeostase e na renovação do nitrogênio e intimamente ligado à fotossíntese, influenciado por mudanças nas condições fotossintéticas, como variações nos níveis de CO₂ e O₂ (Mifflin, Lea, 1977). Os aminoácidos nas plantas servem como blocos de construção para a síntese de proteínas e participam de várias redes metabólicas que controlam o crescimento e a adaptação ao meio ambiente (Larsen et al., 1981). A síntese de proteínas, que é um aspecto chave do metabolismo dos aminoácidos, é influenciada pela taxa de fotossíntese, mas não está diretamente relacionada ao conteúdo total de aminoácidos nas folhas (Tcherkez et al., 2020). Flutuações nas condições ambientais, incluindo disponibilidade de luz, relação CO₂/O₂, temperatura e suprimento de nutrientes precisam de mudanças metabólicas rápidas para manter o metabolismo adequado dos aminoácidos (Timm, Arrivault, 2021). Esse metabolismo nas plantas é regulado por uma rede complexa que envolve a assimilação do nitrogênio e o metabolismo do carbono e é influenciado por sinais fisiológicos, de desenvolvimento e hormonais (Galili, Amir, Galili, 2008). Assim, este é um metabolismo vegetal central, o que explica seu aparecimento como termo enriquecido nessa rede.

O metabolismo de carboidratos, com foco na síntese e degradação de amidos são termos que aparecem no enriquecimento da rede em questão. O principal metabolismo de carboidratos nas plantas envolve a fixação de CO₂ em fosfatos de açúcar por meio da via redutora da pentose fosfato (RPP) (Lal, 2018). A enzima primária envolvida na fixação de carbono é a RuBisCO, que fixa CO₂ e também catalisa a fixação de oxigênio, levando à fotorrespiração, que compete com a fixação de CO₂ (Islam, Khan, Garner, 2006; Sheoran, Singh, 1999). A taxa de retirada de carbono do ciclo de Calvin é controlada pela taxa de síntese de amido e sacarose, que é a principal forma de açúcar transportada da fonte para o dreno nas plantas (Rogers, Ainsworth, 2006).

Descobriu-se que o eCO₂ pode aumentar as atividades das enzimas do metabolismo de carboidratos tanto nas folhas de fonte quanto nos órgãos dreno, como espigas e frutas (Li et al., 2019; Kaur et al., 2023). No trigo, o alto CO₂ aumenta as atividades das enzimas do metabolismo de carboidratos, na fonte e no dreno, levando ao aumento do rendimento (Li et al., 2019). Da mesma forma, em genótipos *Vigna mungo* (L.) Hepper, concentrações mais altas de CO₂ resultaram em aumento do

conteúdo de amido e sacarose e atividades alteradas das enzimas metabolizadoras da sacarose (Yadav et al., 2013). No arroz, o eCO₂ aumentou o nível de sacarose no exsudato do pedúnculo, mas não promoveu o acúmulo de amido nos grãos, possivelmente devido às fracas respostas de CO₂ da sacarose às enzimas de conversão do amido (Lal et al., 2018). Além disso, ainda no trigo, alto CO₂ levou à níveis mais altos de intermediários de açúcar fosforilado e ao aumento do conteúdo transitório de amido, além de promover o acúmulo de metabólitos secundários (Chen, Li, Sung, 1994). Assim, o CO₂ elevado pode influenciar o metabolismo dos carboidratos, como o enriquecimento da nossa rede sugere, levando a mudanças no teor de amido e açúcar nas plantas.

A síntese de proteínas ribossômicas foi outro termo que aparece enriquecido na rede analisada. Em plantas, esse processo é influenciado pela concentração de CO₂ na atmosfera e mudanças nas condições fotossintéticas, como variações nos níveis de CO₂ e O₂, podem impactar a síntese de proteínas e a atividade de tradução. Estudos mostraram que a alocação de carbono para proteínas em folhas iluminadas é responsável por aproximadamente 1-2,5% da fotossíntese líquida e aumenta com a taxa de fotossíntese (Tcherkez et al., 2020). O acúmulo de açúcares solúveis nas folhas fonte também pode inibir a fotossíntese, com mudanças moleculares associadas ao acúmulo de assimilado, incluindo a indução de proteínas específicas envolvidas na regulação da síntese proteica (Monke, Sonnewald, 1995). Os fatores de biogênese proteica associados ao ribossomo (RPBs) podem desempenhar um papel nos eventos co-translacionais que afetam os polipeptídeos nascentes, e esses fatores evoluíram para se adequar à especificidade de diferentes compartimentos celulares nas plantas (Breiman et al., 2016). O enriquecimento prolongado de CO₂ de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pode afetar a quantidade e a atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (RuBPCO), uma enzima chave no ciclo de Calvin envolvida na fotossíntese (Besford, 1993). Essa ligação entre a síntese de proteínas ribossômicas e a fotossíntese sob alto CO₂ atmosférico justifica o enriquecimento desse termo em nossa análise.

A degradação proteica (proteólise) também é um termo enriquecido na rede em questão. Esse processo é regulado pelas proteases de cisteína nas plantas, que desempenham papéis importantes em vários processos vegetais, incluindo degradação de proteínas intracelulares, morte celular programada e respostas a

estímulos ambientais (Yang et al., 2014). As proteases estão envolvidas na renovação de proteínas e na reciclagem de nutrientes durante a senescência foliar e a remobilização de nitrogênio (Huesgen, Overall, 2012). No contexto de altos níveis de CO₂, há estudos investigando o papel das proteases na degradação de proteínas em plantas. Por exemplo, descobriu-se que a protease de cisteína HVPap14 está envolvida na renovação das proteínas do cloroplasto durante a senescência foliar na cevada (Frank et al., 2019). Foi demonstrado que a autofagia, outro processo envolvido na degradação de proteínas, é induzida durante o envelhecimento foliar e em resposta à falta de nitrogênio em *Arabidopsis* (Havé et al., 2018). Um estudo com milho sob eCO₂ identificou dois novos inibidores de serina protease que foram modulados por CO₂, com modulação tanto por açúcares como por pró-oxidante (Prins, 2008).

A rede feita a partir da sonda Sof.3569.1.S1_at, do *cluster* c25, é a última que representa as sondas responsivas às duas análises (eCO₂ e fonte-dreno). Essa rede é composta por 355 nós e 2.795 arestas. Das sondas responsivas à alguma das análises, 31 fazem parte das análises de fonte-dreno, 10 são do subconjunto desse mesmo trabalho, uma responde apenas à CO₂ elevado e uma é responsiva em eCO₂ e nas análises de fonte-dreno, totalizando 43 sondas responsivas na rede. Sobre os termos enriquecidos que aparecem nessa rede de sondas, há o metabolismo de lipídios (síntese e alongamento de ácidos graxos (FA), metabolismo hormonal (síntese e degradação de brassinosteroides) e organização celular, que também é o enriquecimento do *cluster* c25 e que foi discutido nos resultados da Tabela 3.

A síntese e o alongamento de ácidos graxos nas plantas, um dos termos enriquecidos para essa rede, ocorrem nos plastídeos, especificamente nos cloroplastos, por meio da atividade da sintetase de FA (Zhukov, Popov, 2022). No que diz respeito ao CO₂ elevado, descobriu-se que essa condição pode promover a produção de lipídios nas plantas, influenciando a síntese de FA e as vias de alongamento. Estudos em diferentes espécies de algas (*Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss, *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco e *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin), mostraram que sob eCO₂, genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e na biossíntese de triacilglicerol são regulados positivamente, levando ao aumento do fluxo de carbono para a síntese lipídica (Huang et al., 2019; Sun, Chen, Du, 2016; Xi et al., 2023). Além disso, foi demonstrado que altas concentrações de CO₂

aumentam a quantidade total de FA, com mudanças na sua composição, indicando a ativação da síntese de FA e a inibição de seu alongamento e dessaturação (Muradyan et al., 2004). Assim, podemos inferir que condições de alto teor de CO₂ têm um impacto significativo no metabolismo lipídico, promovendo a produção de lipídios por meio de alterações na síntese de FA e nas vias de alongamento, o que explica o enriquecimento para esse termo em nossa rede.

O outro termo enriquecido para essa rede é o metabolismo hormonal, com foco na síntese e degradação de brassinosteroides. Os brassinosteróides (BRs) são hormônios vegetais que desempenham um papel crucial no metabolismo hormonal, incluindo síntese e degradação, bem como na fotossíntese nas plantas (Siddiqui, Hayat, Bajguz, 2018). A síntese de BRs envolve enzimas do citocromo P450, responsáveis pelas reações de hidroxilação/oxidação em posições específicas na molécula BR (Nomura, Bishop, 2006). Descobriu-se que os BRs tem um papel na fotossíntese, evitando a perda de pigmentos fotossintéticos e aumentando a eficiência da fixação fotossintética do carbono (Siddiqui, Hayat, Bajguz, 2018). Por conta de sua proximidade com os processos fotossintéticos, há também uma relação entre esse hormônio e o acúmulo de CO₂. Uma análise com arroz transgênico com altos níveis de brassinosteroides apresentou uma maior eficiência dessas plantas na absorção de CO₂ (Janeczko et al., 2016; Wu et al., 2008). Por outro lado, a deficiência de BR pode levar à uma menor atividade da enzima de ligação ao CO₂ (RuBisCO), não necessariamente alterando a taxa fotossintética (Wu et al., 2008).

