



PEDRO VITOR SCHUMACHER

**PERSPECTIVAS SOBRE O FLORESCIMENTO DA CANA-DE-
AÇÚCAR: INTEGRANDO FOTOPERÍODO E METABOLISMO
ENERGÉTICO**

**LAVRAS - MG
2019**

PEDRO VITOR SCHUMACHER

**PERSPECTIVAS SOBRE O FLORESCIMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR:
INTEGRANDO FOTOPERÍODO E METABOLISMO ENERGÉTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia para obtenção do título de Doutor.

Antonio Chalfun Júnior, PhD.

**LAVRAS – MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Schumacher, Pedro Vitor.

Perspectivas sobre o florescimento da cana-de-açúcar:
integrando fotoperíodo e metabolismo energético / Pedro Vitor
Schumacher. - 2019.

95 p. : il.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. Saccharum spp. 2. Regulação do florescimento. 3.
FLOWERING LOCUS T. I. Chalfun Júnior, Antonio. II. Título.

PEDRO VITOR SCHUMACHER

**PERSPECTIVAS SOBRE O FLORESCIMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR:
INTEGRANDO FOTOPERÍODO E METABOLISMO ENERGÉTICO**

**INSIGHTS ON SUGARCANE FLOWERING: INTEGRATING PHOTOPERIOD AND
ENERGETIC METABOLISM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2019
Dra. Carla Priscila Coelho – MaRS Discovery District
Dr. Adriano Teodoro Bruzi – UFLA
Dra. Elisa Monteze Bicalho – UFLA.
Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori – UFLA.

Antonio Chalfun Júnior, PhD
Orientador

Lavras – MG
2019

Gilmar Schumacher, Alice Coelho e Marieli Rossato
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos disponibilizados para condução dos experimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Chalfun Júnior pela ajuda e confiança a mim depositada na execução deste trabalho.

Aos meus pais, Gilmar e Alice, e irmã Joice, pelo apoio incondicional.

À minha esposa Marieli Rossato, pela parceria, apoio, companhia em todos os momentos e por me aguentar. Sem você não existiria eu.

À Pâmela Marinho Rezende, ao Thales Henrique Cherubino Ribeiro, ao Carlos Henrique Cardon e à Débora Domiciano pelos ensinamentos e ajuda na realização dos experimentos.

Ao Manoel Viana Linhares Neto, pela amizade e pelo apoio em todo o processo do doutorado.

Ao pessoal da Dungeon, Gui, Pato, Feuron, Zardo, Fofão, Breno e Thalin pela amizade.

A todos os membros do LFMP que tive a oportunidade de conviver e trabalhar, obrigado pelo apoio.

RESUMO

O florescimento é um fator limitante a produção de cana-de-açúcar pois prejudica o armazenamento de sacarose, e, conseqüentemente, o rendimento da cultura. O fotoperíodo é o principal fator ambiental responsável pela indução floral da cana-de-açúcar. A transição para o estágio reprodutivo é controlada por sinais endógenos e ambientais que induzem a expressão de genes integradores do florescimento. Entre esses genes, destaca-se o *FLOWERING LOCUS T (FT)*, sua transcrição ocorre em função de alterações no comprimento do dia. Tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas genes homólogos ao *FT* atuam na indução floral, sua expressão é considerada limitante na promoção do florescimento. O fotoperíodo, juntamente com o relógio circadiano, promove mudanças a níveis moleculares, levando à expressão de genes envolvidos na indução floral e também a níveis fisiológicos e bioquímicos. Entre essas mudanças, destaca-se o metabolismo de carboidratos que, inicialmente, pode atuar na indução do florescimento e posteriormente, em cana-de-açúcar, causa perda de produtividade. A sacarose e outros intermediários do metabolismo de carboidratos, como a trealose e enzimas envolvidas em sua síntese, podem atuar na indução do florescimento. Em cana-de-açúcar foram identificados genes homólogos a *TPS (STPSI e STPSII)* e ao *FT*, e, possivelmente, algum desses homólogos do *FT* desempenhe um papel fundamental na indução floral dessa planta via fotoperíodo, podendo ou não, atuar juntamente como genes homólogos ao *TPS*. Nesse sentido, objetivou-se, com a realização desse trabalho, o entendimento do processo de indução floral via fotoperíodo e suas relações com o metabolismo de carboidratos. Foram realizadas análises *in silico* de possíveis ortólogos do *FT* em cana-de-açúcar, caracterização da expressão qualitativa em diferentes tecidos da planta e quantitativa do possível indutor do florescimento *ScFT6* ao longo do dia e em cultivares de cana-de-açúcar contrastantes para o florescimento. Além disso, plantas de cana-de-açúcar foram submetidas a duas condições de fotoperíodo (dia encurtando e dia alongando) e, durante a indução desses tratamentos, foram analisadas trocas gasosas ao longo do período de condução do experimento, expressão em tempo real dos genes *ScFT6*, *SPSI* e *SPSII* e determinação dos teores de açúcares redutores (amido e sacarose). Entre os possíveis homólogos do *FT* identificados em cana-de-açúcar, destacou-se o gene *ScFT6*, que possui uma sequência com domínio conservado e aminoácidos em posições características de genes da família PEBP indutores do florescimento. A expressão do gene *ScFT6*, semelhante a outros *FTs* indutores do florescimento encontrado em outras espécies, ocorre em folhas maduras e no meristema apical de parte aérea e é controlada pelo ritmo circadiano. Variedades com comportamento distinto para o florescimento apresentam expressão variável do gene *ScFT6*. A redução do comprimento do dia, responsável pela indução do florescimento em cana-de-açúcar pela via fotoperiódica, promove aumento da expressão do possível indutor do florescimento *ScFT6*, além de promover o aumento da expressão de *STPSII*, um sinalizador do *status* de carbono da planta. O gene *ScFT6* não tem sua expressão correlacionada a níveis de carboidrato das plantas de cana-de-açúcar. Possivelmente o *ScFT6* atua na indução floral da cana-de-açúcar exclusivamente pela transmissão do sinal luminoso.

Palavras-chave: Comprimento do dia. Metabolismo de carboidratos. Regulação do florescimento. *FLOWERING LOCUS T*. *Saccharum* spp.

ABSTRACT

Flowering is a limiting factor to sugarcane production because it impairs the storage of sucrose and, consequently, the crop yield. The photoperiod is the main environmental factor responsible for the floral induction in sugarcane. The transition to the reproductive stage is controlled by endogenous and environmental signals that induce the expression of flowering integrating genes. Among these genes, FLOWERING LOCUS T (*FT*) stands out: its transcription occurs as a function of day length alterations. In both monocotyledons and dicotyledons genes homologous to *FT* act in floral induction and their expression is considered limiting in flowering promotion. The photoperiod, together with the circadian clock promotes changes at molecular levels, leading to the expression of genes involved in floral induction, and at physiological and biochemical levels. Among the provoked alterations is the carbohydrate metabolism, which initially can act in the flowering induction and later, in sugarcane, causes a loss of productivity. Sucrose and other intermediates of carbohydrate metabolism, such as trehalose and enzymes involved in its synthesis, may act to induce flowering. Homologous genes to *TPS* (*STPSI* and *STPSII*) and to *FT* have already been identified in sugarcane, and possibly, some of these *FT* homologues play a key role in the floral induction of this plant through photoperiod and may or may not act together as genes homologous to *TPS*. In this sense, the purpose of this work was to understand the process of floral induction through photoperiod and its relations with carbohydrate metabolism. We have done in silico analysis of possible orthologues of *FT* in sugarcane, characterization of qualitative expression in different plant tissues and characterization of quantitative expression of the putative flowering promoter *ScFT6* both throughout the day and in sugarcane cultivars contrasting in relation to flowering. Besides that, sugarcane plants were submitted to two photoperiod conditions (shortening day and elongating day). During these treatments, gas exchanges were analyzed throughout the conduction period of the assay, as well as real-time expression of *ScFT6*, *SPSI* and *SPSII* genes and determination of the contents of reducing sugars (starch and sucrose). Among the possible *FT* homologues identified in sugarcane, stands out the *ScFT6* gene, which has a conserved domain sequence and amino acids at characteristic positions of blossoming inducing PEBP family genes. The expression of the *ScFT6* gene, like other flowering inducers *FTs* found in other species, occurs in mature leaves and shoot apex been controlled by the circadian rhythm. Varieties with distinct behavior for flowering have variable expression of the *ScFT6* gene. Reduction in day length, responsible for flowering induction in sugarcane through photoperiod, increases expression of the putative flowering promoter *ScFT6*, besides promoting the increase in expression of *STPSII*, sign of carbon status of the plant. The expression of *ScFT6* gene was not correlated to carbohydrate levels in sugarcane plants. Possibly it acts in the flowering induction exclusively by the luminous signal transmission.

Keywords: Day length. Carbohydrate metabolism. Flowering regulation. *FLOWERING LOCUS T*. *Saccharum* spp.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	12
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Aspectos botânicos da cana-de-açúcar	16
2.2	Aspectos genéticos da cana-de-açúcar.....	17
2.3	Aspectos econômicos da cana-de-açúcar.....	18
2.4	Aspectos produtivos da cana-de-açúcar.....	19
2.5	Ritmos circadianos e o fotoperiodismo	20
2.6	Fotoperíodo e o florescimento	22
2.7	Genes integradores do florescimento	24
2.8	Metabolismo de carboidratos e o florescimento	28
2.9	Fisiologia molecular do florescimento em cana-de-açúcar	29
2.10	CONSIDERAÇÕES GERAIS	30
	REFERÊNCIAS	31
	CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO GENE <i>ScFT6</i>: CANDIDATO A INDUTOR DO FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	42
1	INTRODUÇÃO	45
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1	Experimento 1: Análises <i>in silico</i> dos possíveis ortólogos de <i>FT</i> em cana-de- açúcar	47
2.2	Experimento 2: Caracterização da expressão qualitativa do <i>ScFT6</i> em tecidos de cana-de-açúcar	48
2.3	Experimento 3: Expressão quantitativa do gene <i>ScFT6</i> ao longo do tempo em folhas de cana-de-açúcar	49
2.3.1	Condições de cultivo.....	49
2.3.2	Análises da expressão gênica em tempo real do gene <i>ScFT6</i>	50
2.3.3	Delineamento experimental.....	50
2.4	Experimento 4: análise de crescimento e expressão quantitativa do gene <i>ScFT6</i> em cultivares de cana-de-açúcar contrastantes para o florescimento.....	50
2.4.1	Condições de cultivo.....	50
2.4.2	Análises de crescimento	51

2.4.3	Análises da expressão em tempo real do gene <i>ScFT6</i>	51
2.4.4	Delineamento experimental e análise estatística	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1	O gene <i>ScFT6</i> é um possível indutor do florescimento em cana-de-açúcar	53
3.2	O relógio circadiano controla a expressão do gene <i>ScFT6</i>	58
3.3	Variedades de cana-de-açúcar possuem comportamentos distintos em relação à expressão de <i>ScFT6</i>	60
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE A – Sequências proteicas de homólogos do <i>FT</i> de diversas espécies.	69
	APÊNDICE B – Protocolo de extração de RNA QIAZOL® com adaptações para cana-de-açúcar.	70
	CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DO GENE <i>SCFT6</i> EM FUNÇÃO DO FOTOPERÍODO EM CANA-DE-AÇÚCAR E SUA RELAÇÃO COM O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	71
1	INTRODUÇÃO	74
2	MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1	Condições de cultivo.....	76
2.2	Análises de trocas gasosas	77
2.3	Quantificação de amido, açúcares solúveis totais, sacarose e açúcares redutores	77
2.4	Análises da expressão em tempo real dos genes <i>ScFT6</i> , <i>SPS I</i> e <i>SPSII</i>	78
2.5	Delineamento experimental e análise estatística	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1	A fotossíntese de cana-de-açúcar é alterada em função do fotoperíodo	81
3.2	O fotoperíodo altera os teores de carboidratos em cana-de-açúcar	82
3.3	A expressão de <i>STPSI</i> , <i>STPSII</i> e <i>ScFT6</i> é alterada pelo fotoperíodo	83
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
	REFERENCIAL	87
	APÊNDICE A – Protocolo de extração de RNA QIAZOL® com adaptações para cana-de-açúcar.	91

	APÊNDICE B – Análise da correlação linear simples com entre dados de trocas gasosas, amido, açúcares solúveis totais, sacarose, açúcares redutores e expressão dos genes <i>scft6</i>, <i>stpsi</i> e <i>stpsii</i> pelo teste t ($p \leq 0,05$).....	92
	CAPÍTULO 4 – PERSPECTIVAS FUTURAS	93
1	PERSPECTIVAS FUTURAS	94

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é cultivada em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, nos dois lados da linha do equador entre as latitudes 35° N e 35° S (MUKHERJEE, 1957; VAN DILLEWIJN, 1952). Sua área de cultivo engloba 25.976.939 hectares pelo mundo, com uma produção anual de 1.890.661.751 toneladas e uma produtividade média de 70,6 toneladas por hectare (FAOSTAT; PRODUCTION, 2016). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (768.678.382 toneladas por ano), com uma produtividade média de 75,2 toneladas por hectare (FAOSTAT; PRODUCTION, 2016).

A cana-de-açúcar é considerada a principal fonte de energia renovável brasileira. O etanol produzido através dela é comprovadamente um substituto para os combustíveis fósseis no Brasil, devido a sua natureza bioenergética e tecnologia empregada para sua produção (EFE; STRAATHOF; VAN DER WIELEN, 2005). Além do etanol, a cana-de-açúcar é a principal fonte de açúcar utilizada pela população, tanto no mercado interno brasileiro quanto para exportação, levando o Brasil ao topo no *ranking* como maior produtor mundial de açúcar (OLIVEIRA et al., 2018), sendo responsável por aproximadamente 35% de toda a produção mundial (CONAB, 2018).

Entre os desafios da cadeia produtiva da cana-de-açúcar, no que diz respeito a busca pelo aumento de produtividade, destacam-se o florescimento, o déficit hídrico, salinidade, baixa temperatura, toxicidade de alumínio, solos pobres e compactados, dentre outros. O florescimento, em especial, prejudica o armazenamento de sacarose, e, conseqüentemente, o rendimento da cultura (BERDING; HURNEY, 2005), sendo, portanto, considerado um dos principais desafios para o sistema produtivo da cultura (CRESTE et al., 2010). Ele é considerado prejudicial e indesejável pois promove um deslocamento de energia armazenada no colmo na forma de sacarose para o desenvolvimento da inflorescência e, conseqüentemente, afeta a quantidade e a qualidade da matéria prima (CAPUTO et al., 2007).

O fotoperíodo é o principal fator ambiental responsável pela indução floral da cana-de-açúcar, onde o fotoperíodo ideal para indução do florescimento varia entre 12 a 12,5 horas, principalmente no período do ano em que o comprimento do dia está encurtando e as plantas estão concluindo o período vegetativo (ARALDI et al., 2010; CLEMENTS; AWADA, 1967). Para a indução floral, o fotoperíodo se relaciona com outros fatores como umidade, nutrição e temperatura (MOORE, 1987; MOORE; NUSS, 1987). No caso da temperatura, valores extremos acima de 32 °C são limitantes ao florescimento (BERDING, 1995).

Estudos recentes relacionados a regulação floral fotoperiódica, principalmente em *Arabidopsis thaliana*, aumentaram o conhecimento da atuação do fotoperíodo a níveis moleculares em plantas. Em angiospermas, o relógio circadiano desempenha papéis fundamentais na regulação do tempo de floração, onde medem as mudanças no fotoperíodo para controlar com precisão o tempo de floração (SONG; ITO; IMAIZUMI, 2010). A transição para o estágio reprodutivo e todas as mudanças que ocorrem no meristema apical de parte aérea são controladas por sinais endógenos e ambientais (BERNIER, 1988; MCDANIEL; SINGER; SMITH, 1992). Tais sinais induzem a expressão de genes integradores do florescimento, que incorporam sinais de múltiplas vias do florescimento e seus níveis de expressão determinam o momento do florescimento (PARCY, 2004; SIMPSON; DEAN, 2002).

Entre os genes integradores do florescimento, destaca-se o *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). Sua transcrição em resposta a dias longos é o passo limitante para indução do florescimento em *A. thaliana* (CORBESIER et al., 2007). Dados semelhantes têm sido obtidos para os homólogos de *FT* em muitas outras espécies, relacionando o gene *FT* com a indução do florescimento dependente do comprimento do dia (JIN et al., 2015; KOJIMA et al., 2002; LI; DUBCOVSKY, 2008). Plantas de dia curto também tem o florescimento regulado via fotoperíodo pela expressão de homólogos do *FT*, como o arroz que possui um par de ortólogos do *FT* conhecidos como *Heading-date3* (*Hd3a*) e *HICE FLOWERING LOCUS T1* (*RFT1*), que são transcritos e traduzidos em folhas e formam proteínas que são transportadas através do floema até o meristema apical (KOMIYA; YOKOI; SHIMAMOTO, 2009; TAMAKI et al., 2007).

Em cana-de-açúcar já foram identificados alguns homólogos do gene *FT*, entre eles *ScT1* que possui envolvimento com a atividade meristemática controlando o momento do florescimento e a formação de órgãos férteis (COELHO et al., 2014). Além dele, um homólogo de *TERMINAL FLOWER1* (*TFL*) (gene envolvido na inibição do florescimento) o *ScTFL1*, quando superexpresso em *A. thaliana* provocou um atraso do florescimento e um prolongamento do estágio vegetativo. O *TFL1* apresenta cerca de 60% de sua sequência de aminoácidos semelhante à sequência do *FT*, porém, enquanto o *FT* atua na indução do florescimento, o *TFL1* atua inibindo a expressão de *LEAFY* (*LFY*) e *APETALA1* (*API*) mantendo o centro do meristema apical no estágio vegetativo (AHN et al., 2006; HANZAWA; MONEY; BRADLEY, 2005; WICKLAND; HANZAWA, 2015).

O fotoperíodo, juntamente com o relógio circadiano promove mudanças a níveis moleculares e também a níveis fisiológicos e bioquímicos. Entre as alterações provocadas

destaca-se o metabolismo de carboidratos, que inicialmente atua na indução do florescimento e posteriormente, em cana-de-açúcar, causa perda de produtividade (MARQUES et al., 2008). Mutações em genes de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (sacarose e amido) demonstram suas funções sobre diversos aspectos do desenvolvimento das plantas, incluindo o florescimento (PAUL et al., 2008).

Alguns trabalhos demonstram que a sacarose pode ser um componente inicial e essencial do estímulo floral. Níveis de sacarose na seiva do floema e açúcares solúveis no broto apical aumentam de acordo com a indução do florescimento através do fotoperíodo tanto em plantas de dia longo quanto em plantas de dia curto (BODSON; OUTLAW, 1985; HOUSSA; BERNIER; KINET, 1991; MILYAEVA; KOMAROVA, 1996). Entre os mecanismos que envolvem o metabolismo de carboidratos e o desenvolvimento de plantas destaca-se a Trealose-6-Fosfato-Sintase (TPS) responsável pela síntese de trealose-6-fosfato (T6P).

Com relação ao florescimento, *TREALOSE-6-FOSFATO-SINTASE 1 (TPSI)*, um dos genes envolvidos na síntese de trealose-6-fosfato, é comprovadamente essencial para que sua transição ocorra, possivelmente através do fornecimento de T6P (VAN DIJKEN; SCHLUEPMANN; SMEEKENS, 2004). Além disso, foi demonstrado que em *A. thaliana* uma rota envolvendo T6P regula o florescimento em dois sítios da planta. Na folha, *TPSI* é necessário para indução da expressão do *FT* mesmo em um fotoperíodo favorável, garantindo uma maneira da planta integrar sinais ambientais e sinais fisiológicos. No meristema apical da parte aérea a rota via T6P afeta a expressão de genes envolvidos na indução e genes de identidade de órgãos florais (WAHL et al., 2013).

Em cana-de-açúcar já foram identificados genes homólogos a *TPS*, o *STPSI* e *STPSII*. Ambos são expressos em todos os tecidos da planta, *STPSI* está envolvido com o estresse hídrico em plantas tolerantes e *STPSII* tem pouca relação com o estresse hídrico, tanto em plantas tolerantes quanto em plantas suscetíveis (JUNIOR et al., 2013).

Diante do exposto, objetivou-se com esse trabalho identificar os mecanismos que relacionem o fotoperíodo com o metabolismo de carboidratos e o florescimento em cana-de-açúcar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L. da tribo Andropogoneae e à família Poaceae. A tribo Andropogoneae possui outros membros de importância econômica, como algumas espécies dos gêneros *Zea* e *Sorghum* (DANIELS; ROACH, 1987). Estudos genéticos recentes demonstram que as cultivares nobres de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) surgiram da espécie *S. robustum* em Nova Guiné e, a partir daí, foram espalhadas ao longo do globo pelos humanos (GRIVET et al., 2004).

A planta adulta de cana-de-açúcar apresenta a morfologia típica de Poaceae. A parte aérea é composta de unidades fitométricas repetidas, onde cada uma delas contém um nó, uma folha anexa e um internódio (ARTSCHWAGER; BRANDES, 1958; VAN DILLEWIJN, 1952). A folha é composta do limbo foliar e de uma bainha cilíndrica (ARTSCHWAGER, 1940). Os colmos se desenvolvem a partir do meristema apical e os perfilhos (colmos secundários) são originados de gemas axilares subterrâneas presentes no colmo principal (VAN DILLEWIJN, 1952).

Após a transição do estágio vegetativo para o reprodutivo, durante a indução floral, a morfologia do colmo e da folha sofrem mudanças drásticas. Com o desenvolvimento da inflorescência, a distância entre folhas sucessivas aumentam, o colmo alonga e ocorre a produção da folha bandeira, normalmente menor que as demais (VAN DILLEWIJN, 1952). As folhas de cana-de-açúcar são ordenadas de cima para baixo, a folha de inserção mais alta, que se encontra completamente aberta e apresenta a primeira aurícula visível recebe a denominação de folha +1 e, abaixo dela, as folhas recebem, sucessivamente, os números +2, +3 e +4 (VAN DILLEWIJN, 1952). A inflorescência, também chamada de pendão, é do tipo panícula de forma aberta plumosa, com um eixo principal (ráquis), de onde saem eixos secundários e terciários. É neste local (eixos terciários) que está inserida a espiguetas ou flor da cana-de-açúcar (ALMEIDA; VALSECCHI; GOMES, 1945).

O sistema radicular da cana-de-açúcar é fasciculado. Quando reproduzidas de forma assexuada (forma comercial de reprodução), a emissão das raízes tem início poucos dias após o plantio, emitindo primórdios radiculares na base do internódio e, poucos dias depois, ocorre a emissão de raízes planas. Posteriormente, as raízes planas são substituídas por raízes maiores em diâmetro e mais robustas que emergem da base da parte aérea em

desenvolvimento, formando o sistema radicular que pode alcançar até quatro metros de profundidade (SMITH; INMAN-BAMBER; THORBURN, 2005).

