



MANOEL VIANA LINHARES NETO

**FISIOLOGIA METABÓLICA E SINALIZAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DA CANA-DE-
AÇÚCAR SOB A INFLUÊNCIA DE PIRACLOSTROBINA**

**LAVRAS-MG
2020**

MANOEL VIANA LINHARES NETO

**FISIOLOGIA METABÓLICA E SINALIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO
REPRODUTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB A INFLUÊNCIA DE
PIRACLOSTROBINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em fisiologia do crescimento e desenvolvimento vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Antonio Chalfun Júnior, PhD.

**LAVRAS-MG
2020**

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

Linhares Neto, Manoel Viana.

Fisiologia metabólica e sinalização no desenvolvimento reprodutivo da cana-de-açúcar sob a influência de piraclostrobina / Manoel Viana Linhares Neto. - 2020.

108 p. : il.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Potencial de Rendimento. 2. Florescimento. 3. RNA-seq. I. Chalfun Júnior, Antonio. II. Título.

MANOEL VIANA LINHARES NETO

**FISIOLOGIA METABÓLICA E SINALIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO
REPRODUTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB A INFLUÊNCIA DE
PIRACLOSTROBINA**

**METABOLIC PHYSIOLOGY AND SIGNALING IN THE REPRODUCTIVE
DEVELOPMENT OF SUGARCANE UNDER THE INFLUENCE OF
PYRACLOSTROBIN**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em fisiologia do crescimento e desenvolvimento vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 12 de março de 2020

Antonio Chalfun Júnior, PhD.

Dra. Elisa Monteze Bicalho

Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori

Dr. Eduardo Alves

MBA/M.e. Daniel Medeiros

Prof. Antonio Chalfun Júnior, PhD.

Orientador

**LAVRAS-MG
2020**

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Chalfun Júnior por toda a dedicação, ajuda e confiança a mim depositada.

Aos meus pais, Silvinha e Sérgio, e minha avó, Sônia, pela inspiração, educação, compreensão, dedicação, pelo apoio, pelos incentivos, ensinamentos e por contribuírem de tantas outras maneiras.

À Jéssica, por toda ajuda e apoio, por estar sempre presente, mesmo distante, companheira especial de todas as horas.

Aos meus irmãos Raissa e Ricardo e aos meus tios Genário, Nino, Horácio, Luciano, Fátima Nazaré.

Ao Farley Santana, ao Murilo Della Torre, ao Dawyson Lima, ao Pedro Schumaker, ao Thales Cherubino, ao Daniel Amorin, à Beatriz Costa, à Kaunne Kelen, à Andrea Jaramillo, à Antônia, ao Paulo Cassio e muitos outros que me ajudaram e me acompanharam durante toda a trajetória.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas pela oportunidade de convivência e trabalho.

Aos Laboratórios de Ecofisiologia, de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas e de Fitopatologia (Microscopia Eletrônica) pela disponibilidade.

Ao Professor Paulo Marchirori por toda a ajuda e confiança.

Aos professores Eduardo Alvez, Elisa Monteze, Joao Paulo Barbosa e Letícia dos Anjos, pela ajuda sempre que necessário.

Ao sr. Joel e à sra. Salete, funcionários sempre atenciosos nas várias horas.

À empresa BASF pela parceria.

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das culturas agrícolas mais importantes, sendo fonte de produção industrial mundial tanto no setor alimentício como bioenergético. O florescimento afeta diretamente a sua produção, uma vez que, este processo consome a sacarose armazenada no colmo para o desenvolvimento de estruturas florais. Uma das estratégias na criação de novas tecnologias para ganhos de produção é o uso do fungicida piraclostrobina, o qual tem sido frequentemente relacionado com efeitos fisiológicos em plantas. Dados ainda sob análise, suportam a hipótese de que a piraclostrobina pode promover algum tipo de sinalização com a indução do florescimento, supostamente, via metabolismo de açúcares e do nitrogênio. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência da piraclostrobina nas respostas fotossintéticas e respiratórias, bem como na produção de óxido nítrico (NO), em cana-de-açúcar. Adicionalmente, objetivou-se avaliar as consequências desses efeitos no crescimento, desenvolvimento e florescimento a partir de análises de RNA-seq. Para tanto, foi executado um experimento com plantas cultivadas em vaso e outro experimento em condições de campo. No experimento em vaso foram avaliados parâmetros fotossintéticos, respiração, teores clorofilas e carotenoides, e produção de óxido nítrico. No experimento em campo, foi avaliado um novo sistema de manejo com intuito de otimizar e validar os efeitos no crescimento e desenvolvimento, e sobre o florescimento. Em adição, os dados foram investigados a partir da análise do transcriptoma de plantas com e sem aplicação de piraclostrobina. Os resultados mostraram que plantas de cana-de-açúcar, submetidas ao tratamento com piraclostrobina, apresentaram melhores respostas ao aumento da radiação luminosa. Verificou-se aumentos tanto na respiração como nos teores de pigmentos fotossintéticos. A produção de NO foi incrementada nas folhas de plantas tratadas. As variáveis analisadas tiveram respostas totalmente diferentes com o tratamento. Em campo, as plantas tiveram aumento do colmo, em altura e diâmetro, apresentaram redução da isoporização, prolongamento da fase de crescimento vegetativo e incremento da produtividade final. Dados qualitativos da visualização da região meristemática mostraram que o modelo de manejo com 3 aplicações de piraclostrobina tem potencial pra inibir o florescimento da cana-de-açúcar. As análises de RNA-seq sugerem que a piraclostrobina está envolvida na regulação contra estresses, em mecanismos de tolerância térmica ligados à produção vegetal, em mecanismos fotossintéticos regulatórios, em impactos nas relações fonte-dreno, sinalização cloroplastídica e mitocondrial, e regulação na indução do florescimento.

Palavras-Chave: Potencial de Rendimento; Florescimento; RNA-seq.

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the most important crops, being a source of worldwide industrial production in both the food and bioenergy sectors. Flowering directly affects its production, since this process consumes sucrose stored in the stem for the development of floral structures. One of the strategies in the creation of new technologies for production gains is the use of the fungicide pyraclostrobin, which has often been related to physiological effects on plants. Data still under analysis, support the hypothesis that pyraclostrobin can promote some type of signaling with the induction of flowering, supposedly, via sugar and nitrogen metabolism. In this sense, the objective of this work was to investigate the influence of pyraclostrobin on photosynthetic and respiratory responses, as well as on the production of nitric oxide (NO), in sugarcane. Additionally, the objective was to evaluate the consequences of these effects on growth, development, and flowering based on RNA-seq analyzes. For that, an experiment was carried out with plants grown in a pot and another experiment under field conditions. In the pot experiment, photosynthetic parameters, respiration, chlorophyll, and carotenoid contents, and nitric oxide production were evaluated. In the field experiment, a new management system was evaluated to optimize and validate the effects on growth and development, and flowering. Also, the data were investigated from the analysis of the plant transcriptome with and without the application of pyraclostrobin. The results showed that sugarcane plants, submitted to treatment with pyraclostrobin, showed faster responses to the increase in light radiation. There were increases both in respiration and in the levels of photosynthetic pigments. NO production was increased in the leaves of treated plants. The analyzed variables had different responses with treatment. In the field, the plants had an increase in the diameter and height of the stalk, showed a reduction in the pith process, an extension of the vegetative growth phase and an increase in the final productivity. Qualitative data from the visualization of the meristematic region showed that the model of 3 applications of pyraclostrobin has the potential to inhibit the flowering of sugar cane. RNA-seq analyzes suggest that pyraclostrobin is involved in stress regulation, in thermal tolerance mechanisms linked to plant production, in photosynthetic regulatory mechanisms, in impacts on source-drain relationships, chloroplast and mitochondrial signaling, and regulation in the flowering induction.

Keywords: Yield Potential; Flowering; RNA-seq.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do modelo convencional de aplicação de produtos à base de piraclostrobina. Duas aplicações de Ópera[®] ou Orkestra[®] são, geralmente, recomendadas em intervalos de 20 a 30 dias, sendo uma delas para prevenção fitossanitária e a outra para o ganho de produtividade. Uma aplicação de Comet[®] pode ser incluída, sendo realizada durante o pré-plantio. Fonte: BASF. 22

Figura 2 – Área experimental localizada na fazenda Santo Inácio de Jaborandi, no município de Campo Florido, MG. Barra = 50 m. 32

Figura 3 – Representação da área experimental ilustrando as parcelas (T1, T2, T3, T4 e T5) e as subparcelas as quais representam o número de aplicações de cada tratamento (1Ap, 2Ap, 3Ap). T1: controle (água); T2: BAS751; T3: Ativun[®]; T4: Orkestra[®]; T5: Opera[®]. Pontos vermelhos representam a touceira mantida como unidade experimental. Para cada tipo de análise, foram selecionadas 4 touceiras independentes adjacentes umas das outras. Linhas amarelas representam a bordadura. 34

Figura 4 – Assimilação de CO₂ (A) em função da variação do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (I), em plantas de cana-de-açúcar submetidas à aplicação de piraclostrobina (Comet[®]). Linha e quadrados vermelhos representam plantas com piraclostrobina; Linha e pontos pretos representam plantas controle. * indica diferença significativa pelo teste-t para amostras independentes com equivalência de variâncias ($p \leq 0,05$). 40

Figura 5 – Estimativas de parâmetros de desempenho fotossintéticos em plantas de cana-de-açúcar submetidas à aplicação de Piraclostrobina. $P_{N(I_{max})}$: Máxima fotossíntese obtida em $I = I_{max}$; P_{gmax} : fotossíntese bruta máxima; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II. * Indica diferença significativa pelo Teste-t para amostras independentes com equivalência variâncias ($p \leq 0,05$); n = 8. 41

Figura 6 – Respiração diurna estimada a partir das curvas de respostas à luz, e respiração durante à na madrugada, em plantas de cana-de-açúcar submetidas à aplicação de Piraclostrobina R_D : Respiração no escuro. * Indica diferença significativa pelo Teste-t para amostras independentes com variâncias equivalentes ($p \leq 0,05$). 42

Figura 7 – Teor de pigmentos fotossintéticos das folhas de plantas de cana-de-açúcar submetidas à aplicação de piraclostrobina (Comet[®]). C: plantas controle; P: plantas tratadas com piraclostrobina; d: dias passados após a aplicação. Dados expressos em µg por g de matéria fresca. Letras maiúsculas comparam os tratamentos ao longo do tempo e letras minúsculas comparam entre os tratamentos em cada tempo. Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey(HSD) ($p \leq 0,05$); n = 4. 43

Figura 8 – Fotomicrografias da fluorescência do óxido nítrico (NO) em folha de cana-de-açúcar com e sem aplicação de piraclostrobina (Comet[®]). A fluorescência verde é emitida pela reação química entre NO intracelular e DAF-2A aplicado *in situ*. Cada imagem está representada pela vista superior de segmentos da face adaxial foliar de regiões semelhantes entre si. A, C, E: plantas controle; B, D, F: plantas com piraclostrobina. A/B: plantas com 5 dias; C/D plantas com 15 dias; E/F: plantas com 15 dias; n = 4. 45

Figura 9 – Fotomicrografias da fluorescência do óxido nítrico (NO) no meristema apical da parte aérea de cana-de-açúcar com e sem aplicação de piraclostrobina (Comet[®]). A fluorescência verde é emitida pela reação química entre NO intracelular e DAF-2A aplicado *in situ*. Cada imagem está representada pela vista da seção longitudinal de regiões semelhantes do meristema apical. A linha tracejada vermelha indica a delimitação da zona meristemática A, C, E: plantas controle; B, D, F: plantas com piraclostrobina. A/B: plantas com 5 dias; C/D plantas com 15 dias; E/F: plantas com 15 dias; n = 4. 46

Figura 10 – Fluorescência relativa da reação química entre DAF-2A e óxido nítrico intracelular, em folhas de cana-de-açúcar. Médias nas colunas representam a fluorescência quantificada em porcentagem de pixels, a partir de fotomicrografias obtidas por epifluorescência e analisadas por ImageJ. C: plantas controle. P: plantas com piraclostrobina (Comet[®]). d: número de dias passados após a aplicação. Letras maiúsculas nas colunas comparam os tratamentos ao longo do tempo e letras minúsculas comparam entre os tratamentos em cada tempo. Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon - Mann Whitney ($p < 0,05$). 47

Figura 11 – Fluorescência relativa da reação química entre DAF-2A e óxido nítrico intracelular, em meristemas apicais da parte aérea de cana-de-açúcar. Médias nas colunas representam a fluorescência quantificada em porcentagem de pixels, a partir de fotomicrografias obtidas por epifluorescência e analisadas por ImageJ. C: plantas controle. P: plantas com piraclostrobina (Comet[®]). Médias nas colunas representam a fluorescência verde quantificada em porcentagem de pixels. d: número de dias passados após a aplicação. Letras maiúsculas nas colunas comparam os tratamentos ao longo do tempo e letras minúsculas comparam entre os tratamentos em cada tempo. Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon - Mann Whitney ($p \leq 0,05$). 47

Figura 12 – Análise de correlação e mapa de calor representado a intensidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar sem tratamento com piraclostrobina. T1: plantas sem aplicação de piraclostrobina; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Corr: código de cores em indica variação gradativa do índice de correlação de Pearson. 48

Figura 13 – Análise de correlação e mapa de calor representado a intensidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar com tratamento com piraclostrobina. T2: plantas com piraclostrobina; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Corr: código de cores em indica variação gradativa do índice de correlação de Pearson. 49

Figura 14 – Análise de componentes principais integrada ao cálculo de cosseno quadrado, representado a intensidade variabilidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar sem aplicação de piraclostrobina. T1: plantas controle; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Dim1: Dimensão 1; Dim2: Dimensão 2; cos2: código de cores indicando a variação gradativa do coeficiente de correlação dado pelo cosseno quadrado do ângulo dos vetores, mostrando o impacto da contribuição das variáveis em uma escala de 0 a 1. 51

Figura 15 – Análise de componentes principais integrada ao cálculo de cosseno quadrado, representado a intensidade variabilidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar com aplicação de piraclostrobina. T2 plantas com piraclostrobina; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Dim1: Dimensão 1; Dim2: Dimensão 2; cos2: código de cores indicando a variação gradativa do coeficiente de correlação dado pelo cosseno quadrado do ângulo dos vetores, mostrando o impacto da contribuição das variáveis em uma escala de 0 a 1. 52

Figura 16 – Diâmetro médio do colmo de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina. As colunas representam a média geral, de plantas com 1, 2 e 3 aplicações de cada tratamento. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação dos tratamentos no mês de abril de 2018. Colheita representa as avaliações realizadas no momento antes da colheita, no mês de setembro de 2018. Letras minúsculas nas colunas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).54

Figura 17 – Diâmetro do colmo de plantas da cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetida a diferentes doses de aplicação de produtos à base de piraclostrobina. Valores nas colunas representam a média geral das alturas das plantas sob aplicação de todos os produtos. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação.55

Figura 18 – Altura do colmo de plantas de cana (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina. As colunas representam a média geral, de plantas com 1, 2 e 3 aplicações de cada tratamento. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação dos tratamentos realizada no mês de abril de 2018. Colheita representa as avaliações realizadas no momento antes da colheita, no mês de setembro de 2018. Letras minúsculas diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). 56

Figura 19 – Altura de colmo da cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetida a diferentes doses de aplicação de produtos à base de piraclostrobina. Valores nas colunas representam a média geral das alturas das plantas sob aplicação de todos os produtos. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação, 60 dias após a 2ª aplicação e 90 dias após a aplicação dos produtos. 57

Figura 20 – Senescência foliar de plantas de cana (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina. As colunas no primeiro gráfico representam a média geral, de plantas com 1, 2 e 3 aplicações de cada tratamento. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação dos tratamentos, realizadas no mês de abril (2018). Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os produtos em cada nível de aplicação. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre cada produto dentro dos 3 níveis de aplicações ($p \leq 0,05$). 58

Figura 21 – Vista superior do canavial (cv. SP801842), safra 2017/2018 sem emissão de pendão floral. É possível observar diferenças na densidade de folhas verdes à esquerda (plantas sem aplicação) e do centro para direita plantas com aplicação. Barra = 10 m. 59

Figura 22 – Determinação do teor de açúcares solúveis a partir do °Brix (porcentagem em massa de sólidos solúveis contidos em uma solução de sacarose quimicamente pura) da base e do ápice do colmo. A linha tracejada indica o °Brix do colmo ideal para o corte da cana-de-açúcar (°Brix ≥ 18). A1: Plantas que receberam 1 aplicação; A2: Plantas que receberam 2 aplicações; A3: Plantas que receberam 3 aplicações. As medidas foram realizadas antes da colheita no mês de setembro do ano de 2018. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os

tratamentos para o entrenó da base e letras minúsculas entre os tratamentos para o entrenó do ápice ($p \leq 0,05$). 60

Figura 23 – Índice de maturação (IM) de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina. A1: Plantas que receberam 1 aplicação; A2: Plantas que receberam 2 aplicações; A3: Plantas que receberam 3 aplicações. As medidas foram realizadas previamente antes da colheita, no mês de setembro (2018). Letras maiúsculas nas colunas indicam diferença significativa entre o número de aplicações em cada tratamento. Valores médios (IM) representados pela relação entre entrenós da base (EB) e do ápice (EA). Letras minúsculas nas colunas indicam diferença significativa entre os produtos em cada nível de aplicação ($p \leq 0,05$). 61

Figura 24 – Isoporização de plantas de cana-de-açúcar (SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina. Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os produtos em todos os níveis de aplicação (1, 2 e 3 aplicações). 1A: Plantas que receberam 1 aplicação; 2A: Plantas que receberam 2 aplicações; 3A: Plantas que receberam 3 aplicações. 62

Figura 25 – Distribuição da isoporização ao longo da base, do meio e do ápice do colmo de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina. Dados expressos em porcentagem relativa de isoporização na base, no centro e no ápice do colmo.62

Figura 26 – Incremento do TCH (%) de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina, em relação às plantas sem aplicação. Diferença média para todos os produtos nos 3 níveis de aplicações (média das plantas com 1, 2 e 3 aplicações). 63

Figura 27 – Detalhe da região meristemática da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina. Corte longitudinal do ápice do colmo de plantas com 1, 2 e 3 aplicações dos produtos. Imagens obtidas previamente antes da colheita. Setas indicam a presença de “ponto de vela”, caracterizado como o início a emissão da inflorescência. 65

Figura 28 – Relação de similaridade das sequências obtidas do RNA-seq da folha de cana-de-açúcar preditas por meio do RefSeq (NCBI).66