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nossas análises integraram dados de Casu et al. (2007) e McCormick, Cramer, Watt (2008) sobre a expressão diferencial na cana-de-açúcar durante o desenvolvimento do colmo e no balanço fonte-dreno, formando uma rede de co-expressão com 7.960 nós e 46.372 arestas. A divisão dessa rede pelo método HCCA resultou em 81 *clusters* interligados por 195 arestas. Foram identificados 13 genes responsivos à eCO₂, correspondentes a 21 sondas presentes na rede principal, conforme dados de Souza et al. (2008), evidenciando que alguns transcritos analisados nesses estudos interagem sob condições de CO₂ elevado.

Dos 81 *clusters* existentes, 13 apresentaram uma ou mais sondas que responderam ao aumento de CO₂, sendo estes os *clusters* c03, c06, c07, c13, c14, c20, c25, c32, c34, c44, c45, c74 e c77. O *cluster* c13 foi o que apresentou o maior número de sondas responsivas. Os principais termos enriquecidos nesses *clusters* incluem modificação e degradação de proteínas, resposta ao estresse e organização celular, demonstrando a influência do eCO₂ na expressão desses processos. A análise de conjuntos revelou que sete das 21 sondas responsivas à eCO₂ também pertencem à análise fonte-dreno, reforçando a relação entre aumento de CO₂ e taxa fotossintética. Essas sondas estão distribuídas nos *clusters* c06, c13 e c25, associadas a proteínas induzidas por luz, ferritina e a enzima XTH, respectivamente. Assim, a presença de sondas que respondem tanto em eCO₂ e no balanço fonte-dreno mostra que esses processos estão intimamente relacionados.

Redes de vizinhança foram criadas para transcritos responsivos, com enriquecimentos associados a proteínas do fotossistema, regulação transcricional, estresse térmico, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, síntese proteica ribossômica, degradação de proteínas e metabolismo hormonal. Essas análises fornecem informações valiosas sobre os impactos do eCO₂ na regulação metabólica da cana-de-açúcar.

Com relação às análises de expressão e conservação evolutiva, a maioria das redes dos *clusters* apresentou expressão homogênea, com cerca de metade destas sendo mais expressiva em colmo e outra metade em fonte-dreno. Também a maioria das redes aparece com conservação mediana na comparação de cana com ambas as espécies (*Arabidopsis* e arroz), com exceção das redes dos *clusters* c32, c34, c44 e c45. Transcritos próximos àqueles responsivos para eCO₂ em cada um dos *clusters*

foram observadas quanto ao seu enriquecimento e função, e dentre os principais termos encontrados estão a modificação pós-traducional da proteína quinase, regulação da transcrição do RNA em diferentes famílias proteicas, degradação de proteínas ubiquitina, fotorrespiração, metabolismo hormonal e de degradação de carboidratos, síntese do precursor da parede celular e biossíntese de lignina, nucleotídeos de transporte cíclico ou canais regulados por cálcio e metabolismo hormonal síntese-degradação de auxina.

Com essas análises, reconhecemos que os padrões de expressão da cana para o desenvolvimento do colmo e para o balanço fonte-dreno podem ser bem diferentes. A conservação dessas redes, por sua vez, evidencia que uma parte importante dos transcritos presentes nas redes de co-expressão dos *clusters* analisados são conservados em outras espécies de plantas, indicando que estão ligados à processos mais consolidados. Já os transcritos selecionados para análise mais aprofundada em cada um dos *clusters* apresentaram papéis relacionados à diferentes funções na planta, indicando que mesmo que estes não tenham sido marcadas como responsivos, eles ainda possuem funções importantes dentro do metabolismo geral e na resposta às diferentes condições observadas, o que justifica seu aparecimento nas redes de co-expressão dos *clusters*.

Com isso, podemos concluir que a resposta da cana no balanço fonte-dreno e na resposta à eCO₂ são bastante próximos, inclusive com alguns genes respondendo em ambos os casos. Diversos processos da planta estão envolvidos nessa resposta, e esta envolve vias complexas na planta. Apesar da proximidade, a resposta expressiva da planta em fonte-dreno se mostrou divergente dessa mesma resposta durante o desenvolvimento do colmo, indicando que os mesmos genes podem responder de maneiras diversas em cada um dos casos. Também concluímos que muitas sondas, que até então não haviam sido marcadas como responsivas, na realidade podem desempenhar funções de grande importância no padrão fonte-dreno, desenvolvimento do colmo e resposta ao CO₂ atmosférico elevado na cana. Esperamos que os dados aqui encontrados possam servir como base para análises mais aprofundadas dos genes apresentados nesse trabalho, evidenciando sua participação em diferentes processos do metabolismo da cana e podendo ampliar o nosso entendimento a respeito das respostas dessa planta em diferentes cenários, sobretudo com um aumento das concentrações de gás carbônico atmosférico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AANDERUD, Z. T. et al. Resuscitation of the rare biosphere contributes to pulses of ecosystem activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00024
- ABDELGAWAD, H. et al. Elevated CO₂ mitigates the impact of drought stress by upregulating glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, v. 46, n. 3, p. 812–830, 2023. DOI: 10.1111/pce.14521
- AIZZA, L. C. B.; DORNELAS, M. C. Differential Transcription Factor Networks Orchestrate Flavonoid Biosynthesis. In: CHEN, C. **Pigments in Fruits and Vegetables**. Nova York: Springer New York, 2015. p. 69–91.
- ALMEIDA-SILVA, F. et al. Exploring the complexity of soybean (*Glycine max*) transcriptional regulation using global gene co-expression networks. **Planta**, v. 252, n. 6, p. 104, 2020. DOI: 10.1007/S00425-020-03499-8
- ALSHERIF, E. A.; ABDELGAWAD, H. Elevated CO₂ Suppresses the Vanadium Stress in Wheat Plants under the Future Climate CO₂. **Plants**, v. 12, n. 7, p. 1535, 2023. DOI: 10.3390/plants12071535
- ATIAS, O.; CHOR, B.; CHAMOVITZ, D. A. Large-scale analysis of *Arabidopsis* transcription reveals a basal co-regulation network. **BMC Systems Biology**, v. 3, n. 1, p. 86, dez. 2009. DOI: 10.1186/1752-0509-3-864
- BASSO, L. et al. Flavodiiron proteins enhance the rate of CO₂ assimilation in *Arabidopsis* under fluctuating light intensity. **Plant Physiology**, v. 189, n. 1, p. 375–387, 2022. DOI: 10.1093/plphys/kiac064
- BAZINET, Q.; TANG, L.; BEDE, J. C. Impact of Future Elevated Carbon Dioxide on C3 Plant Resistance to Biotic Stresses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 35, n. 7, p. 527–539, 2022. DOI: 10.1094/MPMI-07-21-0189-FI
- BESFORD, R. T. Photosynthetic acclimation in tomato plants grown in high CO₂. In: ROZEMA, J. et al. **CO₂ and biosphere**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 441–448.
- BHATTACHARYYA, M.; BANDYOPADHYAY, S. **Integration of Co-expression Networks for Gene Clustering**. 2009 Seventh International Conference on Advances in Pattern Recognition. **Anais...** In: 2009 SEVENTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN PATTERN RECOGNITION (ICAPR). Kolkata, West Bengal, India: IEEE, fev. 2009. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/4782808/>>. Acesso em: 3 maio. 2025. DOI: 10.1109/ICAPR.2009.55
- BOLSTAD, B. M. et al. A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. **Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 185-193, 2003. PMID: 12538238
- BOTHA, F. C. et al. Sink Strength During Sugarcane Culm Growth: Size Matters. **Sugar Tech**, v. 25, n. 5, p. 1047–1060, 2023. DOI: 10.1007/s12355-023-01273-0
- BREIMAN, A. et al. The intriguing realm of protein biogenesis: Facing the green co-translational protein maturation networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 5, p. 531–550, 2016.
- BRIAT, J.-F. et al. Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1800, n. 8, p. 806–814, 2010. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.12.003
- BURKS, D. J. et al. The *Arabidopsis* gene co-expression network. **Plant Direct**, v. 6, n. 4, p. e396, 2022. DOI: 10.1002/pld3.396
- CAI, Z.; XIE, T.; XU, J. Source–sink manipulations differentially affect carbon and nitrogen dynamics, fruit metabolites and yield of *Sacha Inchi* plants. **BMC Plant Biology**, v. 21, n. 1, p. 160, 2021. DOI: 10.1186/s12870-021-02931-9
- CALDERAN-RODRIGUES, M. J. et al. Applying Molecular Phenotyping Tools to Explore Sugarcane Carbon Potential. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 637166, 19 fev. 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.637166