Durante o seu desenvolvimento, a cana-de-açúcar apresenta quatro estádios fenológicos. O primeiro estágio é a brotação e a emergência, aonde, em condições ideais de temperatura e umidade, as gemas emergem dando origem a uma nova planta. O segundo estágio é o perfilhamento, logo após a brotação das gemas, aonde ocorre o processo de emissão de colmos de uma mesma planta. No terceiro estágio, a partir do auge do perfilhamento, os colmos crescem e se desenvolvem ganhando altura e acumulando açúcar em sua base. O quarto estágio é a maturação dos colmos, onde o acúmulo de açúcar nos colmos é intenso. Nesta fase, as folhas do terço médio das plantas amarelecem e caem indicando o acúmulo máximo de açúcar nessa região (AUDE, 1993; INMAN-BAMBER, 1991).

O conhecimento sobre o desenvolvimento da cana-de-açúcar é de suma importância para a escolha de cultivares mais adaptados a cada região. Os canaviais brasileiros apresentam grande heterogeneidade devido a variabilidade dos solos, juntamente com as diferenças climáticas durante as estações do ano, afetando assim o manejo e a produtividade da cana-de-açúcar (MONTEIRO; SENTELHAS, 2014). Uma das alternativas utilizadas na agricultura para melhorar o rendimento das culturas é a utilização de cultivares melhoradas geneticamente. No entanto, mesmo diante da importância econômica apresentada pela cana-de-açúcar, a complexidade do seu genoma dificulta o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas para esta cultura (MENOSSI et al., 2008).

2.2 Aspectos genéticos da cana-de-açúcar

Atualmente o germoplasma da cana-de-açúcar é dividido em três grupos: (1) cultivares tradicionais, que não são cultivadas comercialmente mas são importantes fontes para o melhoramento; (2) plantas silvestres, consideradas progenitoras das cultivares tradicionais; e (3) as cultivares modernas ou nobres, produzidas por cruzamentos artificiais entre as cultivares tradicionais e *Saccharum spontaneum*, que são as mais cultivadas na atualidade (GRIVET et al., 2004; MUKHERJEE, 1957). As análises dos progenitores utilizados nos programas de melhoramento revelam o envolvimento de outras espécies na origem dos híbridos cultivados atualmente, entre elas *S. sinense*, *S. barbieri*, *S. robustum*, *S. spontaneum* além da própria *S. officinarum* (D'HONT et al., 1996).

A cana-de-açúcar possui um genoma poliplóide, com um número de cromossomos variando entre 106 e 118, e, conseqüentemente, um número de cópias de cada gene com uma

variação de 8 a 12 (GRIVET; ARRUDA, 2002; PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010). Ela apresenta um elevado grau de complexidade do genoma, sendo a sua reprodução sexual lenta e dificultada por condições ambientais (TIWARI et al., 2010). Todas essas características dificultam o processo de melhoria genética e sequenciamento do genoma, bem como as pesquisas com transformação genética dessa planta (GRIVET; ARRUDA, 2002; KINKEMA et al., 2014).

O melhoramento da cana-de-açúcar teve início com o melhoramento clássico tradicional, mas ganhou força com as atuais técnicas de hibridização e engenharia genética, alcançando um grande aumento de produtividade no último século, devido a seleção de plantas mais produtivas, resistentes ou tolerantes a pragas, doenças e estresses ambientais (MING et al., 2006). O melhoramento convencional, juntamente com técnicas biotecnológicas, como a identificação e utilização de marcadores moleculares (MOORE, 1996), sequenciamento do genoma (GRIVET; ARRUDA, 2002; TELLES et al., 2001), incorporação de genes no genoma de híbridos comerciais (BRAGA et al., 2003) e técnicas de edição do genoma (MOHAN, 2016), são ferramentas promissoras para continuidade dos aumentos de produtividade necessários para garantia da demanda mundial de cana-de-açúcar.

Um dos primeiros passos, e mais importante, do melhoramento de plantas utilizando a transformação genética de plantas é a identificação de genes diferencialmente expressos em condições ambientais específicas, através de técnicas de biologia molecular, incluindo a bioinformática. Esses genes são considerados candidatos promissores para estudos aprofundados (MING et al., 2006). Uma das técnicas empregada no estudo de genes candidatos em cana-de-açúcar é a análise de transcriptomas, que permite determinar quais genes são expressos em determinada condição e a nível de expressão de cada um desses genes expressos (BELESINI, 2015; CORRER, 2016; PALHARES, 2014). A utilização destes candidatos na engenharia genética pode afetar diretamente a produção desta cultura.

2.3 Aspectos econômicos da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é cultivada em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, nos dois lados da linha do equador entre as latitudes 35° N e 35° S (MUKHERJEE, 1957; VAN DILLEWIJN, 1952). Em todo o mundo ela é cultivada em 2.674.304 hectares, apresentando uma produção anual de 1.890.661.751 toneladas e uma produtividade média de 70,6 toneladas por hectare (FAOSTAT; PRODUCTION, 2016).

O Brasil se destaca como maior produtor mundial de cana-de-açúcar (768.678.382 toneladas por ano), com uma produtividade média de 75,2 toneladas por hectare, seguidos por Índia (348.448.00 toneladas por ano) e China (122.663.940 toneladas por ano) (FAOSTAT; PRODUCTION, 2016). São Paulo, Goiás e Minas Gerais são, respectivamente, os três maiores estados brasileiros produtores, sendo responsáveis por mais de 75% de toda produção do país (CONAB, 2018).

Atualmente, a cana-de-açúcar é considerada a principal fonte de energia renovável brasileira. O etanol produzido através dela é comprovadamente um substituto para os combustíveis fósseis no Brasil, devido a sua natureza bioenergética e tecnologia empregada para sua produção (EFE; STRAATHOF; VAN DER WIELEN, 2005). Além do etanol, a cana-de-açúcar é a principal fonte de açúcar utilizado pela população, tanto no mercado interno brasileiro quanto para exportação, levando o Brasil ao topo no *ranking* como maior produtor mundial de açúcar (OLIVEIRA et al., 2018), sendo responsável por aproximadamente 35% de toda a produção mundial (CONAB, 2018).

Destaca-se ainda, a estrutura integrada presente na atividade canavieira brasileira, com o emprego de diversos subprodutos da indústria dentro do próprio sistema produtivo. Entre eles, destacam-se a utilização da palha e da vinhaça no sistema produtivo da cana-de-açúcar, e a produção de etanol de segunda geração, contribuindo com a receita e reduzindo o impacto ambiental oriundo do setor sucroalcooleiro (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992; MEZAROBA; MENEGUETTI; GROFF, 2010).

2.4 Aspectos produtivos da cana-de-açúcar

Entre os desafios da cadeia produtiva da cana-de-açúcar, no que diz respeito a busca pelo aumento de produtividade, destacam-se o florescimento, o déficit hídrico, salinidade, baixa temperatura, toxicidade de alumínio, solos pobres e compactados, dentre outros. O florescimento prejudica o armazenamento de sacarose, e, conseqüentemente, o rendimento da cultura (BERDING; HURNEY, 2005), sendo, portanto, considerado um dos principais desafios para o sistema produtivo da cultura (CRESTE et al., 2010). Ele é considerado prejudicial e indesejável pois promove um deslocamento de energia armazenada no colmo na forma de sacarose para o desenvolvimento da inflorescência e, conseqüentemente, afeta a quantidade e a qualidade da matéria prima (CAPUTO et al., 2007).

O fenômeno de isoporização, altamente relacionado com o florescimento (BERDING; HURNEY, 2005), consiste basicamente da desidratação dos tecidos do colmo (CAPUTO et

al., 2007). Avaliando a variação genotípica de seis cultivares de cana-de-açúcar e relacionando os colmos florescidos induzidos com a intensidade de isoporização, Tasso Júnior et al. (2009) verificaram que as cultivares com maiores porcentagens de florescimento apresentaram as maiores intensidades de isoporização, comprometendo entre 25 e 50% do diâmetro do colmo. Dependendo da intensidade, a isoporização pode causar redução na densidade do colmo, aumento no teor de açúcares redutores, fibras e redução no teor de sacarose, levando a obtenção de um caldo com baixa transparência e com bagacilhos (material residual obtido pelo coamento do caldo oriundo das moendas) em suspensão causando assim, uma redução no valor da matéria prima (MARQUES et al., 2008).

O fotoperíodo é o principal fator ambiental responsável pela indução floral da cana-de-açúcar, onde o fotoperíodo ideal para indução do florescimento varia entre 12 a 12,5 horas, principalmente no período do ano em que o comprimento do dia está encurtando e as plantas estão concluindo o período vegetativo (ARALDI et al., 2010; CLEMENTS; AWADA, 1967). Para a indução floral, o fotoperíodo se relaciona com outros fatores como umidade, nutrição e temperatura (MOORE, 1987; MOORE; NUSS, 1987). No caso da temperatura, valores extremos acima de 32 °C são limitantes ao florescimento (BERDING, 1995).

Estudos relacionados a regulação floral fotoperiódica, principalmente em *A. thaliana*, aumentaram o conhecimento da atuação do fotoperíodo a níveis moleculares em plantas. Em angiospermas, o relógio circadiano desempenha papéis fundamentais na regulação do tempo de floração, nas quais as mudanças de fotoperíodos para controlar com precisão o tempo de floração (SONG; ITO; IMAIZUMI, 2010).

2.5 Ritmos circadianos e o fotoperiodismo

O relógio circadiano regula uma série de aspectos biológicos, incluindo a fisiologia, o crescimento e o desenvolvimento de plantas, produzindo ritmos diários no metabolismo e expressão gênica, interagindo com sinais ambientais, e, assim, controlando as respostas das plantas a esses sinais (MCWATTERS; DEVLIN, 2011). Portanto, ele é o responsável por coordenar respostas às múltiplas e simultâneas mudanças ambientais que as plantas, por serem organismos sésseis, não podem evitar (GREENHAM; MCCLUNG, 2015).

O relógio circadiano é regulado, na maioria dos casos, por mudanças diárias de luz e temperatura. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, os sinais luminosos são percebidos por uma gama de fotorreceptores incluindo fitocromos e criptocromos (FRANKLIN; LARNER; WHITELAM, 2004; MILLAR, 2004). O mecanismo pelo qual a temperatura regula o relógio

circadiano ainda é desconhecido. É fato que ela atua sobre o relógio, mas como esse sinal é percebido e traduzido pelas plantas ainda não foi totalmente compreendido.

Apesar de serem regulados pela luz, os ritmos circadianos não são respostas diretas à luz, pois em ambientes de constante luminosidade ou escuridão eles são mantidos, pelo menos por vários dias (ALABADÍ et al., 2001; SALOME; MCCLUNG, 2004). Existe um mecanismo endógeno que mantém os ritmos circadianos, denominado oscilador endógeno, que exibe uma compensação de temperatura e por isso não é afetado por tal sinal ambiental (GOULD et al., 2006). O núcleo dos ritmos circadianos é um *feedback* autoregulatório, pelo qual proteínas regulam direta ou indiretamente sua própria transcrição. No caso de *A. thaliana*, três dos principais genes do relógio já foram identificados: *TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION 1)*, *LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)* e *CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1)* (ALABADÍ et al., 2001; PERALES; MÁ, 2007).

Em *A. thaliana* estima-se que até 89% dos genes expressos estão, de alguma forma, sob o controle do relógio circadiano, e pelo menos 30% dos genes envolvidos no metabolismo são controlados por ele (MICHAEL et al., 2008; MICHAEL; MCCLUNG, 2003). Nesse sentido o relógio circadiano é responsável por controlar vários aspectos fisiológicos das plantas como crescimento (COVINGTON; HARMER, 2007; DOWSON-DAY; MILLAR, 1999), florescimento (ANDRÉS; COUPLAND, 2012; SONG et al., 2015), processos metabólicos como a liberação de oxigênio e a respiração, abertura e fechamento estomático, respostas a estresse biótico e abiótico (GREENHAM; MCCLUNG, 2015; MCWATTERS; DEVLIN, 2011).

Uma das funções mais perceptíveis do relógio circadiano sobre as plantas é o fotoperiodismo que ativa eventos como o florescimento, senescência, formação de órgãos de reserva e indução de dormência em resposta a mudanças de estação. O relógio proporciona um mecanismo ideal de medição do comprimento do dia para as plantas (KENDRICK; KRONENBERG, 2012; PITTENDRIGH; MINIS, 1964). A palavra fotoperiodismo é derivada de raízes gregas para “luz” e “tempo de duração” e pode ser definida como a resposta a mudanças na duração diária de luz e escuridão que permite aos organismos se aclimatarem a mudanças sazonais do ambiente em que estão (THOMAS; VINCE-PRUE, 1996). Essa capacidade permite aos organismos em geral se anteciparem e prevenirem efeitos adversos de determinada sazonalidade.

Plantas cujo relógio circadiano está com seu período regulado de forma correspondente ao ciclo externo de luz e escuridão apresentam superioridade fotossintética em comparação à aquelas que estão com o relógio alterado, como demonstrado por Dodd et al.

(2005) em um estudo com mutantes de *A. thaliana* com o relógio circadiano longo ou curto e não alterados. Nesse estudo, as plantas que tinham seu relógio interno compatível com o ambiente apresentaram maiores conteúdos de clorofila, maiores taxas de fixação de carbono e de crescimento, e melhor sobrevivência em relação as plantas com relógio circadiano diferente do ambiente.

Através do fotoperíodo o relógio circadiano atua no controle da degradação do amido, sendo que a taxa de degradação desse metabólito é rigorosamente regulada de maneira que a energia armazenada nessa forma não se esgote durante a noite antes do início da fotossíntese no dia seguinte (GRAF et al., 2010). O ajuste na taxa de degradação do amido é coordenado pela antecipação do amanhecer de acordo com o relógio circadiano. Mutantes com ritmo circadiano de curto período apresentam maiores taxas de degradação de amido e privação de sacarose (GRAF et al., 2010; SCIALDONE et al., 2013). Assim como no controle da degradação de amido, o relógio circadiano atua no particionamento de carbono (POKHILKO et al., 2014), juntamente com a sacarose derivada da fotossíntese, que parece atuar como mecanismo de entrada para incorporar ritmos circadianos ao regular a expressão de genes componentes do relógio circadiano (DALCHAU et al., 2011; HAYDON et al., 2013).

2.6 Fotoperíodo e o florescimento

A transição entre o estágio vegetativo e o reprodutivo, onde ocorre a modificação do meristema apical do caule e a formação da inflorescência, é o resultado de uma resposta a vários sinais endógenos e exógenos que posteriormente se integram resultando no florescimento. Em *A. thaliana* e em muitas outras plantas, foram identificados cinco rotas que controlam o florescimento: vernalização, fotoperíodismo, giberelinas, uma via autônoma e, uma via endógena relacionada a idade da planta (SRIKANTH; SCHMID, 2011). No caso da cana-de-açúcar, relatos apontam que além desses mecanismos, existem outros fatores que afetam o florescimento, como altas temperatura, fertilidade do solo e umidade (ARALDI et al., 2010; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Quando o desenvolvimento reprodutivo é iniciado, o meristema apical da parte aérea muda de forma, dando origem diretamente ao meristema floral ou então ao meristema de inflorescência e, a partir desse, o meristema floral é formado. No caso do meristema floral ser formado a partir do meristema de inflorescência, ele se inicia nos flancos periféricos do meristema de inflorescência, sendo dependente da proliferação celular e de sinais de diferenciação que são espacialmente distintos da zona de diferenciação no centro do

meristema de inflorescência (CHANDLER, 2014). Esses eventos que ocorrem no meristema apical da parte aérea levando à produção de flores são chamados de evocação floral. A transição para o estágio reprodutivo e todas as mudanças que ocorrem no meristema apical de parte aérea são controladas por sinais endógenos e ambientais (BERNIER, 1988; MCDANIEL; SINGER; SMITH, 1992).

Em relação ao fotoperíodo, as plantas podem ser classificadas de acordo com seu florescimento em plantas de dia longo, nas quais o florescimento ocorrerá apenas após o comprimento do dia (luz) exceder um determinado valor (duração crítica do dia) em cada ciclo de 24 horas, em plantas de dia curto, onde o florescimento ocorrerá apenas quando o comprimento do dia for menor que a duração crítica do dia, e em plantas insensíveis ao fotoperíodo (GARNER; ALLARD, 1920; PITTENDRIGH; MINIS, 1964; THOMAS; VINCE-PRUE, 1996). Essas plantas podem ser categorizadas em qualitativas e quantitativas em relação ao fotoperíodo, sendo que as plantas qualitativas exigem determinado fotoperíodo para florescer, já as quantitativas tem o florescimento acelerado por determinado fotoperíodo (ERWIN; WARNER, 2000).

Apesar da diferenciação entre dias longos e curtos, as plantas necessitam ainda de adaptações para evitar a ambiguidade da duração do dia, ou seja, para discriminar as estações do ano entre primavera e outono. Para isso, as plantas desenvolveram certos mecanismos específicos, algumas possuem uma fase juvenil que impede a resposta ao comprimento do dia em determinada estação, e outras plantas exigem uma ligação entre temperatura e a resposta fotoperiódica (COLASANTI; CONEVA, 2009). Além disso, existe um grupo de plantas que evitam a ambiguidade sazonal (comprimento do dia semelhante na primavera e no outono) pela distinção entre dias que estão alongando e dias que estão encurtando (ZEEVAART, 1976), o que parece ser o caso para a cana-de-açúcar (ARALDI et al., 2010; CLEMENTS; AWADA, 1967).

Tanto as plantas de dia longo quanto as plantas de dia curto percebem o estímulo fotoperiódico pelas folhas. Em resposta ao fotoperíodo, as folhas emitem um sinal que regula a transição para o florescimento no ápice do caule. Esse mecanismo foi elucidado por Knott (1934) que ao submeterem apenas folhas de espinafre (espécie de dia longo) a dias longos observaram o desenvolvimento de primórdios florais. No entanto, quando apenas o ápice da parte aérea foi exposto a dias longos as plantas permaneceram na fase vegetativa.

Atualmente, são propostos dois modelos para explicar como o fotoperíodo regula o florescimento, ambos baseados em coincidência. O modelo de coincidência interna, propõe que a resposta fotoperiódica é oriunda da interação de dois ritmos endógenos que em

condições fotoperiódicas indutivas são faseados e promovem o florescimento. Em condições não-indutivas os dois ritmos estão descompassados e o florescimento é inibido. O papel da luz nesse modelo é controlar a relação de fases dos dois ritmos (PITTENDRIGH; MINIS, 1964; THOMAS; VINCE-PRUE, 1996). Já o modelo de coincidência externa, propõe que um sinal externo, o fotoperíodo, interage com um ritmo interno, sensível a luz, em determinada hora do dia. Dessa maneira, sob fotoperíodos indutivos a luz e ritmo sensível a luz interagem e as plantas florescem, já sob fotoperíodos não-indutivos, tal interação não ocorre, e o florescimento é inibido (PITTENDRIGH, 1972).

Em *A. thaliana*, uma planta de dia longo, a discriminação entre dias longos e curtos é feita através da interação entre sinalização luminosa, ritmos circadianos e a expressão do gene *CONSTANS (CO)* (SAMACH et al., 2000). O gene *CO* codifica uma proteína dedo de zinco que regula a expressão de outros genes. Mutantes *co* de *A. thaliana* tem o florescimento atrasado quando submetidos a dias longos e plantas selvagens acumulam a proteína *CO* em resposta a dias longos acelerando o florescimento (PUTTERILL et al., 1995). Em dias curtos não-indutivos o mRNA de *CO* tem um pico de expressão entre oito e dez horas após o início do dia. No entanto, sua proteína é degradada no escuro não sendo acumulada o suficiente para promover o estímulo floral (FORNARA et al., 2009).

A proteína *CO* é considerada um regulador transcricional capaz de se ligar a sequências de DNA. Em *A. thaliana*, ela promove o florescimento em dias longos estimulando a expressão de um outro fator de transcrição, o gene *FT*. A proteína *FT* é considerada um sinal móvel no floema que estimula a evocação floral no meristema apical da parte aérea (KARDAILSKY et al., 1999; KOBAYASHI et al., 1999), porém, alguns homólogos do *FT* são responsáveis pela regulação negativa de genes que induzem o florescimento. A beterraba possui dois homólogos do *FT*, onde o *FT1* reprime o florescimento e *FT2* promove o florescimento (PIN et al., 2010).

A relação entre *CO* e *FT* é altamente conservada em Eudicotiledôneas (JANSSON; DOUGLAS, 2007; KOORNNEEF; MEINKE, 2010; SRIKANTH; SCHMID, 2011) e em monocotiledôneas (COLASANTI; CONEVA, 2009; DISTELFELD; LI; DUBCOVSKY, 2009). Em arroz, uma planta de dia curto, os genes *Heading date-1 (Hd-1)* e *Hd3a* codificam proteínas homologas a *CO* e *FT*, respectivamente, de *A. thaliana* (HAYAMA; COUPLAND, 2004; IZAWA et al., 2000).

2.7 Genes integradores do florescimento

A transição para o estágio reprodutivo e todas as mudanças que ocorrem no meristema apical da parte aérea são controladas por sinais endógenos e ambientais (BERNIER, 1988; MCDANIEL; SINGER; SMITH, 1992). Tais sinais induzem a expressão de genes integradores do florescimento. Em *A. thaliana*, alguns genes são responsáveis pela integração dos sinais ambientais e endógenos, destacando-se: *FT*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)* e *LFY*. Esses genes integram sinais de múltiplas vias do florescimento e seus níveis de expressão determinam o momento do florescimento (PARCY, 2004; SIMPSON; DEAN, 2002). Esses integradores atuam induzindo direta ou indiretamente a expressão do gene *API*, que é expresso nas células que darão origem a flor, conferindo a identidade floral no primórdio em questão (ANDRÉS; COUPLAND, 2012; SRIKANTH; SCHMID, 2011; WIGGE et al., 2005). Trabalhos vêm demonstrando que *API* e outros genes pertencentes a família de fatores de transcrição com domínio MADS, codificam proteínas que incorporam o modelo ABC (SOLTIS et al., 2007).

O modelo ABC, em *A. thaliana*, e em outras angiospermas, explica como cada tipo de órgão floral (pétalas, sépalas, carpelos e estames) é formado, através da combinação de genes de identidade de órgãos florais (BOWMAN; SMYTH; MEYEROWITZ, 1991; COEN; MEYEROWITZ, 1991; SCHWARZ-SOMMER et al., 1990). Novos modelos de combinações dos genes de identidade de órgãos florais vêm sendo propostos, tendo em base as diferenças consideráveis na arquitetura floral encontradas entre as espécies de angiospermas (WELLMER; GRACIET; RIECHMANN, 2013). Entretanto, combinações similares de genes homólogos que codificam proteínas com domínio MADS e determinam a identidade dos órgãos florais já foram relatadas em diversas espécies, incluindo monocotiledôneas (BOWMAN; SMYTH; MEYEROWITZ, 2012; IRISH; LITT, 2005; ITO, 2011; WELLMER; GRACIET; RIECHMANN, 2013).

Os genes integradores do florescimento são expressos de acordo com sinais ambientais e endógenos específicos, levando a uma regulação rigorosa do momento em que a planta irá florescer. Essa estrita regulação garante o sucesso reprodutivo permitindo a conclusão do desenvolvimento das sementes em condições ambientais favoráveis. Os sinais endógenos são hormônios (giberelina), uma via autônoma e a própria idade da planta. Já entre os sinais ambientais estão o comprimento do dia, a temperatura e a vernalização. Esses sinais não atuam sozinhos, pelo contrário, há uma relação estrita entre os sinais que levam a expressão de um número relativamente pequeno de genes, os integradores florais (SIMPSON; DEAN, 2002; SRIKANTH; SCHMID, 2011).