Figura 29 – Mapa de calor de assinaturas moleculares e agrupamento hierárquico, indicando genes diferencialmente expressos, a partir das análises dos dados de RNA-seq, de folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de Piraclostrobina (Opera®). A cor gradiente purpura ao amarelo representa a proporção da variação de expressão gênica absoluta, em contagem por milhão (CPM). As anotações na parte superior do mapa de calor mostram o agrupamento das amostras (bibliotecas), as anotações na parte lateral mostram o agrupamento entre os genes. 67

Figura 30 – Representação da variabilidade da expressão gênica entre as amostras de cada tratamento. A cor gradiente purpura ao amarelo representa a proporção da variação de expressão gênica entre repetições dos tratamentos pelo coeficiente de correlação. As anotações na parte superior do mapa de calor mostram o agrupamento das amostras, as anotações na parte lateral mostram o agrupamento entre os genes. 68

Figura 31 – Expressão diferencial de genes em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de Piraclostrobina (Opera®), determinada a partir de análises de RNA-seq. Os genes que foram diferencialmente expressos significativamente são indicados em vermelho. Os dados são organizados ao longo das dimensões biológicas (dada em $-\log$ de Fold Change entre o controle e tratamento) e o valor de significância estatística em FDR ($n = 3$). O eixo x indica o impacto biológico da diferença de expressão, enquanto o eixo “y” indica o nível de expressão gênica em \log de Fold Change. 69

Figura 32 – Representação esquemática da magnitude da expressão diferencial de genes em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) tratadas com Piraclostrobina (Opera®). Os genes que foram diferencialmente expressos significativamente são indicados em vermelho. Os dados são organizados ao longo das dimensões biológicas (dada em $-\log$ de Fold Change entre o controle e tratamento) e o valor de significância estatística ($p < 0,05$) com base em FDR ($n = 3$). O eixo x indica o impacto biológico da diferença de expressão, enquanto o eixo y indica o nível de significância estatística da diferença de expressão.70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 A Cana-de-Açúcar: Potencial Energético e Desafios	18
2.2 O Potencial de Rendimento da Cana-de-Açúcar	20
2.3 A Piraclostrobina e o Aumento do Rendimento Vegetal	21
2.4 Sinalização Molecular e Metabólica do Florescimento	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Experimento I – Plantas cultivadas em vaso.....	27
3.1.1 Material Vegetal e Condições Experimentais	27
3.1.2 Aplicação de Piraclostrobina e Avaliações.....	27
3.1.3 Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos	28
3.1.4 Detecção de Óxido Nítrico e Microscopia de Epifluorescência	28
3.1.5 Análises Fotossintéticas.....	29
3.1.6 Delineamento Experimental	31
3.1.7 Análises Estatísticas dos Dados	31
3.2 Experimento II – Plantas em condições de campo	32
3.2.1 Material Vegetal e Área Experimental.....	32
3.2.2 Aplicação dos Produtos e Avaliações.....	33
3.2.3 Delineamento Experimental	34
3.2.4 Avaliações Biométricas.....	35
3.2.5 Determinação do TCH	35
3.2.6 Avaliação da Maturação	35
3.2.7 Avaliação da Isoporização	36
3.2.8 Análise Estatística dos Dados	36

3.2.9 Avaliação do Florescimento	36
3.2.10 Análises Moleculares	37
3.2.11 Análises de RNA-seq	38
4. RESULTADOS	40
4.1 Análises Fotossintéticas	40
4.2 Análises de Pigmentos Fotossintéticos	42
4.3 Análises de Epifluorescência e Teores de Óxido Nítrico	44
3.4 Análises de Correlação	48
4.5 Crescimento Vegetativo	53
4.5.1 Diâmetro do colmo	53
4.5.2 Altura do colmo	55
4.6 Senescência Foliar	57
4.7 Maturação	59
4.8 Isoporização	61
4.9 TCH	63
4.10 Florescimento	64
4.10 RNA-seq	66
5. DISCUSSÃO	72
5.1 Efeitos da piraclostrobina na eficiência fotossintética e no acúmulo de óxido nítrico	72
5.2 Manejo com piraclostrobina beneficia o crescimento e o desenvolvimento da cana-de- açúcar	76
5.3 Perspectivas sobre o florescimento e o manejo com piraclostrobina	78
5.4 Expressão diferencial por RNA-seq: uma visão holística de funcionalidades	79
5.4.1 A piraclostrobina está envolvida na regulação contra estresses	80
5.4.2 Mecanismos de tolerância térmica e repercussão na produção vegetal	81
5.4.3 Mecanismos fotossintéticos regulatórios	82

5.4.3 Impactos nas relações fonte-dreno.....	83
5.4.4 Sinalização mitocondrial e metabolismo de sacarose.....	84
5.4.5 Impactos sobre o florescimento.....	85
6. CONCLUSÕES.....	88
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
APÊNDICE A.....	103

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das principais culturas agrícolas mundiais, destacando-se como uma importante fonte de produção industrial nos setores alimentícios humano e animal, bem como no setor bioenergético. Devido ao grande destaque econômico e elevada capacidade biológica de produção, o cultivo da cana-de-açúcar tem sido alvo de estudos que buscam um melhor entendimento de seus mecanismos fisiológicos e moleculares no metabolismo e no desenvolvimento reprodutivo (WANG et al., 2013). Assim, muitas pesquisas são desenvolvidas com o objetivo de melhorar a produção de biomassa, visando o rendimento de matérias primas e seus subprodutos, especialmente para a sacarose e o etanol (DIAS et al., 2015; MANFREDI et al., 2018).

Um dos fatores que podem limitar o ganho de produtividade da cana-de-açúcar é o florescimento. O Brasil tem sua produção afetada diretamente por esse processo, apresentando condições ambientais favoráveis para a indução floral na maioria das regiões produtoras. O florescimento reduz a produtividade porque consome a sacarose armazenada no colmo para o desenvolvimento de estruturas florais. Entretanto, existem poucas alternativas tecnológicas que buscam regular o crescimento e o desenvolvimento reprodutivo, tais como maturadores e inibidores do florescimento (CRUSCIOL et al., 2017; LOZANO et al., 2018).

Vários cientistas têm buscado o desenvolvimento de culturas agrícolas bioenergéticas melhoradas (MATTIELLO et al., 2015). Ainda que a cana-de-açúcar seja uma das culturas energéticas mais eficiente, o seu desempenho metabólico ainda pode ser extrapolado ao se considerar os cálculos de capacidade de rendimentos teóricos (WACLAWOSKY et al., 2010; DIAS et al., 2015). Nesse sentido, uma estratégia que pode ser promissora para o aumento de produtividade da cana-de-açúcar é a utilização de produtos químicos à base de piraclostrobina.

Derivada da estrobilurina, uma substância natural isolada a partir de fungos do gênero *Strobilurus* (Physalacriaceae), a piraclostrobina é utilizada para a prevenção de doenças, como a antracnose (PESQUEIRA et al., 2016) e a ferrugem (MOURA et al., 2016), as quais afetam as mais diversas culturas. Nos fungos, essa substância age como inibidor da síntese de ATP, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, essencial para os processos metabólicos vitais (BECKER et al., 1981). Embora de modo incipiente, vários trabalhos já relacionaram o efeito desse fungicida com a fisiologia das plantas, promovendo a melhoria da produção em diferentes culturas agrícolas, com efeitos sobre a respiração, fotossíntese e assimilação de nitrogênio

(FAGAN et al., 2010; CAMPBELL et al., 2012; KANUNGO; JOSHIO, 2014; MA'RUF et al., 2016; LOPES et al., 2018).

Em cana-de-açúcar, pesquisas anteriores demonstraram que a aplicação de produtos à base de piraclostrobina repercutiram tanto em respostas metabólicas rápidas, como em respostas metabólicas e de crescimento a longo prazo. Isso foi verificado para o aumento no metabolismo de carboidratos e atividade de invertases, além de incrementos em nitrogênio e proteínas, em um período de 24 horas, em plantas sob aplicação (SMOZINSKY, 2017). A longo prazo, verificou-se respostas ao incremento da fotossíntese e de biomassa em toneladas por hectare, em plantas sob aplicação (LOPES et al., 2018). Em paralelo a isso, os estudos sobre o florescimento já forneceram evidências sobre uma possível influência da aplicação de piraclostrobina sobre genes ligados à indução e à repressão floral da cana-de-açúcar (SILVA, 2016). Nesse sentido, novas investigações no presente estudo buscaram compreender como as plantas respondem tão rápido ao metabolismo de carboidratos e nitrogênio, e como esses efeitos se revertem em parâmetros de crescimento e no florescimento.

Nesse contexto, foi estudada a hipótese de que a piraclostrobina incrementa a eficiência fotossintética rapidamente, devido ao aumento no metabolismo do nitrogênio, acarretando no acúmulo de açúcares e de óxido nítrico, o quais são sinalizadores na regulação do florescimento. Baseado nisso, acredita-se que a piraclostrobina desvia elétrons nas reações da fosforilação oxidativa mitocondrial na planta, tal como em fungos. Isso levaria à redução da produção de ATP e ao consequente aumento da atividade de oxidases alternativas. A redução do ATP poderia intensificar o ciclo dos ácidos tricarboxílicos na matriz, levando a uma maior entrada de malato em troca de fosfatos. Isto poderia equilibrar o pH da matriz e fornecer mais substratos para a síntese de 2-oxoglutarato, regulando positivamente a atividade da redutase do nitrato, o que aumentariam os níveis de óxido nítrico.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência da piraclostrobina nas respostas fotossintéticas e respiratórias, bem como na produção de óxido nítrico, em cana-de-açúcar. Adicionalmente, objetivou-se avaliar as repercussões dessa influência no crescimento, desenvolvimento e florescimento, em condições de campo, a partir da regulação molecular da piraclostrobina, por meio de análises de RNA-seq.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Cana-de-Açúcar: Potencial Energético e Desafios

O Brasil é o maior produtor de açúcar e etanol obtidos da cana-de-açúcar, os quais representam componentes significativos para a economia do país, a partir de uma área colhida estimada em 8,5 milhões de hectares (GOES et al., 2011; BIZZO et al., 2014; CONAB, 2020). Estimativas apontam que, o Brasil produzirá mais da metade do açúcar comercializado no mundo nos próximos anos. No ano de 2017, o país produziu cerca de 671 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com crescimento de 18% em relação ao ano de 2016. Neste cenário, a produção de açúcar deve alcançar em torno de 47,34 milhões de toneladas, com exportação de até 32,6 milhões de toneladas. Para o etanol, o país deve alcançar uma produção de 50 bilhões de litros e com exportação de cerca de 8,8 bilhões de litros (MAPA, 2018).

No Brasil, além, da agroindustrialização sucroalcooleira associada aos grandes produtores, a cultura da cana-de-açúcar contribui para a geração de renda, tanto para agricultura familiar, como para pequenos e médios produtores, que contam com incentivos financeiros nas esferas Estadual e Federal (CONAB, 2018; MAPA 2018). Atualmente, o cultivo de cana-de-açúcar ainda pode fazer parte da comercialização de créditos de carbono (VAI et al., 2011). Assim, a agroindústria canavieira nacional é tecnicamente qualificada e com bom potencial para o aumento da produção e atendimento da demanda de mercado nacional e internacional.

A crescente demanda global por energia renovável levou a uma grande expansão e intensificação do setor sucroalcooleiro na agricultura e na política de agroenergia do Brasil (BENTO et al., 2018; MAPA, 2018). Entretanto, acredita-se que não devam mais acontecer expansões descontroladas da fronteira agrícola da cana-de-açúcar, o que pode gerar uma limitação de áreas a serem plantadas, aliada à política nacional de meio ambiente e programas de conservação da vegetação nativa. Com isso, aumenta-se a necessidade de estudos para a otimização do potencial metabólico energético, bem como para o melhor aproveitamento da biomassa e das condições edafoclimáticas, e com isso, minimizando fatores limitantes da produtividade

A cana-de-açúcar, sendo uma planta de metabolismo C4, é uma das culturas agrícolas mais eficientes na conversão de energia solar em energia química (JANSSON et al., 2018; WANG et al., 2018). Com uma grande capacidade biológica para estocar sacarose no colmo, o

particionamento de carbono na cana é um processo crucial na distribuição da energia química convertida pela fotossíntese. O carbono fixado é convertido em açúcares, ou em seus derivados, nas células fotossinteticamente ativas, e posteriormente distribuído para tecidos drenos. Então, o açúcar produzido pode ser armazenado em vacúolos, ou remobilizado, ou direcionados à formação de biomassa estrutural (WANG et al., 2013).

As flutuações entre o armazenamento do açúcar e o seu direcionamento para biomassa estrutural no crescimento e desenvolvimento determinam o ponto ideal do estágio de maturação fisiológica e comercial da cana-de-açúcar. Alterar essas características metabólicas implica no uso de estratégias para melhorar o seu potencial de rendimento (WANG et al., 2013; PEREIRA et al., 2017). No entanto, atender à crescente demanda global, por biomassa vegetal para produção de alimentos e energia, sem impactos negativos ao meio ambiente e à economia, exigirá um aumento na produtividade das culturas entre 50-85% nas próximas décadas, sem a expansão da área de terras agrícolas (JANSSON et al., 2018). Nessa perspectiva, são necessárias pesquisas direcionadas ao melhoramento de características biológicas ligadas aos parâmetros de produtividade.

O melhoramento genético da cana-de-açúcar ainda enfrenta grandes dificuldades. A cana moderna se originou da hibridação interespecífica entre as espécies parentais *Saccharum officinarum* L. e *S. spontaneum* L. (silvestre). Em uma variedade típica, cerca de 80% dos cromossomos são herdados de *S. officinarum*, 15% de *S. spontaneum* e 5% são cromossomos recombinantes das duas espécies (AITKEN et al., 2016). Nesse contexto, a cana-de-açúcar apresenta alta poliploidia, aneuploidia e polimorfismo, tendo um genoma com tamanho representado por mais de 10 cópias, em torno de 10 gigabases ou 10^9 pares de bases de comprimento. Comparativamente, estima-se que o seu genoma seja seis vezes maior que o genoma humano e dez vezes maior que o genoma do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) que é uma cultura filogeneticamente muito próxima (BUTTERFIELD et al., 2001; AITKEN et al., 2016).

A complexidade de se trabalhar com o genoma da cana-de-açúcar limita o seu sequenciamento e os avanços da manipulação genética de suas variedades (BUTTERFIELD et al., 2001). Assim, o melhoramento clássico tem sido o único responsável pelo grande número de variedades de cana-de-açúcar liberadas nas últimas décadas, embora alguns esforços que explorem a modificação genética já tenham sido realizados (MATTIELO et al., 2015), como o desenvolvimento da primeira cana-de-açúcar transgênica resistente à broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) (CRISTOFOLETTI et al., 2018).

O melhoramento clássico e o manejo adequado já contribuíram para o aumento da eficiência de várias culturas, incluindo a cana-de-açúcar, por exemplo, na alta diversidade fenotípica para características bioenergéticas, acúmulo de biomassa, sistema radicular, arquitetura da planta e tolerância à seca (JACKSON, 2005; DAL-BIANCO et al., 2012; WACLAWOVSKY et al., 2010; DAROS et al 2017; SILVA et al, 2017). Entretanto, ainda existem outros parâmetros promissores para se atingir superávits na produtividade da cana-de-açúcar, uma vez que, a sua eficiência fotossintética ainda pode ser extrapolada, levando-se em conta os cálculos de rendimentos teóricos.

2.2 O Potencial de Rendimento da Cana-de-Açúcar

O rendimento de uma safra, considerando-se a captação de energia solar, é determinado pela exposição das plantas à luz durante a estação de crescimento e pela eficiência com que elas capturam energia, convertendo-a em açúcares e remobilizando esses açúcares em biomassa antes da colheita (JASSON et al., 2018). O potencial de rendimento (Y_p) pode ser expresso matematicamente a partir da equação $Y_p = Q \cdot \epsilon_i \cdot \epsilon_c \cdot \epsilon_p$. Em que, Y_p é a massa de material colhido por hectare de terra que um genótipo de uma cultura pode alcançar, em um determinado ambiente, desconsiderando-se estresses bióticos e abióticos; Q : é radiação solar recebida durante a estação de crescimento por uma unidade de área de terra; ϵ_i é a eficiência de interceptação de luz; ϵ_c é a eficiência de conversão de energia fotossintética; ϵ_p é a eficiência de particionamento, considerado como índice de colheita (LONG et al., 2015).

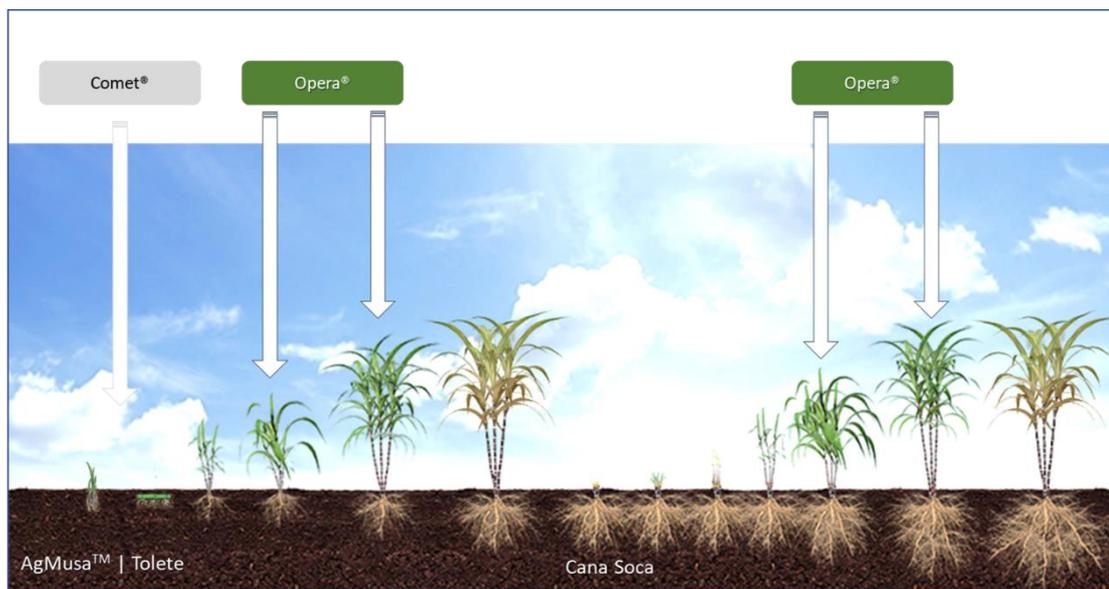
De fato, a eficiência de interceptação (ϵ_i) e de particionamento (ϵ_p) já estão próximos dos seus limites biológicos teóricos, não obstante, a eficiência de conversão (ϵ_c) é um componente promissor para o potencial de rendimento (ZHU et al., 2010; FERREIRA et al., 2015; WANG et al., 2018). Para uma planta C4, o limite teórico para converter a radiação solar total em biomassa é cerca de 6,0%, e os valores para conversão de radiação fotossinteticamente ativa são cerca de 12% (JANSSON et al., 2018). Nesse sentido, uma das estratégias tecnológicas, seguindo por essa abordagem do Y_p e alterando os componentes da equação de rendimento, seria um decorrente aumento do rendimento fotossintético. Por conseguinte, uma perspectiva em potencial seria manter o ponto de maturação ideal, em que a cana-de-açúcar permaneça por mais tempo em estágio vegetativo, retardando ou inibindo o seu desenvolvimento reprodutivo no período final de safra.