- CAO, Z.; BANNIZA, S. Gene co-expression analysis reveals conserved and distinct gene networks between resistant and susceptible *Lens ervoides* challenged by hemibiotrophic and necrotrophic pathogens. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 24967, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-76316-x
- CASSIA, R. et al. Climate Change and the Impact of Greenhouse Gasses: CO₂ and NO, Friends and Foes of Plant Oxidative Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 273, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.00273
- CASTRO, M. A. A. et al. ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1468–1469, 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp246
- CASU, R. E. et al. Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. **Functional & Integrative Genomics**, v. 7, n. 2, p. 153–167, 2007. DOI: 10.1007/s10142-006-0038-z
- CHANG, X.; LV, C.; ZHAO, G. A Dual Function of Ferritin (Animal and Plant): Its Holo Form for Iron Supplementation and Apo Form for Delivery Systems. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 113–133, 2023. DOI: 10.1146/annurev-food-060721-024902
- CHEN, C. L.; LI, C. C.; SUNG, J. M. Carbohydrate metabolism enzymes in CO₂ -enriched developing rice grains of cultivars varying in grain size. **Physiologia Plantarum**, v. 90, n. 1, p. 79–85, 1994. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb02195.x
- CHEN, Z. et al. Co-expression network analysis of genes and networks associated with wheat pistillody. **PeerJ**, v. 10, p. e13902, 2022. DOI: 10.7717/peerj.13902
- CORRER, F. H. et al. Differential expression in leaves of *Saccharum* genotypes contrasting in biomass production provides evidence of genes involved in carbon partitioning. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 673, 2020. DOI: 10.1186/s12864-020-07091-y
- CUI, Y. et al. Genome-Wide Analysis and Expression Profiles of Ethylene Signal Genes and Apetala2/Ethylene-Responsive Factors in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 828482, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.828482
- DE LA MATA, L. et al. Elevated CO₂ concentrations alter nitrogen metabolism and accelerate senescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Plant, Soil and Environment**, v. 59, n. 7, p. 303–308, 2013.
- DEBSKA, K. et al. Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H₂O₂, NO production and protein carbonylation level. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 5, p. 480–488, 2013. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.11.018
- DIJKSTRA, F. A. et al. Rhizosphere priming: a nutrient perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–8, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00216
- DOBRA, A. et al. Sparse graphical models for exploring gene expression data. **Journal of Multivariate Analysis**, v. 90, n. 1, p. 196–212, 2004. DOI: 10.1016/j.jmva.2004.02.009
- DUTT, S. et al. Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 3, p. 401–412, 2015. DOI: 10.1007/s10535-015-0517-y
- EDWARDS, K. D. et al. TobEA: an atlas of tobacco gene expression from seed to senescence. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 142, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-142
- FACCIOLI, P. et al. From Single Genes to Co-Expression Networks: Extracting Knowledge from Barley Functional Genomics. **Plant Molecular Biology**, v. 58, n. 5, p. 739–750, 2005. DOI: 10.1007/s11103-005-8159-7
- FAWZY, S. et al. Strategies for mitigation of climate change: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 2069–2094, 2020. DOI: 10.1007/s10311-020-01059-w
- FERNIE, A. R. et al. Synchronization of developmental, molecular and metabolic aspects of source–sink interactions. **Nature Plants**, v. 6, n. 2, p. 55–66, 2020. DOI: 10.1038/s41477-020-0590-x
- FICKLIN, S. P.; FELTUS, F. A. Gene Coexpression Network Alignment and Conservation of Gene Modules between Two Grass Species: Maize and Rice. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1244–1256, 2011. DOI: 10.1104/pp.111.173047

- FICKLIN, S. P.; LUO, F.; FELTUS, F. A. The Association of Multiple Interacting Genes with Specific Phenotypes in Rice Using Gene Coexpression Networks. **Plant Physiology**, v. 154, n. 1, p. 13–24, 2010. DOI: 10.1104/pp.110.159459
- FÖLSCH, V.; GROSSMANN, C.; RICHTER, A. S. Impact of Porphyrin Binding to GENOMES UNCOUPLED 4 on Tetrapyrrole Biosynthesis in planta. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 850504, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.850504
- FRANK, S. et al. Barley cysteine protease PAP14 plays a role in degradation of chloroplast proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 21, p. 6057–6069, 2019. DOI: 10.1093/jxb/erz356
- FRIEDMAN, N. Inferring Cellular Networks Using Probabilistic Graphical Models. **Science**, v. 303, n. 5659, p. 799–805, 2004. DOI: 10.1126/science.1094068
- FRIEDMAN, N. et al. Using Bayesian Networks to Analyze Expression Data. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 3–4, p. 601–620, 2000. DOI: 10.1089/106652700750050961
- GALILI, S.; AMIR, R.; GALILI, G. Genetic Engineering of Amino Acid Metabolism in Plants. In: BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H.; LEWIS, N. G. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdã: Elsevier, 2008. p. 49–80.
- GAMAGE, D. et al. New insights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide concentrations. **Plant, Cell & Environment**, v. 41, n. 6, p. 1233–1246, 2018. DOI: 10.1111/pce.13206
- GAN, Y. et al. Light-driven CO₂ conversion system: construction, optimization and application. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 2390–2409, 2023. DOI: 10.13345/j.cjb.221008
- GAO, P. et al. Weighted Gene Coexpression Network Analysis of Candidate Pathways and Genes in Soft Rot Resistance of *Amorphophallus*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 147, n. 6, p. 322–333, 2022. DOI: 10.21273/jashs05251-22
- GHOSH, R. et al. Comparative transcriptional analysis of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from '*Hibiscus cannabinus*' L., during developmental stages in various tissues and stress regulation. **Plant Omics**, v. 5, n. 2, p. 184–193, 2012. DOI: 10.3316/informit.189095634533224
- GLOBAL CARBON ATLAS. CO₂ emissions. **Foundation BNP Paribas**, 2021. Disponível em: <http://www.globalcarbonatlas.org/en/CO2-emissions>. Acesso em: 18 de jan. de 2024.
- GREEN, E. Gene. **National Human Genome Research Institute**, Bethesda, 2024. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene>. Acesso em: 19 de jan. de 2024.
- GU, Y.; ZU, J.; LI, Y. A novel evolutionary model for constructing gene coexpression networks with comprehensive features. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 460, 2019. DOI: 10.1186/S12859-019-3035-7
- HAMMER, G. et al. Models for navigating biological complexity in breeding improved crop plants. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 12, p. 587–593, 2006. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.10.006
- HALL, J. M.; PATERSON, E.; KILLHAM, K. The effect of elevated CO₂ concentration and soil pH on the relationship between plant growth and rhizosphere denitrification potential. **Global Change Biology**, v. 4, n. 2, p. 209–216, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2486.1998.00124.x
- HAN, J. et al. A Surprising Diversity of Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase in Wheat: New in Sight to the Roles in Drought Tolerance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 9886, 2023. DOI: 10.3390/ijms24129886
- HARTMANN, H. et al. Plant carbon allocation in a changing world – challenges and progress: introduction to a Virtual Issue on carbon allocation. **New Phytologist**, v. 227, p. 981–988, 2020. DOI: 10.1111/nph.16757
- HAVÉ, M. et al. Increases in activity of proteasome and papain-like cysteine protease in *Arabidopsis* autophagy mutants: back-up compensatory effect or cell-death promoting effect? **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 6, p. 1369–1385, 2018. DOI: 10.1093/jxb/erx482
- HERNÁNDEZ E. I.; HERNÁNDEZ, M. R. Plant Glutathione S-transferases: An overview. **Plant Gene**, v. 23, p. 100233, 2020. DOI: 10.1016/j.plgene.2020.100233

HOSAKA, G. K. **Temporal changes in the expression of genes involved in carbon partitioning in apical culms of contrasting sugarcane genotypes**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) - Colégio de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

HRMOVA, M.; STRATILOVÁ, B.; STRATILOVÁ, E. Broad Specific Xyloglucan:Xyloglucosyl Transferases Are Formidable Players in the Re-Modelling of Plant Cell Wall Structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1656, 2022. DOI: 10.3390/ijms23031656

HUANG, A. et al. Provision of carbon skeleton for lipid synthesis from the breakdown of intracellular protein and soluble sugar in *Phaeodactylum tricornutum* under high CO₂. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 53, 2019. DOI: 10.1186/s12896-019-0544-4

HUESGEN, P. F.; OVERALL, C. M. N- and C-terminal degradomics: new approaches to reveal biological roles for plant proteases from substrate identification. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 5–17, 2012.

IEA. CO₂ Emissions in 2022. **International Energy Agency**, 2022.

IPCC Summary for policy makers. *In: Climate Change: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. Cambridge: Cambridge University Press. 2014.

IRIZARRY, R. A. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 4, p. 15e–115, 2003. DOI: 10.1093/nar/gng015

ISHIHARA, H. et al. Assessing Protein Synthesis and Degradation Rates in *Arabidopsis thaliana* Using Amino Acid Analysis. **Current Protocols**, v. 1, n. 5, p. e114, 2021. DOI: 10.1002/cpz1.114

ISLAM, S.; KHAN, S.; GARNER, J. Elevated Atmospheric CO₂ Concentration Enhances Carbohydrate Metabolism in Developing *Lycopersicon esculentum* mill. Cultivars. **Int. J. Agri. Biol**, v. 8, n. 2, p. 157-161, 2006.

JANECZKO, A. et al. Physiological and biochemical characterisation of watered and drought-stressed barley mutants in the HvDWARF gene encoding C06-oxidase involved in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 99, p. 126–141, 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.12.003

JANSSENS, I. A. et al. Elevated atmospheric CO₂ increases fine root production, respiration, rhizosphere respiration and soil CO₂ efflux in scots pine seedlings. **Global Change Biology**, v. 4, n.8, p. 871-878, 1998.