Análises da variação genética natural, em complemento às mutações induzidas em espécies modelo permitiram o isolamento de genes que controlam as respostas das plantas ao fotoperíodo, identificando inclusive mecanismos conservados entre espécies distantes, como *A. thaliana*, e espécies de cereais, como o arroz (*Oryza sativa*) (ROMERA-BRANCHAT; ANDRÉS; COUPLAND, 2014). *A. thaliana* apresenta um florescimento precoce em condições de dias longos, ou seja, quando comprimento do dia é maior que o comprimento da noite (ANDRÉS; COUPLAND, 2012; SONG; ITO; IMAIZUMI, 2013). Nessa condição, ocorre o aumento da transcrição de dois genes nas células companheiras do floema: *FT* e *TWIN SISTER OF FT (TSF)*. O gene *FT* é expresso em maiores níveis que *TSF*, sendo assim, a indução da sua transcrição em resposta a dias longos é o passo limitante para indução do florescimento em *A. thaliana*. Dados semelhantes têm sido obtidos para os homólogos do *FT* em muitas outras espécies, relacionando o gene *FT* com a indução do florescimento dependente do comprimento do dia (JIN et al., 2015; KOJIMA et al., 2002; LI; DUBCOVSKY, 2008).

O principal responsável pela indução da expressão do *FT* é o gene *CONTANS (CO)*, um fator de transcrição regulado pelo relógio circadiano e rigidamente controlado nos níveis transcricional e pós-transcricional pela interação de múltiplos fatores de transcrição e fotorreceptores (ANDRÉS; COUPLAND, 2012; VALVERDE, 2011). Em *A. thaliana*, o *FT* é expresso nas células companheiras do floema de folhas, sua proteína adentra os elementos crivados e é transportada por fluxo de massa até o meristema apical do caule, onde induz o florescimento (PIN; NILSSON, 2012).

O gene *FT* é membro da família de proteínas de ligação fosfatidiletanolamina (PEBP). Além dele, outro gene dessa família está envolvido no florescimento, o gene *TFLI*. O *TFLI* apresenta cerca de 60% de sua sequência de aminoácidos semelhante a sequência do *FT*, porém, enquanto o *FT* atua na indução do florescimento, o *TFLI* atua inibindo a expressão de *LFY* e *API* mantendo o centro do meristema apical no estágio vegetativo (AHN et al., 2006; HANZAWA; MONEY; BRADLEY, 2005; WICKLAND; HANZAWA, 2015). Enquanto o *FT* é expresso em folhas e transportado até o meristema apical do caule, o *TFLI* é expresso no meristema apical do caule e movimenta-se apenas célula a célula (ABE et al., 2005; CONTI; BRADLEY, 2007; CORBESIER et al., 2007). Assim como ocorre com o gene *FT*, o papel do *TFLI* também é conservado entre várias espécies (WICKLAND; HANZAWA, 2015), inclusive na cana-de-açúcar (COELHO et al., 2014).

Algumas espécies utilizam da mesma família de proteínas PEPB para regular o florescimento em dias curtos. Por exemplo o arroz, que tem o florescimento induzido por dias

curtos e possui um par de ortólogos do *FT* conhecidos como *Hd3a* e *RFT1*, que são transcritos e traduzidos em folhas e formam proteínas que são transportadas através do floema até o meristema apical (KOMIYA; YOKOI; SHIMAMOTO, 2009; TAMAKI et al., 2007). O *Hd3a* é o responsável por promover o florescimento em dias curtos, enquanto o *RFT1* é ativado em condições de dias longos e, apesar de não impedir o florescimento, causa atraso do mesmo (KOJIMA et al., 2002; KOMIYA; YOKOI; SHIMAMOTO, 2009). Plantas de dia neutro (insensíveis a duração do dia) também tem o florescimento regulado por genes da família de proteínas PEPB. O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) possui o *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)*, que está envolvido na integração do sinal floral no meristema apical do caule (LIFSCHITZ et al., 2006; MOLINERO-ROSALES et al., 2004).

No meristema apical do caule, os genes *FT* e *TFL1* (e possivelmente outros genes da família PEPB) interagem com o fator de transcrição *FD* para, de forma antagônica, regular a indução do florescimento (ABE et al., 2005; HANANO; GOTO, 2011; WIGGE et al., 2005). Esse fator de transcrição pertence à família *bZIP* (*basic leucine zipper*) e atua na regulação de vários processos fisiológicos de desenvolvimento das plantas (CORRÊA et al., 2008). *FT* e *FD* formam um complexo juntamente com uma proteína 14-3-3 (TAOKA et al., 2011) desencadeando o florescimento através da ativação de genes chaves de identidade floral do meristema. Em *A. thaliana*, mutantes sem o gene *FD* suprimem parcialmente o florescimento precoce causado pela superexpressão do *FT*, comprovando a importância desse fator de transcrição na sinalização do *FT* (ABE et al., 2005; WIGGE et al., 2005).

A demonstração de que mutantes de *A. thaliana* para o gene *FD* suprimem parcialmente o florescimento (ABE et al., 2005), indica a necessidade de fatores além do *FD* para a sinalização do *FT*. Jaeger et al. (2013) identificaram um gene intimamente relacionado, o *FD PARALOG (FDP)*, que é expresso nos flancos do meristema apical do caule. Segundo os autores, mutantes de *A. thaliana* para esse gene apresentam um fenótipo com florescimento ligeiramente tardio, e duplos mutantes *fd2-fdp1* suprimem em grande parte a superexpressão de *FT*, demonstrando que a maioria da sinalização do *FT* é mediada por *FD/FDP*.

Ao contrário do *FT*, em *A. thaliana* o gene *FD* é intensamente expresso no meristema apical do caule. Seu RNA foi encontrado em pouca quantidade em folhas e em primórdios florais. Esses níveis de RNA diminuem logo após o primórdio floral começar a expressar o *API* (WIGGE et al., 2005). A função do *FD* na sinalização do florescimento via *FT* é relatada em outras espécies como no arroz (TAOKA et al., 2011, 2013) e em *Actinidia* spp. (VARKONYI-GASIC et al., 2013). No milho (*Zea mays* L.), seu provável ortólogo (*DLF1*) é

requerido no meristema apical do caule para promoção do florescimento por uma via independente através do gene *INDETERMINATE1 (ID1)* (MUSZYNSKI et al., 2006).

O fotoperíodo, juntamente com o relógio circadiano, promovem mudanças a níveis moleculares e também a níveis fisiológicos e bioquímicos. Entre as alterações provocadas destaca-se o metabolismo de carboidratos que inicialmente atua na indução do florescimento e posteriormente, em cana-de-açúcar, causa perda de produtividade (MARQUES et al., 2008).

2.8 Metabolismo de carboidratos e o florescimento

Além das suas ações metabólicas e estruturais, os carboidratos podem influenciar o crescimento e desenvolvimento de plantas atuando como elicitores ou reguladores de crescimento (CREELMAN; MULLET, 1997). Alguns trabalhos demonstram que a sacarose pode ser um componente inicial e essencial do estímulo floral. Níveis de sacarose na seiva do floema e açúcares solúveis no broto apical, aumentam de acordo com a indução do florescimento através do fotoperíodo tanto em plantas de dia longo quanto em plantas de dia curto (BODSON; OUTLAW, 1985; HOUSSA; BERNIER; KINET, 1991; MILYAEVA; KOMAROVA, 1996). Além disso, mutações em genes de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (sacarose e amido) demonstram sua função sobre diversos aspectos do desenvolvimento das plantas, incluindo o florescimento (PAUL et al., 2008).

Entre os mecanismos que envolvem o metabolismo de carboidratos e o desenvolvimento de plantas, destaca-se a TPS, responsável pela síntese de T6P através de glicose-6-fostato e UDP-glicose. A T6P consiste de duas unidades de glicose ligadas em uma conformação α , α -1,1, formando um dissacarídeo não redutor estável (CABIB; LELOIR, 1958). Encontra-se apenas traços de T6P na maioria das plantas, com possível função de sinalização que transmite informações sobre a disponibilidade de carboidratos para outras vias de sinalização (LUNN et al., 2006).

A alteração na rota metabólica da T6P provoca vários efeitos sobre as plantas, possivelmente devido a alteração no conteúdo de T6P. Os efeitos dessas alterações podem ser observados no desenvolvimento do embrião, da folha, na divisão celular, na síntese de parede celular, na arquitetura da inflorescência, biomassa de plântulas e de plantas, fotossíntese, tolerância a estresses abióticos, especialmente a seca (EASTMOND et al., 2002; GARG et al., 2002; KOLBE et al., 2005; PELLNY et al., 2004; SATOH-NAGASAWA et al., 2006; SCHLUEPMANN et al., 2003).

Em *A. thaliana* existe um total de 11 genes que codificam para TPS, os quais se dividem em duas classes, onde *TPS1-4* pertencem a classe I, e os *TPS5-11*, pertencem a classe II (BLAZQUEZ et al., 1998). A classe II apresenta um domínio sintase e um domínio fosfatase característicos, mas a atividade desses sítios são pouco conservadas em comparação a classe I (HARTHILL et al., 2006; VOGEL et al., 2001). Enquanto a classe I de TPS possui expressão constitutiva e está envolvida na síntese de T6P (BLAZQUEZ et al., 1998), a classe II possivelmente possui função reguladora, tendo sua expressão regulada transcricionalmente pelo *status* de carbono da planta e por estresses, podendo ser fosforilada e/ou interagir com proteínas 14-3-3 (HARMER et al., 2000; HARTHILL et al., 2006; PAUL et al., 2008).

Com relação ao florescimento, *TPS1* é comprovadamente essencial para que o mesmo ocorra, possivelmente através do fornecimento de T6P (VAN DIJKEN; SCHLUEPMANN; SMEEKENS, 2004). Além disso, recentemente foi demonstrado que em *A. thaliana* uma rota envolvendo T6P regula o florescimento em dois sítios da planta. Na folha, *TPS1* é necessário para indução da expressão do *FT* mesmo em um fotoperíodo favorável, garantindo uma maneira da planta integrar sinais ambientais e sinais fisiológicos. No meristema apical da parte aérea, a rota via T6P afeta a expressão de genes envolvidos na indução e genes de identidade de órgãos florais (WAHL et al., 2013).

Em cana-de-açúcar, a atuação de alguns desses genes já começou a ser elucidada. Foram identificados genes pertencentes às duas classes de TPS expressos em todos os tecidos da planta. *STPS1* (classe I) tem sua expressão reduzida em uma variedade de cana-de-açúcar tolerante ao estresse hídrico submetida ao déficit hídrico, e aumentada em plantas susceptíveis ao estresse hídrico submetida ao déficit hídrico. Nessas mesmas condições, o *STPS2* (classe II) tem pouca alteração na sua expressão (JUNIOR et al., 2013). Juntamente com esses genes já identificados, outros genes relacionados ao processo de florescimento estão sendo apresentados pela literatura (COELHO et al., 2013; COELHO et al., 2014). No entanto, ainda é necessário elucidar outras possíveis proteínas envolvidas nessa rota.

2.9 Fisiologia molecular do florescimento em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem o fotoperíodo como um dos principais fatores que determinam a indução do florescimento da cultura, dias com comprimentos inferiores a um fotoperíodo crítico são necessários para que ela floresça, sendo, portanto, uma planta de dia curto (ARALDI et al., 2010; RIZK; KHALIL; NOSAER, 2007). Segundo Berding et al. (2004) o pendoamento da cana-de-açúcar é iniciado com a diminuição do comprimento do dia.

Coelho et al. (2013) propuseram um modelo para o mecanismo de floração da cana-de-açúcar via fotoperíodo. Através de análises no banco de dados do SUCEST (FIGUEIREDO et al., 2001) foram identificados oito possíveis ortólogos do *FT* e *TFL1*: *FtC1*, *FtC2*, *FtC3*, *FtS1*, *FtS2*, *FtS3*, *FtS4* e *FtS5*. Análises de expressão quantitativa e semiquantitativas, demonstraram que esses genes compartilham do mesmo padrão de expressão de seus ortólogos. A caracterização do *FtS3*, renomeado como *ScTFL1*, demonstrou que esse gene pertence a subfamília do *TFL1-like*, sua superexpressão em *A. thaliana* levou a um atraso do florescimento e um aumento do estágio vegetativo. A caracterização do *FtS1* (renomeado como *ScFTI*) estabeleceu seu possível envolvimento na atividade meristemática, controlando o momento do florescimento e a formação de órgãos férteis (COELHO et al., 2014).

Além desses possíveis ortólogos do *FT* e *TFL1* já caracterizados (*ScTFL1* e *ScFTI*), restam outros a serem estudados. *FtS3* e *FtS4* (renomeados para *ScFT3* e *ScFT4*, respectivamente) são os que apresentam maior semelhança com genes do tipo promotores do florescimento (*FT-like*), indicando que um, ou mais, deles possam atuar como promotores do florescimento (COELHO et al., 2014).

2.10 Considerações gerais

A caracterização de possíveis ortólogos do gene *FT* em cana-de-açúcar faz-se necessário para elucidação da indução floral da cana-de-açúcar através do fotoperíodo. Identificar mecanismos que controlam o florescimento da cana-de-açúcar via fotoperíodo e suas relações com o metabolismo primário, permitirá o entendimento de como a indução floral ocorre nessas plantas, gerando possibilidades para alterações desses mecanismos, possivelmente contribuindo diretamente para aumentos de produtividade da cultura. Nesse sentido, alguns trabalhos visando a identificação de genes ortólogos ao *FT* em cana-de-açúcar já foram realizados, no entanto, apenas alguns possíveis genes envolvidos na repressão do florescimento foram identificados. A identificação de um possível ortólogo ao *FT*, envolvido na indução do florescimento em cana-de-açúcar, permitirá a caracterização da relação entre fotoperíodo e o florescimento dessa espécie.

REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator *FT* at the shoot apex. **Science**: New York, v. 309, n. 5737, p. 1052–1056, 2005.
- AHN, J. H. et al. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. **The EMBO journal**: London, v. 25, n. 3, p. 605–614, 2006.
- ALABADÍ, D. et al. Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. **Science**: New York, v. 293, n. 5531, p. 880–883, 2001.
- ALMEIDA, J. R. DE; VALSECCHI, O.; GOMES, F. P. O florescimento da cana de açúcar. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**: Piracicaba, v. 2, p. 49–118, 1945.
- ANDRÉS, F.; COUPLAND, G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 13, n. 9, p. 627, 2012.
- ARALDI, R. et al. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 694–702, 2010.
- ARTSCHWAGER, E. Morphology of the vegetative organs of sugarcane. **Journal of Agricultural Research**: Abraka, v. 60, p. 503–549, 1940.
- ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E. W. **Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)**. 1ed. ed. Washington: USDA, 1958.
- AUDE, M. I. DA S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 241–248, 1993.
- BELESINI, A. A. **Análise do transcriptoma de folhas de cana-de-açúcar submetidas à prolongada limitação hídrica usando RNA-Seq**. 2015. 140 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2015.
- BERDING, N. **Improving flowering through breeding: progress and prospects**. International Society of Sugar Cane Technologists. **Anais...**1995
- BERDING, N. et al. Tropical, managed initiation of sugarcane flowering: optimisation of non-photoperiodic variables. **Proceedings - Australian Society of Sugar Cane Technologists**: Bundaberg, v. 26, p. 1–13, 2004.
- BERDING, N.; HURNEY, A. P. Flowering and lodging, physiological-based traits affecting cane and sugar yield: What do we know of their control mechanisms and how do we manage them? **Field Crops Research**: Amsterdã, v. 92, n. 2–3, p. 261–275, 2005.
- BERNIER, G. The control of floral evocation and morphogenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**: Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 175–219, 1988.
- BLAZQUEZ, M. A. et al. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* *TPS1*

gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 13, n. 5, p. 685–689, 1998.

BODSON, M.; OUTLAW, W. H. Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 79, n. 2, p. 420–424, 1985.

BOWMAN, J. L.; SMYTH, D. R.; MEYEROWITZ, E. M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. **Development**: Cambridge v. 112, n. 1, p. 1–20, 1991.

BOWMAN, J. L.; SMYTH, D. R.; MEYEROWITZ, E. M. The ABC model of flower development: then and now. **Development**: Cambridge, v. 139, n. 22, p. 4095–4098, 2012.

BRAGA, D. P. V et al. Expression of the *CryIAb* protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**: [S.l.: s.n.], v. 5, n. 2–3, p. 209–221, 2003.

CABIB, E.; LELOIR, L. F. The biosynthesis of trehalose phosphate. **Journal of Biological Chemistry**: Rockville, v. 231, n. 1, p. 259–275, 1958.

CAPUTO, M. M. et al. Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana-de-açúcar sob reguladores vegetais. **Interciência**: Santiago, v. 32, n. 12, p. 834–840, 2007.

CHANDLER, J. W. Patterns and polarity in floral meristem and floral organ initiation. **Critical reviews in plant sciences**, v. 33, n. 6, p. 457–469, 2014.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

CLEMENTS, H. F.; AWADA, M. **Experiments on the artificial induction of flowering in sugarcane**. Amsterdam: Proceedings - International Society of Sugar Cane Technologists, 1967.

COELHO, C. P. et al. A proposed model for the flowering signaling pathway of sugarcane under photoperiodic control. **Genet. Mol. Res**: Ribeirão Preto, v. 12, p. 1347–1359, 2013.

COELHO, C. P. et al. Putative sugarcane *FT/TFL1* genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 5, p. 221, 2014.

COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**: London, v. 353, n. 6339, p. 31, 1991.

COLASANTI, J.; CONEVA, V. Mechanisms of floral induction in grasses: something borrowed, something new. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 149, n. 1, p. 56–62, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira Cana-de-açúcar**. Brasília - CONAB, 2018.

CONTI, L.; BRADLEY, D. *TERMINAL FLOWER1* is a mobile signal controlling

- Arabidopsis* architecture. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 19, n. 3, p. 767–778, 2007.
- CORBESIER, L. et al. *FT* protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. **Science**: New York, v. 316, n. 5827, p. 1030–1033, 2007.
- CORRÊA, L. G. G. et al. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **PloS ONE**: Cambridge, v. 3, n. 8, p. e2944, 2008.
- CORRER, F. H. **Perfis de expressão gênica temporal de cana-de-açúcar infectada por ferrugem alaranjada**. 2016. 25 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Lavras, 2016.
- CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**: [S.l.: s.n.], v. 2, n. 2, p. 111, 1992.
- COVINGTON, M. F.; HARMER, S. L. The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. **PLoS Biology**: Cambridge, v. 5, n. 8, p. e222, 2007.
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 9, n. 7, p. 1211–1223, 1997.
- CRESTE, S. et al. Sugarcane: breeding method and genetic mapping. **Sugarcane bioethanol - R&D for Productivity and Sustainability**: São Paulo, p. 353–357, 2010.
- D'HONT, A. et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics MGG**: [S.l.: s.n.], v. 250, n. 4, p. 405–413, 1996.
- DALCHAU, N. et al. The circadian oscillator gene GIGANTEA mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 108, n. 12, p. 5104–5109, 2011.
- DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: **Developments in Crop Science**. [S.l.: s.n.], v. 11, p. 7–84, 1987.
- DISTELFELD, A.; LI, C.; DUBCOVSKY, J. Regulation of flowering in temperate cereals. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 12, n. 2, p. 178–184, 2009.
- DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science**: New York, v. 309, n. 5734, p. 630–633, 2005.
- DOWSON-DAY, M. J.; MILLAR, A. J. Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 17, n. 1, p. 63–71, 1999.
- EASTMOND, P. J. et al. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 29, n. 2, p. 225–235, 2002.

EFE, C.; STRAATHOF, A. J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M. **Technical and economical feasibility of production of ethanol from sugar cane and sugar cane bagasse**. Delft: Delft University of Technology, 2005. 374 p.

ERWIN, J. E.; WARNER, R. M. Determination of photoperiodic response group and effect of supplemental irradiance on flowering of several bedding plant species. **Acta Horticulturae**: Leuven, v. 580, p. 95–99, 2000.

FAOSTAT, F. A. O.; PRODUCTION, A. C. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. **Roma, Italy**, 2016.

FIGUEIREDO, R. C. et al. Dissecting the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database: Unraveling flower-specific genes. **Genetics and Molecular Biology**: Ribeirão Preto, v. 24, n. 1–4, p. 77–84, 2001.

FORNARA, F. et al. *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. **Developmental Cell**: Cambridge, v. 17, n. 1, p. 75–86, 2009.

FRANKLIN, K. A.; LARNER, V. S.; WHITELAM, G. C. The signal transducing photoreceptors of plants. **International Journal of Developmental Biology**: Bilbao v. 49, n. 5–6, p. 653–664, 2004.

GARG, A. K. et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 99, n. 25, p. 15898–15903, 2002.

GARNER, W. W.; ALLARD, H. A. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. **Monthly Weather Review**: Boston, v. 48, n. 7, p. 415, 1920.

GOULD, P. D. et al. The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 18, n. 5, p. 1177–1187, 2006.

GRAF, A. et al. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 107, n. 20, p. 9458–9463, 2010.

GREENHAM, K.; MCCLUNG, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 16, n. 10, p. 598, 2015.

GRIVET, L. et al. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**: Tbilisi, v. 2, p. 9–17, 2004.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 5, n. 2, p. 122–127, 2002.

HANANO, S.; GOTO, K. *Arabidopsis* *TERMINAL FLOWER1* is involved in the regulation of

flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 23, p. 3172–3184, 2011.

HANZAWA, Y.; MONEY, T.; BRADLEY, D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 102, n. 21, p. 7748–7753, 2005.

HARMER, S. L. et al. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. **Science**: New York, v. 290, n. 5499, p. 2110–2113, 2000.

HARTHILL, J. E. et al. Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 47, n. 2, p. 211–223, 2006.

HAYAMA, R.; COUPLAND, G. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 135, n. 2, p. 677–684, 2004.

HAYDON, M. J. et al. Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. **Nature**: London, v. 502, n. 7473, p. 689, 2013.

HOUSSA, P.; BERNIER, G.; KINET, J. M. Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in leaf exudate of the short-day plant, *Xanthium strumarium* L. during floral transition. **Journal of Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 138, n. 1, p. 24–28, 1991.

INMAN-BAMBER, N. G. A growth model for sugar-cane based on a simple carbon balance and the CERES-Maize water balance. **South African Journal of Plant and Soil**: [S.l.: s.n.], v. 8, n. 2, p. 93–99, 1991.

IRISH, V. F.; LITT, A. Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployment. **Current Opinion in Genetics & Development**: Amsterdã, v. 15, n. 4, p. 454–460, 2005.

ITO, T. Coordination of flower development by homeotic master regulators. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 14, n. 1, p. 53–59, 2011.

IZAWA, T. et al. Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). **The Plant Journal**: Hoboken, v. 22, n. 5, p. 391–399, 2000.

JAEGER, K. E. et al. Interlocking feedback loops govern the dynamic behavior of the floral transition in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 25, p. 820–833, 2013.

JANSSON, S.; DOUGLAS, C. J. *Populus*: a model system for plant biology. **Annual Review of Plant Biology**: Palo Alto, v. 58, p. 435–458, 2007.

JIN, S. et al. Flowering locus T has higher protein mobility than twin sister of *FT*. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 66, n. 20, p. 6109–6117, 2015.