Uma das estratégias na criação de novas tecnologias para aumentar produtividade da cana-de-açúcar e prolongar o tempo de maturação pode ser a aplicação de Piraclostrobina. Nas últimas décadas, esse fungicida tem sido relacionado com aumentos de produção em algumas culturas, não apenas por sua ação fitossanitária preventiva, como também pelo possível “efeito fisiológico” em plantas (FAGAN et al., 2010; CAMPBELL et al., 2012; KANUNGO; JOSHIO, 2014; MA'RUF et al., 2016; LOPES et al., 2018) . Estas características podem estar ligadas a natureza química da molécula. Em sua essência, a Piraclostrobina age como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células fúngicas, interrompendo a transferência de elétrons no local de oxidação do quinol no complexo do citocromo-*bc1*, inibindo a síntese de ATP, que é essencial para o seu funcionamento metabólico normal (BECKER et al., 1981).

2.3 A Piraclostrobina e o Aumento do Rendimento Vegetal

A Piraclostrobina pertence ao grupo químico das Estrobilurinas e pode ser encontrada no mercado agrícola como Comet[®] (Piraclostrobina – 250 g L⁻¹), usado em cana-de-açúcar contra a ferrugem (*Puccinia melanocephala*). Pode ser encontrada na forma conjugada com outros grupos químicos, como Triazol no Opera[®] (Piraclostrobina – 133 g L⁻¹ e Epoxiconazol – 50 g L⁻¹) contra *P. melanocephala* e ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar (*Puccinia kuehnii*), bem como conjugada com Carboxamida no Orkestra[®] (Piraclostrobina – 333 g L⁻¹ e Fluxapiraxade – 167 g L⁻¹) contra *P. melanocephala*, *P. kuehnii* e podridão da coroa (*Ceratocystis paradoxa*). Ainda, em menor concentração, a Piraclostrobina está contida no Ativum[®] (Piraclostrobina 81 g L⁻¹, Epoxiconazol – 50 g L⁻¹ e Fluxapiraxade – 50 g L⁻¹), que é indicado para outras culturas (BASF, 2020). Geralmente, recomendam-se duas aplicações do produto, em intervalos de 20 a 30 dias (FIGURA 1).

Figura 1 - Representação esquemática do modelo convencional de aplicação de produtos à base de piraclostrobina.



Legenda: Duas aplicações de Ópera® ou Orkestra® são, geralmente, recomendadas em intervalos de 20 a 30 dias, sendo uma delas para prevenção fitossanitária e a outra para o ganho de produtividade. Uma aplicação de Comet® pode ser incluída, sendo realizada durante o pré-plantio; AgMusa™: sistema de mudas saudáveis, de alta qualidade, desenvolvido pela BASF. Fonte: BASF (2020).

Vários pesquisadores já inferiram sobre o efeito fisiológico dos produtos comerciais à base de Piraclostrobina, apresentando consequências positivas para a produtividade (CAMPBELL et al., 2012; KANUNGO; JOSHIO, 2014; MA'RUF et al., 2016). Dentre os seus efeitos, destacam-se o incremento da fotossíntese (BECK et al., 2002; BALBA, 2007), que é de grande importância para a cana-de-açúcar. Na cultura de soja, por exemplo, a aplicação de Piraclostrobina promove a redução da respiração, incremento da fotossíntese e da atividade da enzima redutase do nitrato, aumento da massa de grãos e produtividade final (FAGAN et al., 2010). Entretanto, para a cultura do milho (*Zea mays* L.) não se constataram efeitos na produtividade, mesmo sendo aplicada em diferentes épocas e combinações de aplicação (SCHUMACHER et al., 2017).

Na cana-de-açúcar, estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP), da Universidade Federal de Lavras, têm levado à hipótese de que a Piraclostrobina interfere no metabolismo de carbono da cana-de-açúcar. Foram verificadas alterações no teor de sacarose e na atividade das enzimas invertases ácida, invertases neutras e invertases da parede celular (SMOZINSKI, 2017), tal como no aumento da fotossíntese (LOPES et al., 2018). No crescimento, foi verificado um acentuado alongamento de colmos (LOPES, 2018) e aumento de TCH (tonelada de colmo/hectare) (LOPES et al.,

2018). Uma possível relação metabólica com a Piraclostrobina pode estar ligada ao aumento de atividade da redutase do nitrato, contribuindo com a biossíntese de aminoácidos, clorofilas (MARTINAZZO et al., 2016) e hormônios (HARDIANSYAH et al., 2017).

Estudos sugerem que o aumento da expressão gênica da redutase do nitrato, em *Arabidopsis thaliana*, eleva os níveis de óxido nítrico (NO), o qual influencia na respiração da via alternativa ao citocromo mitocondrial, regulando positivamente a atividade da oxidase alternativa (AOX) (HUANG et al., 2002). Isso se deve a possível relação entre o aumento do NO endógeno e a inibição da enzima aconitase nas mitocôndrias, e isto acarreta no acúmulo de citrato que é um forte indutor da expressão gênica da AOX (GUPTA et al., 2012). O citrato é precursor de 2-oxoglutarato, o qual está ligado à assimilação do nitrogênio e, portanto, à biossíntese de aminoácidos e clorofilas.

Existem evidências que a atividade da AOX também pode induzir à produção de NO dentro das mitocôndrias (GUPTA et al., 2018; VISHWAKARMA et al., 2018). Nesse sentido, a função química da Piraclostrobina, inibindo o fluxo de elétrons pelo citocromo-*bc1* mitocondrial de fungos (BECKER et al., 1981; BASF, 2018), implica em sua possível relação com o aumento da atividade de AOX em plantas para desviar os elétrons da rota bloqueada no complexo III. Apesar disso, ainda não há relatos de atividades-chaves da regulação por Piraclostrobina no metabolismo mitocondrial vegetal envolvendo o NO e a biossíntese da sacarose, sobretudo, em cana-de-açúcar.

A sintase da sacarose-6-fosfato (SPS) é a enzima-chave da regulação da síntese de sacarose e, conseqüentemente, na produtividade da cana-de-açúcar. A atividade da SPS pode ser regulada pela glicose-6-fosfato e inibida por fosfato inorgânico (DOEHLERT et al., 1983; DOEHLERT et al., 1984). A sua expressão gênica pode ocorrer em diferentes tecidos (SOLÍS-GUZMÁN et al., 2017), sendo importante na regulação do acúmulo de amido, armazenamento de proteína, síntese de celulose e crescimento vegetativo (PARK et al., 2008; WANG et al., 2018). Na manutenção energética biológica, a SPS possui estreita relação com as invertases, catalisando a hidrólise da sacarose, além de estarem envolvidas na regulação da alocação de carbono (WANG et al., 2018). Em conjunto, essas enzimas podem ser indicadores da possível atuação bioquímica da piraclostrobina em cana-de-açúcar.

Com base nessas pesquisas, são necessários estudos que contemplem a associação da Piraclostrobina com a fisiologia molecular da cana-de-açúcar, visando o aumento de produção, tanto através da eficiência energética como pela inibição do florescimento. Em outro estudo preliminar, desenvolvido pelo LFMP, constatou-se indícios de que a aplicação de

Piraclostrobina pode promover alteração no padrão de expressão de genes ligados ao florescimento (SILVA, 2016), sendo necessárias mais investigações. Assim, não há estudos suficientes que elucidaram o envolvimento direto da Piraclostrobina nos processos bioquímicos celulares nos tecidos da cana-de-açúcar e na sinalização desses efeitos para a transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva.

2.4 Sinalização Molecular e Metabólica do Florescimento

O processo de transição para a fase reprodutiva envolve uma complexa rede de sinais ambientais e endógenos, por meio de promotores e repressores florais (MATSOUKAS et al., 2012; KHAN et al., 2014). Em *A. thaliana*, o florígeno *FLOWERING LOCUS T (FT)* promove a transição para o desenvolvimento reprodutivo e floração, enquanto *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* reprime essa transição (WICKLAND; HANZAWA, 2015). O gene da identidade do meristema floral, o *LEAFY (LFY)*, ativa diretamente o *FLOWERING LOCUS D (FD)*, criando um ciclo de retroalimentação positiva (WIGGE et al., 2005; JAEGER et al., 2013). A proteína FT é translocada da folha para o meristema apical do caule, onde interage com a proteína FD formando um complexo FT/FD, associado a outras proteínas. Esse mecanismo, então, promove as mudanças ontogênicas do estágio vegetativo para o estágio reprodutivo do meristema (WIGGE et al., 2005; MEDEIROS et al., 2016).

Em cana-de-açúcar, sabe-se que o processo de indução do florescimento se dá com a diminuição do comprimento do dia, temperaturas amenas durante a noite e elevadas temperaturas diurnas com alta umidade. Entretanto, as pesquisas sobre a regulação genética do florescimento da cana-de-açúcar ainda são inscipientes. Nos estudos de expressão gênica, foi observada floração tardia em plantas de *A. thaliana* com superexpressão dos homólogos de *FT* e *TFL* provenientes da cana-de-açúcar, identificados como *ScFT1* e *ScTFL1* (COELHO, 2013). Desse modo, foi proposto que o *ScFT1* atua como um repressor floral em cana e a expressão deste varia sob condições não indutiva e indutivas (COELHO et al., 2014). Além desses homólogos, foram também identificadas quatro sequências incompletas denominadas *ScFT2*, *ScFT3*, *ScFT4* e *ScFT5*. O *ScFT1* apresenta a maior similaridade com o *FT* de *A. thaliana*, enquanto que *ScFT2* é mais similar ao *ScFT1* e ao candidato *FT* em *Z. mays (ZCN8)* (COELHO, 2013).

Uma sequência semelhante ao gene *INDETERMINATE1 (IDI)*, expresso em folhas imaturas de *Z. mays* (CONEVA et al., 2007), foi isolada e identificada parcialmente como *ScIDI* em cana-de-açúcar (COELHO, 2010), sugerindo um possível papel como indutor do florescimento da cana-de-açúcar tal como em *Z. mays*, podendo ser autônomo e distinto da via do fotoperíodo (COELHO, 2010). Uma possível semelhança entre genes *IDI* de outras gramíneas, como arroz (*Oryza sativa* L.), também reforça uma relação com a sua função no florescimento (COLASANTI et al., 2006; AGARWAL et al., 2007). Em *Z. mays*, o gene *IDI* codifica um fator de transcrição que está ligado à regulação da transição para floração, em que plantas mutantes *idl* se apresentam apenas em estágio vegetativo com crescimento prolongado e não desenvolvem flores normais (CONEVA et al., 2007).

O tempo da floração também pode ser regulado pelo *status* de carboidratos na planta e, conseqüentemente, sendo um indicativo para a maturação da cana-de-açúcar. Acredita-se que os açúcares desempenham um papel crucial na regulação da floração, em que a trealose-6-fosfato (T6P) atua com um indicador desse *status* (WAHL et al., 2013). A T6P, precursora da trealose na via biossintética, é um importante metabólito de sinalização envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas em resposta à disponibilidade de carbono (O'HARA et al., 2013). Por exemplo, a perda da enzima TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS1) pode atrasar o florescimento, como já foi demonstrado em *A. thaliana*. Assim, a via T6P afeta a indução floral, unindo a TPS1 ao grupo de reguladores do tempo de floração em resposta balanço de carboidratos (WAHL et al., 2013).

Além do teor de carboidratos, o balanço de nitrogênio tem seu papel no florescimento que é modulado pela atividade da enzima redutase do nitrato (SELIGMAN et al., 2008). Plantas de *A. thaliana* deficientes em redutase do nitrato, representadas pelo mutante duplo *nia1* e *nia2*, emitem menos óxido nítrico (NO). Este mutante floresce precocemente quando comparado com plantas selvagens. Ressalta-se que, este fenótipo parece resultar dos níveis acentuadamente reduzidos de NO nas folhas durante o crescimento vegetativo, revelando o papel da redutase do nitrato no florescimento. Assim, o NO é identificado como um potencial repressor da indução floral (HE et al., 2004).

Os limites de desempenho fisiológico da cana-de-açúcar estão em foco, diante dos grandes desafios da cultura em acompanhar e superar as expectativas de mercado. Um sistema de manejo estratégico com produtos à base de piraclostrobina vem a ser promissor para extrapolar as capacidades de produção, mediando as capacidades fotossintéticas e balanço de carbono e nitrogênio. Tais observações levaram à hipótese de um possível papel da

piraclostrobina não só no metabolismo energético, como também na regulação do florescimento. A piraclostrobina pode ter ligação direta com o complexo III mitocondrial sendo bem conservado entre fungos e plantas. Dessa forma a molécula pode estar envolvida na respiração celular e integrando o metabolismo do carbono e do nitrogênio com as vias de indução do florescimento, via sinalização com o NO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A execução experimental deste trabalho foi dividida em dois experimentos principais. No experimento 1, foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos para investigação de aspectos bioquímicos e metabólicos. O experimento 2 foi realizado em condições de campo, onde foi realizado no novo modelo de 3 aplicações piraclostrobina no período real de safra, em que foram obtidos dados de desempenho no crescimento, desenvolvimento e florescimento, bem como o sequenciamento de RNA (RNA-seq) para o estudo da expressão gênica ligada à regulação da piraclostrobina sobre a cana-de-açúcar.

3.1 Experimento I – Plantas cultivadas em vaso

3.1.1 Material Vegetal e Condições Experimentais

No experimento em vasos, foram utilizadas mudas de cana-de-açúcar cv. RB966920 oriundas do Sistema AgMusa™. Os vasos foram mantidos a pleno sol sob irrigação e adubação controladas a cada 2 e 40 dias, respectivamente. O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal, S21°14'43" - W44°59'59" com 900 m de altitude aproximadamente.

3.1.2 Aplicação de Piraclostrobina e Avaliações

A aplicação de piraclostrobina foi realizada uma única vez em plantas de 7 meses de idade, utilizando-se o produto comercial Comet® (Piraclostrobina 250 g L⁻¹ de ingrediente ativo) na dose recomendada pelo fabricante de 1 L ha⁻¹, por meio de pulverizador costal ajustado para aplicação do volume de calda de 150 L ha⁻¹, considerando-se que cada planta ocupe 1 m² e que, com uma única pulverização, não ocorra escoamento da calda. As aplicações foram realizadas entre 8 e 9 horas da manhã, utilizando-se todos os equipamentos de proteção individual necessários. Para as plantas controle, foi aplicada água nas mesmas proporções de volume.

O experimento teve 48 plantas para avaliações destrutivas e 20 plantas para avaliações não-destrutivas, totalizando 68 vasos, além da bordadura. Nas plantas destinadas para amostras destrutivas foram realizadas a quantificação dos teores de pigmentos e de óxido nítrico. Já nas plantas não-destrutivas foram realizadas a análise de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*. As avaliações fotossintéticas foram realizadas de 1 a 5 dias após a aplicação. As coletas foram realizadas com 1, 5, 10, 15, 20 dias após a aplicação para pigmentos fotossintéticos e com 5, 10 e 15 dias após a aplicação para o óxido nítrico.

3.1.3 Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos

Para determinação dos teores de pigmentos foi utilizado o terço médio de folhas +3. Foi macerado 0,1 g de folha em nitrogênio líquido, misturados com 5 mL de acetona (80% v/v). Após filtração, o volume final foi completado para 10 mL e, em seguida foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 663,2 e 646,8 nm para as clorofilas *a* e *b* respectivamente, e 470 nm para os teores de carotenoides totais, de acordo com a metodologia descrita por Lichtenthaler; Buschmann (2001). A quantificação de pigmentos foi dada em µg de matéria fresca e realizada de acordo com as equações:

$$Chla = 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8}$$

$$Chlb = 21,50 \times A_{646,8} - 5,10 \times A_{663,2}$$

$$Car = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times Cla - 85,02 \times Clb) / 198$$

3.1.4 Detecção de Óxido Nítrico e Microscopia de Epifluorescência

A detecção de óxido nítrico (NO) foi realizada de acordo com avaliações feitas com cana-de-açúcar, realizadas por Silveira et al. (2017) a partir de análises de fluorescência, com adaptações. O NO intracelular foi visualizado utilizando o corante específico de NO permeável para a célula, o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína-2 (DAF2-DA). Os segmentos frescos de

folhas foram incubados em tampão MES-KCl (MES 10 mM, KCl 50 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 6,15), à temperatura ambiente durante 15 min. Em seguida, esses segmentos foram incubados em solução de 10 µM de DAF2-DA, misturando-se suavemente por 40 min no escuro em temperatura ambiente.

As amostras foram lavadas com tampão para remover o excesso de DAF2-DA e colocadas em uma lâmina de vidro e cobertas com um deslizamento de vidro antes de observar a fluorescência usando microscópio de epifluorescência com filtro verde de excitação em 450/50 (425-475) e emissão a 510/50 (485-535, espelho discróbico 480 (Microscópio de Epi-Fluorescência Zeiss Observer Z.1). As fotos foram tiradas utilizando uma objetiva de 10x, 10 seg de exposição e 30% de intensidade. As imagens foram analisadas usando o *software* ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) por densidade ótica de pixels, a partir da imagem convertida para 8 bits, e com um algoritmo para escalas de cores do branco ao preto (utilizando-se uma régua de cores com 10 tonalidades de coloração do branco ao preto). Os dados foram apresentados como porcentagem da intensidade média de pixels para a intensidade da fluorescência:

$$\%NO = [(\sum \text{Pixels}_{\text{OD1-6}}) * 100] / \sum \text{Pixels}_{\text{OD1-10}}$$

Em que, %NO é o teor de óxido nítrico, $\sum \text{Pixels}_{\text{OD1-6}}$ é o somatório de pixels com densidades de ópticas representadas pela fluorescência do óxido nítrico, e $\text{Pixels}_{\text{OD1-10}}$ é o somatório de pixels das densidades ópticas da imagem como um todo.

3.1.5 Análises Fotossintéticas

Foram realizadas coletadas de dados de trocas gasosas no período diurno, entre 8:00 e 15:00 horas, sempre nas mesmas folhas +3 (terceira folha completamente expandida), a partir de um analisador-infravermelho de gás portátil com fluorômetro integrado (LI-6800XT, LICOR, Lincoln, EUA). Foram obtidos dados de respostas à luz, fluorescência da clorofila *a* e respiração no escuro.