JARDINE, K. et al. Integration of C1 and C2 Metabolism in Trees. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2045, 2017. DOI: 10.3390/ijms18102045

KALDENHOFF, R. A revised view on cellular CO₂ transport mechanisms: biophysics, physiology and genomics of aquaporin-facilitated CO₂ transport in plants. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 3, p. 627a, 2012.

KATAGIRI, F. Attacking Complex Problems with the Power of Systems Biology. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 417–419, 2003. DOI: 10.1104/pp.103.021774

KAUR, H. et al. Effect of elevated CO₂ on plant growth, active constituents, and production. *In: HUSEN, A. Plants and Their Interaction to Environmental Pollution*. Amsterdam: Elsevier, 2023. p. 61–77. DOI: 10.1016/B978-0-323-99978-6.00016-9

KOBAYASHI, Y. et al. Tetrapyrrole signal as a cell-cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 803–807, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0804270105

KUMAR, S.; TRIVEDI, P. K. Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 751, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.00751

KWEKU, D. et al. Greenhouse Effect: Greenhouse Gases and Their Impact on Global Warming. **Journal of Scientific Research and Reports**, v. 17, n. 6, p. 1–9, 2017. DOI: 10.9734/JSRR/2017/39630

LAL, M. A. Metabolism of Storage Carbohydrates. *In: BHATLA, S. C.; A. LAL, M. Plant Physiology, Development and Metabolism*. Singapura: Springer Singapore, 2018. p. 339–377.

LARKIN, R. M. Tetrapyrrole Signaling in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.01586

LARSEN, P. O. et al. Amino Acid Synthesis in Photosynthesizing Spinach Cells: effects of ammonia on pool sizes and rates of labeling from $^{14}\text{CO}_2$. **Plant Physiology**, v. 68, n. 2, p. 292–299, 1981. DOI: 10.1104/pp.68.2.292

LEE, T. H. et al. RiceArrayNet: A Database for Correlating Gene Expression from Transcriptome Profiling, and Its Application to the Analysis of Coexpressed Genes in Rice. **Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 16–33, 2009. DOI: 10.1104/pp.109.139030

LI, X. et al. Responses of carbohydrate metabolism enzymes in leaf and spike to CO_2 elevation and nitrogen fertilization and their relations to grain yield in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 164, p. 149–156, 2019. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.05.008

LI, Y. et al. Light-driven CO_2 assimilation by photosystem II and its relation to photosynthesis. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 44, p. 117–126, 2023. DOI: 10.1016/S1872-2067(22)64170-6

LIMA, J. C. **Ferritina**: silenciamento gênico, caracterização molecular de mutantes e expressão em plantas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* cv Nipponbare). 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

LIN, W.; ZHANG, F.; BAI, K. Responses of plant rhizosphere to atmospheric CO_2 enrichment. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 2, p. 97–101, jan. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02884650>

LINNENLUECKE, M. K.; NUCIFORA, N.; THOMPSON, N. Implications of climate change for the sugarcane industry. **WIREs Climate Change**, v. 9, n. 1, p. e498, 2018. DOI: 10.1002/wcc.498

LIU, G. NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 82–86, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg121

LIU, S. et al. Global Transcriptome and Weighted Gene Co-expression Network Analyses of Growth-Stage-Specific Drought Stress Responses in Maize. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 645443, 2021. DOI: 10.3389/fgene.2021.645443

LUO, Y. et al. Progressive Nitrogen Limitation of Ecosystem Responses to Rising Atmospheric Carbon Dioxide. **BioScience**, v. 54, n. 8, p. 731, 2004. DOI: 10.1641/0006-3568(2004)054[0731:PNLOER]2.0.CO;2

MA, Y.-S. et al. Identification of the Xyloglucan Endotransglycosylase/Hydrolase (XTH) Gene Family Members Expressed in *Boehmeria nivea* in Response to Cadmium Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 16104, 2022. DOI: 10.3390/ijms232416104

MAHESHWARI, H.; CHANDRA, U.; JAIN, K. A review from greenhouse effect to carbon footprint. **Pollution Research**, v. 37, n. 4, p. 1033-1038, 2018.

MAO, L. et al. *Arabidopsis* gene co-expression network and its functional modules. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 346, 2009. DOI: 10.1186/1471-2105-10-346

MATHAN, J.; SINGH, A.; RANJAN, A. Sucrose transport and metabolism control carbon partitioning between stem and grain in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 12, p. 4355–4372, 2021. DOI: 10.1093/jxb/erab066

MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Differential Expression of Genes in the Leaves of Sugarcane in Response to Sugar Accumulation. **Tropical Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 142–158, 2008. DOI: 10.1007/s12042-008-9013-2

MENTZEN, W. I. et al. Articulation of three core metabolic processes in *Arabidopsis*: Fatty acid biosynthesis, leucine catabolism and starch metabolism. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 76, 2008. DOI: 10.1186/1471-2229-8-76

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. Amino Acid Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, n. 1, p. 299–329, 1977. DOI: 10.1146/annurev.pp.28.060177.001503

MIKHAYLOV, A. et al. Global climate change and greenhouse effect. **Entrepreneurship and Sustainability Issues**, v. 7, n. 4, p. 2897–2913, 2020. DOI: 10.9770/jesi.2020.7.4(21)

- MO, Z. et al. Proteomics and Co-expression Network Analysis Reveal the Importance of Hub Proteins and Metabolic Pathways in Nicotine Synthesis and Accumulation in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 860455, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.860455
- SASAN, M. et al. Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 42, p. 8160-8165, 2011. DOI: 10.5897/AJB11.1024
- MONKE, G.; SONNEWALD, U. Elevated mRNA Levels of the Ribosomal Protein L19 and a Calmodulin-Like Protein in Assimilate-Accumulating Transgenic Tobacco Plants. **Plant Gene Register**, v. 107, p. 1451-1452, 1995.
- MOORE, P. H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2–3, p. 119–135, 2005. DOI: 10.1016/j.fcr.2005.01.031
- MUHAMMAD, I. et al. Mechanisms Regulating the Dynamics of Photosynthesis Under Abiotic Stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 615942, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2020.615942
- MURAD, N. F. **Redes de regulação gênica do metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar utilizando redes bayesianas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- MURADYAN, E. A. et al. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 1, p. 53–62, 2004.
- MUTWIL, M. et al. PlaNet: Combined Sequence and Expression Comparisons across Plant Networks Derived from Seven Species. **The Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 895–910, 2011. DOI: 10.1105/tpc.111.083667
- MUTWIL, M. et al. Assembly of an Interactive Correlation Network for the *Arabidopsis* Genome Using a Novel Heuristic Clustering Algorithm. **Plant Physiology**, v. 152, n. 1, p. 29–43, 2010. DOI: 10.1104/pp.109.145318
- NELSON, D. M.; CANN, I. K. O.; MACKIE, R. I. Response of Archaeal Communities in the Rhizosphere of Maize and Soybean to Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations. **PLOS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15897, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0015897
- NIE, M.; PENDALL, E. Do rhizosphere priming effects enhance plant nitrogen uptake under elevated CO₂? **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 224, p. 50–55, 2016. DOI: 10.1016/j.agee.2016.03.032
- NIMMO, H. G. et al. Protein Phosphorylation and the Control of Photosynthetic CO₂ Assimilation in C₄ and CAM Plants. In: RANJEVA, R.; BOUDET, A. M. **Signal Perception and Transduction in Higher Plants**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1990. p. 265–273.
- NOMURA, T.; BISHOP, G. J. Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2–3, p. 421–432, 2006. DOI: 10.1007/s11101-006-9024-2
- NORBY, R. J.; ZAK, D. R. Ecological Lessons from Free-Air CO₂ Enrichment (FACE) Experiments. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, n. 1, p. 181–203, 2011. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-102209-144647.
- OBAYASHI, T.; KINOSHITA, K. Rank of Correlation Coefficient as a Comparable Measure for Biological Significance of Gene Coexpression. **DNA Research**, v. 16, n. 5, p. 249–260, 2009. DOI: 10.1093/dnares/dsp016
- OGATA, Y.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D. A database for poplar gene co-expression analysis for systematic understanding of biological processes, including stress responses. **Journal of Wood Science**, v. 55, n. 6, p. 395–400, 2009. DOI: 10.1007/s10086-009-1058-9
- OLIVEROS, J.C. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. **BioinfoGP**, Madri, 2015. Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> . Acesso em: 19 de jan. de 2024.
- O'NEILL, E. G.; LUXMOORE, R. J.; NORBY, R. J. Elevated atmospheric CO₂ effects on seedling growth, nutrient uptake, and rhizosphere bacterial populations of *Liriodendron tulipifera* L. **Plant and Soil**, v. 104, n. 1, p. 3–11, 1987. DOI: 10.1007/BF02370618