JUNIOR, N. N. et al. Expression analysis of two genes coding for trehalose-6-phosphate synthase (TPS), in sugarcane (*Saccharum* spp.) under water stress. **American Journal of**

Plant Sciences: [S.l.: s.n.], v. 4, n. 12, p. 91, 2013.

KARDAILSKY, I. et al. Activation tagging of the floral inducer *FT*. **Science:** New York, v. 286, n. 5446, p. 1962–1965, 1999.

KENDRICK, R. E.; KRONENBERG, G. H. M. **Photomorphogenesis in plants**. 2ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2012.

KINKEMA, M. et al. Improved molecular tools for sugar cane biotechnology. **Plant molecular biology:** [S.l.: s.n.], v. 84, n. 4–5, p. 497–508, 2014.

KNOTT, J. E. Effect of a localized photoperiod on spinach. **Proc Amer Soc Hortic Sci:** [S.l.: s.n.], v. 31, p. 152–154, 1934.

KOBAYASHI, Y. et al. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science:** New York, v. 286, n. 5446, p. 1960–1962, 1999.

KOJIMA, S. et al. *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hdl* under short-day conditions. **Plant and Cell Physiology:** London, v. 43, n. 10, p. 1096–1105, 2002.

KOLBE, A. et al. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences:** [S.l.: s.n.], v. 102, n. 31, p. 11118–11123, 2005.

KOMIYA, R.; YOKOI, S.; SHIMAMOTO, K. A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice. **Development:** Cambridge, v. 136, n. 20, p. 3443–3450, 2009.

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal:** Hoboken, v. 61, n. 6, p. 909–921, 2010.

LI, C.; DUBCOVSKY, J. Wheat *FT* protein regulates *VRN1* transcription through interactions with *FDL2*. **The Plant Journal:** Hoboken, v. 55, n. 4, p. 543–554, 2008.

LIFSCHITZ, E. et al. The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences:** [S.l.: s.n.], v. 103, n. 16, p. 6398–6403, 2006.

LUNN, J. E. et al. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical Journal:** London, v. 397, n. 1, p. 139–148, 2006.

MARQUES, M. O. et al. Considerações sobre a qualidade da matéria-prima. In.: **Tecnologias Na Agroindústria Canavieira. Jaboticabal: FCAV**, p. 9–16, 2008.

MCDANIEL, C. N.; SINGER, S. R.; SMITH, S. M. E. Developmental states associated with the floral transition. **Developmental Biology:** Amsterdã, v. 153, n. 1, p. 59–69, 1992.

MCWATTERS, H. G.; DEVLIN, P. F. Timing in plants – a rhythmic arrangement. **FEBS**

letters: Heidelberg, v. 585, n. 10, p. 1474–1484, 2011.

MENOSSE, M. et al. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International journal of plant genomics:** Cairo, v. 2008, p. 1–11, 2008.

MEZAROBA, S.; MENEGUETTI, C. C.; GROFF, A. M. **Processos de produção do açúcar de cana e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema.** Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial. **Anais...**2010

MICHAEL, T. P. et al. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day–specific cis-regulatory modules. **PLoS Genetics:** Cambridge, v. 4, n. 2, p. e14, 2008.

MICHAEL, T. P.; MCCLUNG, C. R. Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis*. **Plant Physiology:** [S.l.: s.n.], v. 132, n. 2, p. 629–639, 2003.

MILLAR, A. J. Input signals to the plant circadian clock. **Journal of Experimental Botany:** Palo Alto, v. 55, n. 395, p. 277–283, 2004.

MILYAEVA, E. L.; KOMAROVA, E. N. Changes in the sugar content in stem apices of the short-day plant *Perilla nankinensis* at floral transition. **Russian Journal of Plant Physiology:** Moscow, v. 43, n. 2, p. 149–154, 1996.

MING, R. et al. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews:** [S.l.: s.n.], v. 27, p. 15–119, 2006.

MOHAN, C. Genome editing in sugarcane: challenges ahead. **Frontiers in Plant Science:** Lausanne, v. 7, p. 1–5, 2016.

MOLINERO-ROSALES, N. et al. SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. **Planta:** Berlin, v. 218, n. 3, p. 427–434, 2004.

MONTEIRO, L. A.; SENTELHAS, P. C. Potential and actual sugarcane yields in southern Brazil as a function of climate conditions and crop management. **Sugar Tech:** [S.l.: s.n.], v. 16, n. 3, p. 264–276, 2014.

MOORE, P. H. **Physiology and control of flowering.** Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop. **Anais...**Copersucar Brazil, 1987

MOORE, P. H. **Progress in sugarcane molecular biology.** Proc Int Soc Sugar Cane Technol. **Anais...**1996

MOORE, P. H.; NUSS, K. J. Flowering and flower synchronization. **Developments in Crop Science:** [S.l.: s.n.], v. 11, p. 273–311, 1987.

MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette:** Chicago, v. 119, n. 1, p. 55–61, 1957.

MUSZYNSKI, M. G. et al. Delayed flowering1 encodes a basic leucine zipper protein that mediates floral inductive signals at the shoot apex in maize. **Plant Physiology:** [S.l.: s.n.], v.

142, n. 4, p. 1523–1536, 2006.

OLIVEIRA, A. F. DE M. et al. Competitividade internacional das exposições de açúcar no período de 1991-2014. **FACEF Pesquisa-Desenvolvimento e Gestão**: Franca, v. 20, n. 1, p. 75–88, 2018.

PALHARES, A. C. **Análise, via RNAseq, do transcrito da cana-de-açúcar e identificação de genes expressos em resposta a *Sporisorium scitamineum*, o agente causal do carvão**. 2014. 147 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

PARCY, F. Flowering: a time for integration. **International Journal of Developmental Biology**: Bilbao, v. 49, n. 5–6, p. 585–593, 2004.

PAUL, M. J. et al. Trehalose metabolism and signaling. **Annu. Rev. Plant Biol.**: Palo Alto, v. 59, p. 417–441, 2008.

PELLNY, T. K. et al. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. **Plant Biotechnology Journal**: Hoboken, v. 2, n. 1, p. 71–82, 2004.

PERALES, M.; MÁZ, P. A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the *Arabidopsis* biological clock. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 19, n. 7, p. 2111–2123, 2007.

PIN, P. A. et al. An antagonistic pair of *FT* homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. **Science**: New York, v. 330, n. 6009, p. 1397–1400, 2010.

PIN, P. A.; NILSSON, O. The multifaceted roles of *FLOWERING LOCUS T* in plant development. **Plant, cell & environment**: Malden, v. 35, n. 10, p. 1742–1755, 2012.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**: Amsterdã, v. 284, n. 1, p. 65–73, 2010.

PITTENDRIGH, C. S. Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 69, n. 9, p. 2734–2737, 1972.

PITTENDRIGH, C. S.; MINIS, D. H. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. **The American Naturalist**: Massachusetts, v. 98, n. 902, p. 261–294, 1964.

POKHILKO, A. et al. Adjustment of carbon fluxes to light conditions regulates the daily turnover of starch in plants: a computational model. **Molecular BioSystems**: Londres, v. 10, n. 3, p. 613–627, 2014.

PUTTERILL, J. et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. **Cell**: Amsterdã, v. 80, n. 6, p. 847–857, 1995.

RIZK, T. Y.; KHALIL, H. A.; NOSAER, H. A. **Effect of two-photoperiod regimes on flower induction of five non flowering sugar cane varieties.** 8th African Crop Science Society Conference. **Anais...African Crop Science Society**, 2007

ROMERA-BRANCHAT, M.; ANDRÉS, F.; COUPLAND, G. Flowering responses to seasonal cues: what's new? **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 21, p. 120–127, 2014.

SALOME, P. A.; MCCLUNG, C. R. The *Arabidopsis thaliana* clock. **Journal of Biological Rhythms**: Thousand Oaks, v. 19, n. 5, p. 425–435, 2004.

SAMACH, A. et al. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. **Science**: New York, v. 288, n. 5471, p. 1613–1616, 2000.

SATOH-NAGASAWA, N. et al. A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. **Nature**: London, v. 441, n. 7090, p. 227, 2006.

SCHLUEPMANN, H. et al. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Science**: [S.l.: s.n.], v. 100, n. 11, p. 6849–6854, 2003.

SCHWARZ-SOMMER, Z. et al. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. **Science**: New York, v. 250, n. 4983, p. 931–936, 1990.

SCIALDONE, A. et al. *Arabidopsis* plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. **Elife**: Berkeley, v. 2, p. e00669, 2013.

SIMPSON, G. G.; DEAN, C. *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? **Science**: New York, v. 296, n. 5566, p. 285–289, 2002.

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**: Amsterdã, v. 92, n. 2–3, p. 169–183, 2005.

SOLTIS, D. E. et al. The ABC model and its applicability to basal angiosperms. **Annals of Botany**: Oxford, v. 100, n. 2, p. 155–163, 2007.

SONG, Y. H. et al. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. **Annual review of plant biology**: Palo Alto, v. 66, p. 441–464, 2015.

SONG, Y. H.; ITO, S.; IMAIZUMI, T. Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 13, n. 5, p. 594–603, 2010.

SONG, Y. H.; ITO, S.; IMAIZUMI, T. Flowering time regulation: photoperiod-and temperature-sensing in leaves. **Trends in plant science**: Kidlington, v. 18, n. 10, p. 575–583, 2013.

SRIKANTH, A.; SCHMID, M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. **Cellular and molecular life sciences**: [S.l.: s.n.], v. 68, n. 12, p. 2013–2037, 2011.

TAMAKI, S. et al. *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. **Science**: New York, v.

316, n. 5827, p. 1033–1036, 2007.

TAOKA, K. et al. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice *Hd3a* florigen. **Nature**: London, v. 476, n. 7360, p. 332, 2011.

TAOKA, K. et al. Structure and function of florigen and the receptor complex. **Trends in plant science**: Kidlington, v. 18, n. 5, p. 287–294, 2013.

TASSO JÚNIOR, L. C. et al. Variação genotípica no florescimento, isoporização e características tecnológicas em seis cultivares de cana-de-açúcar. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**: São Cristóvão, v. 9, n. 1, 2009.

TELLES, G. P. et al. Bioinformatics of the sugarcane EST project. **Genetics and Molecular Biology**: Ribeirão Preto, v. 24, n. 1–4, p. 9–15, 2001.

THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. **Photoperiodism in plants**. 2 ed. ed. Cambridge: Academic Press, 1996.

TIWARI, A. et al. Biotechnological approaches to improve sugarcane crop with special reference to disease resistance. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**: [S.l.: s.n.], v. 45, n. 2, p. 235–249, 2010.

VALVERDE, F. CONSTANS and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. **Journal of experimental botany**: Palo Alto, v. 62, n. 8, p. 2453–2463, 2011.

VAN DIJKEN, A. J. H.; SCHLUEPMANN, H.; SMEEKENS, S. C. M. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 135, n. 2, p. 969–977, 2004.

VAN DILLEWIJN, C. **Botany of Sugarcane**. New York: Stechert-Hafner, 1952.

VARKONYI-GASIC, E. et al. Homologs of *FT*, *CEN* and *FD* respond to developmental and environmental signals affecting growth and flowering in the perennial vine kiwifruit. **New Phytologist**: London, v. 198, n. 3, p. 732–746, 2013.

VOGEL, G. et al. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. **Journal of Experimental Botany**: Palo Alto, v. 52, n. 362, p. 1817–1826, 2001.

WAHL, V. et al. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Science**: New York, v. 339, n. 6120, p. 704–707, 2013.

WELLMER, F.; GRACIET, E.; RIECHMANN, J. L. Specification of floral organs in *Arabidopsis*. **Journal of experimental botany**: Palo Alto, v. 65, n. 1, p. 1–9, 2013.

WICKLAND, D. P.; HANZAWA, Y. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* gene family: functional evolution and molecular mechanisms. **Molecular Plant**: [S.l.: s.n.], v. 8, n. 7, p. 983–997, 2015.

WIGGE, P. A. et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in

Arabidopsis. **Science**: New York, v. 309, n. 5737, p. 1056–1059, 2005.

ZEEVAART, J. A. D. Physiology of flower formation. **Annual Review of Plant Physiology**: Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 321–348, 1976.

**CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO GENE *ScFT6*: CANDIDATO A INDUTOR
DO FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

RESUMO

Um dos fatores que restringe a produtividade da cana-de-açúcar é o florescimento, que afeta a quantidade e qualidade da matéria prima produzida, devido ao deslocamento de sacarose presente no colmo para emissão da inflorescência. O fotoperíodo é o principal fator ambiental envolvido na indução floral da cana-de-açúcar. A indução floral ocorre via estímulos ambientais e endógenos, e esses sinais são integrados em algumas rotas. Um dos genes envolvidos nessa integração é o *FLOWERING LOCUS T (FT)*, considerado um sinal móvel no floema que estimula a evocação floral no meristema apical da parte aérea. Assim, objetivou-se identificar e caracterizar homólogos do gene *FT* em cana-de-açúcar, bem como determinar a possível função desses genes identificados na indução do florescimento nessa espécie. Foram realizadas análises *in silico* de possíveis ortólogos do *FT* em cana-de-açúcar, caracterização da expressão qualitativa em diferentes tecidos da planta e quantitativa do possível indutor do florescimento *ScFT6* ao longo do dia e em cultivares de cana-de-açúcar (RB 85-5453 e CTC 9003) contrastantes para o florescimento. Foram identificados três novos genes, possíveis ortólogos do *FT*, com altos valores de identidade em relação à homólogos do *FT* em outras espécies. Dentre os três genes identificados, destaca-se o *ScFT6*, que possui uma sequência com domínio conservado e aminoácidos em posições características de genes da família PEBP indutores do florescimento e sua expressão ocorre de acordo com o modelo de coincidência, sendo controlada pelo relógio circadiano. As cultivares com comportamento distinto para o florescimento apresentam expressão variável do gene *ScFT6*, indicando uma possível relação genotípica para expressão do gene em questão. Portanto, cana-de-açúcar possui pelo menos um possível gene ortólogo ao *FT* com função de indução do florescimento.

Palavras-chave: Indução do florescimento. Fotoperíodo. Comprimento do dia. *FLOWERING LOCUS T*. *Saccharum* spp.

ABSTRACT

One of the factors that restricts the sugarcane productivity is flowering, which affects the quantity and quality of the raw material produced, due to the consumption of sucrose present in the stem for the emission of the inflorescence. Photoperiod is the main environmental factor involved in the floral induction of sugarcane. Flowering induction occurs through environmental and endogenous stimuli, and those signals are integrated within some routes. One of the genes involved in that integration is the *FLOWERING LOCUS T (FT)*, which is considered a mobile signal in the phloem that stimulates floral evocation in the shoot apical meristem. The aim of this work was to identify and characterize homologues of the *FT* gene in sugarcane, as well as to determine the putative function of these identified genes in the induction of flowering in this species. For this, we have done in silico analysis of possible orthologues of *FT* in sugarcane, characterization of qualitative expression in different plant tissues and characterization of quantitative expression of the putative flowering promoter *ScFT6* both throughout the day and in sugarcane cultivars (RB 85-5453 and CTC 9003) contrasting in relation to flowering. Three new genes, possible *FT* orthologs, with high identity values were identified in relation to *FT* homologues in other species. Among the three genes identified, we highlight *ScFT6*, which has a sequence with has a conserved domain in its sequence and amino acids at characteristic positions of blossoming inducing PEBP family genes and its expression occurs according to the coincidence model, being controlled by the circadian clock. Cultivars with distinct behavior to flowering have variable expression of the *ScFT6* gene, indicating a possible genotypic relationship for expression of the gene in question. Therefore, sugarcane has at least one putative gene orthologous to *FT* that promotes floral induction.

Keywords: Flowering induction. Photoperiod. Day length. *FLOWERING LOCUS T*. *Saccharum* spp

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é considerada a principal fonte de energia renovável brasileira. O etanol produzido através dela é comprovadamente um substituto para os combustíveis fósseis no Brasil, devido a sua natureza bioenergética e tecnologia empregada para sua produção (EFE; STRAATHOF; VAN DER WIELEN, 2005; GOLDEMBERG, 2007). Um dos fatores que restringe a produtividade dessa *comoditie* é o florescimento, que afeta a quantidade e qualidade da matéria prima produzida, devido ao consumo de sacarose presente no colmo para formação da inflorescência (CAPUTO et al., 2007; TASSO JÚNIOR et al., 2009).

Indiretamente, o florescimento é responsável pela isoporização do colmo, ou seja, pela desidratação dos seus tecidos, causando diminuição de sua densidade, aumento no teor de açúcares redutores, fibras e redução no teor de sacarose (MARQUES et al., 2008). Esse processo leva à obtenção de um caldo com baixa transparência e com bagacilios em suspensão, que conseqüentemente reduz o valor da matéria prima (MARQUES et al., 2008). Genótipos de cana-de-açúcar podem apresentar comportamento independente em relação ao florescimento, porém, há uma relação direta entre genótipos com maiores porcentagens de florescimento e com maiores intensidades de isoporização (TASSO JÚNIOR et al., 2009).

O fotoperíodo, ou seja, o tempo de exposição à luz e à escuridão que uma planta é submetida, é o principal fator ambiental envolvido na indução floral da cana-de-açúcar. Para essa espécie, o comprimento ideal do dia para que ocorra o florescimento é uma variação de 12 a 12,5 horas de luz no período do ano em que o dia está encurtando e que coincida com o momento que as plantas já concluíram o período vegetativo ou fase juvenil (ARALDI et al., 2010).

Em geral, as plantas percebem o estímulo fotoperiódico pelas folhas, as quais emitem sinais que regulam a transição para o florescimento no ápice do caule. Em *A. thaliana*, uma planta de dia longo, a discriminação entre dias longos e curtos é feita através da interação entre sinalização luminosa, ritmos circadianos e a expressão do gene *CONSTANS* (*CO*) (SAMACH et al., 2000). A proteína *CO* é um regulador transcricional capaz de se ligar a seqüências de DNA promovendo o florescimento de *A. thaliana* submetidas a condições de dias longos estimulando a expressão de um outro fator de transcrição, o gene *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), considerado um sinal móvel no floema que estimula a evocação floral no meristema apical da parte aérea (KARDAILSKY et al., 1999; KOBAYASHI et al., 1999).

O gene *FT* é membro da família de proteínas de ligação fosfatidiletanolamina (PEBP), e, além dele, um outro gene dessa família está envolvido no florescimento, o gene *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)*. O *TFL1* apresenta cerca de 60% de sua sequência de aminoácidos semelhante a sequência do *FT*. Enquanto o *FT* atua na indução do florescimento, o *TFL1* atua inibindo a ação de *LEAFY (LFY)* e *APETALA1 (API)*, genes que participam da indução do florescimento, mantendo o centro do meristema apical no estágio vegetativo (AHN et al., 2006; HANZAWA; MONEY; BRADLEY, 2005; WICKLAND; HANZAWA, 2015). Assim como ocorre com o gene *FT*, a função do *TFL1* também é conservado entre várias espécies (WICKLAND; HANZAWA, 2015).

Assim como plantas de dia longo, as plantas de dia curto também utilizam genes da família de proteínas PEPB (*Phosphatidyl Ethanolamine-Binding Protein*) para regular o florescimento. O arroz (*Oryza sativa* L.) possui um par de ortólogos do *FT* conhecidos como *Heading-date3 (Hd3a)* e *HICE FLOWERING LOCUS T1 (RFT1)* que são transcritos e traduzidos em folhas, formando proteínas que são translocadas através do floema até o meristema apical (KOMIYA; YOKOI; SHIMAMOTO, 2009; TAMAKI et al., 2007). O *Hd3a* é o responsável por promover o florescimento em dias curtos, enquanto que o *RFT1* é expresso em condições de dias longos e, apesar de não impedir o florescimento, causa o atraso do mesmo (KOJIMA et al., 2002; KOMIYA; YOKOI; SHIMAMOTO, 2009; TAOKA et al., 2011).

Em cana-de-açúcar já foram identificados dois possíveis homólogos dos genes *FT* e *TFL*, pertencentes a família de proteínas PEPB. O *ScTFL1*, pertencente a subfamília *TFL1-like*, causa atraso do florescimento e aumento do período vegetativo ao ser superexpresso em *A. thaliana*. O *ScFT1* possui um possível envolvimento na atividade meristemática controlando o momento do florescimento e a formação de órgãos férteis (COELHO et al., 2014). A identificação e caracterização desses genes, com o auxílio da análise de expressão heteróloga, forneceram subsídios importantes para o conhecimento regulatório do florescimento. Apesar disso, os avanços nas pesquisas que visam a elucidar os mecanismos de controle do florescimento dessa cultura ainda precisam ser explorados considerando à sua grande importância econômica e complexidade genômica.

Buscando a elucidar o mecanismo de indução floral da cana-de-açúcar, via fotoperíodo, foram realizados experimentos com o objetivo de identificar e caracterizar homólogos do gene *FT* em cana-de-açúcar, bem como determinar a possível função desses genes identificados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento 1: Análises *in silico* dos possíveis ortólogos de *FT* em cana-de-açúcar

Possíveis ortólogos dos genes *FT* de cana-de-açúcar foram identificados através de técnicas computacionais em uma biblioteca pública (MATTIELLO et al., 2015) de dados provenientes de RNA-*seq* contendo aproximadamente 48 milhões de fragmentos de RNA. A remoção de adaptadores e controle de qualidade foram realizados por meio do software *Trimmomatic* versão 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), restando aproximadamente 43 milhões de fragmentos de RNA (91%) na biblioteca. A montagem dos transcritos foi realizada utilizando o montador *Trinity* versão 2.3.2 (GRABHERR et al., 2011). Ao final do processo, foram produzidos 80647 possíveis transcritos com valor N50 de 1392 e tamanho médio 1065 pares de bases.

A identificação de transcritos com potencial codante e suas respectivas cadeias polipeptídicas foi realizada com o programa *TransDecoder* versão 3.0.1 (HAAS; PAPANICOLAOU, 2016). Após a predição das proteínas, foram feitos alinhamentos de sequências de *FT* já caracterizados a partir de *A. thaliana* e *S. viridis* contra as sequências proteicas preditas utilizando a ferramenta Blastp versão 2.4.0 (ALTSCHUL et al., 1997). Uma nova etapa de predição foi realizada a partir dos transcritos referentes aos resultados do blastp utilizando a ferramenta *ORFinder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o *GeneScan* (BURGE; KARLIN, 1997).

Foi feito um alinhamento múltiplo entre as possíveis proteínas do gene *FT* de cana-de-açúcar preditas, possíveis proteínas do gene *FT* identificadas por Coelho et al. (2013) e homólogos de outras espécies relacionadas (APÊNDICE A) utilizando o *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Após o alinhamento foi realizada a construção de uma árvore filogenética no programa *MEGA 5.2.2* (TAMURA et al., 2007) seguindo o modelo de comparação *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987) e utilizando a matriz de distância entre sequências Jones-Taylor-Thornton (JTT) e o teste estatístico com 2000 randomizações.

As sequências de proteínas obtidas foram submetidas a análise de domínios conservados pela ferramenta *CDD (Conserved Domains Database)* (MARCHLER-BAUER et al., 2014) afim de identificar e caracterizar todos os domínios presentes nas proteínas e comparar com os domínios presentes no *FT* de outras espécies já caracterizados.