Para as curvas de respostas à luz, foram padronizados uma concentração de CO₂ de 400 µmol mol⁻¹, umidade relativa de 50%, oxigênio em 21% e fluxo de ar em 900 µmol s⁻¹. Os

níveis de radiação fotossinteticamente ativa (I) foram de 2000, 1800, 1500, 600, 400, 200, 100, 60, 40, 20 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aplicados em intervalos de 120 segundos.

Simultaneamente às medições de troca gasosa, durante as curvas de resposta à luz, foram realizadas as leituras de emissão de fluorescência da clorofila, no entanto, sem aclimação ao escuro. Para as medições de fluorescência com adaptação ao escuro, medições foram realizadas à noite, entre 0:00 e 02:00 horas. As medidas no claro (parâmetros adaptados ao claro) e no escuro (parâmetros adaptados ao escuro) foram mescladas. Foram utilizados os dados das relações F_v/F_m (eficiência quântica do fotossistema II) e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), ambos fornecidos pelo equipamento. Para a medição da respiração no escuro, foram utilizadas leituras durante o dia (ponto 0 da curva de luz) e medições à noite (0:00 e 02:00 h). Em todas as medições, as folhas foram aclimatadas por 5 minutos.

Modelos matemáticos foram testados e comparados para as curvas de resposta à luz, considerando-se o coeficiente de determinação para a regressão, calculado como o quadrado do coeficiente de correlação entre os dados originais e as estimativas dos valores de fotossíntese líquida. Para os cálculos, foi utilizada a ferramenta Excel Solver (Microsoft Excel ver. 2016). Foi utilizado o modelo descrito por Prioul e Chartier, (1977) como o mais adequado (pelo valor mínimo da soma dos quadrados dos erros):

$$P_N = ((f(I_0) \times I + P_{g_{\max}} - ((f(I_0) \times I + P_{g_{\max}})^2 - 4\theta \times f(I_0) \times I \times P_{g_{\max}})0.4)/2\theta) - R_D$$

Em que,

$$P_N = \text{Fotossíntese líquida } [\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{s}^{-1}]$$

$$f(I_0) = \text{Rendimento quântico, quando } I = 0 [\mu\text{mol (CO}_2\text{) } \mu\text{mol}^{-1} \text{ (fótons)}]$$

$$I = \text{Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos } [\mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}]$$

$$P_{g_{\max}} = \text{Fotossíntese bruta máxima } [\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{s}^{-1}]$$

$$\theta = \text{fator de convexidade (adimensional)}$$

$$R_D = \text{Respiração no escuro } [\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{s}^{-1}]$$

3.1.6 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi realizado com adaptação em faixa para evitar os efeitos adversos da pulverização, com 2 tratamentos (uma linha com plantas controles e outra linha com plantas aplicadas com piraclostrobina) distribuídos em amostras destrutivas e não destrutivas. Para pigmentos fotossintéticos, foi usado um fatorial 2 x 5 x 4 (2 tratamentos x 5 tempos x 4 blocos), sendo a unidade experimental constituída por uma planta por bloco (para óxido nítrico foram usados 3 tempos de coleta). Para as avaliações não destrutivas, foi usado um fatorial 2 x 3 x 4 (2 tratamentos 3 tempos x 4 blocos) sendo a unidade experimental representada por duas plantas por bloco.

3.1.7 Análises Estatísticas dos Dados

Todos dados foram submetidos à análise de normalidade e homogeneidade de variâncias. Por conseguinte, os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, sendo as médias comparadas por Tukey(HSD) para comparações em fatorial e Teste-t para comparações entre amostras não pareadas. Dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis e as médias comparadas pelo teste de Mann Whitney. Tomados em conjunto, alguns dados foram submetidos à análise multivariada de componentes principais, a partir de matrizes de correlação de Pearson, integradas ao cálculo de cosseno quadrado ($\text{variável } \cos^2 * 100 / (\cos^2 \text{ total da componente})$). Todas as análises foram feitas em ambiente R versão 3.6.1.

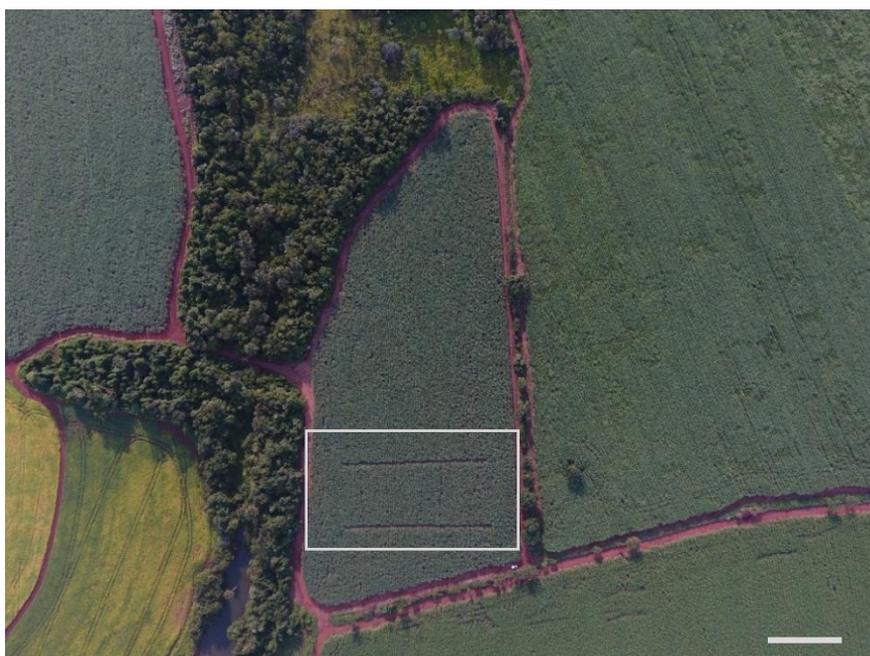
3.2 Experimento II – Plantas em condições de campo

Nessa etapa do trabalho foi adaptado um novo modelo de manejo integrado com 3 aplicações de piraclostrobina. O intuito da terceira aplicação foi atingir o período provável de indução do florescimento da cana-de-açúcar, considerando-se os efeitos piraclostrobina a curto prazo e o acúmulo das duas aplicações realizadas consecutivamente de maneira convencional.

3.2.1 Material Vegetal e Área Experimental

Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar da cultivar SP801842 – considerada de alta produtividade e com alto índice de florescimento – inicialmente com 4 meses de idade desde o último corte (cana-de-açúcar ressoca, em 3º corte de agosto a setembro). O experimento em campo foi conduzido no município de Campo Florido, MG, fazenda Santo Inácio de Jaborandi S19°51.673' - O48°38.292', com altitude de 543 m. A área experimental foi delimitada em 4.000 m² (100 x 40 m), dividida em 20 parcelas (18 x 10 m) com 3 subparcelas (6 x 10 m) cada uma (FIGURA 2). As parcelas de cada tratamento foram constituídas de 12 linhas de cana-de-açúcar com espaçamento de 1,5 m.

Figura 2 – Área experimental localizada na fazenda Santo Inácio de Jaborandi, no município de Campo Florido, MG.



Legenda: Barra = 50 m. Fonte: Do autor (2018).

3.2.2 Aplicação dos Produtos e Avaliações

Os produtos selecionados foram aplicados com base nas recomendações do fabricante: Opera[®] (1 L ha⁻¹), Orkestra[®] (0,350 L ha⁻¹), Ativun[®] (1 L ha⁻¹) e o BAS751¹ (0,5 L ha⁻¹ - produto ainda não comercial em fase de avaliação). O equipamento utilizado para aplicação foi uma barra estilo “trave” de 5 metros, contendo 6 bicos do tipo leque espaçados a 0,75 m, acoplada a um cilindro de gás CO₂ que alimenta o sistema de vazão. A vazão de calda gerada por este sistema foi ajustada para 15 mL seg⁻¹, quais foram pulverizados por metro percorrido para que toda a parcela recebesse um volume de calda de 150 L ha⁻¹ (2,7 L) na dosagem específica calculada para cada produto.

Os produtos foram aplicados entre 8 e 10 horas da manhã, utilizando-se todos os equipamentos de proteção individuais necessários. Para as plantas controle, foi aplicada água nas mesmas proporções de volume.

O experimento foi composto por plantas que receberam uma aplicação, plantas com duas aplicações e plantas com três aplicações, sendo cada aplicação em um momento estratégico, obedecendo a previsão do período de indução do florescimento. Essa terceira aplicação foi determinada para que o acúmulo de resposta fisiológicas causadas pela piraclostrobina fosse concentrado no período de indução do florescimento. Portanto, seguindo-se o cronograma de safra, a 1^a aplicação foi realizada no início do mês de janeiro, a 2^a aplicação no início de fevereiro e 3^a aplicação no início de março.

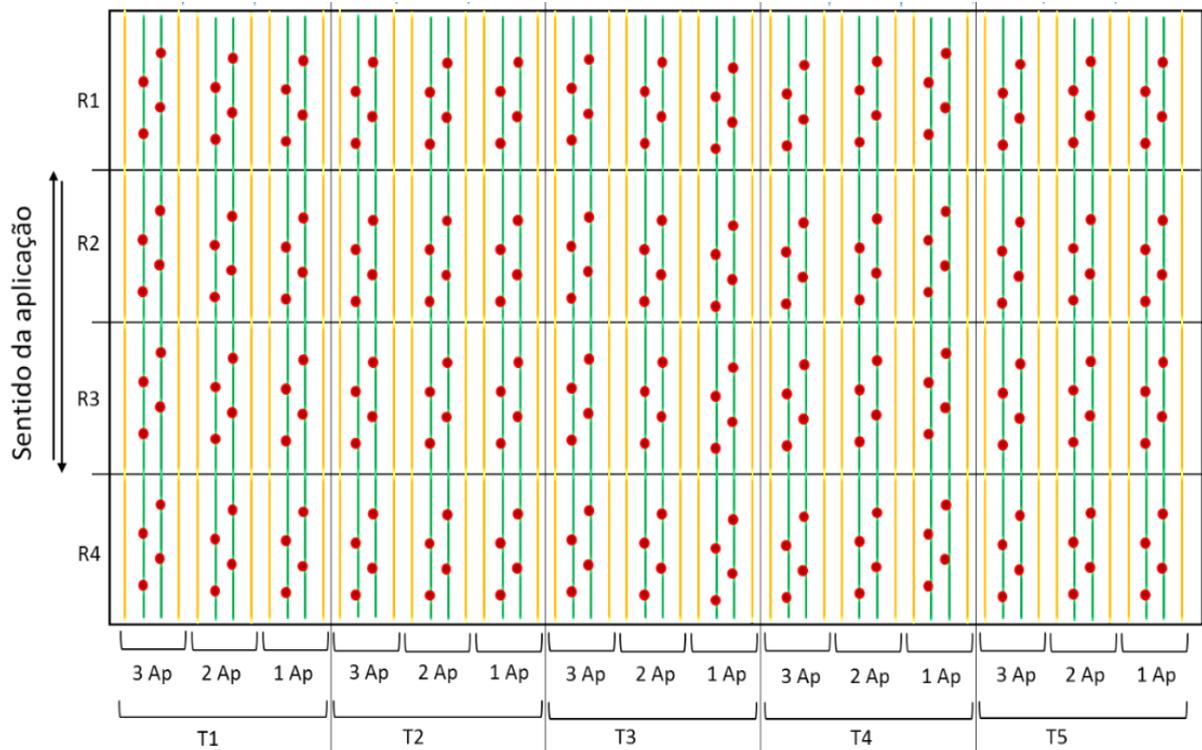
O período de coletas se deu 30 dias após cada aplicação dos produtos, isto é, seguindo-se o cronograma de safra, a primeira coleta ocorreu na primeira semana de fevereiro, a segunda coleta na primeira semana de março e a terceira coleta na primeira semana de abril. O material coletado nos tempos 1 (fevereiro), 2 (março) e 3 (abril) foram destinados para análises de expressão gênica, totalizando 180 amostras (5 tratamentos x 3 modelos de aplicações x 4 repetições x 3 tempos de coleta). As amostras foram armazenadas e utilizadas de acordo com resultado do florescimento.

¹ Produto não comercial, ainda em fase de avaliação.

3.2.3 Delineamento Experimental

O experimento foi desenvolvido em esquema de faixas com parcelas subdivididas em 15 tratamentos (5 tratamentos x 3 modelos de aplicação). Cada tratamento continha com 4 parcelas (4 repetições) sendo a unidade experimental constituída por 4 plantas em cada parcela, sendo assim para cada tipo de análise. Os tratamentos também foram avaliados em parcelas subdivididas no tempo, coletados e avaliados com 0, 30, 60 e 90 dias após a aplicação. As parcelas tiveram aplicação de 4 produtos à base de piraclostrobina e água como controle, as quais foram subdivididas em três subparcelas que se referem ao número de aplicações desses produtos. Assim, a primeira subparcela recebeu somente uma aplicação (janeiro), a segunda recebeu duas aplicações (janeiro e fevereiro) e a terceira recebeu 3 aplicações (janeiro, fevereiro e março) (FIGURA 3).

Figura 3 - Representação da área experimental ilustrando as parcelas (T1, T2, T3, T4 e T5) e as subparcelas as quais representam o número de aplicações de cada tratamento (1Ap, 2Ap, 3Ap).



Legenda: T1: controle (água); T2: BAS751; T3: Ativun®; T4: Orkestra®; T5: Opera®. Pontos vermelhos representam a touceira mantida como unidade experimental. Para cada tipo de análise, foram selecionadas 4 touceiras independentes adjacentes umas das outras. Linhas amarelas representam a bordadura.

3.2.4 Avaliações Biométricas

As plantas foram avaliadas com 0, 30, 60, e 90 dias após o início do experimento, bem como no momento da colheita. Foram registrados o diâmetro (DMC) e altura média de colmos (AMC), altura da planta (AMP), área foliar (AF), número de folhas verdes e senescentes. O DMC foi medido a partir do entrenó maduro padronizado ao centro do colmo e a AMC foi medida da base do colmo até a inserção da folha +1. Adicionalmente área foliar por perfilho (AF) foi determinada aplicando-se a fórmula: $AF = C \times L \times 0,75 \times (N + 2)$, em que, C é o comprimento, L a largura, N é o número de folhas verdes abertas, 2 o fator de ponderação para as folhas que ainda não estão totalmente expandidas e 0,75 o fator de correção para a cultura.

3.2.5 Determinação do TCH

Ao final do experimento as touceiras selecionadas para a colheita foram coletadas para determinação da produtividade média, utilizando a tonelada de colmo por hectare (TCH) como referência. A relação de massa verde e TCH, para toneladas por hectare, foi feita através da relação: Metros lineares em 1 hectare * kg em 10 metros / metros da parcela /1000 tal como realizado por Lopes et al. (2018).

3.2.6 Avaliação da Maturação

Em seguida amostras padronizadas (1,5 cm) do entrenó de colmos foram retiradas para quantificação de açúcares solúveis por meio da quantificação de sacarose descrita no experimento 1 e pela obtenção do °Brix (porcentagem em massa de sólidos solúveis contidos em uma solução de sacarose quimicamente pura) o qual também foi usado para a determinação do índice de maturação usando-se a base e a extremidade superior do colmo (maturidade adequada °Brix \geq 18): $IM = (\text{°Brix da ponta} / \text{°Brix da base}) * 100$.

Adicionalmente, amostras de cada repetição foram submetidas à análise tecnológica para medir a pureza do caldo extraído após a moagem do colmo nas usinas. Os dados coletados

incluem ATR (açúcares totais recuperáveis), POL (porcentagem em massa de sacarose aparente contida em uma solução em luz polarizada), °Brix, açúcares redutores e porcentagem de fibras, e serão usados em etapas posteriores desta pesquisa.

3.2.7 Avaliação da Isoporização

Foi avaliada a porcentagem de área isoporizada a partir de seções longitudinais e transversais dos entrenós da base, do meio e do ápice do colmo. O nível de isoporização foi medido escalonando a área isoporizada em 0, 25, 50, 75 e 100% de área afetada.

3.2.8 Análise Estatística dos Dados

Os dados referentes às avaliações em campo foram submetidos à análise de variância pelo Teste F, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Todos os resultados foram verificados quanto à homogeneidade e homocedasticidade de variâncias, submetendo os dados ao teste estatístico mais adequado.

3.2.9 Avaliação do Florescimento

O florescimento foi avaliado qualitativamente mediante a observação da alteração morfológica do meristema apical da parte aérea, sendo classificado como: sem indução visível (sem meristema de inflorescência visível), induzido (com meristema de inflorescência visível). Como na safra 2017/2018 não houve ocorrências de florescimento na região experimental, não foi possível realizar a aplicação do método do Percentual de Intensidade de Fournier, cujos os valores obtidos em campo seriam dados através de uma escala intervalar semi-quantitativa de cinco categorias (0 a 4) com intervalo de 25% entre cada categoria. Isto permitiria estimar a porcentagem da intensidade fenológica em cada indivíduo (BENCKE; MORELLATO, 2002). Os valores obtidos no presente estudo corresponderam a uma proporção meramente restrita a observação de 4 plantas aleatórias por parcela em cada tratamento.

3.2.10 Análises Moleculares

3.2.10.1 Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada a partir do terço médio de folhas completamente expandidas (+3), por meio do Protocolo QIAzol de acordo com as instruções do fabricante e com adaptações feitas para folha madura de cana-de-açúcar. Após a extração do RNA, as amostras foram analisadas quanto à quantidade e qualidade (relações A260\280 e A260\230), utilizando-se o espectrofotômetro Nanovue[®] (NanoVue GE Healthcare). Para avaliar a integridade do RNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain e visualizado em fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReader XS D-77Ls- 20. M).

3.2.10.2 Tratamento com DNase e Síntese de cDNA

As amostras foram tratadas com o Turbo DNA free[™] kit (Ambion) para eliminação do DNA residual. Em seguida, um volume de 1,5 µL do RNA tratado foi utilizado para quantificação no Nanovue[®]. Para avaliar a integridade e pureza do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese, visualizadas em fotodocumentador UV-transilluminator, armazenadas posteriormente em freezer -80°C.

Após a extração do RNA e do tratamento com DNase, as amostras apresentando alto grau de integridade e pureza foram submetidas para o sequenciamento do RNA (RNA-seq). Parte das amostras foram armazenadas para a síntese DNA complementar (cDNA) a serem utilizados para análises de expressão gênica por RTqPCR, em continuidade dessa pesquisa.

Para o sequenciamento das amostras, o RNA tratado foi transferido para tubos estabilizantes que foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, foram submetidos ao SpeedVac[™] até a secagem total, mantendo-se a concentração e qualidade recomendados pela empresa de sequenciamento.