- PANAHI, B.; SHAHI, A. Transcriptome data mining in combination with co-expression network analysis identifies the functional modules and critical regulators in *Hordeum vulgare* L. in response to cold stress. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 37, p. 101620, 2024. DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101620
- PARK, S.-C. et al. Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (IbLEA14) gene influences lignification and increases osmotic- and salt stress-tolerance of transgenic calli. **Planta**, v. 233, n. 3, p. 621–634, 2011. DOI: 10.1007/s00425-010-1326-3
- PAWAR, A. U.; MAHARDIKA, I. H.; KANG, Y. S. Solar CO₂ Conversion into Liquid Fuels By Photoelectrochemical Approaches. **ECS Meeting Abstracts**, v. MA2022-01, n. 36, p. 1566–1566, 2022. DOI: 10.1149/MA2022-01361566mtgabs
- PAWŁOWSKI, T. A.; STASZAK, A. M. Analysis of the embryo proteome of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seeds reveals a distinct class of proteins regulating dormancy release. **Journal of Plant Physiology**, v. 195, p. 9–22, 2016. DOI: 10.1016/j.jplph.2016.02.017
- PERSSON, S. et al. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 24, p. 8633–8638, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0503392102
- PIAO, S. et al. Plant phenology and global climate change: Current progresses and challenges. **Global Change Biology**, v. 25, n. 6, p. 1922–1940, 2019. DOI: 10.1111/gcb.14619
- PIÑEIRO, J. et al. No CO₂ fertilization effect on plant growth despite enhanced rhizosphere enzyme activity in a low phosphorus soil. **Plant and Soil**, v. 471, n. 1–2, p. 359–374, 2022. DOI: 10.1007/s11104-021-05175-6
- PÖRTNER, H. et al. **Climate change 2022: impacts, adaptation and vulnerability**. Cambridge: Cambridge University Press, 2022.
- PRINS, A. **Proteases and protease inhibitors involved in plant stress response and acclimation**. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Naturais e Agricultura, Universidade de Pretoria, Pretoria, 2008.
- PRITCHARD, S. G. et al. Elevated CO₂ and plant structure: a review. **Global Change Biology**, v. 5, n. 7, p. 807–837, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-2486.1999.00268.x
- PROOST, S.; MUTWIL, M. PlaNet: Comparative Co-Expression Network Analyses for Plants. Em: VAN DIJK, A. D. J. (Ed.). **Plant Genomics Databases**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1533, p. 213–227. DOI: 10.1007/978-1-4939-6658-5_12
- RAY, D. K. et al. Climate change has likely already affected global food production. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217148, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0217148
- RAZA, A. et al. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 34, 2019. DOI: 10.3390/plants8020034
- RODRIGUES, J. et al. Source–Sink Regulation in Crops under Water Deficit. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 7, p. 652–663, 2019. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.04.005
- ROGERS, A.; AINSWORTH, E. A. The Response of Foliar Carbohydrates to Elevated [CO₂]. In: NÖSBERGER, J. et al. **Managed Ecosystems and CO₂: Case Studies, Processes, and Perspectives**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 293–308.
- ROGERS, H. H.; PRIOR, S. A.; O'NEILL, E. G. Cotton root and rhizosphere responses to free-air CO₂ enrichment. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, n. 2–3, p. 251–263, 1992. DOI: 10.1080/07352689209382346
- ROGINI, R.; BOLNICK, D. I. **Effects of hybridization and gene flow on gene co-expression networks**. 4 dez. 2024. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.12.04.626860>. Acesso em: 3 maio. 2025
- RUPRECHT, C. et al. Large-Scale Co-Expression Approach to Dissect Secondary Cell Wall Formation Across Plant Species. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, 2011. DOI: 10.3389/fpls.2011.00023

- SADDHE, A. A.; MANUKA, R.; PENNA, S. Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 171, n. 4, p. 739–755, 2021. DOI: 10.1111/ppl.13283
- SAHA, K.; MOULIN, M.; SMITH, A. G. Tetrapyrroles in Plants: Chemical Biology of Metal Insertion and Removal. *In*: BEGLEY, T. P. **Wiley Encyclopedia of Chemical Biology**. Nova Jersey: Wiley, 2009. p. 1–13.
- SEGAL, E. et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 166–176, 2003. DOI: 10.1038/ng1165
- SERIN, E. A. R. et al. Learning from Co-expression Networks: Possibilities and Challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00444
- SHANNON, P. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003. DOI: 10.1101/gr.1239303
- SHARMA, N.; SINHA, P. G.; BHATNAGAR, A. K. Effect of elevated [CO₂] on cell structure and function in seed plants. **Climate Change and Environmental Sustainability**, v. 2, n. 2, p. 69, 2014. DOI: 10.5958/2320-642X.2014.00001.5
- SCHÄPE, P. et al. **High-quality co-expression networks for accurate gene function predictions in the fungal cell factory *Aspergillus niger* and beyond**. 28 jul. 2023. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.07.28.550800>. Acesso em: 3 maio. 2025
- SHEORAN, I. S.; SINGH, R. Carbon Dioxide Metabolism in Photosynthesis. *In*: SINGHAL, G. S. et al. **Concepts in Photobiology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. p. 430–473.
- SIDDIQUI, H.; HAYAT, S.; BAJGUZ, A. Regulation of photosynthesis by brassinosteroids in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 3, p. 59, 2018. DOI: 10.1007/s11738-018-2639-2
- SILVA, R. G. D.; ALVES, R. D. C.; ZINGARETTI, S. M. Increased [CO₂] Causes Changes in Physiological and Genetic Responses in C4 Crops: A Brief Review. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1567, 2020. DOI: 10.3390/plants9111567
- SKINNER, J. et al. Construct and Compare Gene Coexpression Networks with DAPfinder and DAPview. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 286, 2011. DOI: 10.1186/1471-2105-12-286
- SMITH, M. R.; RAO, I. M.; MERCHANT, A. Source-Sink Relationships in Crop Plants and Their Influence on Yield Development and Nutritional Quality. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1889, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01889
- SONKAR, G. et al. Simulating the Impacts of Climate Change on Sugarcane in Diverse Agro-climatic Zones of Northern India Using CANEGRO-Sugarcane Model. **Sugar Tech**, v. 22, n. 3, p. 460–472, 2020. DOI: 10.1007/s12355-019-00787-w
- SOUZA, A. P. et al. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 8, p. 1116–1127, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01822.x
- SUN, Z.; CHEN, Y.; DU, J. Elevated CO₂ improves lipid accumulation by increasing carbon metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 557–566, 2016. DOI: 10.1111/pbi.12398
- SWAMI, P.; MUNJAL, R.; DESWAL, K. Targeting Photosynthesis under Abiotic Stress. **Journal of Cereal Research**, v. 14, n. 1, p. 53-66, 2021. DOI: 10.25174/2582-2675/2022/113965
- TAI, Y. et al. Gene co-expression network analysis reveals coordinated regulation of three characteristic secondary biosynthetic pathways in tea plant (*Camellia sinensis*). **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 616, 2018. DOI: 10.1186/S12864-018-4999-9
- TANAKA, R.; TANAKA, A. Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 321–346, 2007. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105448
- TAUB, D. R.; MILLER, B.; ALLEN, H. Effects of elevated CO₂ on the protein concentration of food crops: a meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 14, n. 3, p. 565–575, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2007.01511.x

- TCHERKEZ, G. et al. Protein synthesis increases with photosynthesis via the stimulation of translation initiation. **Plant Science**, v. 291, p. 110352, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110352
- THIMM, O. et al. MapMan: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, v. 37, n. 6, p. 914–939, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02016.x
- TIMM, S.; ARRIVAUULT, S. Regulation of Central Carbon and Amino Acid Metabolism in Plants. **Plants**, v. 10, n. 430, p. 1-4, 2021. DOI: 10.3390/plants10030430.
- TOH, H.; HORIMOTO, K. Inference of a genetic network by a combined approach of cluster analysis and graphical Gaussian modeling. *Bioinformatics*, v. 18, n. 2, p. 287–297, 2002. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.2.287
- TZFADIA, O. et al. CoExpNetViz: Comparative Co-Expression Networks Construction and Visualization Tool. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2016. DOI: 10.3389/FPLS.2015.01194
- UEGUCHI-TANAKA, M. et al. Gibberellin insensitive DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 693–698, 2005. DOI: 10.1038/nature04028
- USADEL, B. et al. A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 9, p. 1211–1229, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.01978.x
- VAISH, S. et al. Glutathione S-transferase: a versatile protein family. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 321, 2020. DOI: 10.1007/s13205-020-02312-3
- VICENTINI, R. et al. Gene Content Analysis of Sugarcane Public ESTs Reveals Thousands of Missing Coding-Genes and an Unexpected Pool of Grasses Conserved ncRNAs. **Tropical Plant Biology**, v. 5, p. 199-205, 2012. DOI: 10.1007/s12042-012-9103-z
- WANG, J. et al. Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* species). **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 201, p. 1-6, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00201.
- WANG, Q. et al. **Fuzzy soft subspace clustering method for gene co-expression network analysis**. 2010 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops (BIBMW). **Anais...** In: 2010 IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICINE WORKSHOPS (BIBMW). HongKong, China: IEEE, dez. 2010. Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5703771/>. Acesso em: 3 maio. 2025. DOI: 10.1109/ICAPR.2009.55
- WANG, Z.; WANG, C.; LIU, S. Elevated CO₂ alleviates adverse effects of drought on plant water relations and photosynthesis: A global meta-analysis. **Journal of Ecology**, v. 110, n. 12, p. 2836–2849, 2022. DOI: 10.1111/1365-2745.13988
- WEI, H. et al. Transcriptional Coordination of the Metabolic Network in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 142, n. 2, p. 762–774, 2006. DOI: 10.1104/pp.106.080358
- WEIRAUCH, M. T. Gene Coexpression Networks for the Analysis of DNA Microarray Data. In: DEHMER, M. et al. **Applied Statistics for Network Biology**. Nova Jersey: Wiley, 2011. p. 215–250. DOI: 10.1002/9783527638079.ch11
- 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, 1990. DOI: 10.1104/pp.93.3.1147
- WHITE, A. C. et al. How can we make plants grow faster? A source–sink perspective on growth rate. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 31–45, 2016. DOI: 10.1093/jxb/erv447
- WHITTAKER, A.; BOTHA, F. C. Carbon Partitioning during Sucrose Accumulation in Sugarcane Internodal Tissue. **Plant Physiology**, v. 115, n. 4, p. 1651–1659, 1997. DOI: 10.1104/pp.115.4.1651
- WU, C. et al. Brassinosteroids Regulate Grain Filling in Rice. **The Plant Cell**, v. 20, n. 8, p. 2130–2145, 2008. DOI: 10.1105/tpc.107.055087
- XI, Y. et al. High CO₂ facilitates fatty acid biosynthesis and mitigates cellular oxidative stress caused by CAC2 dysfunction in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 115, n. 5, p. 1316–1330, 2023. DOI: 10.1111/tpj.16321