2.2 Experimento 2: Caracterização da expressão qualitativa do *ScFT6* em tecidos de cana-de-açúcar

A partir das sequências obtidas nas análises *in silico*, os *primers* para amplificação do gene *ScFT6* foram desenhados através da ferramenta *OligoPerfect* (<http://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716>). A qualidade dos *primers* desenhados foram analisadas por meio do software Oligo Analyzer3.1 (OWCZARZY et al., 2008) no site da empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Foram desenhados dois pares de *primers* (TABELA 1), um deles para amplificação através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e outro para amplificação pela técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR).

Tabela 1 – Sequência dos *primers* desenhados a partir da identificação *in silico* do possível gene *ScFT6* de cana-de-açúcar.

Identificação	Sequência 5'→3'	Amplicon estimado (pb)	Eficiência
ScFT6 qPCR Fw	GTGTGGAGGCAGACGATA	112	1,02
ScFT6 qPCR Rv	GCTTTGCGAAGTGGCTGG	112	1,02
ScFT6 Fw1	CGGCTTCTTTGTTCTCTA	247	-
ScFT6 Rv1	CTTGGTTCATTTGCTACT	247	-

Fonte: Do autor (2019).

Para obtenção dos diferentes tecidos a serem analisados, cultivou-se mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB 85-5156) durante seis meses em vasos de 40L contendo solo previamente analisado. A necessidade de adubação durante a condução do experimento foi determinada de acordo com Oliveira et al. (1991), sendo realizadas em intervalos de 30 dias. Foram mantidas duas plantas em cada vaso, o restante dos perfilhos produzidos ao longo do período de condução do experimento foram eliminados com auxílio de tesoura de poda uma vez por semana. As plantas foram mantidas a pleno sol sob irrigação à capacidade de campo, com intervalo de rega de dois dias. Ao final dos seis meses, foram coletados tecidos da folha 3+ (VAN DILLEWIJN, 1952), de folhas imaturas, do colmo (do entrenó envolto pela folha 3+) e do meristema apical de parte aérea de cana-de-açúcar.

Imediatamente após a coleta, os tecidos foram resfriados com nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. Posteriormente a coleta e armazenamento, o material foi macerado em nitrogênio líquido e novamente armazenado em freezer -80°C. A extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo do Qiazol® adaptado para tecidos de cana-de-açúcar (APÊNDICE B).

Após a extração de RNA as amostras foram tratadas com o kit *DNA-free* (Ambion) para eliminar DNA residual. A integridade das amostras foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UVITEC. Posteriormente as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanovue®) a A260, A230 e A280nm, determinando-se a quantidade e a qualidade do material extraído. As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram utilizadas para a síntese de cDNA, com o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas em freezer a -20° C até o uso.

A expressão do gene *ScFT6* foi caracterizada nos diferentes tecidos através da amplificação via PCR semi-quantitativa utilizando o cDNA oriundo de cada um dos tecidos coletados, com visualização do resultado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UVITEC.

2.3 Experimento 3: Expressão quantitativa do gene *ScFT6* ao longo do tempo em folhas de cana-de-açúcar

2.3.1 Condições de cultivo

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras, na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal, S21°14'43" - W44°59'59" com aproximadamente 900 m de altitude e na sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, durante o período 28 de agosto de 2017 a 16 de dezembro de 2017. Foram utilizadas mudas provenientes do Sistema AgMusa™, doadas pela empresa BASF. A cultivar utilizada foi a RB 85-5156 que possui florescimento frequente na região sudeste do Brasil (DAROS et al., 2010).

Inicialmente, no dia 28 de agosto de 2017 as mudas foram transplantadas para vasos de 25L contendo solo previamente analisado. A necessidade de adubação e o manejo durante o cultivo foram os mesmos descritos no subitem 2.2. As plantas foram condicionadas a pleno sol até dia 14 de novembro de 2017 quando foram transferidas para sala de crescimento com luminosidade controlada ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em condições de dia curto (11 horas de luz e 13 horas de escuro). Durante todo o experimento as plantas foram mantidas sob irrigação à capacidade de campo, com intervalo de rega de dois dias.

2.3.2 Análises da expressão gênica em tempo real do gene *ScFT6*

Aos 30 dias após a submissão das plantas à luminosidade e fotoperíodo controlados foram realizadas coletas das folhas 3+ (VAN DILLEWIJN, 1952) para posterior análise da expressão gênica. As coletas foram realizadas às 06 horas, 12 horas, 18 horas e 00 horas durante 48 horas. As folhas coletadas foram maceradas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. A extração do RNA foi feita seguindo o protocolo Qiazol® adaptado para tecidos de cana-de-açúcar, de acordo com os procedimentos citados no subitem 2.2., assim como a síntese de cDNA.

A partir das sequências obtidas (das análises *in silico*) no item 2.1 foram desenhados *primers* para amplificar o gene previamente identificado como *ScFT6*. Foi realizado um ensaio de quantificação para determinação da curva padrão, eficiência dos *primers* e melhor diluição das amostras. A PCR em tempo real (qPCR) foi conduzida utilizando o equipamento *Rotor-Gene Q Real-Time PCR* (Qiagen) pelo sistema de detecção por *SYBR Green* com cDNA obtido a partir de RNA previamente extraído. O volume de cDNA a ser utilizado para cada reação foi determinado após quantificação da eficiência dos *primers*, utilizando-se 10 µL de volume de reação por amostra com MasterMix SYBR Green (Qiagen). Foi realizado o experimento de expressão relativa determinado pelo método do $\Delta\Delta CT$ (Ciclo Threshold) comparativo obtidos a partir dos genes de referência *GAPDH* e *eEF-1 α* (LING et al., 2014). Os dados de expressão do gene *ScFT6* foram analisados por meio do programa *Rotor-Gene Series Pure Detection Software* (Versão 2.0.2) e a expressão relativa foi calculada de acordo com Pfaffl (2001).

2.3.3 Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos (horários de coleta) e três repetições.

2.4 Experimento 4: Análise de crescimento e expressão quantitativa do gene *ScFT6* em cultivares de cana-de-açúcar contrastantes para o florescimento

2.4.1 Condições de cultivo

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras, na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal, S21°14'43" - W44°59'59" com aproximadamente 900 m de altitude durante o período de 09 de novembro de 2016 a 20 de junho de 2017. Foram utilizadas mudas provenientes do Sistema AgMusa™ doadas pela empresa BASF. As cultivares utilizadas foram a RB 85-5453 que possui florescimento frequente, e a CTC 9003 que possui florescimento raro para região sudeste do Brasil (DAROS et al., 2010).

Inicialmente, no dia 09 de novembro de 2016 as mudas foram transplantadas para vasos de 40L contendo solo previamente analisado. A necessidade de adubação e o manejo durante o cultivo foram os mesmos descritos no subitem 2.2. As plantas foram mantidas a pleno sol sob irrigação à capacidade de campo, com intervalo de rega de dois dias.

2.4.2 Análises de crescimento

Aos 140, 160, 180, 200 e 220 dias após o transplântio das mudas foram realizadas medições de estatura média do colmo (EMC), diâmetro médio do colmo (DMC), comprimento da folha 3+, largura do início, meio e fim da folha 3+ (VAN DILLEWIJN, 1952), número de folhas verdes completamente abertas, número de folhas emergentes e número de folhas mortas de acordo com metodologia descrita por Marafon (2012). A partir desses valores foi estimada a área foliar das plantas de cana-de-açúcar (HERMANN; CÂMARA, 1999).

2.4.3 Análises da expressão em tempo real do gene *ScFT6*

Aos 140, 180 e 220 dias após o transplântio das mudas foram realizadas coletas das folhas 3+ (VAN DILLEWIJN, 1952) para posterior análise da expressão gênica. A extração e determinação da qualidade e quantidade de RNA foi realizada de acordo com os procedimentos citados no subitem 2.2., assim como a síntese de cDNA. As folhas coletadas foram maceradas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80. Após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas no freezer a -20° C até o uso.

O desenho de *primers*, determinação da eficiência dos *primers*, a PCR em tempo real (qPCR) e o experimento de expressão relativa foram feitos de acordo com os procedimentos citados no subitem 2.2.

2.4.4 Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, em esquema de parcelas subdividas no tempo (2 x 5) com duas cultivares e cinco tempos de avaliação. Os dados obtidos nas medidas biométricas foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$) e, em caso de significância da análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) ou submetidas a análise de regressão ($p \leq 0,05$) quando ocorreu interação entre cultivares e tempos de avaliação. Os dados de expressão foram analisados por meio do programa *Rotor-Gene Series Pure Detection Software* (Versão 2.0.2), a expressão relativa foi calculada de acordo com Pfaffl (2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 O gene *ScFT6* é um possível indutor do florescimento em cana-de-açúcar

O alinhamento das sequências já caracterizadas do gene *FT* de *A. thaliana* e *Setaria viridis* com o banco de dados de RNA-*seq* resultou em 51 possíveis sequências homologas aos genes *FTs* de *A. thaliana* e *S. viridis*. À partir dos resultados de alinhamento entre as proteínas dos genes *AtFT*, *SiFT* e as 51 possíveis sequências de proteínas homologas foram selecionadas as sequências de cana-de-açúcar com identidade acima de 50% e *query cover* acima de 70%. Dessa maneira, foram identificadas 3 sequências compatíveis com essas características, sendo nomeadas de *ScFT6*, *ScFT7* e *ScFT8* com 174, 173 e 197 aminoácidos, respectivamente. Essas três sequências foram alinhadas com sequências homologas do gene *FT* em diferentes espécies (TABELA 2).

Tabela 2 – Resumo dos três possíveis homólogos do gene *FT* de cana-de-açúcar comparados com genes *FT* de *A. thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* e *S. italica*.

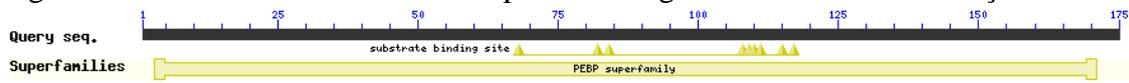
Nome	Espécie	Referência	Identidade (%)		
			<i>ScFT6</i>	<i>ScFT7</i>	<i>ScFT8</i>
<i>AtFT</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(KARDAILSKY et al., 1999; KOBAYASHI et al., 1999)	72	56	56
<i>ZCN8</i>	<i>Zea mays L</i>	(MUSZYNSKI et al., 2006)	54	49	52
<i>ZCN12</i>	<i>Zea mays L</i>	(DANILEVSKAYA et al., 2008)	54	53	57
<i>Hd3a</i>	<i>Oryza sativa</i>	(KOJIMA et al., 2002)	68	59	62
<i>SbFT1</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	(WOLABU et al., 2016)	68	57	62
<i>SbFT8</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	(WOLABU et al., 2016)	55	51	55
<i>SiFT</i>	<i>Setaria italica</i>	(BENNETZEN et al., 2012)	87	52	53

Fonte: Do autor (2019).

Os três possíveis homólogos do gene *FT* identificados em cana-de-açúcar apresentaram altos valores de identidade com os de outras espécies, destacando o *ScFT6* que apresentou, em geral, os maiores valores. *ScFT6*, *ScFT7* e *ScFT8* possuem o domínio conservado PEBP (FIGURA 1), presente em sequências de genes que atuam de forma generalista como reguladores de complexos de sinalização (PNUELI et al., 1998) ou de forma mais específica, no caso de genes que atuam como reguladores da transição da fase vegetativa

para fase reprodutiva, estando envolvidos ainda na determinação da arquitetura das plantas (BRADLEY et al., 1996; KARDAILSKY et al., 1999; KARLGREN et al., 2011).

Figura 1 – Domínio conservado PEBP presente no gene *ScFT6* de cana-de-açúcar.



Fonte: Do autor (2019).

Genes com domínio PEBP envolvidos na transição da fase vegetativa para reprodutiva em plantas podem ser classificados como repressores ou indutores do florescimento, dependendo de aminoácidos específicos presentes em suas sequências (CORRÊA et al., 2008). No caso dos possíveis *FTs* identificados em cana-de-açúcar, o *ScFT6* possui um resíduo de tirosina (Y) na posição 85 (FIGURA 2) que caracteriza os genes *FT* indutores do florescimento, e os outros dois (*ScFT7* e *ScFT8*) possuem um domínio histidina (H) que é característico de genes *TFL-like*, considerados repressores do florescimento (HANZAWA; MONEY; BRADLEY, 2005; KOBAYASHI et al., 1999).

Em diversas espécies de plantas, a histidina (H) é o aminoácido chave dos membros da família PEBP com função semelhante ao *TFL1* e a tirosina (Y) nos membros com funções semelhantes ao *FT* (HANZAWA; MONEY; BRADLEY, 2005). Apesar da importância dos resíduos presentes na posição 85, para que o gene exerça sua função plena, é necessário que a proteína esteja completa. Perdas de função em outras regiões da proteína têm demonstrado alterações nas funções tanto de *TFL* quanto do *FT* (BRADLEY et al., 1997; KOBAYASHI et al., 1999).

Existem espécies de plantas que possuem genes homólogos ao *FT* que são repressores ou indutores do florescimento. Nas sequências proteicas dos *FTs* dessas espécies, além da posição 85 no exon 2, as posições 134 e 139 do exon 4 são importantes na determinação da característica indutora ou repressora do florescimento (HO; WEIGEL, 2014; PIN et al., 2010).

Nas espécies que possuem homólogos do *FT* repressores do florescimento, em sua maioria, os *FTs* indutores possuem uma tirosina (Y) na posição 134 (baseado no alinhamento com a proteína *FT* de *A. thaliana*) e outro resíduo que não seja tirosina (Y), é encontrado nos *FTs* repressores. No caso da cana-de-açúcar o *ScFT1* é comprovadamente um repressor do florescimento (COELHO et al., 2014), e possui um resíduo fenilalanina (F) na posição 134. Além do *ScFT1*, *ScFT2*, *ScFT7* e *ScFT8* possuem resíduos diferentes de tirosina (Y) na posição 134 (FIGURA 2). Já *ScFT3*, *ScFT4*, *ScFT5* e *ScFT6* possuem um resíduo tirosina (Y) na posição 134 (FIGURA 2), característico de homólogos do *FT* indutores do florescimento.

Com relação à posição 139 nas sequências de aminoácidos dos homólogos de *FT*, as espécies que possuem *FTs* repressores, em sua maioria, apresentam nas sequências dos *FTs* indutores um resíduo conservado de triptofano (W), e os *FTs* repressores apresentam um aminoácido que não seja o triptofano (HO; WEIGEL, 2014; PIN et al., 2010). A presença do triptofano (W) nos homólogos do *FT* de cana-de-açúcar foi observado apenas nos genes *ScFT3*, *ScFT4*, *ScFT5* *ScFT6* (FIGURA 2).

Figura 2 – Alinhamento múltiplo de seqüências proteicas de cana-de-açúcar e, demais espécies relacionadas em uma porção do domínio PEBP demonstrando as variações de aminoácidos na posição 85 do Exon 2 e nas posições 134 e 139 no “loop” externo do Exon 4.

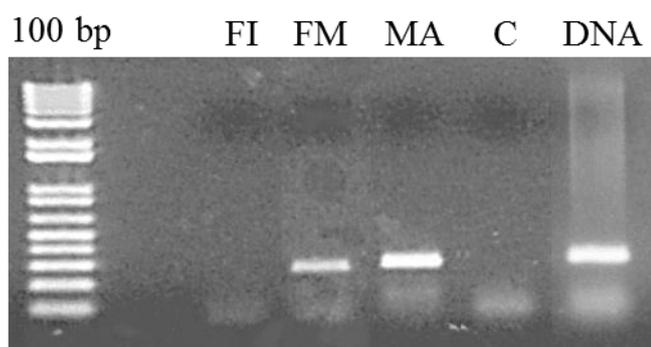
	85		134			139
ScFT1	H	...	F	-	A P	Q V
ScFT2	Y	...	D	Q	P P	L L
ScFT3	Y	...	Y	-	A P	G W
ScFT4	Y	...	Y	-	A P	G W
ScFT5	N	...	Y	-	A P	G W
ScFT6	Y	...	Y	-	A P	G W
ScFT8	H	...	T	V	P S	S -
ScFT7	H	...	N	P	P S	S -
SvFT	Y	...	Y	-	A P	G W
SbFT1	Y	...	Y	-	A P	G W
ZCN_15	Y	...	Y	-	A P	G W
VRN3	Y	...	Y	-	A P	G W
HvFT1	Y	...	Y	-	A P	G W
Hd3a	Y	...	Y	-	A P	G W
HvFT2	Y	...	Y	-	A P	G W
ZCN14	Y	...	Y	-	A P	G W
AtFT	Y	...	Y	-	A P	G W
AtTSF	Y	...	Y	-	A P	G W
SbFT6	Y	...	Y	-	A P	G W
SbFT11	Y	...	Y	-	A P	G W
SbFT5	N	...	Y	-	A P	G W
SbFT3	Y	...	Y	-	A P	G W
ZCN16	Y	...	Y	-	A P	G W
SbFT7	Y	...	Y	-	A P	S W
SbFT12	Y	...	F	A	A P	S R
SbFT9	Y	...	F	-	A P	Q V
SbFT8	Y	...	F	-	A P	D M
ZCN12	Y	...	F	-	A P	D M
ZCN8	Y	...	F	-	A P	E M
SbMFT1	Y	...	V	H	A E	A P
ZCN10	Y	...	V	H	A E	G P
TaMFT	Y	...	V	P	A A	S P
HvMFT	Y	...	V	D	A A	S P
AtMFT	W	...	M	V	Q Q	P P
ZCN11	L	...	P	P	S L	A P
AtTFL1	H	...	F	P	N I	P S
SbTFL1-2	H	...	T	V	P S	S -
SbTFL1-3	H	...	A	M	P S	S -
HvTFL1	H	...	T	V	P S	F -
SbTFL1-1	H	...	N	P	P S	S -
ZCN2	H	...	N	P	P S	S -
SbTFL1-4	H	...	R	P	P S	S -
ZCN4	H	...	R	P	P S	S G

Fonte: Do autor (2019).

Esses resultados indicam que possivelmente o gene *ScFT6* atua na cana-de-açúcar como indutor do florescimento podendo ser classificado como *FT-like* devido à presença do resíduo tirosina (Y) nas posições 85 e 134 e do triptofano (W) na posição 138 (FIGURA 2) e ainda pela sua classificação na árvore filogenética (FIGURA 3). Já os genes *ScFT7* e *ScFT8* são possíveis repressores do florescimento, podendo ser classificados como o *TFL-like* devido a presença do resíduo histidina (H) na posição 85 e pelas suas classificações na árvore filogenética (FIGURA 3).

Em cana-de-açúcar, o gene *ScFT6* é expresso especificamente em folhas maduras (FM) e no meristema apical do caule (MA) (FIGURA 4), assim como seu homólogo em *A. thaliana*, onde é capaz de induzir o florescimento ao ser expresso nas células do floema das folhas ou no meristema apical (AN et al., 2004; CORBESIER; COUPLAND, 2005). O mesmo padrão é observado em arroz, onde *Hd3a* (homólogo ao *FT*) tem sua expressão elevada em fotoperiodismo indutivo em tecidos da folha e no meristema apical (HAYAMA; COUPLAND, 2004)(TAMAKI et al., 2007).

Figura 4 – Padrão de expressão do gene *ScFT6* em diferentes tecidos de cana-de-açúcar por PCR semi-quantitativa. FI: Folha Imatura; FM: Folha madura; MA: Meristema Apical; C: Colmo; DNA: *Pool* de DNA – controle positivo.



Fonte: Do autor (2019).

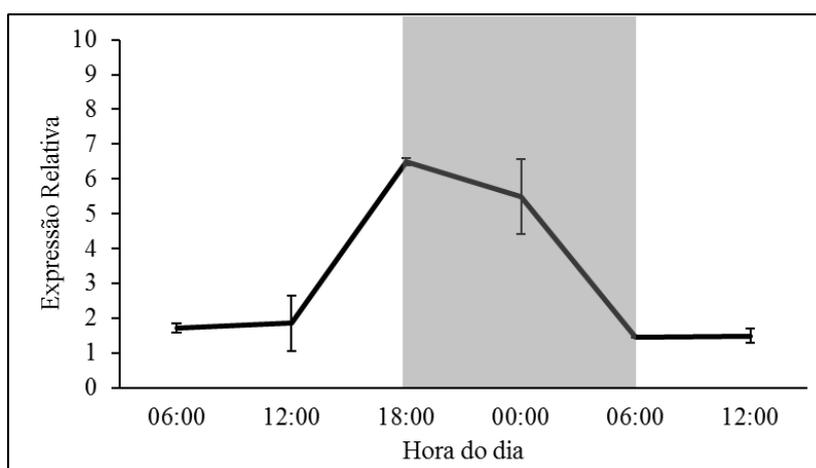
3.2 O relógio circadiano controla a expressão do gene *ScFT6*

O relógio circadiano atua sobre a expressão do gene *FT* de forma indireta. Segundo o modelo de coincidência, há uma correlação direta entre a luz e a estabilidade da proteína do gene *CONSTANS* (CO), de maneira que a luz aumenta a estabilidade dessa proteína, levando ao seu acúmulo durante o dia e, conseqüentemente, com que ocorra a indução do florescimento (KIM; YU; MICHAELS, 2008; VALVERDE et al., 2004). O gene *CO* é um regulador transcricional que promove o florescimento através da indução da expressão do

gene *FT* em plantas de dia longo submetidas a essa condição específica (SUÁREZ-LÓPEZ et al., 2001) e inibe o florescimento de plantas de dia curto submetidas a condições de dias longos pela inibição da expressão de homólogos do *FT* (HAYAMA; COUPLAND, 2004; YANO et al., 2000).

Através do modelo de coincidência, é possível determinar que o gene *FT* tem sua expressão controlada pelo relógio circadiano e, assim, seu pico de expressão sobrepõe-se com o dia, tanto em plantas de dia longo como em plantas de dia curto (GREENHAM; MCCLUNG, 2015; VALVERDE et al., 2004). Dessa maneira, também é o comportamento do gene *ScFT6* em cana-de-açúcar, um possível homólogo do *FT*, que é acumulado ao longo do dia, e no decorrer da noite tem sua expressão reduzida (FIGURA 5). Por essa perspectiva, podemos inferir que o gene *ScFT6* tem sua expressão controlada pelos ritmos circadianos, assim como seus homólogos indutores do florescimento em outras espécies.

Figura 5 – Perfil da expressão relativa por RT-qPCR do gene *ScFT6* em folhas de cana-de-açúcar. Os valores de expressão de cada genótipo foram obtidos a partir de três repetições biológicas, a diferença na expressão ao longo do período de condução do experimento foi calculada em relação a uma amostra normalizadora (06:00 horas). As barras de erro representam o erro padrão entre elas. Os valores de expressão foram normalizados pelos genes de referência *GAPDH* e *eEF1 α* .



Fonte: Do autor (2019).