3.2.11 Análises de RNA-seq

2.11.1 Predição de mRNAs

Foram produzidos 1.367.779.374 *paired-end reads* (2x150pb) com um sequenciador Illumina modelo Hiseq 2500. Para a separação do RNA mensageiro (mRNA) de RNAs ribossomais, utilizou-se a técnica de seleção de cauda poli-A (*poly-A tail selection*), na qual diferentes tipos de RNA são separados em função de sua afinidade com sequências compostas por longas repetições do nucleotídeo timina. Os fragmentos de RNA foram inspecionados por sequências de baixa qualidade PHRED e adaptadores de sequenciamento com os programas Minion e Trimmomatic versão 0.39. Após esta etapa de controle de qualidade, 1.046.300.689 fragmentos foram selecionados para a predição *de novo*.

As sequências de RNA (mRNA e alguns tipos de ncRNA sequenciados por possuírem cauda poli-A) foram inferidas (*assembly*) com o programa Trinity, versão 2.8.5, com o parâmetro “no_normalize_reads” ativado. Esse procedimento reconstrói o RNA sequenciado pelo alinhamento múltiplo e massivo de diversas subsequências de 35 pb (denominadas *kmers*) presentes nos *paired-end reads*. RNAs preditos com similaridade superior ou igual a 95% foram colapsados com o programa CD-HIT-EST. As sequências preditas foram caracterizadas por meio de buscas de similaridade com outros RNAs presentes na base de dados RefSeq obtida no servidor FTP do NCBI (National Center for Biotechnology Information) no dia 22/02/2020 utilizando-se o programa Blastn versão 2.9.0+.

2.11.2 Análises de Expressão Diferencial

Os genes diferencialmente expressos nos tratamentos T1 (controle) e T5 (piraclostrobina – Opera[®]) foram inferidos a partir da comparação dos conjuntos de fragmentos de RNA presentes nestas bibliotecas com o transcriptoma *de novo* montado anteriormente. A quantificação dos transcritos expressos foi conduzida com o programa Salmon e apresentou uma taxa alinhamento de aproximadamente 89%. Nesse sentido, 89% dos fragmentos foram mapeados com sucesso ao transcriptoma. A partir do número de fragmentos alinhados ao transcriptoma, o pacote EdgeR foi utilizado para inferir genes diferencialmente expressos entre

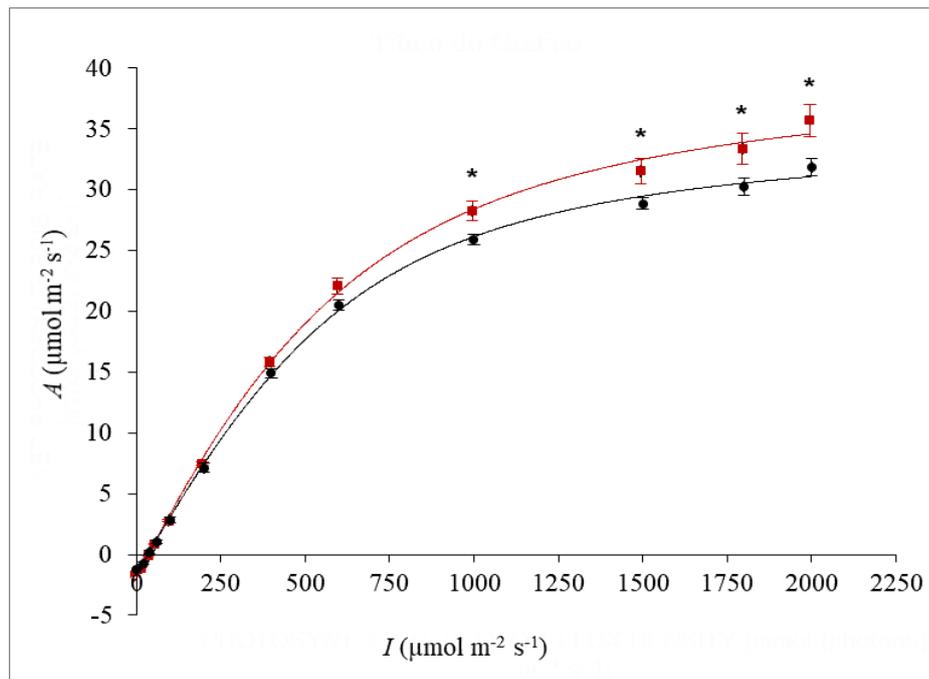
os tratamentos. Genes quatro vezes mais expressos, em T1 ou T5 (\log_2FC igual a 2) e com valor FDR (False Discovery Rate) inferior a 0,05, foram considerados como Diferencialmente Expressos.

4 RESULTADOS

4.1 Análises Fotossintéticas

As curvas de resposta à luz forneceram informações importantes sobre características de desempenho fotossintético geral das plantas. Nesse estudo, verificou-se que plantas de cana-de-açúcar submetidas à aplicação de piraclostrobina apresentaram respostas mais rápidas ao aumento da radiação luminosa, com diferenças significativas sobre a fotossíntese líquida (FIGURA 4).

Figura 4 - Assimilação de CO₂ (A) em função da variação do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (I), em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) submetidas à aplicação de piraclostrobina (Comet®).

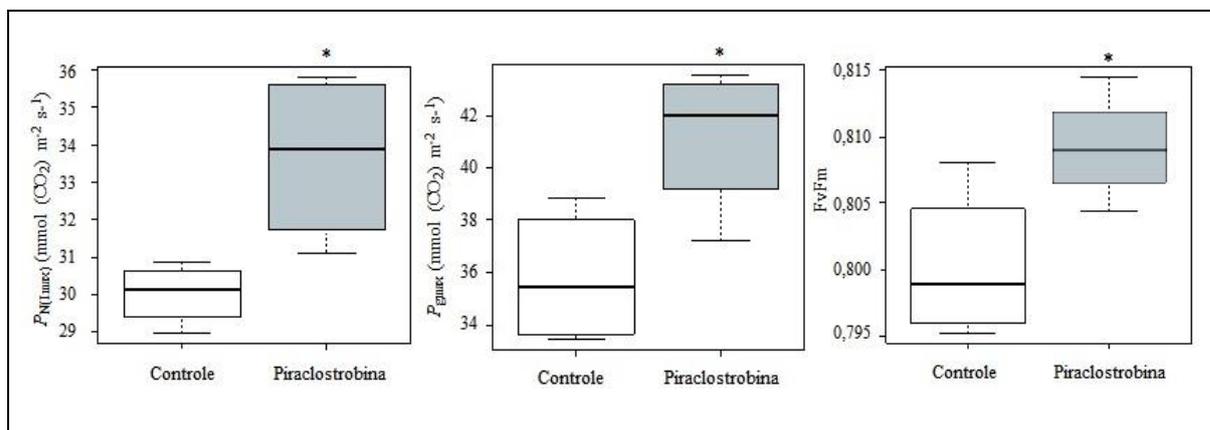


Legenda: Linha e quadrados vermelhos representam plantas com piraclostrobina; Linha e pontos pretos representam plantas controle. * indica diferença significativa pelo teste-t para amostras independentes com equivalência de variâncias ($p < 0,05$).

A assimilação líquida de CO₂, no ponto máximo de radiação ($P_{N(I_{max})}$), aumentou em cerca de 12,2% com a aplicação de piraclostrobina. Para as estimativas de fotossíntese bruta (P_{gmax}), foi verificado um aumento de 14,9% com a aplicação. O incremento na relação Fv/Fm foi sutil, representando menos de 1% para as plantas com aplicação. Para a taxa aparente de

transporte de elétrons, bem como para a relação ETR/P_N , não foram observadas diferenças significativas (FIGURA 5).

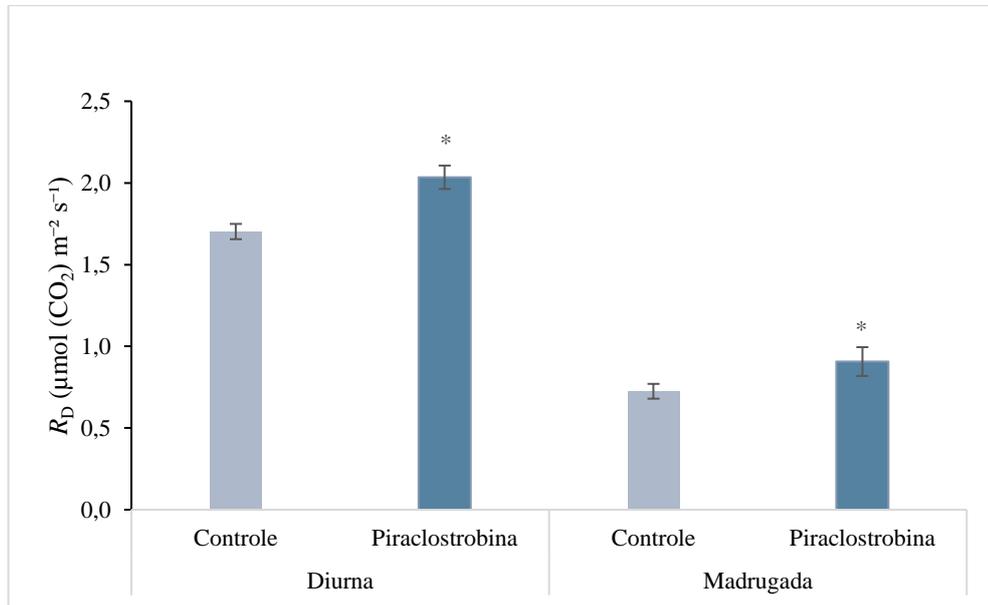
Figura 5 - Estimativas de parâmetros de desempenho fotossintéticos em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) submetidas à aplicação de Piraclostrobina.



Legenda: $P_{N(I_{max})}$: Máxima fotossíntese obtida em $I = I_{max}$; P_{gmax} : fotossíntese bruta máxima; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II. * Indica diferença significativa pelo Teste-t para amostras independentes com equivalência variâncias ($p \leq 0,05$); $n = 8$.

Para uma melhor compreensão sobre os efeitos da piraclostrobina na atividade respiratória, foram tomadas em conjunto as respostas durante o dia e durante à noite. Para as estimativas de respiração no escuro (R_D), a partir das medições diurnas, verificou-se um incremento de 19,5%, enquanto que, para a R_D na madrugada o aumento foi de 25%, em plantas com aplicação (FIGURA 6). Entre os dados medidos durante o dia e durante a noite também foram verificadas diferenças significativas, sendo as maiores atividades respiratórias durante o dia para ambos os tratamentos.

Figura 6 - Respiração diurna estimada a partir das curvas de respostas à luz, e respiração durante à na madrugada, em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) submetidas à aplicação de Piraclostrobina.

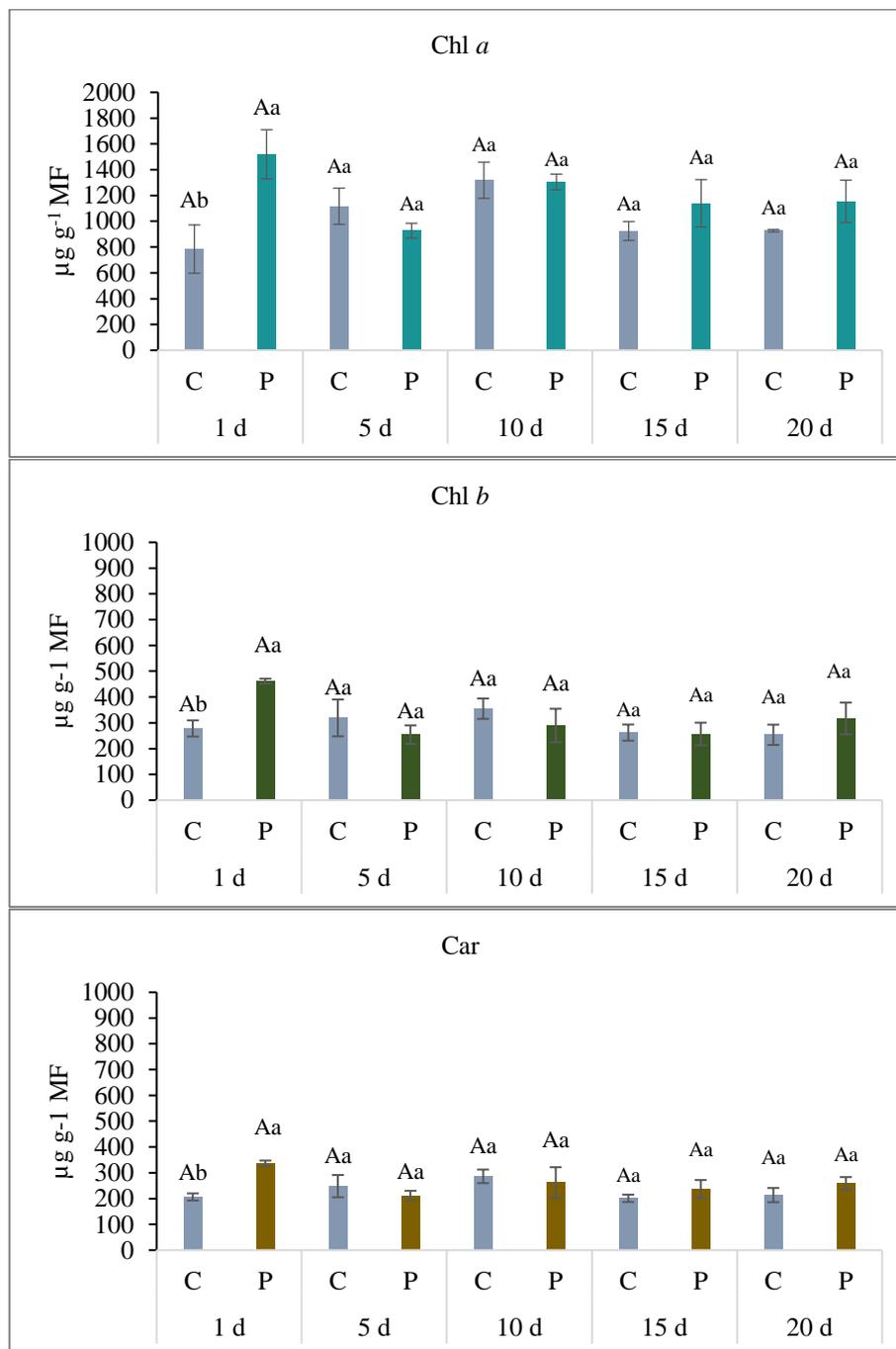


Legenda: R_D : Respiração no escuro. * Indica diferença significativa pelo Teste-t para amostras independentes com variâncias equivalentes ($p \leq 0,05$).

4.2 Análises de Pigmentos Fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos apresentaram aumentos significativos nas folhas de plantas com aplicação de piraclostrobina (FIGURA 7). Os dados foram analisados ao longo de 20 dias após a aplicação. Não foi verificada alteração nos teores em função do tempo. O efeito do tratamento foi observado somente com um dia após a aplicação. Clorofilas *a* e *b* aumentaram em média cerca de 94 e 66%, respectivamente, com o tratamento. Carotenoides apresentaram um aumento médio de 63%.

Figura 7 - Teor de pigmentos fotossintéticos das folhas de plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) submetidas à aplicação de piraclostrobina (Comet®).



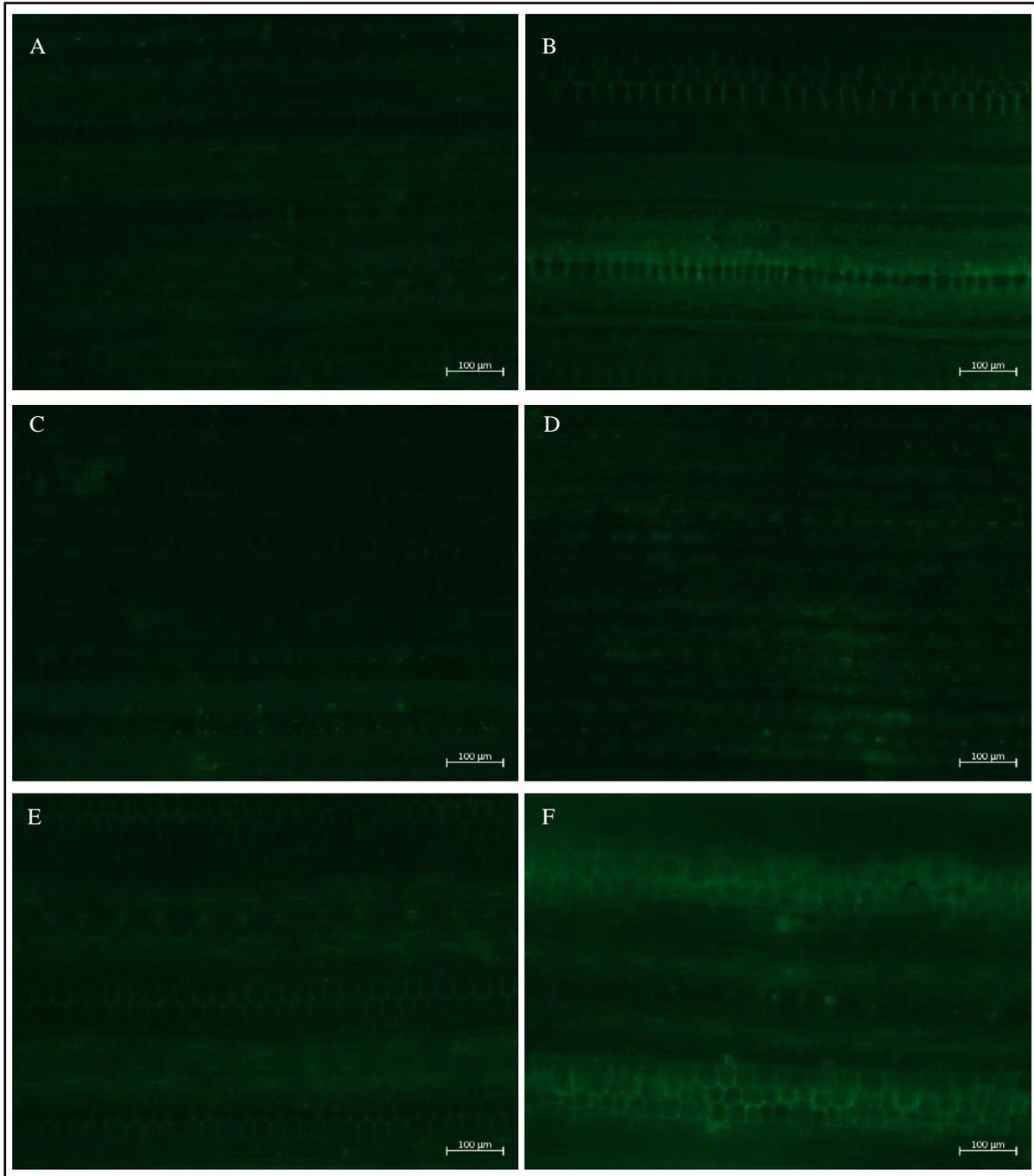
Legenda: C: plantas controle; P: plantas tratadas com piraclostrobina; d: dias passados após a aplicação. Dados expressos em μg por g de matéria fresca. Letras maiúsculas comparam os tratamentos ao longo do tempo e letras minúsculas comparam entre os tratamentos em cada tempo. Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey(HSD) ($p < 0,05$); $n = 4$.