- XU, D. et al. Research progresses on one-carbon compound metabolism in higher plants. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, v. 29, n. 6, p. 1284-1289, 2009.
- XUE, S. et al. Effects of elevated CO₂ and drought on the microbial biomass and enzymatic activities in the rhizospheres of two grass species in Chinese loess soil. **Geoderma**, v. 286, p. 25–34, 2017. DOI: 10.1016/j.geoderma.2016.10.025
- YADAV, S. K. et al. Carbohydrates and Sucrose Metabolizing Enzymes in the Leaves of *Vigna mungo* Genotypes as Influenced by Elevated CO₂ Concentration. **J. Agri. Sci. Tech.**, v. 15, n. 6, p. 1107–1120, 2013.
- YADAV, S.; RATHORE, M. S.; MISHRA, A. The Pyruvate-Phosphate Dikinase (C4-SmPPDK) Gene From *Suaeda monoica* Enhances Photosynthesis, Carbon Assimilation, and Abiotic Stress Tolerance in a C3 Plant Under Elevated CO₂ Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 345, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00345
- YANG, Y. et al. Cysteine Protease 51 (CP51), an anther-specific cysteine protease gene, is essential for pollen exine formation in *Arabidopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 119, n. 2, p. 383–397, 2014. DOI: 10.1007/s11240-014-0542-0
- YEUNG, M. K. S.; TEGNÉR, J.; COLLINS, J. J. Reverse engineering gene networks using singular value decomposition and robust regression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6163–6168, 2002. DOI: 10.1073/pnas.092576199
- YORO, K. O.; DARAMOLA, M. O. CO₂ emission sources, greenhouse gases, and the global warming effect. In: RAHIMPOUR, M. R. et al. **Advances in Carbon Capture**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020. p. 3–28. DOI: 10.1016/B978-0-12-819657-1.00001-3
- YU, J. et al. Photosynthesis and protein metabolism associated with elevated CO₂-mitigation of heat stress damages in tall fescue. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 75–85, 2014. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.09.007
- YU, T. et al. Hub Gene Mining and Co-Expression Network Construction of Low-Temperature Response in Maize of Seedling by WGCNA. **Genes**, v. 14, n. 8, p. 1598, 2023. DOI: 10.3390/genes14081598
- ZENG, Z. et al. Gene-coexpression network analysis identifies specific modules and hub genes related to cold stress in rice. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 251, 2022. DOI: 10.1186/s12864-022-08438-3
- ZHAI, Y. et al. APETALA2/ethylene responsive factor in fruit ripening: Roles, interactions and expression regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 979348, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.979348
- ZHANG, H.; YIN, T. Analysis of topology properties in different tissues of poplar based on gene co-expression networks. **Tree Genetics & Genomes**, v. 16, n. 1, p. 6, 2020. DOI: 10.1007/s11295-019-1400-3
- ZHANG, L. et al. Progress of Molecular Basis of Biosynthesis and Transcriptional Regulation of Anthocyanins [J]. **Acta Horticulturae Sinica**, v. 35, n. 6, p. 909-916, 2008. DOI: 10.5555/20103057465
- ZHANG, S. Hierarchical Modular Structure Identification with Its Applications in Gene Coexpression Networks. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–8, 2012. DOI: 10.1100/2012/523706
- ZHANG, Y. et al. Rice co-expression network analysis identifies gene modules associated with agronomic traits. **Plant Physiology**, v. 190, n. 2, p. 1526–1542, 2022. DOI: 10.1093/plphys/kiac339
- ZHAO, D. et al. A *Paeonia ostii* caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers drought stress tolerance by promoting lignin synthesis and ROS scavenging. **Plant Science**, v. 303, p. 110765, 2021. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110765
- ZHUKOV, A.; POPOV, V. Synthesis of C20–38 Fatty Acids in Plant Tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4731, 2022. DOI: 10.3390/ijms23094731
- XULVI-BRUNET, R.; LI, H. Co-expression networks: graph properties and topological comparisons. **Bioinformatics**, v. 26, n. 2, p. 205–214, 2010. DOI: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTP632

Dado suplementar 1

	Casu et al., 2007	McCormick et al., 2008	Souza et al., 2008
Espécie	<i>Saccharum</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	<i>Saccharum officinarum</i> (L.)
Genótipo	Q117	Híbrido cv. N19	cv. SP80–3280
Número de amostras	Três amostras, quatro duplicatas	Duas amostras	Quatro câmaras (duas a 720 ppm e duas a 370 ppm), seis duplicatas em cada
Tecido de coleta	Caule jovem (meristema e entrenós 1–3; M, I1–3), caule em maturação (entrenó 8; I8) e caule maduro (entrenó 20; I20)	Segunda e terceira folhas totalmente expandidas	Folhas inteiras (folha +1)
Tempo de maturação da planta	11 meses	12 meses	50 semanas de exposição ao experimento
Local de cultivo	Campo (cultivo comercial)	Campo	Casa de vegetação
País de origem	Austrália	África do Sul	Brasil

Dado suplementar 1: Tabela comparativa com os principais métodos utilizados nos três trabalhos analisados.

Dado suplementar 2

	MapMan ID	Term description	Terms total	p-value
Top (c00)	31.2	cell.division	23	0.02
Top (c01)	28.1.3	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	43	0.009
Top (c02)	17.6.3	hormone metabolism.gibberelin.induced-regulated-responsive-activated	5	0
Top (c03)	20	stress	10	0
Top (c04)	34.16	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	20	0.02
Top (c05)	29.3.1	protein.targeting.nucleus	12	0.004
Top (c06)	20.2.1	stress.abiotic.heat	31	0
Top (c07)	29.5	protein.degradation	51	0.001
Top (c08)	29.2.4	protein.synthesis.elongation	21	0.002
Top (c09)	16.1.2.2	secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.HMG-CoA synthase	3	0
Top (c10)	28.1.3	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	43	0
Top (c11)	30.5	signalling.G-proteins	46	0.005
Top (c12)	13.1.1.2.1	amino acid metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.aspartate.aspartate aminotransferase	5	0
Top (c13)	15.2	metal handling.binding, chelation and storage	12	0
Top (c14)	29.4	protein.postranslational modification	164	0
Top (c15)	10.2.1	cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	20	0
Top (c16)	26.26.1	misc.aminotransferases.aminotransferase class IV family protein	5	0
Top (c17)	29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	56	0
Top (c18)	18.3.1	Co-factor and vitamine metabolism.riboflavin.GTP cyclohydrolase II	3	0
Top (c19)	34.19.3	transport.Major Intrinsic Proteins.NIP	3	0
Top (c20)	31.4	cell.vesicle transport	55	0
Top (c21)	29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	24	0.001
Top (c22)	20.1	stress.biotic	29	0.001
Top (c23)	17.5.3	hormone metabolism.ethylene.induced-regulated-responsive-activated	5	0.001
Top (c24)	16.2	secondary metabolism.phenylpropanoids	5	0
Top (c25)	31.1	cell.organisation	124	0
Top (c26)	26.22	misc.short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	7	0

Top (c27)	3.6	minor CHO metabolism.callose	6	0.03
Top (c28)	34.3	transport.amino acids	11	0
Top (c29)	20.1	stress.biotic	29	0
Top (c30)	27.3.67	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	44	0
Top (c31)	11.4	lipid metabolism.TAG synthesis	1	0.009
Top (c32)	16.8.1.21	secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins.anthocyanin 5- aromatic acyltransferase	1	0.01
Top (c33)	16.2.1.6	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CCoAOMT	6	0
Top (c34)	10.1.3	cell wall.precursor synthesis.AXS	2	0.027
Top (c35)	20.2.1	stress.abiotic.heat	31	0.025
Top (c36)	9.1.2	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	10	0
Top (c37)	20.2.3	stress.abiotic.drought/salt	25	0.001
Top (c38)	29.2.1.2.1.28	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S28	2	0
Top (c39)	27.3.3	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein family	8	0.008
Top (c40)	27.3.99	RNA.regulation of transcription.unclassified	63	0.001
Top (c41)	33.99	development.unspecified	94	0
Top (c42)	29.2.1.2.1.12	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S12	4	0
Top (c43)	1.3.3	PS.calvin cycle.phosphoglycerate kinase	4	0.001
Top (c44)	30.6	signalling.MAP kinases	19	0
Top (c45)	27.1.1	RNA.processing.splicing	22	0.003
Top (c46)	13.1.6.1.5	amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.chorismate.shikimate kinase	4	0
Top (c47)	26.1	misc.misc2	18	0.017
Top (c48)	29.2.1.2.2.513	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L13A	6	0.001
Top (c49)	20.2.1	stress.abiotic.heat	31	0.005
Top (c50)	20.2.3	stress.abiotic.drought/salt	25	0.024
Top (c51)	28.1.3	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	43	0.005
Top (c52)	3.4.3	minor CHO metabolism.myo-inositol.InsP Synthases	4	0
Top (c53)	29.2.1.1.1.1.8	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit.S8	2	0
Top (c54)	30.5	signalling.G-proteins	46	0
Top (c55)	10.1.10	cell wall.precursor synthesis.RHM	4	0