A determinação do tempo de florescimento em plantas de dia curto e dia longo apresenta dependência da sinalização luminosa, onde esse sinal deve coincidir com fases sensíveis estabelecidas por componentes endógenos do relógio circadiano (SHRESTHA et al., 2014; SONG et al., 2015). O gene *FT* e seus homólogos, incluindo o possível indutor do florescimento de cana-de-açúcar *ScFT6*, são comprovadamente controlados por tais sinais,

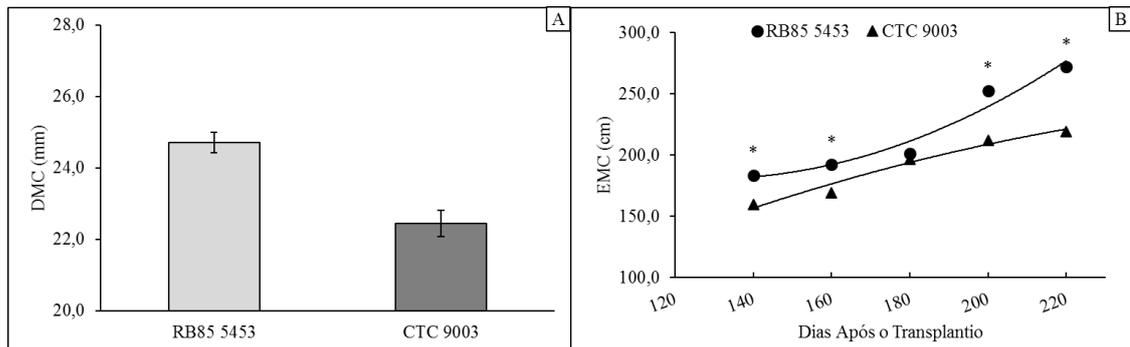
sendo sua expressão regulada indiretamente por fatores de transcrição controlados pela luz e pela duração da sua exposição a luz (KOMIYA et al., 2008; SHRESTHA et al., 2014).

3.3 Variedades de cana-de-açúcar possuem comportamentos distintos em relação à expressão de *ScFT6*

Cultivares de cana-de-açúcar podem apresentar comportamentos distintos com relação à indução do florescimento, sendo afetadas de diferentes maneiras pelo fotoperíodo. Há diferenças com relação ao número de dias requeridos dentro do fotoperíodo indutivo para que ocorra o estímulo floral e, além disso, a quantidade de estímulo floral necessário varia entre as cultivares (BERDING; HURNEY, 2005). Existem cultivares em que ocorre a indução ao florescimento, porém, não há o desenvolvimento completo do órgão floral, devido a regimes sub ótimos de fotoperíodo (BERDING; PENDRIGH; DUNNE, 2010) e outras condições ambientais estressantes, apesar de haver comprometimento da qualidade da matéria prima (TASSO JÚNIOR et al., 2009).

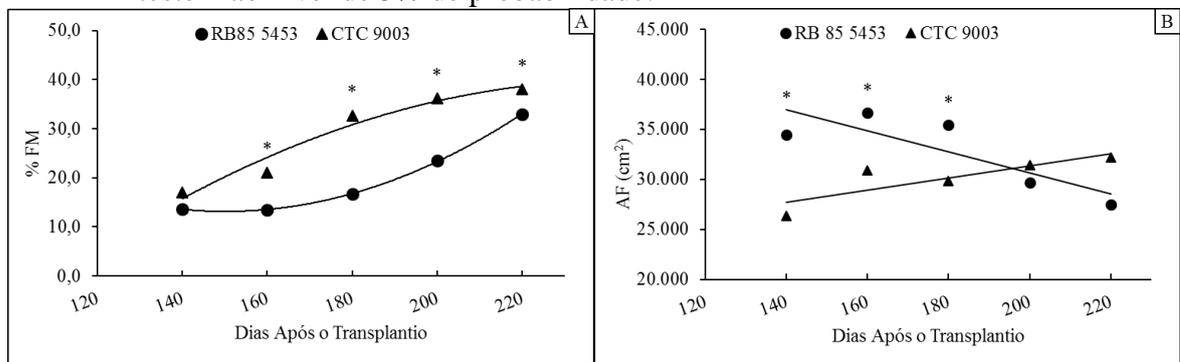
O processo de florescimento na cana-de-açúcar se dá pela indução e posterior realocação de reservas presentes no colmo para o órgão floral (ARALDI et al., 2010). Dessa maneira, um maior desenvolvimento inicial caracterizado pelo maior diâmetro médio do colmo e estatura média do colmo, ocorrido na cultivar RB85 5453 (FIGURA 6) possivelmente são características que levam ao florescimento frequente dessa cultivar. Além disso, a cultivar RB85 5453 apresentou uma menor senescência e maior área foliar no início do período de cultivo (FIGURA 7), o que denota melhores características para maior produção e armazenamento de sacarose, garantindo maior fonte de energia para o desenvolvimento do órgão floral.

Figura 6 – Diâmetro médio do colmo (A) e estatura média do colmo (B) das cultivares RB85 5453 e CTC 9003. * indica diferença estatística entre médias pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. A barra de erros indica o erro padrão da média.



Fonte: Do autor (2019).

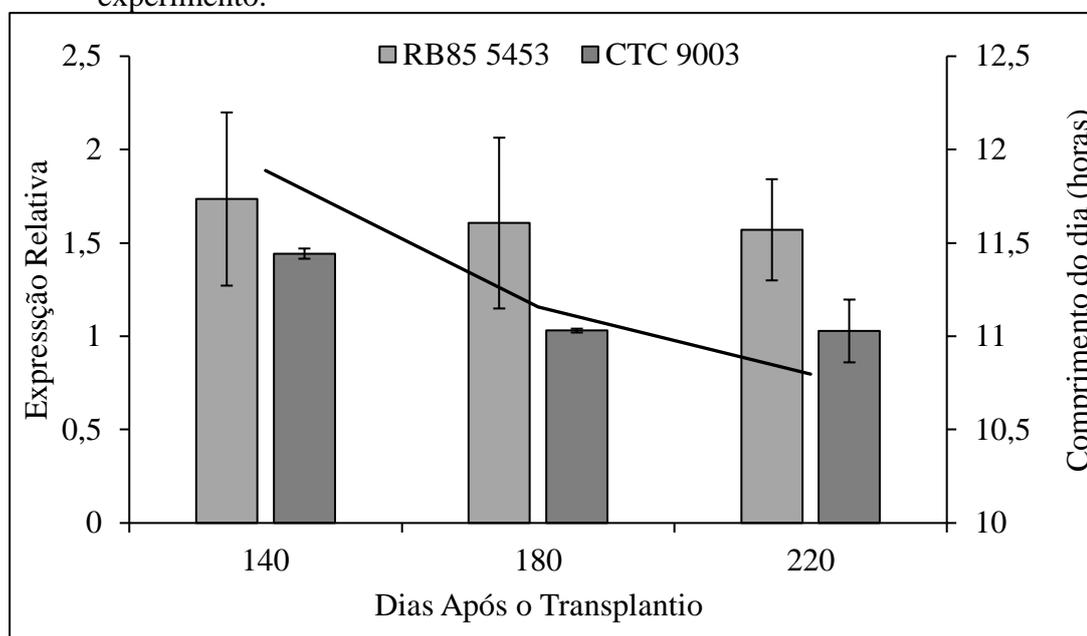
Figura 7 – Porcentagem de folhas mortas (%FM, a direita) e área foliar (AF, a esquerda) das cultivares RB85 5453 e CTC 9003. * indica diferença estatística entre médias pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2019).

Possivelmente, associada às características fenológicas da cultivar florífera (RB 85 5453), a expressão do gene *ScFT6*, possível indutor do florescimento, apresentou maiores níveis de expressão em relação à cultivar CTC 9003, com florescimento ausente (FIGURA 8). Sendo assim, de acordo com os resultados apresentados, a sensibilidade de cada cultivar em relação ao fotoperíodo é uma característica genotípica envolvendo a expressão do possível gene indutor do florescimento *ScFT6*.

Figura 8 – Perfil da expressão relativa por RT-qPCR do gene *ScFT6* em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar. As barras representam a diferença na expressão entre as variedades ao longo do período de condução do experimento em relação a uma amostra normalizadora (CTC 9003 – 17/06/2017). Os valores de expressão de cada genótipo foram obtidos a partir de três repetições biológicas e as barras de erro representam o erro padrão entre elas. Os valores de expressão foram normalizados pelos genes de referência *GAPDH* e *eEF1 α* . O eixo Y secundário representa a redução do comprimento do dia ao longo do período de condução do experimento.



Fonte: Do autor (2019).

Estes resultados demonstram que a cana-de-açúcar possui pelo menos um possível gene homólogo ao *FT* com função de indução do florescimento. O gene *ScFT6* possui uma sequência com domínio conservado e aminoácidos em posições características de genes da família PEBP indutores do florescimento, expressão nos diferentes tecidos de cana semelhante aos seus homólogos em outras espécies e é controlado pelos ritmos circadianos de acordo com o modelo de coincidência. Além disso, corroborando com os resultados expostos, as variedades de cana-de-açúcar com comportamentos distintos para o florescimento, apresentam expressão variável do gene *ScFT6*, demonstrando uma possível característica genotípica de expressão desse gene.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstram que a cana-de-açúcar possui pelo menos um possível gene homólogo ao *FT* com função de indução do florescimento em cana-de-açúcar. O gene *ScFT6* possui uma sequência com domínio conservado e aminoácidos em posições características de genes da família PEBP indutores do florescimento. A expressão de *ScFT6* ocorre em tecidos de cana-de-açúcar de modo semelhante à expressão de seus homólogos em outras espécies e é controlado pelos ritmos circadianos de acordo com o modelo de coincidência. Além disso, corroborando com os resultados obtidos, as variedades de cana-de-açúcar com comportamentos distintos para o florescimento apresentam expressão variável do gene *ScFT6*.

REFERÊNCIAS

- AHN, J. H. et al. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. **The EMBO journal**: London, v. 25, n. 3, p. 605–614, 2006.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**: London, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- AN, H. et al. CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. **Development**: Cambridge, v. 131, n. 15, p. 3615–3626, 2004.
- ARALDI, R. et al. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 40, n.3, p. 694–702, 2010.
- BENNETZEN, J. L. et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature Biotechnology**: London, v. 30, n. 6, p. 555, 2012.
- BERDING, N.; HURNEY, A. P. Flowering and lodging, physiological-based traits affecting cane and sugar yield: What do we know of their control mechanisms and how do we manage them? **Field Crops Research**: Amsterdã, v. 92, n. 2–3, p. 261–275, 2005.
- BERDING, N.; PENDRIGH, R. S.; DUNNE, V. Pursuing higher efficacy for managed photoperiodic initiation of sugarcane flowering in the tropics. Proc Aust Soc Sugar Cane Technol. **Anais...**2010
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**: Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BRADLEY, D. et al. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. **Nature**: London, v. 379, n. 6568, p. 791, 1996.
- BRADLEY, D. et al. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. **Science**: New York, v. 275, n. 5296, p. 80–83, 1997.
- BURGE, C.; KARLIN, S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA1. **Journal of Molecular Biology**: Amsterdã, v. 268, n. 1, p. 78–94, 1997.
- CAPUTO, M. M. et al. Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana-de-açúcar sob reguladores vegetais. **Interciencia**: Santiago, v. 32, n. 12, p. 834–840, 2007.
- COELHO, C. P. et al. A proposed model for the flowering signaling pathway of sugarcane under photoperiodic control. **Genet. Mol. Res**: Ribeirão Preto, v. 12, p. 1347–1359, 2013.
- COELHO, C. P. et al. Putative sugarcane *FT/TFL1* genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 5, p. 221, 2014.

- CORBESIER, L.; COUPLAND, G. Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. **Plant, Cell & Environment**: Malden, v. 28, n. 1, p. 54–66, 2005.
- CORRÊA, L. G. G. et al. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **PloS ONE**: Cambridge, v. 3, n. 8, p. e2944, 2008.
- DANILEVSKAYA, O. N. et al. A genomic and expression compendium of the expanded PEBP gene family from maize. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 146, n. 1, p. 250–264, 2008.
- DAROS, E. et al. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba: Ridesa, 2010.
- EFE, C.; STRAATHOF, A. J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M. **Technical and economical feasibility of production of ethanol from sugar cane and sugar cane bagasse**. Delft: Delft University of Technology, 2005. 374 p.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**: New York, v. 315, n. 5813, p. 808–810, 2007.
- GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**: London, v. 29, n. 7, p. 644, 2011.
- GREENHAM, K.; MCCLUNG, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 16, n. 10, p. 598, 2015.
- HAAS, B. J.; PAPANICOLAOU, A. **TransDecoder (find coding regions within transcripts)**. Disponível em: <<http://transdecoder.sourceforge.net>>.
- HANZAWA, Y.; MONEY, T.; BRADLEY, D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 102, n. 21, p. 7748–7753, 2005.
- HAYAMA, R.; COUPLAND, G. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 135, n. 2, p. 677–684, 2004.
- HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. S. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **Revista da STAB**: [S.l.: s.n.], v. 17, n. 1, p. 32–34, 1999.
- HO, W. W. H.; WEIGEL, D. Structural features determining flower-promoting activity of *Arabidopsis* *FLOWERING LOCUS T*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 26, p. 552–564, 2014.
- KARDAILSKY, I. et al. Activation tagging of the floral inducer *FT*. **Science**: New York, v. 286, n. 5446, p. 1962–1965, 1999.
- KARLGREN, A. et al. Evolution of the PEBP gene family in plants: functional diversification in seed plant evolution. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 156, p. 1967–1977, 2011.

- KIM, S. Y.; YU, X.; MICHAELS, S. D. Regulation of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* expression in response to changing light quality. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 148, n. 1, p. 269–279, 2008.
- KOBAYASHI, Y. et al. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science**: New York, v. 286, n. 5446, p. 1960–1962, 1999.
- KOJIMA, S. et al. *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 43, n. 10, p. 1096–1105, 2002.
- KOMIYA, R. et al. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. **Development**: Cambridge, v. 135, n. 4, p. 767–774, 2008.
- KOMIYA, R.; YOKOI, S.; SHIMAMOTO, K. A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice. **Development**: Cambridge, v. 136, n. 20, p. 3443–3450, 2009.
- LING, H. et al. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PloS ONE**: Cambridge, v. 9, n. 5, p. e97469, 2014.
- MARAFON, A. C. Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**: London, v. 43, n. 1, p. 222–226, 2014.
- MARQUES, M. O. et al. Considerações sobre a qualidade da matéria-prima. **Tecnologias Na Agroindústria Canavieira. Jaboticabal: FCAV**, p. 9–16, 2008.
- MATTIELLO, L. et al. Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. **BMC Plant Biology**: London, v. 15, n. 1, p. 300, 2015.
- MUSZYNSKI, M. G. et al. Delayed flowering1 encodes a basic leucine zipper protein that mediates floral inductive signals at the shoot apex in maize. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 142, n. 4, p. 1523–1536, 2006.
- OLIVEIRA, A. J. et al. **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA-SEA, 1991.
- OWCZARZY, R. et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Research**: London, v. 36, n. 2, p. 163–169, 2008.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**: London, v. 29, n. 9, p. 16–21, 2001.
- PIN, P. A. et al. An antagonistic pair of *FT* homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. **Science**: New York, v. 330, n. 6009, p. 1397–1400, 2010.

- PNUELI, L. et al. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. **Development**: Cambridge, v. 125, n. 11, p. 1979–1989, 1998.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**: London, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SAMACH, A. et al. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. **Science**: New York, v. 288, n. 5471, p. 1613–1616, 2000.
- SHRESTHA, R. et al. Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. **Annals of botany**: Oxford, v. 114, n. 7, p. 1445–1458, 2014.
- SONG, Y. H. et al. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. **Annual review of plant biology**: Palo Alto, v. 66, p. 441–464, 2015.
- SUÁREZ-LÓPEZ, P. et al. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. **Nature**: London, v. 410, n. 6832, p. 1116, 2001.
- TAMAKI, S. et al. *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. **Science**: New York, v. 316, n. 5827, p. 1033–1036, 2007.
- TAMURA, K. et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**: London, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007.
- TAOKA, K. et al. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice *Hd3a* florigen. **Nature**: London, v. 476, n. 7360, p. 332, 2011.
- TASSO JÚNIOR, L. C. et al. Variação genotípica no florescimento, isoporização e características tecnológicas em seis cultivares de cana-de-açúcar. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**: São Cristóvão, v. 9, n. 1, 2009.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**: London, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
- VALVERDE, F. et al. Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. **Science**: New York, v. 303, n. 5660, p. 1003–1006, 2004.
- VAN DILLEWIJN, C. **Botany of Sugarcane**. New York: Stechert-Hafner, 1952.
- WICKLAND, D. P.; HANZAWA, Y. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* gene family: functional evolution and molecular mechanisms. **Molecular Plant**: [S.l.: s.n.], v. 8, n. 7, p. 983–997, 2015.
- WOLABU, T. W. et al. Three *FLOWERING LOCUS T*-like genes function as potential florigens and mediate photoperiod response in sorghum. **New Phytologist**: London, v. 210, n.

3, p. 946–959, 2016.

YANO, M. et al. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 12, n. 12, p. 2473–2483, 2000.

APÊNDICE A – Sequências proteicas de homólogos do FT de diversas espécies.

SbFT1 (XP_002436509.1), ZCN15 (NP_001106252), VRN3 (AAW23034), HvFT1 (AAZ38709), Hd3a (AB052941.1) HvFT2 (ABB99414), ZCN14 (NP_001106251), AtFT (NP_001320342.1), AtTSF (AT4G20370.1), SbFT6 (XP_002462655.1), SbFT11 (XP_002443085.1), SbFT5 (XP_002489297.1), SbFT3 (XP_002446704.1), ZCN16 (NP_001106253), SbFT7 (XP_002451827.1), SbFT12 (XP_002446272.1), SbFT9 (XP_002438551.1), SbFT8 (XP_002456354.1), ZCN12 (NP_001106250), ZCN8 (NP_001106247), SbMFT1 (XP_002457494.1), HvMFT (BAK06374), AtMFT (AT1G18100.1), SbTFL1-2 (XP_002442808.1), SbTFL1-3 (XP_002450283.1), HvTFL1 (BAH24197), SbTFL1-1 (XP_002453931.1), ZCN2 (NP_001106241), SbTFL1-4 (XP_002447782.1), ZCN4 (NP_001106243), SvFT (XP_004953015.1)

APÊNDICE B – Protocolo de extração de RNA Qiazol® com adaptações para cana-de-açúcar.

1. Adicionar 1 mL de Qiazol® para cada 100 mg de tecido macerado. Vortex de 30 segundos; Obs.: Adiciona o Qiazol, agita brevemente no vortex para que todo o tecido descongele com o Qiazol. Faz isso para todas as amostras a serem extraídas. Depois, vortex de 30 segundos para cada amostra.
 2. Deixe em temperatura ambiente por 5 minutos; Obs.: Os tubos devem ser mantidos deitados para aumentar a superfície de contato do Qiazol® com o tecido macerado.
 3. Adicionar 300 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Qiazol® e homogeneizar rigorosamente no vortex por 15 segundos; Obs.: Adicionar o clorofórmio e já homogeneizar.
 4. Deixar em temperatura ambiente por 3 minutos;
 5. Centrifugar por 15 minutos a 12000 g ou 12125,74 rpm a 4°C;
 6. Transferir o sobrenadante para novos tubos (1,5 mL), aproximadamente 300 µL; Obs.: Muito cuidado para não misturar as fases. Usar duas ponteiras para fazer a transferência do sobrenadante (ponteiras de 1000 e 200 µL).
 7. Adicionar 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de Qiazol®. Vortex rigoroso de 30 segundos; Obs.: Adicione e já promova o vortex de 30 segundos, amostra por amostra.
 8. Deixar em temperatura ambiente por 10 minutos;
 9. Centrifugar por 10 minutos a 12000 g ou 12125,74 rpm a 4°C;
 10. Aspirar o sobrenadante e descarta-lo; Obs.: O tubo deve ser virado em um béquer com cuidado para não remover o pellet junto com o conteúdo líquido.
 11. Adicionar 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Qiazol® e centrifugar por 10 minutos a 7500 g ou 9586 rpm a 4 °C;
 12. Remover completamente o sobrenadante, deixar secando por 15 minutos aproximadamente, até que o pellet esteja seco e ressuspender em 20 µL de água livre de RNase - água MiliQ autoclavada.
- Segunda lavagem
13. Adicionar 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de Qiazol®. Vortex rigoroso de 30 segundos; Obs.: Adicione já promova o vortex de 30 segundos, amostra por amostra.
 14. Deixar em temperatura ambiente por 10 minutos;
 15. Centrifugar por 10 minutos a 12000 g ou 12125,74 rpm a 4°C;
 16. Aspirar o sobrenadante e descarta-lo; Obs.: O tubo deve ser virado em um béquer com cuidado para não remover o pellet junto com o conteúdo líquido.
 17. Adicionar 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Qiazol® e centrifugar por 10 minutos a 7500 g ou 9586 rpm a 4 °C;
 18. Remover completamente o sobrenadante, deixar secando por 15 minutos aproximadamente, até que o pellet esteja seco e ressuspender em 20 µL de água livre de RNase - água MiliQ autoclavada.

**CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DO GENE *ScFT6* EM FUNÇÃO DO FOTOPERÍODO
EM CANA-DE-AÇÚCAR E SUA RELAÇÃO COM O METABOLISMO DE
CARBOIDRATOS**

RESUMO

O florescimento é considerado um entrave na busca de altas produtividades em cana-de-açúcar, pois promove uma realocação de carboidratos do colmo para a inflorescência, levando à redução da quantidade e qualidade da matéria prima. O fotoperíodo é o principal fator ambiental responsável pela indução floral da cana-de-açúcar. Há relatos que demonstram a relação entre o fotoperíodo, o metabolismo de carboidratos e a indução do florescimento em algumas espécies, por exemplo através da regulação da expressão do *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) via Trealose-6-fosfato-sintase (*TPS*). O objetivo desse trabalho foi avaliar, em cana-de-açúcar, o efeito de alterações do comprimento do dia sobre a atividade fotossintética, o metabolismo de carboidratos, a expressão do gene *ScFT6* e as correlações entre essas variáveis condicionadas ao fotoperíodo. Plantas de cana-de-açúcar foram submetidas a duas condições de fotoperíodo (dia encurtando e dia alongando) e, durante a indução desses tratamentos, foram analisadas trocas gasosas ao longo do período de condução do experimento, expressão em tempo real dos genes *ScFT6*, *SPSI* e *SPSII* e determinação dos teores de açúcares redutores, amido e sacarose. A redução do comprimento do dia, responsável pela indução do florescimento em cana-de-açúcar pela via fotoperiódica promove aumento do possível indutor do florescimento *ScFT6*, além de promover o aumento da expressão de *STPSII*, um sinalizador do *status* de carbono da planta. O gene *ScFT6* não tem sua expressão correlacionada a níveis de carboidrato das plantas de cana-de-açúcar. Possivelmente ele atue na indução do florescimento exclusivamente pela transmissão do sinal luminoso.