4.3 Análises de Epifluorescência e Teores de Óxido Nítrico

A partir das análises de Epifluorescência foi possível avaliar se a aplicação de piraclostrobina induziu o acúmulo da produção de óxido nítrico (NO) em cana-de-açúcar (FIGURA 8 e 9). Com isso, foi possível observar e quantificar *in situ* a presença do NO intracelular, tanto em folhas quanto no meristema apical da parte aérea. Verificou-se que esse acúmulo foi mais pronunciado em folhas do que no meristema. Há indícios de que as maiores quantidades de NO estão detectadas no apoplasto do que dentro das células, nas plantas com 15 dias após a aplicação (Figura 8E e F). As variações ao longo do tempo de análise não foram significativas (FIGURAS 10 e 11).

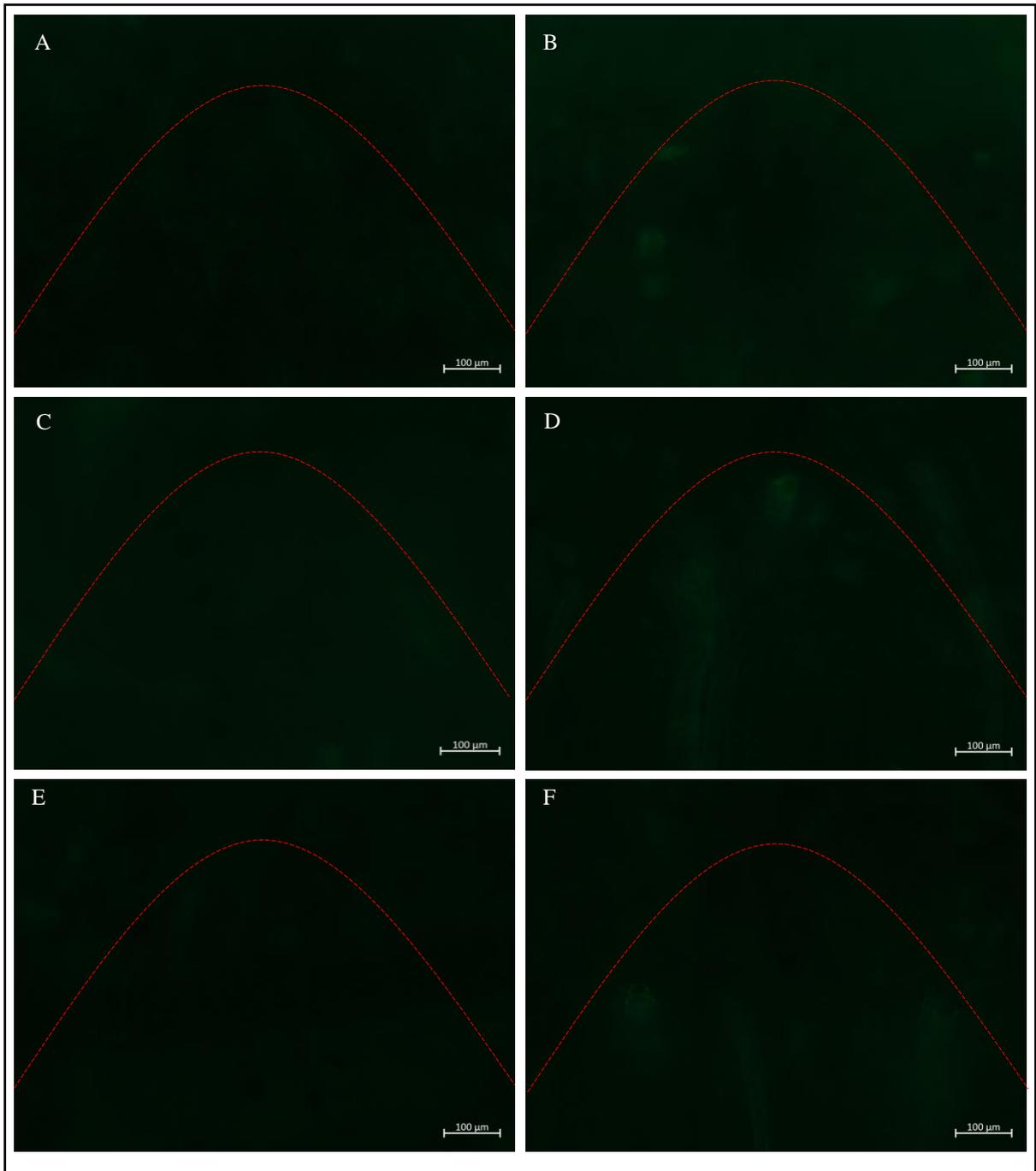
As dificuldades de se trabalhar com o meristema apical da parte aérea da cana-de-açúcar, em técnicas e reações *in situ*, dificultam a quantificação e a análise dos dados, uma vez que o meristema sofre oxidação muito rapidamente, podendo mascarar ou anular os resultados. No meristema foi observado níveis de fluorescência acentuados no tratamento com piraclostrobina, porém sem variação significativa ($p < 0,05$), levando-se em conta a ocorrência de elevados coeficientes de variação para a densidade de pixels contabilizados.

Figura 8 - Fotomicrografias da fluorescência do óxido nítrico (NO) em folha de cana-de-açúcar com e sem aplicação de piraclostrobina (Comet®).



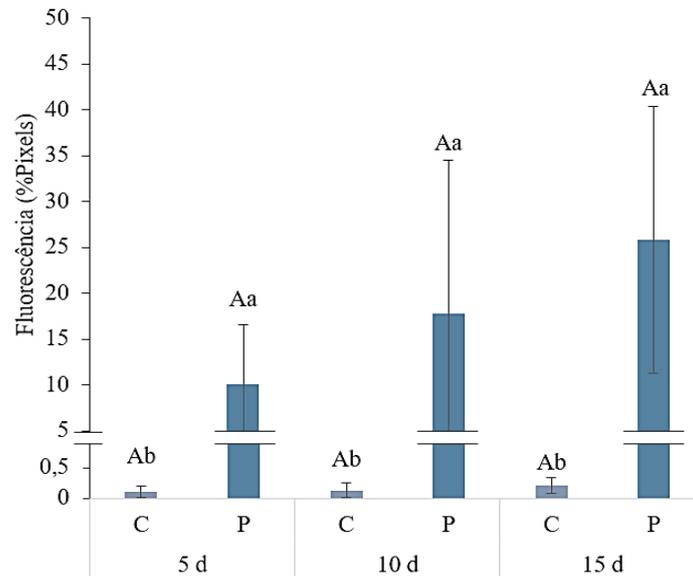
Legenda: A fluorescência verde é emitida pela reação química entre NO intracelular e DAF-2A aplicado *in situ*. Cada imagem está representada pela vista superior de segmentos da face adaxial foliar de regiões semelhantes entre si. A, C, E: plantas controle; B, D, F: plantas com piraclostrobina. A/B: plantas com 5 dias; C/D plantas com 15 dias; E/F: plantas com 15 dias; n = 4.

Figura 9 - Fotomicrografias da fluorescência do óxido nítrico (NO) no meristema apical da parte aérea de cana-de-açúcar com e sem aplicação de piraclostrobina (Comet®).



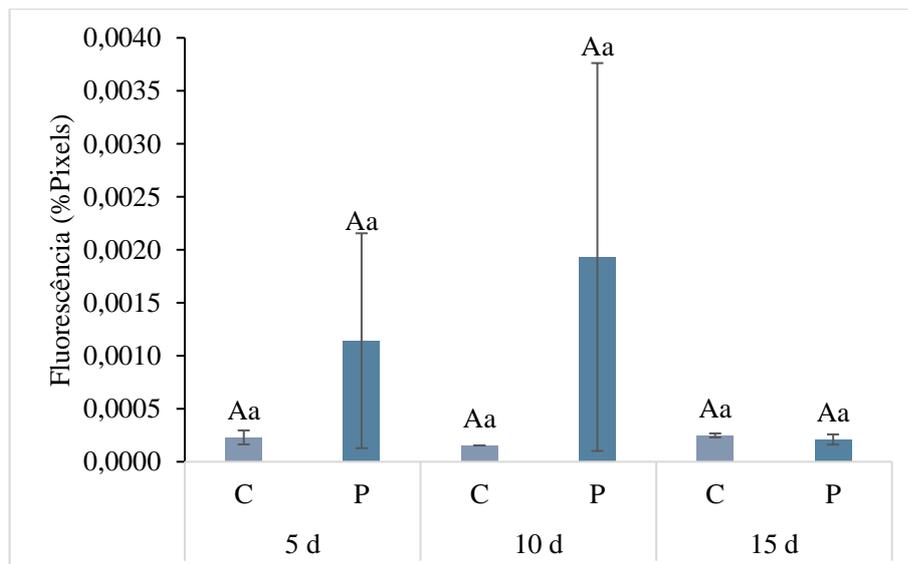
Legenda: A fluorescência verde é emitida pela reação química entre NO intracelular e DAF-2A aplicado *in situ*. Cada imagem está representada pela vista da seção longitudinal de regiões semelhantes do meristema apical. A linha tracejada vermelha indica a delimitação da zona meristemática A, C, E: plantas controle; B, D, F: plantas com piraclostrobina. A/B: plantas com 5 dias; C/D plantas com 15 dias; E/F: plantas com 15 dias; n = 4.

Figura 10 - Fluorescência relativa da reação química entre DAF-2A e óxido nítrico intracelular, em folhas de cana-de-açúcar (cv. RB966920).



Legenda: Médias nas colunas representam a fluorescência quantificada em porcentagem de pixels, a partir de fotomicrografias obtidas por epifluorescência e analisadas por ImageJ. C: plantas controle. P: plantas com piraclostrobina (Comet®). d: número de dias passados após a aplicação. Letras maiúsculas nas colunas comparam os tratamentos ao longo do tempo e letras minúsculas comparam entre os tratamentos em cada tempo. Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon - Mann Whitney ($p < 0,05$).

Figura 11 – Fluorescência relativa da reação química entre DAF-2A e óxido nítrico intracelular, em meristemas apicais da parte aérea de cana-de-açúcar (cv. RB966920).



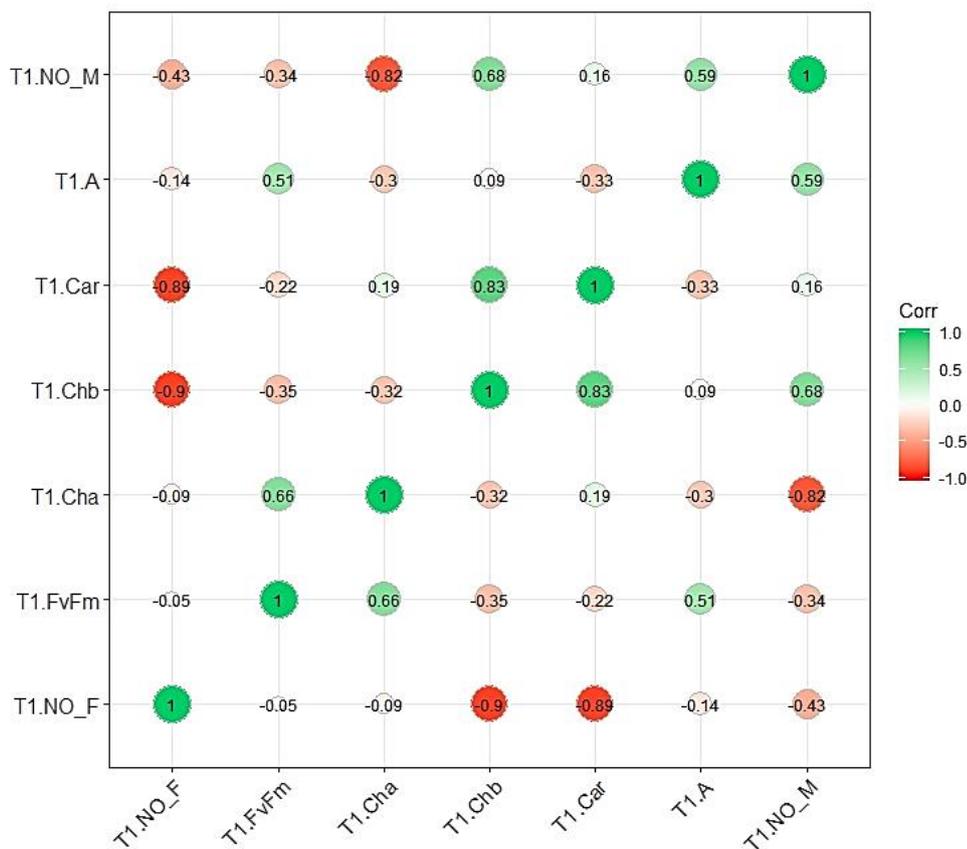
Legenda: Médias nas colunas representam a fluorescência quantificada em porcentagem de pixels, a partir de fotomicrografias obtidas por epifluorescência e analisadas por ImageJ. C: plantas controle. P: plantas com piraclostrobina (Comet®). Médias nas colunas representam a fluorescência verde quantificada em porcentagem de pixels. d: número de dias passados após a aplicação. Letras maiúsculas nas colunas comparam os tratamentos ao longo do tempo e letras minúsculas comparam entre os

tratamentos em cada tempo. Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon - Mann Whitney ($p < 0,05$).

3.4 Análises de Correlação

Os dados mostraram que no tratamento com piraclostrobina há uma relação positiva maior entre o incremento de pigmentos, em torno dos primeiros dias após à aplicação, com a eficiência fotossintética e posterior aumento na produção de NO foliar. As variáveis analisadas mostraram correlações totalmente diferente entre plantas com e sem tratamento com piraclostrobina (FIGURAS 12 e 13).

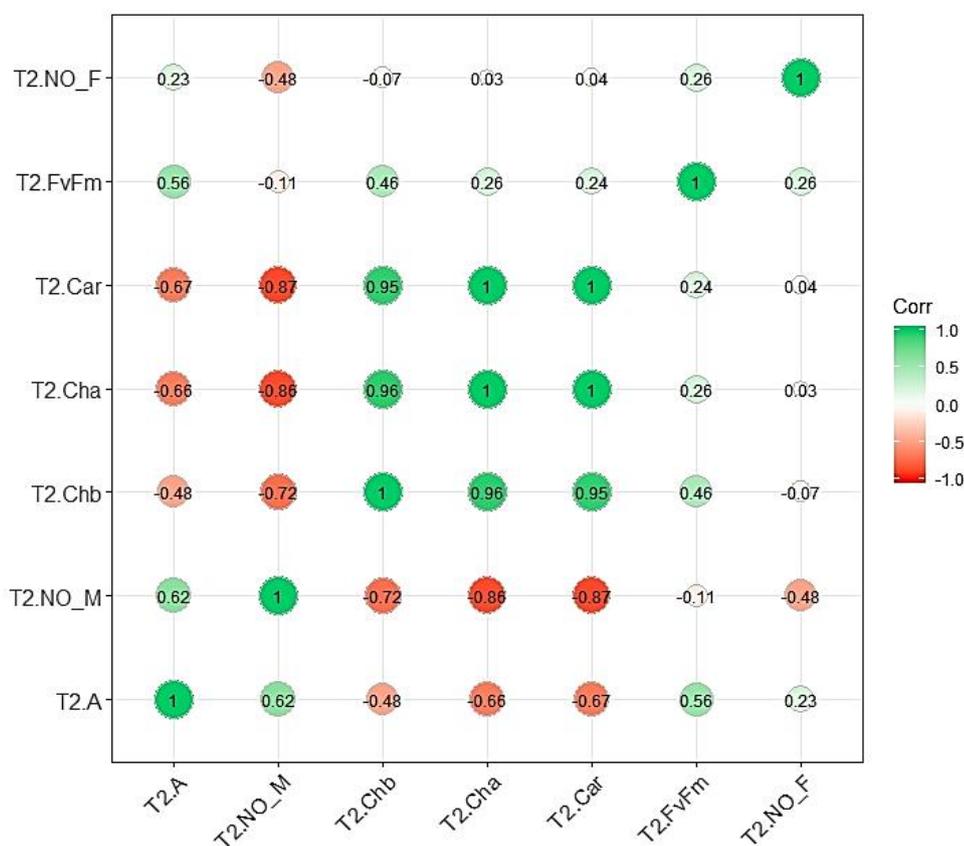
Figura 12 – Análise de correlação e mapa de calor representado a intensidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) sem tratamento com piraclostrobina.



Legenda: T1: plantas sem aplicação de piraclostrobina; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Corr: código de cores em indica variação gradativa do índice de correlação de Pearson.

Para as plantas controle, os resultados mostraram uma correlação altamente negativa entre o teor de NO foliar com clorofila *b* e carotenoides, e quase nenhuma correlação com clorofila *a* e fotossíntese (FIGURA 12). No tratamento com piraclostrobina, destaca-se que os pigmentos estão positivamente correlacionados, e que houve uma correlação positiva entre o teor de NO foliar com o teor de clorofila *a* e com a FvFm (FIGURA 13). A fotossíntese se correlacionou positivamente com a FvFv em ambos os tratamentos.

Figura 13 – Análise de correlação e mapa de calor representado a intensidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) com tratamento com piraclostrobina.



Legenda: T2: plantas com piraclostrobina; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Corr: código de cores em indica variação gradativa do índice de correlação de Pearson.