Top (c56)	34.2	transporter.sugars	18	0
Top (c57)	11.2.3	lipid metabolism.FA desaturation.omega 3 desaturase	2	0
Top (c58)	9.9	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1- ATPase	9	0
Top (c59)	27.4	RNA.RNA binding	49	0.007
Top (c60)	1.1.40	PS.lightreaction.cyclic electron flow-chlororespiration	7	0.001
Top (c61)	27.3.99	RNA.regulation of transcription.unclassified	63	0.014
Top (c62)	29.4	protein.postranslational modification	164	0
Top (c63)	28.1.3	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	43	0
Top (c64)	26.2	misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	24	0
Top (c65)	13.2.4.3	amino acid metabolism.degradation.branched-chain group.valine	1	0.012
Top (c66)	29.6	protein.folding	18	0
Top (c67)	33.99	development.unspecified	94	0.009
Top (c68)	20.2.3	stress.abiotic.drought/salt	25	0
Top (c69)	28.1.3	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	43	0
Top (c70)	8.1.2	TCA / org. transformation.TCA.CS	3	0
Top (c71)	20.2.5	stress.abiotic.light	3	0
Top (c72)	29.2.1.2.1.15	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S15	5	0.001
Top (c73)	29.5.11.2	protein.degradation.ubiquitin.E1	8	0.004
Top (c74)	28.99	DNA.unspecified	16	0.012
Top (c75)	30.3	signalling.calcium	70	0.013
Top (c76)	13.1.6.1.1	amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.chorismate.3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7- phosphate synthase	8	0
Top (c77)	33.2	development.late embryogenesis abundant	5	0
Top (c78)	29.2.4	protein.synthesis.elongation	21	0.011
Top (c79)	30.6	signalling.MAP kinases	19	0
Top (c80)	29.4	protein.postranslational modification	164	0.011

Dado suplementar 2: Enriquecimento funcional MapMan dos clusters formados.

Dado suplementar 3

	<u>Top MAPMAN Term</u>	<u>Gen.</u> <u>1</u>	<u>Resp.</u> <u>gen.</u> ²	<u>Prop.</u> <u>(%)</u> ³	<u>p-</u> <u>val</u> <u>ue</u>	<u>S</u> <u>S</u> ⁴	<u>C</u> <u>W</u> ⁵	<u>C</u> <u>O</u> ₂
c0	DNA.synthesis/chromatin	185	10	5.405405	0.0	6	4	
1	structure.histone			405	09			
c0	hormone	220	26	11.81818	0.0		26	
2	metabolism.gibberelin.induced-regulated-responsive-activated			182				
c0	20. stress	196	8	4.081632	0.0	2 ,	2	1
3				653		3		
c0	transport.ABC transporters and	85	0	0	0.0			
4	multidrug resistance systems				2			
c0	protein.targeting.nucleus	187	6	3.208556	0.0	4	1 ,	
5				15	04		1	
c0	20.2.1. stress.abiotic.heat	254	25	9.842519	0.0	4 ,		1 ,
6				685		19		1
c0	29.5. protein.degradation	163	29	17.79141	0.0	28		1
7				104				
c0	protein.synthesis.elongation	111	6	5.405405	0.0	3 ,	2	
8				405	02	1		
c0	secondary	142	2	1.408450	0.0	2		
9	metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.HMG-CoA synthase			704				
c1	DNA.synthesis/chromatin	124	7	5.645161	0.0	4	3	
0	structure.histone			29				
c1	signalling.G-proteins	72	4	5.555555	0.0	4		
1				556	05			
c1	amino acid	106	1	0.943396	0.0	1		
2	metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.aspartate.aspartate aminotransferase			226				
c1	15.2. metal handling.binding, chelation and storage	125	31	24.8	0.0	26		5
3								
c1	29.4. protein.postranslational modification	155	11	7.096774	0.0		10	1
4				194				
c1	cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	154	32	20.77922	0.0	22 ,	9	
5				078		1		
c1	misc.aminotransferases.aminotransf erase class IV family protein	80	5	6.25	0.0	5		
6								
c1	protein.degradation.ubiquitin.proteas om	132	4	3.030303	0.0	3	1	
7				03				
c1	Co-factor and vitamine	61	4	6.557377	0.0	3	1	
8	metabolism.riboflavin.GTP cyclohydrolase II			049				
c1	transport.Major Intrinsic Proteins.NIP	77	1	1.298701	0.0	1		
9				299				
c2	31.4. cell.vesicle transport	180	6	3.333333	0.0		4	1 ,
0				333				1
c2	protein.degradation.cysteine protease	183	4	2.185792	0.0	1	3	
1				35	01			
c2	stress.biotic	152	2	1.315789	0.0		2	
2				474	01			
c2	hormone	67	0	0	0.0			
3	metabolism.ethylene.induced-regulated-responsive-activated				01			
c2	secondary	108	9	8.333333	0.0	9		
4	metabolism.phenylpropanoids			333				

c2 5	31.1. cell.organisation	207	19	9.178743 961	0.0	16 , 1		1 1
c2 6	misc.short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	44	3	6.818181 818	0.0	2	1	
c2 7	minor CHO metabolism.callose	45	0	0	0.0 3			
c2 8	transport.amino acids	46	11	23.91304 348	0.0	11		
c2 9	stress.biotic	54	7	12.96296 296	0.0	7		
c3 0	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	83	3	3.614457 831	0.0	3		
c3 1	lipid metabolism.TAG synthesis	86	1	1.162790 698	0.0 9	1		
c3 2	16.8.1.21. secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins. anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	83	1	1.204819 277	0.0 1			1
c3 3	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CCoAOMT	163	18	11.04294 479	0.0	14	2, 2	
c3 4	10.1.3. cell wall.precursor synthesis.AXS	101	2	1.980198 02	0.0 27	1		1
c3 5	stress.abiotic.heat	169	7	4.142011 834	0.0 25	1, 3	3	
c3 6	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	56	1	1.785714 286	0.0	1		
c3 7	stress.abiotic.drought/salt	51	7	13.72549 02	0.0 01	7		
c3 8	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S28	61	0	0	0.0			
c3 9	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein family	122	14	11.47540 984	0.0 08	14		
c4 0	RNA.regulation of transcription.unclassified	76	1	1.315789 474	0.0 01	1		
c4 1	development.unspecified	116	5	4.310344 828	0.0		5	
c4 2	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S12	104	0	0	0.0			
c4 3	PS.calvin cycle.phosphoglycerate kinase	108	11	10.18518 519	0.0 01	11		
c4 4	30.6. signalling.MAP kinases	74	4	5.405405 405	0.0	3		1
c4 5	27.1.1. RNA.processing.splicing	111	13	11.71171 171	0.0 03	11	1	1
c4 6	amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.chorismate.shikimate kinase	106	12	11.32075 472	0.0	12		
c4 7	misc.misc2	93	0	0	0.0 17			
c4 8	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L13A	66	0	0	0.0 01			
c4 9	stress.abiotic.heat	87	4	4.597701 149	0.0 05	1, 1	1, 1	
c5 0	stress.abiotic.drought/salt	81	11	13.58024 691	0.0 24	11		