Palavras-chave: Comprimento do dia. Metabolismo energético. Indução do florescimento. *FLOWERING LOCUS T*. *Saccharum* spp

ABSTRACT

Flowering is considered an obstacle in the search for high yields in sugarcane, as it promotes carbohydrate reallocation from the stem into the inflorescence, reducing the quantity and quality of the raw material. The photoperiod is the main environmental factor responsible for floral induction in sugarcane. There are reports that demonstrate a relationship between photoperiod, carbohydrate metabolism and flowering induction in some species, for example by regulating *FLOWERING LOCUS T (FT)* expression via Trehalose-6-phosphate-synthase (TPS). The aim of this work was to evaluate the effect of day length changes in photosynthetic activity, carbohydrate metabolism, expression of the *ScFT6* gene and correlations between these variables conditioned to the photoperiod. Sugarcane plants were submitted to two photoperiod conditions (shortening day and elongating day). During these treatments, gas exchanges were analyzed throughout the conduction period of the assay, as well as real-time expression of *ScFT6*, *SPSI* and *SPSII* genes and determination of the contents of reducing sugars (starch and sucrose). Reduction in day length, responsible for flowering induction in sugarcane through photoperiod increase expression of the putative flowering promoter *ScFT6*, besides promoting the increase in expression of *STPSII*, sign of carbon status of the plant. The expression of *ScFT6* gene was not correlated to carbohydrate levels in sugarcane plants. Possibly it acts in the flowering induction exclusively by the luminous signal transmission.

Keywords: Day length. Energetic metabolism. Flowering induction. *FLOWERING LOCUS T. Saccharum* spp

1 INTRODUÇÃO

O etanol produzido através da cana-de-açúcar faz dessa cultura uma das principais fontes de energia renovável brasileira. Além disso, ela é a principal fonte de açúcar para o Brasil e para o mundo (EFE; STRAATHOF; VAN DER WIELEN, 2005; OLIVEIRA et al., 2018). Um dos obstáculos enfrentados pelos canavieiros do Brasil é o florescimento da cana-de-açúcar, o qual promove um deslocamento de energia armazenada no colmo na forma de sacarose para o desenvolvimento da inflorescência e, conseqüentemente, afeta a quantidade e a qualidade da matéria prima (CAPUTO et al., 2007).

O fotoperíodo é o principal fator ambiental responsável pela indução floral da cana-de-açúcar, relacionando-se com outros fatores como umidade, nutrição e temperatura (MOORE, 1987; MOORE; NUSS, 1987). O comprimento ideal do dia para indução do florescimento varia entre 12 a 12,5 horas, principalmente no período do ano em que os dias estão encurtando e as plantas estão concluindo o período vegetativo (ARALDI et al., 2010; CLEMENTS; AWADA, 1967).

O gene *FLOWERING LOCUS T (FT)*, um membro da família de proteínas de ligação fosfatidiletanolamina (PEBP), tem papel central na integração entre sinais ambientais (fotoperíodo) e o florescimento das plantas (JIN et al., 2015; KOJIMA et al., 2002; LI; DUBCOVSKY, 2008). Em *A. thaliana*, o *FT* é expresso nas células companheiras do floema das folhas, onde, a partir deste local, ela adentra os elementos crivados e é transportada por fluxo de massa até o meristema apical do caule induzindo o florescimento (PIN; NILSSON, 2012). Homólogos do *FT* promovem o florescimento em resposta a alterações de comprimento do dia tanto em plantas de dia curto quanto em plantas de dia longo (KOMIYA et al., 2008; LIN et al., 2007; TAMAKI et al., 2007). Em cana-de-açúcar já foram identificados alguns membros da família do *FT*, incluindo alguns envolvidos no atraso do florescimento (COELHO et al., 2014).

Além de possíveis ortólogos do *FT* e *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* já caracterizados (*ScTFL1* e *ScFT1*), restam outros a serem estudados. *FtS3* e *FtS4* (renomeados para *ScFT3* e *ScFT4*, respectivamente), os quais apresentam maior semelhança com genes do tipo promotores do florescimento (*FT-like*), indicando que um ou mais deles pode atuar como promotor do florescimento (COELHO et al., 2014).

Outro fator envolvido na indução floral e, em alguns casos, na expressão do gene *FT*, é o metabolismo de carboidratos (VAN DIJKEN; SCHLUEPMANN; SMEEKENS, 2004; WAHL et al., 2013). Os níveis dessas biomoléculas podem influenciar o crescimento e

desenvolvimento de plantas atuando como elicitores ou reguladores de crescimento (CREELMAN; MULLET, 1997). Um dos mecanismos que envolvem o metabolismo de carboidratos e o desenvolvimento de plantas, é via Trealose-6-Fosfato-Sintase (TPS), que é encontrada em concentrações traço com possível função de sinalização, transmitindo informações sobre a disponibilidade de carboidratos para outras vias de sinalização (LUNN et al., 2006).

Em *A. thaliana*, *TPSI* é comprovadamente essencial para que a transição para o florescimento ocorra, possivelmente através do fornecimento de trealose-6-fosfato (T6P) (VAN DIJKEN; SCHLUEPMANN; SMEEKENS, 2004). Além disso, recentemente foi demonstrado que em *A. thaliana*, uma rota envolvendo T6P regula o florescimento em dois sítios da planta. Na folha, *TPSI* é necessário para indução da expressão do *FT* mesmo em um fotoperíodo favorável, garantindo uma maneira da planta integrar sinais ambientais e sinais fisiológicos. No meristema apical da parte aérea, a rota da via T6P afeta a expressão de genes integradores do florescimento e genes responsáveis pela determinação de padrões florais, tais como o *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 (SPL3)* (WAHL et al., 2013).

Em cana-de-açúcar foram identificados dois homólogos de TPS, os genes *STPSI* e *STPSII*, que codificam proteínas responsáveis pela síntese de trealose-6-fosfato, e atuam possivelmente como sinalizadores da disponibilidade de carboidratos para outras vias de sinalização (LUNN et al., 2006). O *STPSII*, pertencente à classe II (JUNIOR et al., 2013), apresenta possível função reguladora, tendo sua expressão regulada transcricionalmente pelo *status* de carbono da planta e por estresses, podendo ser fosforilados e/ou interagir com proteínas 14-3-3 (HARMER et al., 2000; HARTHILL et al., 2006; PAUL et al., 2008).

Fundamentado nas informações mencionadas anteriormente, o objetivou-se com esse trabalho avaliar, em cana-de-açúcar, o efeito de alterações do comprimento do dia sobre a atividade fotossintética, o metabolismo de carboidratos, a expressão do gene *ScFT6* e as correlações entre essas variáveis condicionadas ao fotoperíodo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

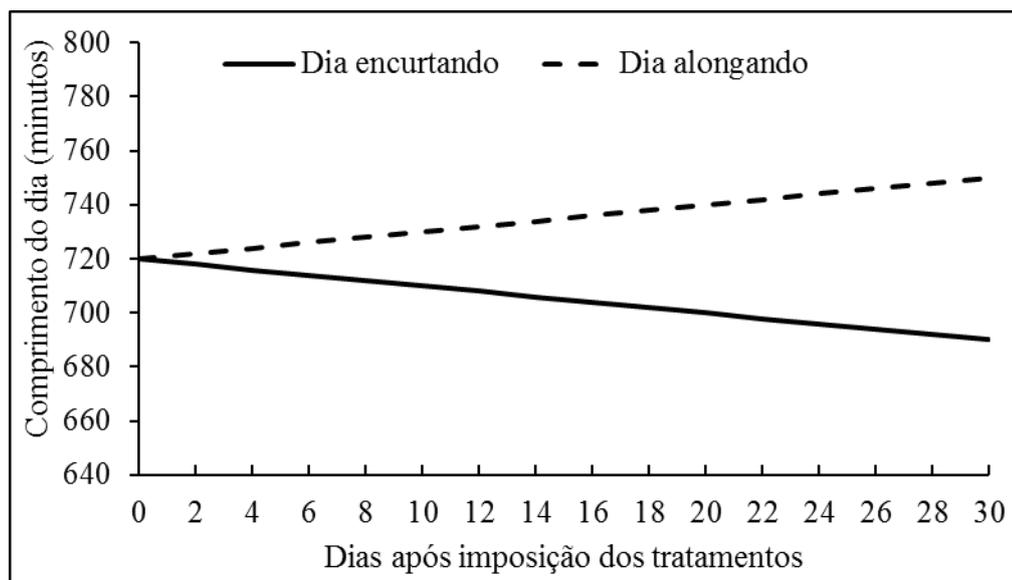
2.1 Condições de cultivo

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras, na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal, S21°14'43" - W44°59'59" com aproximadamente 900 m de altitude e na sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, durante o período 21 de setembro de 2017 a 08 de fevereiro de 2018. Foram utilizadas mudas provenientes do Sistema AgMusa™ doadas pela empresa BASF. A cultivar utilizada foi a RB 85-5156 que possui florescimento frequente na região sudeste do Brasil (DAROS et al., 2010).

Inicialmente, no dia 21 de setembro de 2017 as mudas foram transplantadas para vasos de 40 L contendo solo previamente analisado e a necessidade de adubação durante a condução do experimento foi determinada de acordo com Oliveira et al. (1991), sendo realizadas em intervalos de 30 dias. Foram mantidas duas plantas em cada vaso e o restante dos perfilhos eram eliminados com auxílio de tesoura de poda uma vez por semana. As plantas foram condicionadas em pleno sol até dia 17 de dezembro de 2017 quando foram transferidas para sala de crescimento e mantidas em câmaras de 6,2 m² com luminosidade controlada (400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com três lâmpadas de vapor metálico (HQI OSRAM 400W E40TUB®) em condições de dia neutro (12 horas de luz e 12 horas de escuro) para aclimatização.

Vinte dias após o início da aclimatização as plantas foram submetidas aos tratamentos, onde um grupo de plantas foi submetido a uma condição de dia encurtando (redução diária de 1 minuto de luz) e o outro grupo foi submetido a uma condição de dia alongando (aumento diário de 1 minuto de luz) de acordo com a Figura 1. Durante todo o experimento as plantas foram mantidas sob irrigação à capacidade de campo, com intervalo de rega de dois dias.

Figura 1 – Comprimento do dia ao longo do experimento de acordo com cada tratamento imposto



Fonte: Do autor (2019).

2.2 Análises de trocas gasosas

As determinações de trocas gasosas foram realizadas por meio de um sistema aberto portátil de trocas gasosas, IRGA (*Infra Red Gas Analyzer*), modelo LI-6400 (Li-cor®), sempre no terço médio das folhas +3, onde cada medida foi tomada duas vezes. Em todas as avaliações de trocas gasosas, o início das medições ocorreu, no mínimo, uma hora após o acendimento das lâmpadas em cada uma das câmaras.

Durante as medições, o terço central da folha +3 (VAN DILLEWIJN, 1952) de cada planta foi colocada dentro da câmara selada do equipamento, não suprida por ar externo, sob $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF). O tempo de equilíbrio entre as medidas de fotossíntese e a respiração foliar foi de 5 minutos e o valor máximo de déficit de pressão de vapor em que foram realizadas as medidas foi de 1,8 kPa e temperatura do ar média de 30 ± 2 °C. As determinações de trocas gasosas foram realizadas aos 0, 15 e 30 dias após a imposição dos tratamentos, entre 9 e 11 horas da manhã.

2.3 Quantificação de amido, açúcares solúveis totais, sacarose e açúcares redutores

Para quantificação de amido, açúcares solúveis totais, sacarose e açúcares redutores, amostras do terço central de folhas 1+ (VAN DILLEWIJN, 1952) completamente expandidas foram coletadas aos 30 dias após a imposição dos tratamentos no horário entre 10 e 11 horas

da manhã. O material vegetal foi seco em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C, durante 72 horas, e, posteriormente, armazenados em papel tipo craft até o momento das análises. Os carboidratos foram extraídos pela homogeneização de 0,2 g de massa seca (MS) de folhas em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM e pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido e os sobrenadantes combinados, perfazendo um volume final de 10 mL. O extrato bruto foi utilizado para a quantificação de amido e sacarose pelo método Antrona (DISCHE, 1962), os açúcares solúveis totais e os açúcares redutores foram quantificados de acordo com protocolo descrito por Miller (1959), utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

2.4 Análises da expressão em tempo real dos genes *ScFT6*, *SPS I* e *SPSII*

Aos 30 dias após a submissão das plantas aos tratamentos foram realizadas coletas das folhas 3+ (VAN DILLEWIJN, 1952) para posterior análise da expressão gênica. As folhas coletadas foram maceradas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C. A extração do RNA foi feita seguindo o protocolo Qiazol® adaptado para tecidos de cana-de-açúcar (APÊNDICE A). Em seguida, as amostras foram tratadas com o kit *DNA-free* (Ambion) para eliminação de DNA residual nas amostras. A integridade das amostras de RNA extraídas foi determinada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UVITEC. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanovue®) a A260, A230 e A280nm, determinando-se a quantidade e a qualidade do material extraído. As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram utilizadas para a síntese de cDNA, com o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas no freezer a -20 °C até o uso.

Os *primers* utilizados para análise de expressão (TABELA 1) do gene *ScFT6* desenhados a partir da sequência previamente identificada e os *primers* dos genes *STPSI* e *STPSII* foram os mesmos utilizados no trabalho de Júnior et al. (2013), onde esses genes foram identificados e caracterizados em cana-de-açúcar.

Tabela 1 – Sequência dos *primers* para análise da expressão dos genes *ScFT6*, *STPSI* e *STPSII* de cana-de-açúcar.

Identificação	Sequência 5'→3'	Eficiência
<i>ScFT6</i> qPCR Fw	GTGTGGAGGCAGACGATA	1,02
<i>ScFT6</i> qPCR Rv	GCTTTGCGAAGTGGCTGG	1,02
<i>STPSI</i> Fw	GTGCCAACAAGAAGTACTGACG	0,95
<i>STPSI</i> Rv	TGTGCCTGTGTCGTTTCTC	0,95
<i>STPSII</i> Fw	GTGGACGAGAGATGAAGGG	0,92
<i>STPSII</i> Rv	AGCCAAGTCATCCTCCAAC	0,92

Fonte: Do autor (2019).

Foi realizado um ensaio de quantificação para determinação da curva padrão, eficiência dos *primers* e melhor diluição das amostras para o gene *ScFT6*. Para os genes *STPSI* e *STPSII* a eficiência dos *primers* foi determinada através do software *LinRegPCR* (RUIJTER et al., 2009).

A PCR em tempo real (qPCR) foi conduzida utilizando o equipamento *Rotor-Gene Q Real-Time PCR* (Qiagen) pelo sistema de detecção por *SYBR Green* com cDNA obtido a partir de RNA previamente extraído. A concentração de cDNA a ser utilizado para cada reação foi determinado após quantificação da eficiência dos *primers*, utilizando-se 10 µL de volume de reação por amostra com *MasterMix SYBR Green* (Qiagen). Foi realizado o experimento de expressão relativa utilizando o método do $\Delta\Delta CT$ (Ciclo *Threshold*) comparativo utilizando como genes de referência o *GAPDH* e o *eEF-1 α* (LING et al., 2014).

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos (comprimento do dia) e quatro repetições. No caso das análises de trocas gasosas o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) no esquema de parcelas subdivididas no tempo (Comprimento do dia X Dias após imposição dos tratamentos). Os dados de trocas gasosas, amido, açúcares solúveis totais, sacarose e açúcares redutores foram submetidos ao teste F ($p \leq 0,05$) para análise de variância e quando necessário ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação de médias. Os dados de expressão dos genes *ScFT6*, *STPSI* e *STPSII* foram analisados por meio do programa *Rotor-Gene Series Pure Detection Software* (Versão 2.0.2), a expressão relativa foi calculada de acordo com Pfaffl (2001).

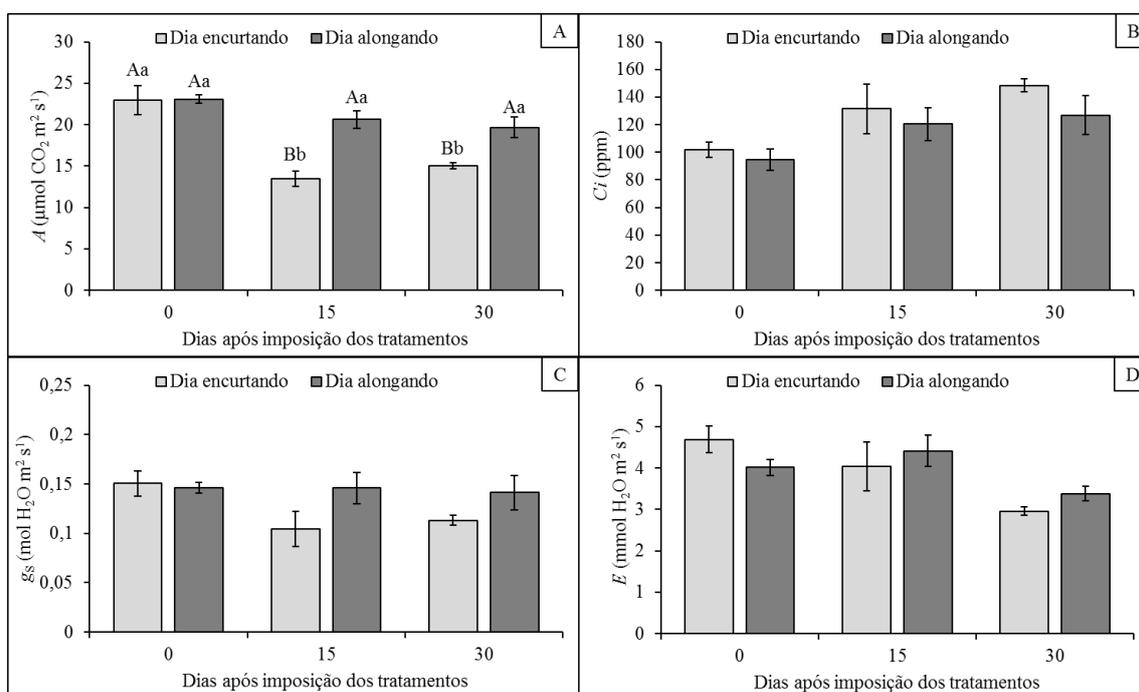
Foi realizado uma análise de correlação linear simples com os dados de trocas gasosas, amido, açúcares solúveis totais, sacarose, açúcares redutores e expressão dos genes *ScFT6*, *STPSI* e *STPSII*, utilizando-se o teste t ($p \leq 0,05$) para determinação de correlação positiva ou negativa entre as variáveis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 A fotossíntese de cana-de-açúcar é alterada em função do fotoperíodo

Aos dezesseis dias após a imposição dos tratamentos, as plantas submetidas à condição de dias encurtando, tiveram sua fotossíntese (A) reduzida se comparada ao tempo inicial e a condição de dia alongando. Entretanto, a concentração de CO_2 na câmara subestomática (C_i), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E) não foram alteradas, independentemente do número de dias após a imposição dos tratamentos ou do comprimento do dia (FIGURA 2). A condição de dia alongando não alterou a taxa fotossintética, a concentração de CO_2 na câmara subestomática, a condutância estomática e a transpiração ao longo do período em que foram realizadas as avaliações (FIGURA 2).

Figura 2 – Fotossíntese (A - A), concentração de CO_2 na câmara subestomática (C_i - B), a condutância estomática (g_s - C) e a transpiração (E - D) ao longo do período de condução do experimento. Presença de letras maiúsculas nas colunas indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação e letras minúsculas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos em cada um dos tempos de avaliação. As barras de erro representam o erro padrão da média oriunda de quatro repetições.



Fonte: Do autor (2019).

Alterações na transpiração e na abertura estomática ocorrem devido a alterações ambientais, como temperatura, concentração de CO₂, intensidade luminosa e devido a alterações hormonais (CASSON; GRAY, 2008; ZANDALINAS et al., 2018). Com relação à luz, os fatores que se destacam são intensidade e a qualidade (comprimento de onda), sendo que o fotoperíodo pouco interfere nessa variável e, conseqüentemente, na transpiração (FIGURA 2D).

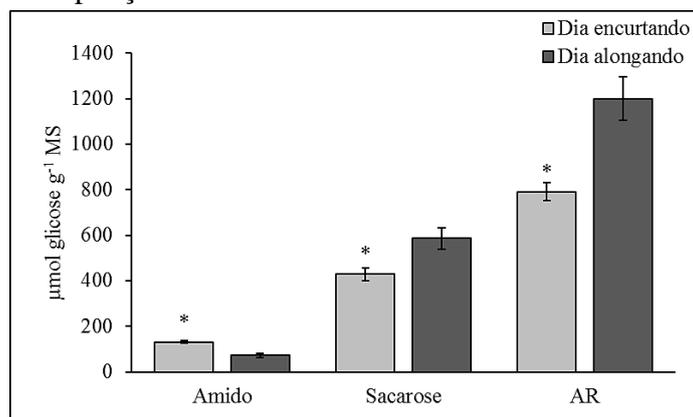
No ambiente, a redução no tempo total de luz diária (dia encurtando) é capaz de causar um decréscimo da fotossíntese, em diversas espécies de plantas, antes mesmo do pico de temperatura do ar (BAUERLE et al., 2012). Dessa maneira uma redução da assimilação líquida de CO₂ devido à redução do comprimento do dia pode limitar o ganho de carbono (BAUERLE et al., 2012), alterar o teor de nitrogênio nas folhas (OLLINGER et al., 2008; HALE et al., 2017), o que leva a uma alteração do metabolismo primário, desencadeando mudanças no crescimento e desenvolvimento das plantas.

3.2 O fotoperíodo altera os teores de carboidratos em cana-de-açúcar

Em cana-de-açúcar, a produção de carboidratos se torna ineficiente quando o comprimento do dia é menor do que dez horas de luz (RANGANATHAN, 2016). Os resultados apresentados demonstram uma correlação positiva direta entre o metabolismo de carboidratos e a fotossíntese (APÊNDICE A), com o um decréscimo da fotossíntese (FIGURA 2A) e do teor de sacarose e açúcares redutores (FIGURA 3) no tratamento com redução do comprimento do dia. Ou seja, a redução do comprimento do dia provoca uma redução na assimilação líquida de CO₂ e, conseqüentemente, uma redução dos teores de sacarose e açúcares redutores.

Ao final do período de imposição dos tratamentos, a redução do comprimento do dia levou a um incremento do teor de amido e uma redução dos teores de sacarose e açúcares redutores em comparação ao aumento do comprimento do dia (FIGURA 3). As reações de síntese de amido e sacarose são competidoras, portanto, seus teores dependem de reações inversas (MACNEILL et al., 2017; THALMANN; SANTELIA, 2017), ou seja, uma redução da quantidade de sacarose em condições de dias encurtando pode ser devido a um aumento da síntese de amido.

Figura 3 – Teores de amido, sacarose e açúcares redutores (AR) ao final do período de condução do experimento. * indica a diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. As barras de erro representam o erro padrão entre da média oriunda de quatro repetições.



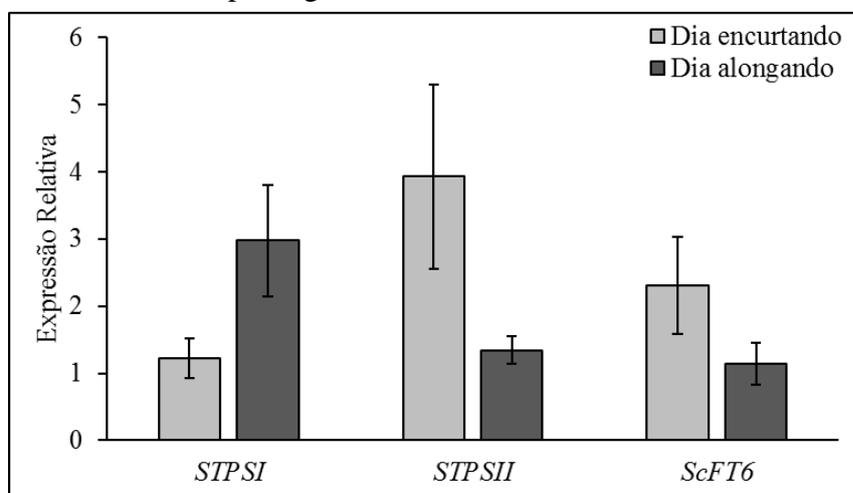
Fonte: Do autor (2019).