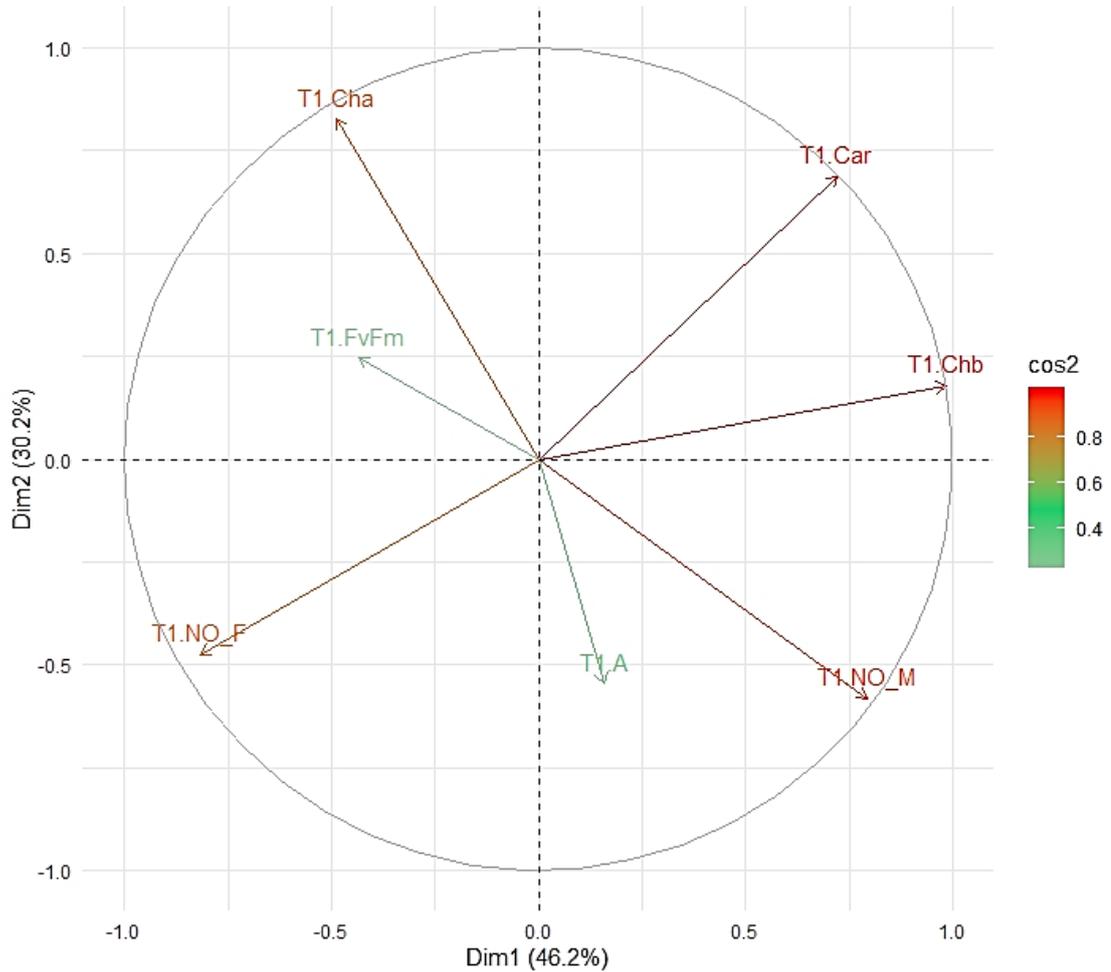
A influência de cada variável sobre a outra pode ser investigada tanto do ponto de vista fisiológico, quanto do ponto de vista matemático. A partir de uma transformação linear ortogonal dos dados da matriz de correlação, foram geradas ortogonizações de vetores a partir

da análise de componentes principais, para se verificar o impacto da variância de cada variável em função da outra, em cada tratamento. Para a visualização do nível de contribuição de cada variável, a análise foi integrada ao cálculo do quadrado cosseno (FIGURAS 14 e 15).

De acordo com a Figura 14, as variáveis nas plantas sem aplicação de piraclostrobina foram menos entrelaçadas e estão condizentes pela representatividade de cerca de 76% da variabilidade total dos dados nas duas dimensões. O teor de NO na folha não teve contribuição sobre as demais variáveis, apresentando um comportamento totalmente isolado e negativamente correlacionado. Semelhante aconteceu para o teor de NO no meristema, para a fotossíntese e para o teor de clorofila *a*. O comportamento para *A* e teor de clorofila *a* está representado em somente cerca de 30% da variabilidade total dos dados (dimensão 2), tendo pouco impacto uma sobre a outra. A FvFm e *A*, embora tenham apresentado uma correlação positiva, tiveram baixa contribuição sobre as outras variáveis em cada dimensão em que se encontram (vetores menores e coloração mais clara). Os teores de carotenoides e clorofila *b* parecem ter promovido maiores influências sobre as demais variáveis, sendo o teor de clorofila *b* a componente principal e carotenoides a secundária.

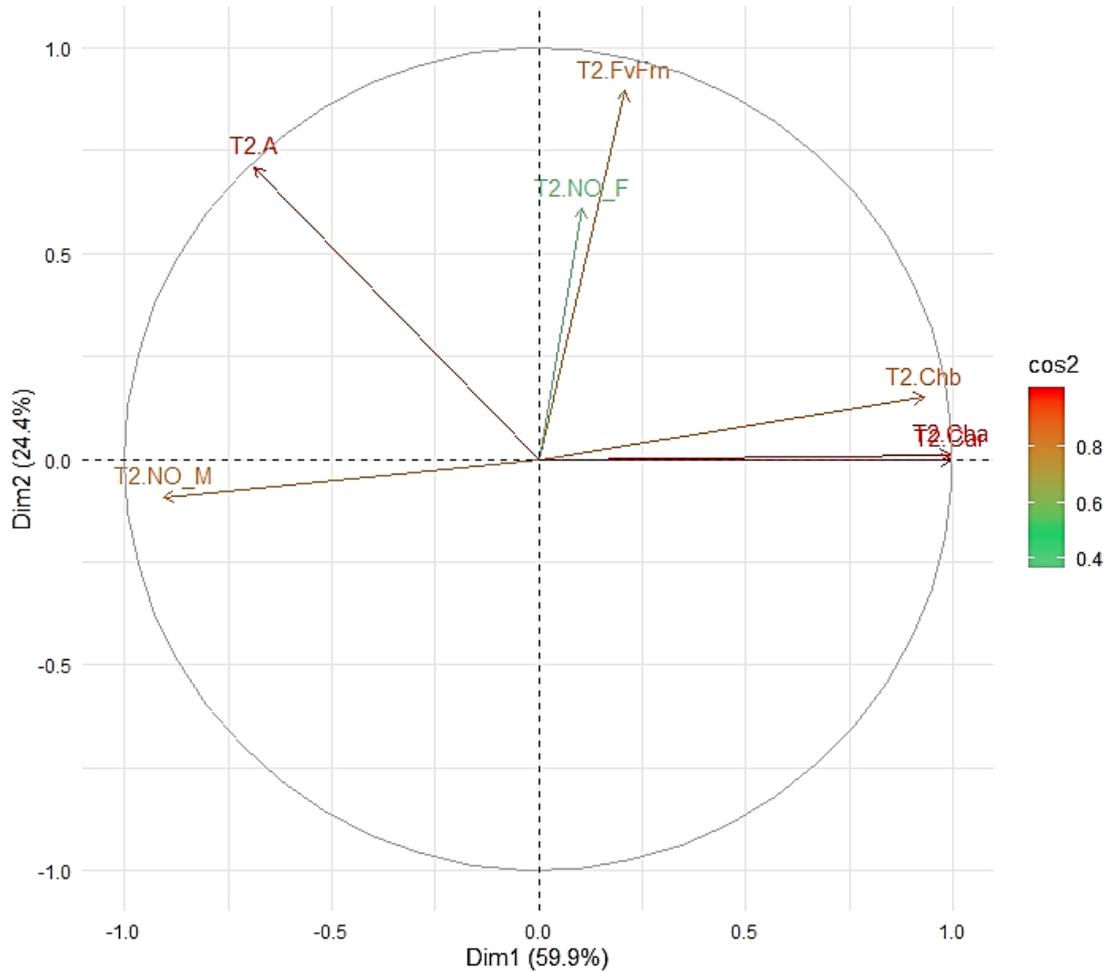
De acordo com a Figura 15, plantas tratadas com piraclostrobina (T2) exibiram padrões de impacto totalmente diferentes em relação às plantas controle. Maiores contribuições foram promovidas pelos pigmentos fotossintéticos, estando altamente correlacionados entre si (ângulos mais agudos entre os seus vetores). Esses impactos repercutiram em FvFm, seguido do teor de NO foliar, os quais estão altamente correlacionados (ângulos mais agudos entre si). Esses dados foram mais entrelaçados e condizentes pela representatividade de cerca de 84% da variabilidade total dos dados. Para os impactos gerados pela *A* e teor de NO no meristema, os dados seguem comportamentos mais desarmônicos, tendo uma relação entre si representada em apenas 24%. Apesar de NO no meristema já apresentar maiores relações com a fotossíntese, teve pouca ou nenhuma contribuição com as demais variáveis. Nesse caso, clorofila *a* e carotenoides são as componentes principais e resumem efetivamente a variância amostral em torno de 60% (dimensão 1).

Figura 14 – Análise de componentes principais integrada ao cálculo de cosseno quadrado, representado a intensidade variabilidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) sem aplicação de piraclostrobina.



Legenda: T1: plantas controle; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Dim1: Dimensão 1; Dim2: Dimensão 2; cos2: código de cores indicando a variação gradativa do coeficiente de correlação dado pelo cosseno quadrado do ângulo dos vetores, mostrando o impacto da contribuição das variáveis em uma escala de 0 a 1.

Figura 15 – Análise de componentes principais integrada ao cálculo de cosseno quadrado, representado a intensidade variabilidade da correlação entre as variáveis analisadas, em plantas de cana-de-açúcar (cv. RB966920) com aplicação de piraclostrobina.



Legenda: T2 plantas com piraclostrobina; NO: óxido nítrico; M: meristema apical da parte aérea; F: folha; A: fotossíntese; FvFm: eficiência quântica do fotossistema II, Cha: clorofila *a*; Chb: clorofila *b*; Car: carotenoides; Dim1: Dimensão 1; Dim2: Dimensão 2; cos2: código de cores indicando a variação gradativa do coeficiente de correlação dado pelo cosseno quadrado do ângulo dos vetores, mostrando o impacto da contribuição das variáveis em uma escala de 0 a 1.

4.5 Crescimento Vegetativo

Os resultados obtidos no experimento em campo mostraram que os produtos Opera[®], Orkestra[®], Ativum[®] e BAS751* apresentaram efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar. Esses efeitos variaram tanto entre o tipo de produto como entre a quantidade de aplicações. Destaca-se que os resultados foram mais significativos com o acúmulo de 3 aplicações dos produtos feitas a cada 30 dias, em que na maioria dos parâmetros, a utilização apenas de 1 e 2 aplicações não promoveram diferenças significativas.

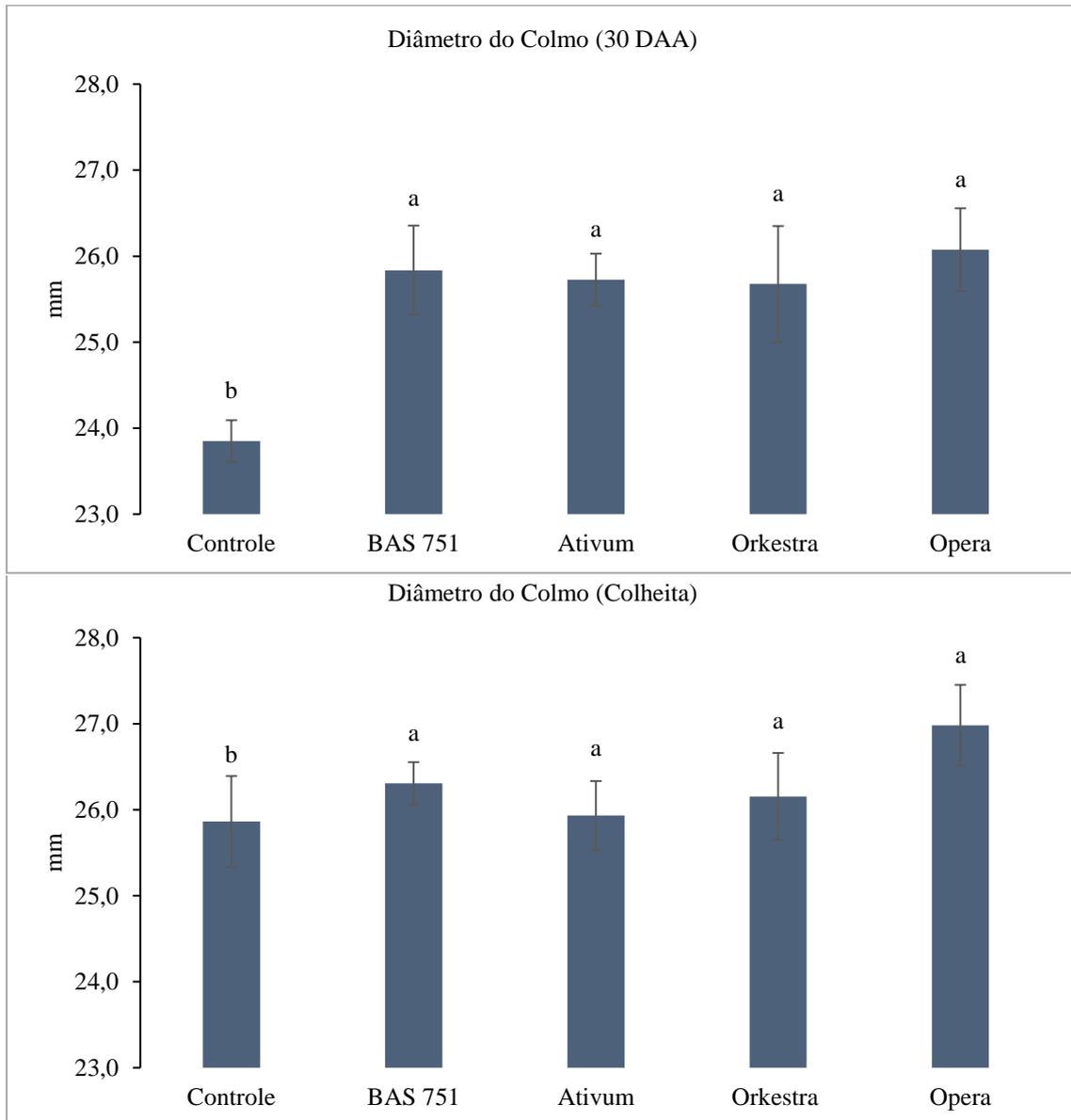
As plantas sob aplicação piraclostrobina apresentaram efeitos positivos em parâmetros ligados ao crescimento vegetativo e na produtividade final, bem como na regulação da expressão gênica. Os dados indicaram uma forte influência da piraclostrobina no metabolismo e na transição do estágio vegetativo para o reprodutivo. Esses resultados apontam para a necessidade de uma maior investigação dos efeitos dos produtos no controle do florescimento, considerando-se a adição de uma 3ª aplicação, no manejo convencional usado em cana-de-açúcar, em momentos estratégicos da indução floral e da maturação.

4.5.1 Diâmetro do colmo

A partir da coleta de dados biométricos foram feitas as análises sobre o crescimento das plantas, considerando-se o efeito dos produtos e o efeito do número de aplicações feitas a cada 30 dias. Em média, o BAS751, o Ativum, o Orkestra e o Opera promoveram aumentos de 8,4%; 7,9%; 7,7%; e 9,4%; respectivamente, 30 dias após a 3ª aplicação (FIGURA 16).

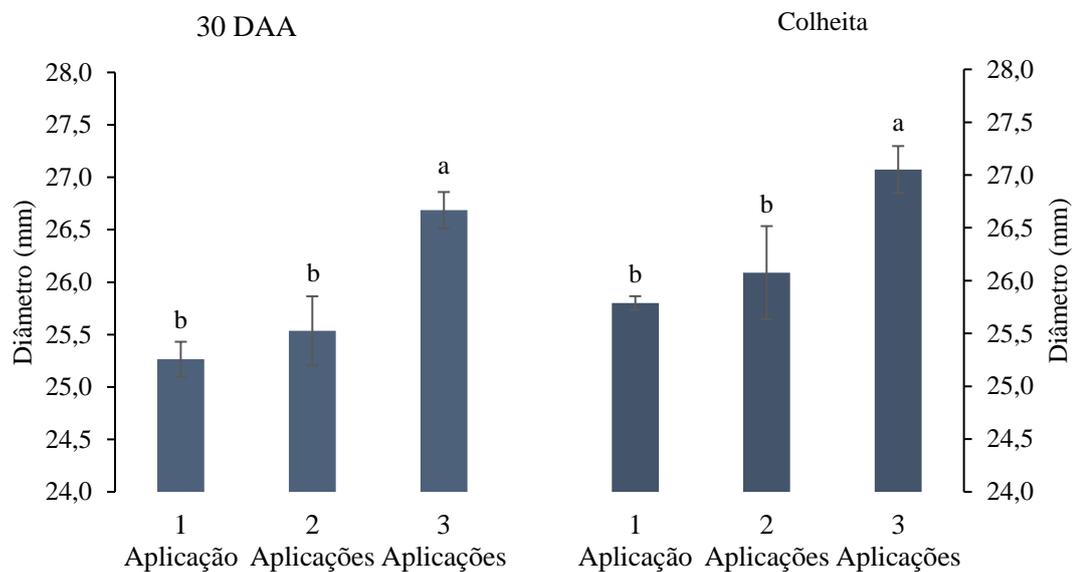
Em média, todos os produtos aumentaram o DC em 3,84, 7,84 e 13,37%, com 1, 2 e 3 aplicações, respectivamente, em relação às plantas sem aplicação (FIGURA 17). Os resultados apresentaram maiores diferenças 30DAA (30 dias após a 3ª aplicação). Isso indica que o efeito dos produtos se intensifica 90 dias após a 1ª aplicação em todas as parcelas.

Figura 16 – Diâmetro médio do colmo de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina.



Legenda: As colunas representam a média geral, de plantas com 1, 2 e 3 aplicações de cada tratamento. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação dos tratamentos no mês de abril de 2018. Colheita representa as avaliações realizadas no momento antes da colheita, no mês de setembro de 2018. Letras minúsculas nas colunas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Figura 17 – Diâmetro do colmo de plantas da cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetida a diferentes doses de aplicação de produtos à base de piraclostrobina.