c5	DNA.synthesis/chromatin	73	13	17.80821	0.0		13
1	structure.histone			918	05		
c5	minor CHO metabolism.myo-	59	14	23.72881	0.0	13	1
2	inositol.InsP Synthases			356			
c5	protein.synthesis.ribosomal	57	3	5.263157	0.0		3
3	protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit.S8			895			
c5	signalling.G-proteins	146	1	0.684931	0.0		1
4				507			
c5	cell wall.precursor synthesis.RHM	52	10	19.23076	0.0	10	
5				923			
c5	transporter.sugars	68	7	10.29411	0.0	7	
6				765			
c5	lipid metabolism.FA	53	6	11.32075	0.0	6	
7	desaturation.omega 3 desaturase			472			
c5	mitochondrial electron transport /	45	8	17.77777	0.0	8	
8	ATP synthesis.F1-ATPase			778			
c5	RNA.RNA binding	66	1	1.515151	0.0	1	
9				515	07		
c6	PS.lightreaction.cyclic electron flow-	49	6	12.24489	0.0	6	
0	chlororespiration			796	01		
c6	RNA.regulation of	61	2	3.278688	0.0	2	
1	transcription.unclassified			525	14		
c6	protein.postranslational modification	70	2	2.857142	0.0	2	
2				857			
c6	DNA.synthesis/chromatin	66	6	9.090909	0.0	3	3
3	structure.histone			091			
c6	misc.UDP glucosyl and glucoronyl	84	9	10.71428	0.0	2	7
4	transferases			571			
c6	amino acid	88	2	2.272727	0.0	2	
5	metabolism.degradation.branched-			273	12		
	chain group.valine						
c6	protein.folding	151	4	2.649006	0.0		4
6				623			
c6	development.unspecified	44	0	0	0.0		
7					09		
c6	stress.abiotic.drought/salt	69	26	37.68115	0.0	26	
8				942			
c6	DNA.synthesis/chromatin	101	4	3.960396	0.0	3	1
9	structure.histone			04			
c7	TCA / org. transformation.TCA.CS	40	0	0	0.0		
0							
c7	stress.abiotic.light	64	2	3.125	0.0	2	
1							
c7	protein.synthesis.ribosomal	86	2	2.325581	0.0	2	
2	protein.eukaryotic.40S subunit.S15			395	01		
c7	protein.degradation.ubiquitin.E1	58	1	1.724137	0.0	1	
3				931	04		
c7	28.99. DNA.unspecified	85	10	11.76470	0.0	5	2 , 2
4				588	12		1
c7	signalling.calcium	57	3	5.263157	0.0	3	
5				895	13		
c7	amino acid	65	18	27.69230	0.0	18	
6	metabolism.synthesis.aromatic			769			
	aa.chorismate.3-deoxy-D-arabino-						
	heptulosonate 7-phosphate synthase						
c7	33.2. development.late	86	1	1.162790	0.0		1
7	embryogenesis abundant			698			
c7	protein.synthesis.elongation	51	0	0	0.0		
8					11		

c7	signalling.MAP kinases	50	0	0	0.0	
9						
c8	protein.postranslational modification	46	3	6.521739	0.0	3
0				13	11	

Dado suplementar 3: Principais termos funcionais de enriquecimento MapMan para *clusters* de HCCA. Os números em azul indicam genes regulados negativamente, enquanto os escritos em vermelho são regulados positivamente na análise. Em roxo estão aqueles cuja regulação é ao mesmo tempo positiva e negativa nos diferentes experimentos do trabalho que os analisou. ¹Genes in cluster.

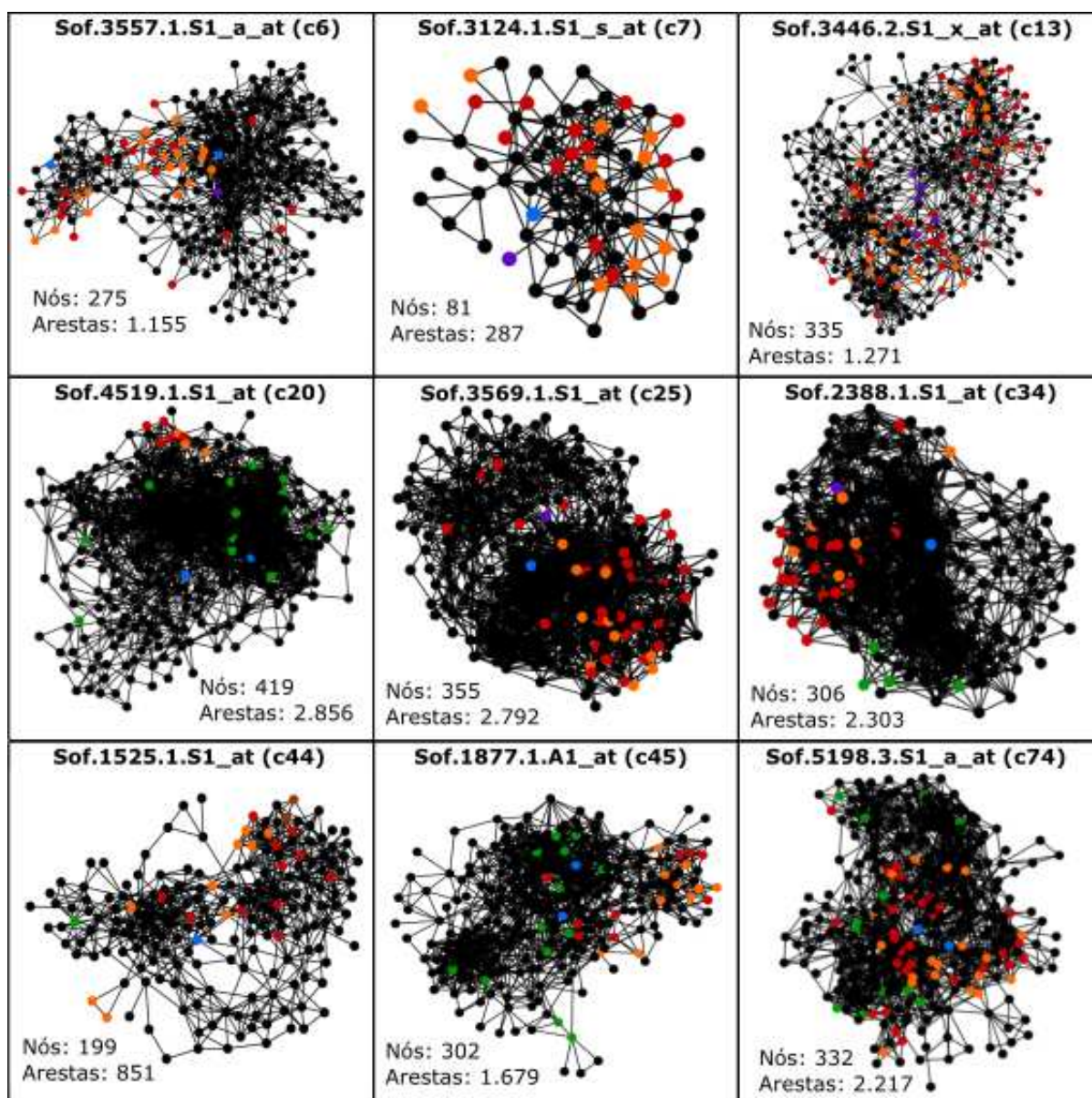
²Responsive genes in cluster. ³Proportion. ⁴Fisher p-value. ⁵Source-sink. ⁶Cell-wall.

Dado suplementar 4

Sonda	Responsiva	Cluster	Enriquecimento funcional
Sof.3557.1.S1_a_at	Fonte-dreno/CO ₂	c06	Light-induced protein
Sof.3419.1.A1_at	Fonte-dreno/Parede celular	c10	phytosulfokine-alpha 1 precursor
Sof.3446.2.S1_at	Fonte-dreno/CO ₂	c13	Ferritin
Sof.3446.2.S1_s_at	Fonte-dreno/CO ₂	c13	Ferritin
Sof.3446.2.S1_x_at	Fonte-dreno/CO ₂	c13	Ferritin
Sof.3446.3.S1_a_at	Fonte-dreno/CO ₂	c13	Ferritin
Sof.3446.3.S1_x_at	Fonte-dreno/CO ₂	c13	Ferritin
Sof.3707.1.S1_at	Fonte-dreno/Parede celular	c21	DNA.synthesis/chromatin structure.histone
Sof.3569.1.S1_at	Fonte-dreno/CO ₂	c25	Xyloglucan transglycosylase/hydrolase peroxidase
Sof.820.1.S1_at	Fonte-dreno/Parede celular	c26	
Sof.4028.1.S1_at	Fonte-dreno/Parede celular	c32	DNA.synthesis/chromatin structure.histone
Sof.3822.1.S1_at	Fonte-dreno/Parede celular	c33	cellulose synthase catalytic subunit 11
Sof.1025.1.S1_a_at	Fonte-dreno/Parede celular	c33	lipid binding protein
Sof.3590.1.S1_at	Fonte-dreno/Parede celular	c33	fasciclin-like protein
Sof.4025.1.S1_x_at	Fonte-dreno/Parede celular	c51	DNA.synthesis/chromatin structure.histone
Sof.3504.1.S1_at	Fonte-dreno/Parede celular	c52	annexin p33
Sof.4028.1.S1_a_at	Fonte-dreno/Parede celular	c63	histone H2A
Sof.4025.1.S1_s_at	Fonte-dreno/Parede celular	c63	histone H2A

Dado suplementar 4: Sondas marcadas como responsivas em mais de uma análise, com os *clusters* aos quais pertencem e seus respectivos enriquecimentos funcionais.

Dado suplementar 5



Dado suplementar 5: Conjunto de redes baseadas nas sondas responsivas para CO₂ criadas a partir da rede principal. As cores de cada nó seguem o mesmo padrão utilizado nas redes dos clusters.

Anexo 1

DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “**ANÁLISE EM LARGA ESCALA DE REDES DE EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADAS À FOTOSSÍNTESE E SÍNTESE DE PAREDE CELULAR EM CANA-DE-AÇÚCAR (SACCHARUM SP.) EM AMBIENTE DE CO₂ ELEVADO**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 

Nome do(a) aluno(a): Christiane de Paula Ribeiro Silva Campos

Assinatura: 

Nome do(a) orientador(a): Renato Vicentini dos Santos

Anexo 2

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ANÁLISE EM LARGA ESCALA DE REDES DE EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADAS À FOTOSSÍNTESE E SÍNTESE DE PAREDE CELULAR EM CANA-DE-AÇÚCAR (SACCHARUM SP.) EM AMBIENTE DE CO₂ ELEVADO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas,

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): Christiane de Paula Ribeiro Silva Campos

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): Renato Vicentini dos Santos