A redução na quantidade de sacarose em condições de redução do comprimento do dia pode ser indicativa de remobilização desse metabólito para regiões dreno da planta, incluído o meristema apical de parte aérea, que poderá dar origem ao meristema de inflorescência através da indução floral. Tal alteração, levando possivelmente a um aumento dos teores de sacarose na seiva do floema e açúcares solúveis no meristema apical da parte aérea, ocorre de acordo com a indução floral via fotoperíodo em plantas de dia curto e plantas de dia longo (CHO et al., 2018; ORTIZ-MARCHENA et al., 2014). É possível que um maior teor de amido, observado em condições de dia encurtando, contribui com um maior fornecimento de energia para a manutenção celular e de esqueletos de carbono estruturais para o crescimento durante a noite.

3.3 A expressão de *STPSI*, *STPSII* e *ScFT6* é alterada pelo fotoperíodo

Assim como a maioria das variáveis analisadas, a expressão relativa dos genes *STPSI*, *STPSII* e *ScFT6* variou em função da alteração no comprimento do dia (FIGURA 4). O gene *STPSI* é mais expresso quando o dia está alongando, já os genes *STPSII* e *ScFT6* são mais expressos em condições de encurtamento do dia. Contraditório ao que foi relatado por Blazquez et al. (1998), em *A. thaliana*, a expressão de *STPSI* em cana-de-açúcar não é constitutiva, sendo alterada pelo comprimento do dia (FIGURA 4) e por condições de estresse hídrico (JUNIOR et al., 2013).

Figura 4 – Perfil da expressão relativa por RT-qPCR dos genes *STPSI*, *STPSII* e *ScFT6* em folhas de cana-de-açúcar. As barras representam a diferença na expressão entre as duas condições de fotoperíodo em relação a uma amostra normalizadora (dia encurtando para o *STPSI* e dia alongando para os demais genes). Os valores de expressão em cada tratamento foram obtidos a partir de quatro repetições biológicas e as barras de erro representam o erro padrão entre elas. Os valores de expressão foram normalizados pelos genes de referência *GAPDH* e *eEF1a*.



Fonte: Do autor (2019).

Em *A. thaliana*, *TPSI*, pertencente a classe I, é comprovadamente essencial para que a transição para que o florescimento ocorra, possivelmente através do fornecimento de T6P (VAN DIJKEN; SCHLUEPMANN; SMEEKENS, 2004). Porém, em cana-de-açúcar, *STPSII*, pertencente a classe II, tem sua expressão aumentada em condições de fotoperíodo indutivo (FIGURA 4), e, possivelmente está relacionada ao florescimento dessa planta. Não está descartado o envolvimento de *STPSI* com o florescimento da cana-de-açúcar, pois em outras espécies há relatos de sua atuação sobre a expressão de genes envolvidos na indução e genes de identidade de órgãos florais no meristema apical de parte aérea (WAHL et al., 2013).

O aumento da expressão do gene *ScFT6* em condições de dias encurtando (FIGURA 4) é mais um indicativo de sua função como indutor do florescimento. Seus homólogos em outras espécies, como *A. thaliana*, arroz e sorgo, apresentam comportamento semelhante, ou seja, são expressos em condições indutivas de fotoperíodo (LIN et al., 2007; TAMAKI et al., 2007; WOLABU et al., 2016).

As análises de correlação (Material Suplementar) demonstraram haver correlação positiva ($R^2 > 70\%$) entre a expressão de *STPSI*, os níveis de açúcares redutores, a taxa fotossintética, a condutância estomática e a transpiração, já para sacarose não houve tal correlação. Em *A. thaliana* o silenciamento da expressão de *TPSI* promove um atraso do florescimento, uma redução dos níveis de T6P e um aumento nos níveis de sacarose das

plantas mutantes (WAHL et al., 2013), indicando assim, que possivelmente os níveis de sacarose intrinsecamente não tem correlação direta com o florescimento dessas plantas.

A expressão do gene *STPSII* se correlacionou positivamente apenas com o teor de amido. O controle da degradação de amido tem sua regulação vinculada ao fotoperíodo e ao relógio circadiano (GRAF et al., 2010). Uma vez que a classe II dos genes *TPS*, onde está incluso o gene *STPSII* (JUNIOR et al., 2013), possui função reguladora e é regulada pelo *status* de carbono na planta a correlação positiva entre amido e a expressão de *STPSII* pode ser devido a função de *STPSII* no controle da degradação de amido em cana-de-açúcar via sinalização fotoperiódica.

A expressão do gene *ScFT6* não se correlacionou com nenhuma das variáveis analisadas nesse experimento (APÊNDICE B). Alguns trabalhos demonstram uma relação entre a expressão de *FTs* com o metabolismo de carboidratos, principalmente com a trealose e seus intermediários (MOGHADDAM; ENDE, 2013; WAHL et al., 2013). Porém, o *FT* é primordialmente um intermediário da via de sinalização fotoperiódica do florescimento, sua expressão é controlada pelo ritmo circadiano através da coincidência entre a expressão de homólogos dos genes *CO* e *FT* em diversas espécies de dicotiledôneas (JANSSON; DOUGLAS, 2007; KOORNNEEF; MEINKE, 2010; SRIKANTH; SCHMID, 2011) e monocotiledôneas (COLASANTI; CONEVA, 2009; DISTELFELD; LI; DUBCOVSKY, 2009). Dessa maneira, sua relação com o metabolismo de carboidratos e com a sacarose não é essencial para indução do florescimento. Ademais, há a possibilidade de que um outro homólogo do *FT*, ainda não caracterizado, possa fazer essa interação entre metabolismo de carboidratos e o florescimento em cana-de-açúcar.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações no fotoperíodo, ou seja, redução ou aumento do comprimento do dia, promovem alterações metabólicas em cana-de-açúcar. A redução do comprimento do dia, responsável pela indução do florescimento em cana-de-açúcar pela via fotoperiódica, promove aumento na expressão do possível indutor do florescimento *ScFT6*, além de promover o aumento da expressão de *STPSII*, um sinalizador do *status* de carbono da planta. O gene *ScFT6* não tem sua expressão correlacionada a níveis de carboidrato das plantas de cana-de-açúcar e possivelmente ele atue na indução do florescimento exclusivamente pela transmissão do sinal luminoso.

REFERÊNCIAL

ARALDI, R. et al. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 694–702, 2010.

BAUERLE, W. L. et al. Photoperiodic regulation of the seasonal pattern of photosynthetic capacity and the implications for carbon cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 109, n. 22, p. 8612–8617, 2012.

BLAZQUEZ, M. A. et al. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 13, n. 5, p. 685–689, 1998.

CAPUTO, M. M. et al. Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana-de-açúcar sob reguladores vegetais. **Interciencia**: Santiago, v. 32, n. 12, p. 834–840, 2007.

CASSON, S.; GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. **New Phytologist**: London, v. 178, n. 1, p. 9–23, 2008.

CHO, L.-H. et al. Roles of sugars in controlling flowering time. **Journal of Plant Biology**: Berlin, v. 61, n. 3, p. 121–130, 2018.

CLEMENTS, H. F.; AWADA, M. **Experiments on the artificial induction of flowering in sugarcane**. Amsterdam: Proceedings - International Society of Sugar Cane Technologists, 1967.

COELHO, C. P. et al. Putative sugarcane *FT/TFL1* genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 5, p. 221, 2014.

COLASANTI, J.; CONEVA, V. Mechanisms of floral induction in grasses: something borrowed, something new. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 149, n. 1, p. 56–62, 2009.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 9, n. 7, p. 1211–1223, 1997.

DAROS, E. et al. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba: Ridesa, 2010.

DISCHE, Z. **Methods in carbohydrate chemistry**. 8 ed. ed. New York: Academic Press, 1962.

DISTELFELD, A.; LI, C.; DUBCOVSKY, J. Regulation of flowering in temperate cereals. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 12, n. 2, p. 178–184, 2009.

EFE, C.; STRAATHOF, A. J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M. **Technical and economical feasibility of production of ethanol from sugar cane and sugar cane bagasse**. Delft: Delft

University of Technology, 2005. 374 p.

GRAF, A. et al. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 107, n. 20, p. 9458–9463, 2010.

GREENHAM, K.; MCCLUNG, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 16, n. 10, p. 598, 2015.

HALE, A. L. et al. Effect of growing media and fertilization on sugarcane flowering under artificial photoperiod. **PloS ONE**: Cambridge, v. 12, n. 8, p. e0181639, 2017.

HARMER, S. L. et al. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. **Science**: New York, v. 290, n. 5499, p. 2110–2113, 2000.

HARTHILL, J. E. et al. Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 47, n. 2, p. 211–223, 2006.

JANSSON, S.; DOUGLAS, C. J. Populus: a model system for plant biology. **Annu. Rev. Plant Biol.**: Palo Alto, v. 58, p. 435–458, 2007.

JIN, S. et al. Flowering locus T has higher protein mobility than twin sister of *FT*. **Journal of Experimental Botany**: Palo Alto, v. 66, n. 20, p. 6109–6117, 2015.

JUNIOR, N. N. et al. Expression analysis of two genes coding for trehalose-6-phosphate synthase (TPS), in sugarcane (*Saccharum* spp.) under water stress. **American Journal of Plant Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 4, n. 12, p. 91, 2013.

KOJIMA, S. et al. *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hdl* under short-day conditions. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 43, n. 10, p. 1096–1105, 2002.

KOMIYA, R. et al. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. **Development**: Cambridge, v. 135, n. 4, p. 767–774, 2008.

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 61, n. 6, p. 909–921, 2010.

LI, C.; DUBCOVSKY, J. Wheat *FT* protein regulates *VRN1* transcription through interactions with *FDL2*. **The Plant Journal**: Hoboken, v. 55, n. 4, p. 543–554, 2008.

LIN, M.-K. et al. *FLOWERING LOCUS T* protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 19, n. 5, p. 1488–1506, 2007.

LING, H. et al. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PloS ONE**: Cambridge, v. 9, n. 5, p. e97469, 2014.

LUNN, J. E. et al. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox

- activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical Journal**: London, v. 397, n. 1, p. 139–148, 2006.
- MACNEILL, G. J. et al. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. **Journal of Experimental Botany**: Palo Alto, v. 68, n. 16, p. 4433–4453, 2017.
- MCWATTERS, H. G.; DEVLIN, P. F. Timing in plants – a rhythmic arrangement. **FEBS letters**: Heidelberg, v. 585, n. 10, p. 1474–1484, 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**: Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOGHADDAM, M. R. B.; ENDE, W. VAN DEN. Sugars, the clock and transition to flowering. **Frontiers in plant science**: Lausanne, v. 4, p. 22, 2013.
- MOORE, P. H. **Physiology and control of flowering**. Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop. **Anais...Copersucar Brazil**, 1987
- MOORE, P. H.; NUSS, K. J. Flowering and flower synchronization. **Developments in Crop Science**: [S.l.: s.n.], v. 11, p. 273–311, 1987.
- OLIVEIRA, A. F. DE M. et al. Competitividade internacional das exposições de açúcar no período de 1991-2014. **FACEF Pesquisa-Desenvolvimento e Gestão**: Franca, v. 20, n. 1, p. 75–88, 2018.
- OLIVEIRA, A. J. et al. **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA-SEA, 1991.
- OLLINGER, S. V et al. Canopy nitrogen, carbon assimilation, and albedo in temperate and boreal forests: Functional relations and potential climate feedbacks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 105, n. 49, p. 19335–19340, 2008.
- ORTIZ-MARCHENA, M. I. et al. Photoperiodic control of carbon distribution during the floral transition in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 26, n. 2, p. 565–584, 2014.
- PAUL, M. J. et al. Trehalose metabolism and signaling. **Annu. Rev. Plant Biol.**: Palo Alto, v. 59, p. 417–441, 2008.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**: London, v. 29, n. 9, p. 16–21, 2001.
- PIN, P. A.; NILSSON, O. The multifaceted roles of *FLOWERING LOCUS T* in plant development. **Plant, cell & environment**: Malden, v. 35, n. 10, p. 1742–1755, 2012.
- RANGANATHAN, V. Chasing the Theoretical Limits of Productivity in Sugarcane (*Saccharum* Spp.). **Indian Journal of Plant and Soil**: [S.l.: s.n.], v. 3, n. 1, p. 41, 2016.
- RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency : linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**: London, v. 37, n. 6, p. 1–12, 2009.

SRIKANTH, A.; SCHMID, M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. **Cellular and molecular life sciences**: [S.l.: s.n.], v. 68, n. 12, p. 2013–2037, 2011.

TAMAKI, S. et al. *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. **Science**: New York, v. 316, n. 5827, p. 1033–1036, 2007.

TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 13, n. 2, p. 206–212, 2010.

THALMANN, M.; SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**: London, v. 214, n. 3, p. 943–951, 2017.

VAN DIJKEN, A. J. H.; SCHLUEPMANN, H.; SMEEKENS, S. C. M. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. **Plant physiology**: [S.l.: s.n.], v. 135, n. 2, p. 969–977, 2004.

VAN DILLEWIJN, C. **Botany of Sugarcane**. New York: Stechert-Hafner, 1952.

WAHL, V. et al. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Science**: New York, v. 339, n. 6120, p. 704–707, 2013.

WOLABU, T. W. et al. Three *FLOWERING LOCUS T*-like genes function as potential florigens and mediate photoperiod response in sorghum. **New Phytologist**: London, v. 210, n. 3, p. 946–959, 2016.

ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**: Malden, v. 162, n. 1, p. 2–12, 2018.

APÊNDICE A – Protocolo de extração de RNA Qiazol® com adaptações para cana-de-açúcar.

1. Adicionar 1 mL de Qiazol® para cada 100 mg de tecido macerado. Vortex de 30 segundos; Obs.: Adiciona o Qiazol, agita brevemente no vortex para que todo o tecido descongele com o Qiazol. Faz isso para todas as amostras a serem extraídas. Depois, vortex de 30 segundos para cada amostra.
 2. Deixe em temperatura ambiente por 5 minutos; Obs.: Os tubos devem ser mantidos deitados para aumentar a superfície de contato do Qiazol® com o tecido macerado.
 3. Adicionar 300 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Qiazol® e homogeneizar rigorosamente no vortex por 15 segundos; Obs.: Adicionar o clorofórmio e já homogeneizar.
 4. Deixar em temperatura ambiente por 3 minutos;
 5. Centrifugar por 15 minutos a 12000 g ou 12125,74 rpm a 4°C;
 6. Transferir o sobrenadante para novos tubos (1,5 mL), aproximadamente 300 µL; Obs.: Muito cuidado para não misturar as fases. Usar duas ponteiras para fazer a transferência do sobrenadante (ponteiras de 1000 e 200 µL).
 7. Adicionar 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de Qiazol®. Vortex rigoroso de 30 segundos; Obs.: Adicione e já promova o vortex de 30 segundos, amostra por amostra.
 8. Deixar em temperatura ambiente por 10 minutos;
 9. Centrifugar por 10 minutos a 12000 g ou 12125,74 rpm a 4°C;
 10. Aspirar o sobrenadante e descarta-lo; Obs.: O tubo deve ser virado em um béquer com cuidado para não remover o pellet junto com o conteúdo líquido.
 11. Adicionar 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Qiazol® e centrifugar por 10 minutos a 7500 g ou 9586 rpm a 4 °C;
 12. Remover completamente o sobrenadante, deixar secando por 15 minutos aproximadamente, até que o pellet esteja seco e ressuspender em 20 µL de água livre de RNase - água MiliQ autoclavada.
- Segunda lavagem
13. Adicionar 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de Qiazol®. Vortex rigoroso de 30 segundos; Obs.: Adicione já promova o vortex de 30 segundos, amostra por amostra.
 14. Deixar em temperatura ambiente por 10 minutos;
 15. Centrifugar por 10 minutos a 12000 g ou 12125,74 rpm a 4°C;
 16. Aspirar o sobrenadante e descarta-lo; Obs.: O tubo deve ser virado em um béquer com cuidado para não remover o pellet junto com o conteúdo líquido.
 17. Adicionar 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Qiazol® e centrifugar por 10 minutos a 7500 g ou 9586 rpm a 4 °C;
 18. Remover completamente o sobrenadante, deixar secando por 15 minutos aproximadamente, até que o pellet esteja seco e ressuspender em 20 µL de água livre de RNase - água MiliQ autoclavada.

APÊNDICE B – Análise da correlação linear simples com entre dados de trocas gasosas, amido, açúcares solúveis totais, sacarose, açúcares redutores e expressão dos genes *ScFT6*, *STPSI* e *STPSII* pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Variáveis*		Amido	Sacarose	AR	A	gs	Ci	E	<i>ScFT6</i>	<i>SPSI</i>	<i>SPSII</i>
Amido	R	1,00	-0,64	-0,60	-0,73	-0,60	0,24	-0,42	0,63	-0,49	0,73
	Teste t	p= ---	p=0,120	p=0,114	p=0,040	p=0,119	p=0,562	p=0,303	p=0,095	p=0,216	p=0,041
Sacarose	R	-0,64	1,00	0,91	0,83	0,53	-0,44	0,75	-0,32	0,71	-0,41
	Teste t	p=0,120	p= ---	p=0,005	p=0,021	p=0,223	p=0,327	p=0,050	p=0,485	p=0,075	p=0,361
AR	R	-0,60	0,91	1,00	0,81	0,40	-0,66	0,87	-0,24	0,71	-0,35
	Teste t	p=0,114	p= 0,005	p= ---	p=0,015	p=0,324	p=0,072	p=0,005	p=0,567	p=0,049	p=0,396
A	R	-0,73	0,83	0,81	1,00	0,86	-0,12	0,87	-0,42	0,94	-0,40
	Teste t	p=0,040	p=0,021	p=0,015	p= ---	p=0,006	p=0,769	p=0,005	p=0,300	p=0,000	p=0,330
gs	R	-0,60	0,53	0,40	0,86	1,00	0,39	0,61	-0,40	0,87	-0,26
	Teste t	p=0,119	p=0,223	p=0,324	p=0,006	p= ---	p=0,336	p=0,110	p=0,320	p=0,006	p=0,534
Ci	R	0,24	-0,44	-0,66	-0,12	0,39	1,00	-0,31	0,03	0,02	0,25
	Teste t	p=0,562	p=0,327	p=0,072	p=0,769	p=0,336	p= ---	p=0,451	p=0,947	p=0,959	p=0,545
E	R	-0,42	0,75	0,87	0,87	0,61	-0,31	1,00	-0,30	0,87	-0,09
	Teste t	p=0,303	p=0,050	p=0,005	p=0,005	p=0,110	p=0,451	p= ---	p=0,474	p=0,005	p=0,830
<i>ScFT6</i>	R	0,63	-0,32	-0,24	-0,42	-0,40	0,03	-0,30	1,00	-0,25	0,24
	Teste t	p=0,095	p=0,485	p=0,567	p=0,300	p=0,320	p=0,947	p=0,474	p= ---	p=0,543	p=0,573
<i>SPSI</i>	R	-0,49	0,71	0,71	0,94	0,87	0,02	0,87	-0,25	1,00	-0,17
	Teste t	p=0,216	p=0,075	p=0,049	p=0,000	p=0,006	p=0,959	p=0,005	p=0,543	p= ---	p=0,693
<i>SPSII</i>	R	0,73	-0,41	-0,35	-0,40	-0,26	0,25	-0,09	0,24	-0,17	1,00
	Teste t	p=0,041	p=0,361	p=0,396	p=0,330	p=0,534	p=0,545	p=0,830	p=0,573	p=0,693	p= ---

AR – Açúcar redutor

A – Fotossíntese

gs – Condutância estomática

Ci – Câmara substomática

E – Transpiração

R – Coeficiente de correlação

* - Valores grifados de vermelho indicam uma correlação significativa entre as variáveis.

Fonte: Do autor (2019).

CAPÍTULO 4 – PERSPECTIVAS FUTURAS

1 PERSPECTIVAS FUTURAS

O fotoperíodo é, para cana-de-açúcar, um dos principais fatores ambientais envolvidos na indução floral. Sua função está ligada a definição do momento em que o florescimento ocorre nessa espécie, sendo necessário um período de dias com comprimento inferiores a um fotoperíodo crítico para que ela floresça. Ademais, estudos demonstraram que, a cana-de-açúcar, exige um período de dias encurtando, associado a temperaturas abaixo de 32 °C, para emitir sua inflorescência.

A identificação e caracterização funcional de genes envolvidos no florescimento da cana-de-açúcar via fotoperíodo teve seu início com a identificação de alguns genes homólogos ao *FT* com possível função de repressão do florescimento. Com os trabalhos de sequenciamento de RNA da cana-de-açúcar foi possível desenvolver novas pesquisas buscando a identificação e caracterização de genes envolvidos na sua indução floral.

Foram identificados e caracterizados novos possíveis ortólogos do *FT* em cana-de-açúcar, o *ScFT6*, *ScFT7* e *ScFT8*. Entre esses, destacou-se o gene *ScFT6*, que apresentou características em sua sequência semelhante a outros genes envolvidos na indução floral de outras espécies, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas. Além do mais, sua expressão, semelhante a outros *FTs* indutores do florescimento encontrado em outras espécies, ocorre em folhas maduras e no meristema apical de parte aérea e é controlada pelo ritmo circadiano.

Foi caracterizada a relação entre a redução do comprimento do dia, responsável pela indução do florescimento em cana-de-açúcar pela via fotoperiódica, a expressão do gene *ScFT6* e o metabolismo de carboidratos. A redução do comprimento do dia promove aumento da expressão do possível indutor do florescimento *ScFT6*, além de promover o aumento da expressão de *STPSII*, um sinalizador do *status* de carbono da planta. No entanto, o gene *ScFT6* não tem sua expressão correlacionada a níveis de carboidrato das plantas de cana-de-açúcar. Dessa maneira, possivelmente, o gene *ScFT6* atue na indução floral da cana-de-açúcar exclusivamente pela transmissão do sinal luminoso, relacionado ao comprimento do dia.

Futuros trabalhos poderão focar na superexpressão do gene *ScFT6* de cana-de-açúcar em plantas modelo (*Setaria viridis* ou *A. thaliana*) visando confirmar sua função na indução floral. A identificação de possíveis ortólogos do gene *FD* já foi iniciada (dados não publicados), análises de interação (proteína-proteína via “*yeast two-hybrid*”) entre o *ScFT6* e *FDs* de cana-de-açúcar, permitirão a definição da ocorrência da formação do complexo *FT-FD*, característico da indução floral em diversas espécies. Uma outra linha é dar continuidade aos experimentos com cana-de-açúcar em ambiente controlado (fotoperíodo e temperatura)

visando obter material para realização de análises de RNA-seq afim de gerar informações completas do transcriptoma de cana-de-açúcar nessas condições e assim identificar todos os genes que tem sua expressão alterada por esses fatores ambientais. Nesse sentido será possível identificar redes de co-expressão entre vias metabólicas e de sinalização envolvidas na indução floral de cana-de-açúcar.