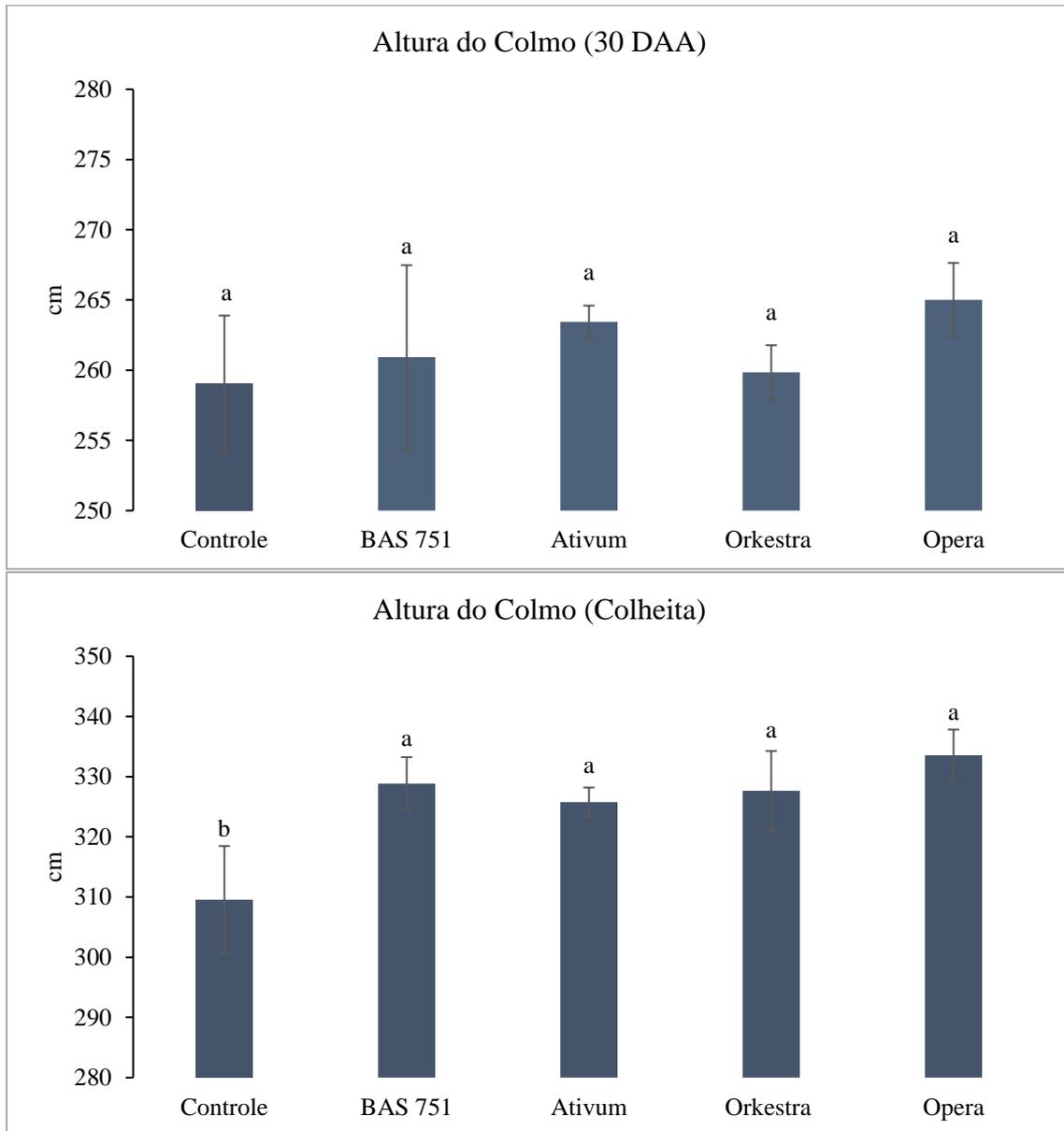


Legenda: Valores nas colunas representam a média geral das alturas das plantas sob aplicação de todos os produtos. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação.

4.5.2 Altura do colmo

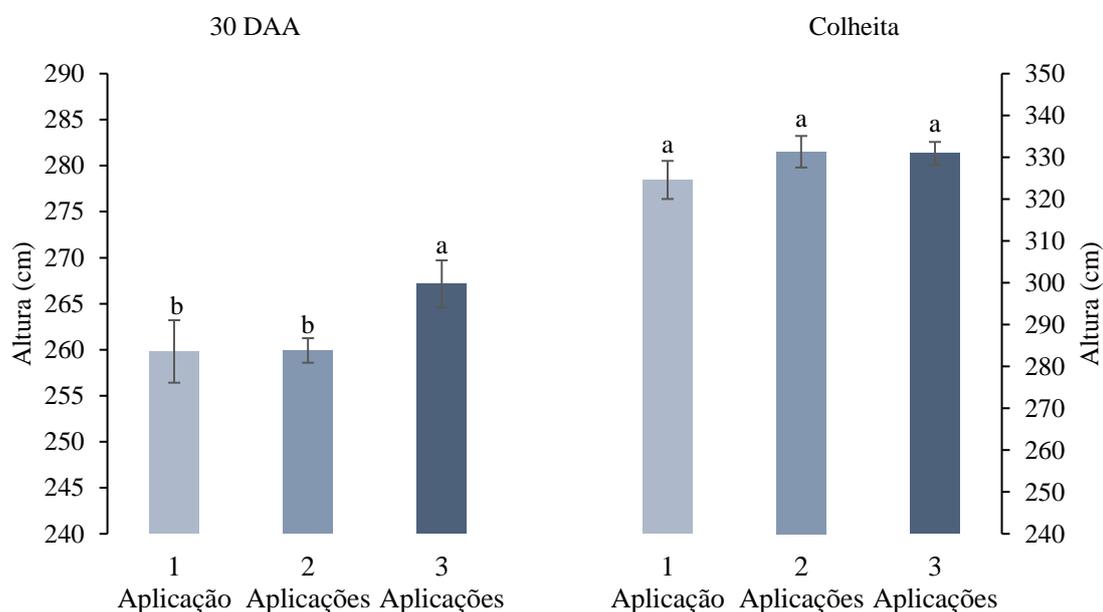
A altura do colmo apresentou diferenças significativas apenas no momento da colheita. Todos os produtos promoveram o incremento do crescimento do colmo em relação ao controle (FIGURA 18). Quanto ao número de aplicações, o crescimento só foi significativo com o acúmulo de 3 aplicações dos produtos, com um incremento médio em torno de 6% (FIGURA 19).

Figura 18 – Altura do colmo de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina.



Legenda: As colunas representam a média geral, de plantas com 1, 2 e 3 aplicações de cada tratamento. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação dos tratamentos realizada no mês de abril de 2018. Colheita representa as avaliações realizadas no momento antes da colheita, no mês de setembro de 2018. Letras minúsculas diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Figura 19 - Altura de colmo da cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetida a diferentes doses de aplicação de produtos à base de piraclostrobina.

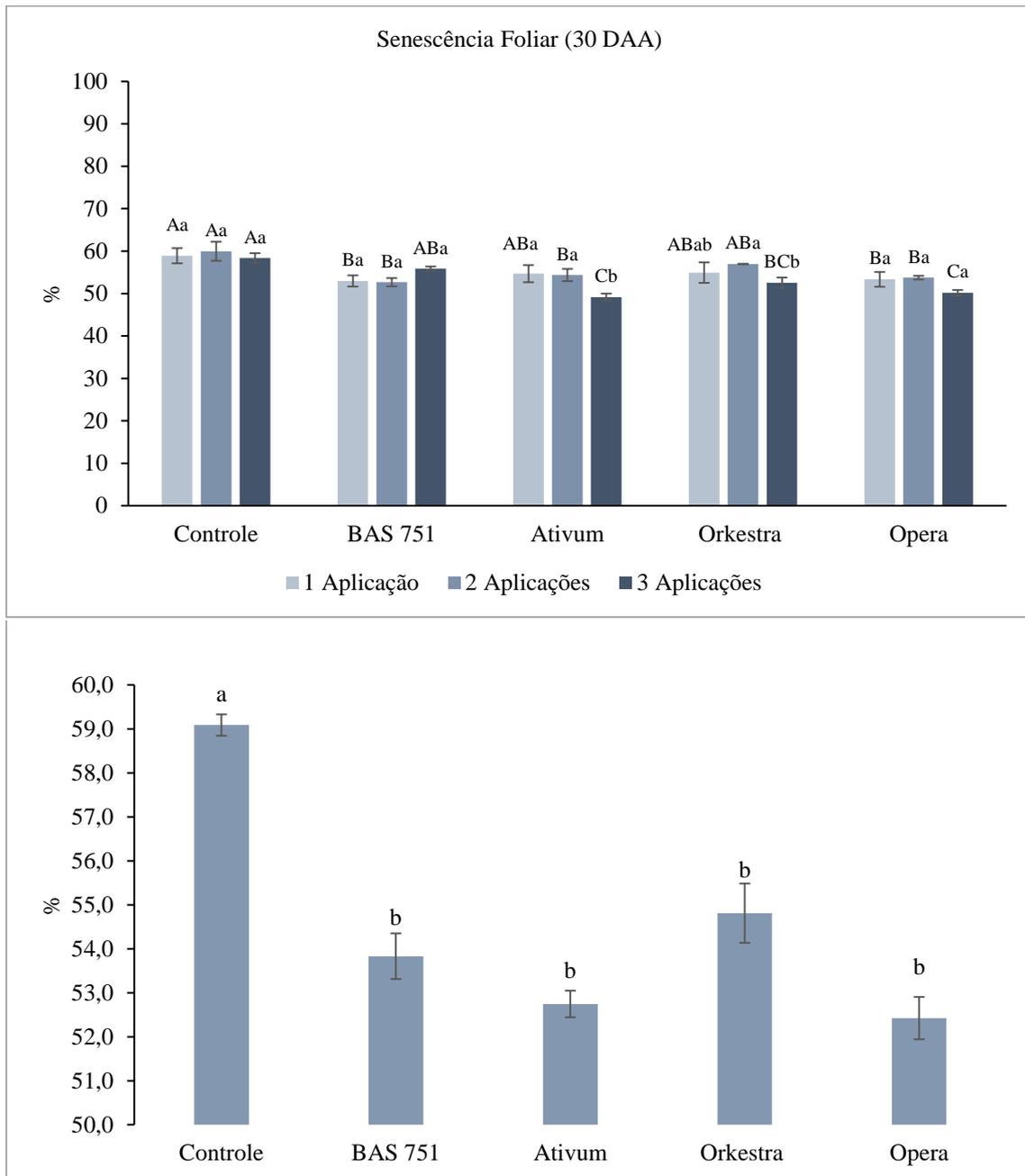


Legenda: Valores nas colunas representam a média geral das alturas das plantas sob aplicação de todos os produtos. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação, 60 dias após a 2ª aplicação e 90 dias após a aplicação dos produtos.

4.6 Senescência Foliar

A partir dos dados quanto ao número de folhas vivas e senescentes, foram realizadas estimativas da senescência foliar (FIGURA 20). Os resultados indicaram que todos os produtos reduziram a senescência foliar, destacando-se o Ativum, o Orkestra e o Opera, com 3 aplicações. No momento da colheita, não houveram diferenças significativas para os produtos e quantidade de aplicações. Em observações qualitativas no interior do canavial, foi possível notar grandes diferenças em relação à quantidade de folhas secas em plantas sem aplicação e folhas verdes em plantas com aplicação (FIGURA 21).

Figura 20 – Senescência foliar de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina.



Legenda: As colunas no primeiro gráfico representam a média geral, de plantas com 1, 2 e 3 aplicações de cada tratamento. 30 DAA indica que as avaliações foram feitas 30 dias após a 3ª aplicação dos tratamentos, realizadas no mês de abril (2018). Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os produtos em cada nível de aplicação. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre cada produto dentro dos 3 níveis de aplicações ($p \leq 0,05$).

Figura 21 – Vista superior do canavial (cv. SP801842), safra 2017/2018 sem emissão de pendão floral.



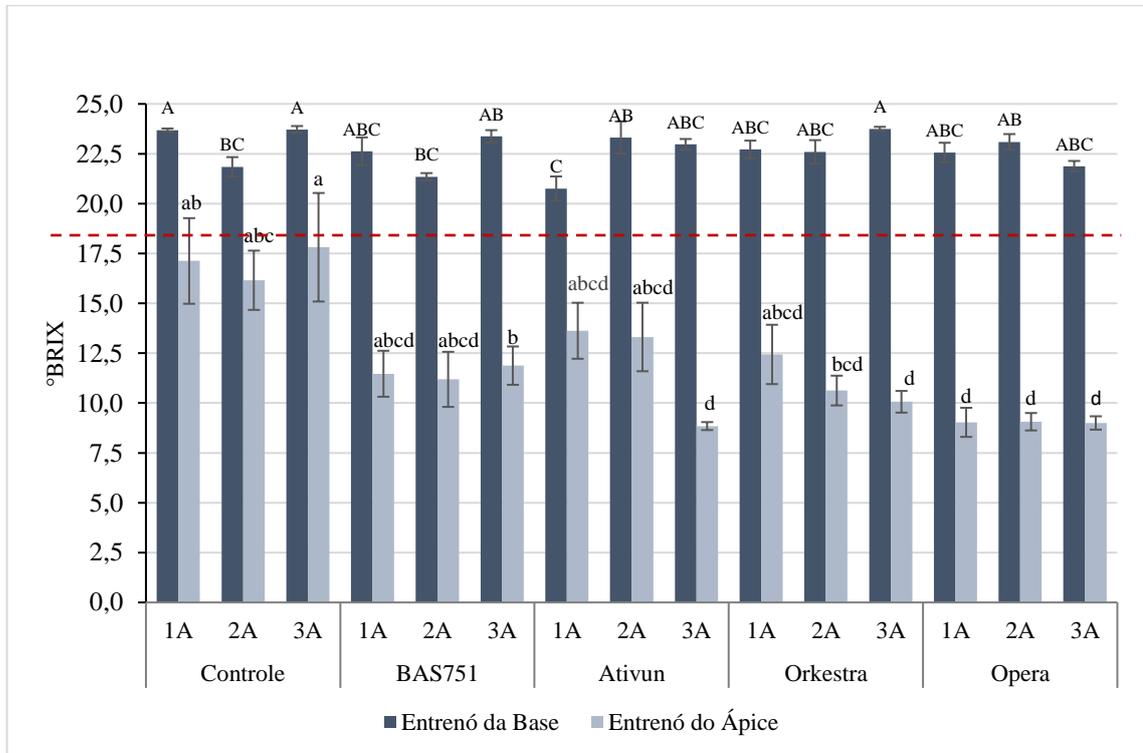
Legenda: Diferenças na densidade de folhas verdes à esquerda (plantas sem aplicação - Controle) e do centro para direita (plantas com aplicação de produtos à base de piraclostrobina). Barra = 10 m. Fonte: Do autor (2018).

4.7 Maturação

Os resultados quanto ao índice de maturação foram obtidos a partir da relação entre a aferição do °Brix da base e do ápice de colmos. As variações entre todos os tratamentos para o açúcar na base do colmo foram mínimas, sendo as variações no ápice determinantes para a análise da influência do açúcar sobre o florescimento. Plantas com aplicação de Ativum foram mais sensíveis para 3 aplicações, com cerca de 50% de redução do açúcar no ápice. O Opera promoveu redução de 47% ainda que sem variação quanto ao número de aplicações. O BAS751 e o Orkestra promoveram redução de 32% e 37 %, respectivamente, sendo menos sensíveis ao número de aplicações (FIGURA 22).

As medições feitas na base e no ápice mostraram a relação entre o açúcar disponível nos entrenós maduros e entrenós imaturos, o que é importante agronomicamente no manejo da cana-de-açúcar para inferências sobre o nível de maturação em que as plantas se encontram. Esses dados mostraram que as plantas com piraclostrobina apresentaram redução de açúcares próximo à região apical, podendo limitar o desenvolvimento floral.

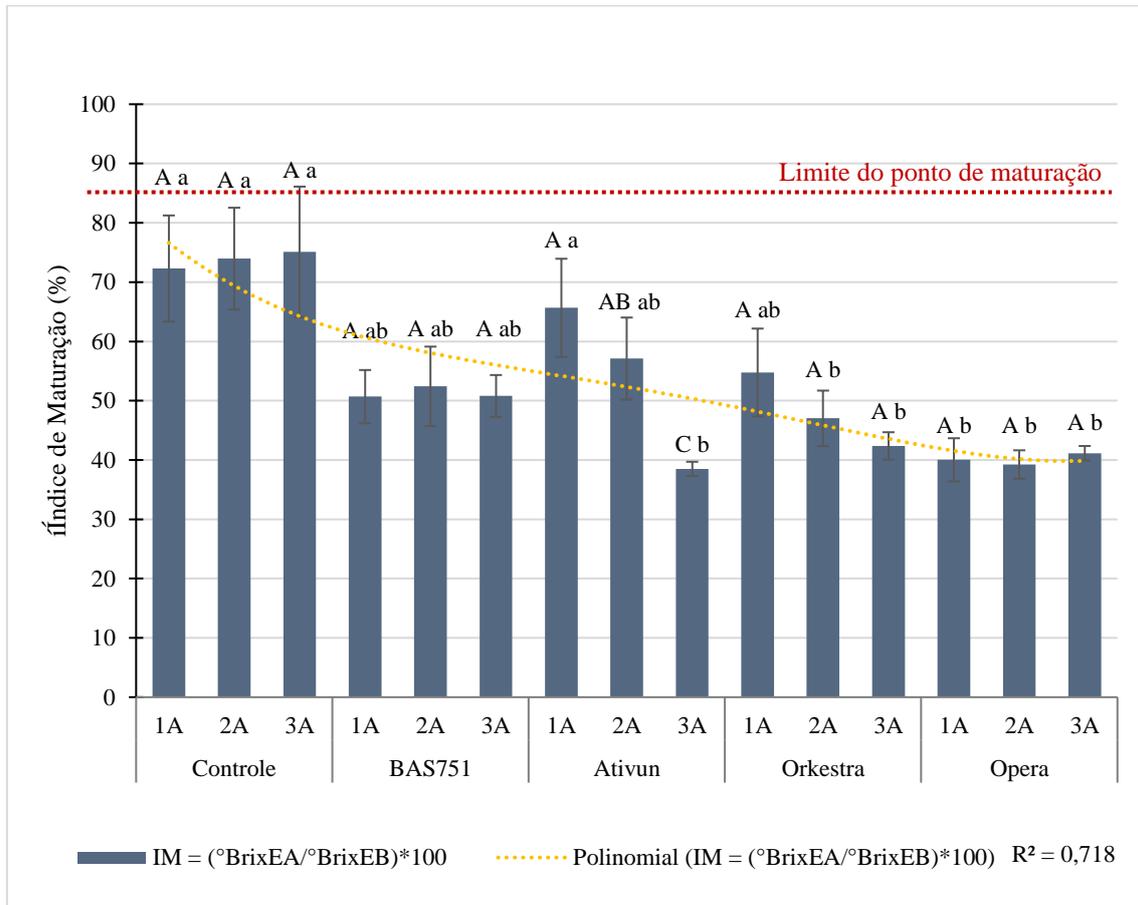
Figura 22 - Determinação do teor de açúcares solúveis a partir do °Brix (porcentagem em massa de sólidos solúveis contidos em uma solução de sacarose quimicamente pura) da base e do ápice do colmo, em cana-de-açúcar (cv. SP801842), sob aplicação de piraclostrobina.



Legenda: A linha tracejada indica o °Brix do colmo ideal para o corte da cana-de-açúcar ($^{\circ}\text{Brix} \geq 18$). A1: Plantas que receberam 1 aplicação; A2: Plantas que receberam 2 aplicações; A3: Plantas que receberam 3 aplicações. As medidas foram realizadas antes da colheita no mês de setembro do ano de 2018. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para o entrenó da base e letras minúsculas entre os tratamentos para o entrenó do ápice ($p \leq 0,05$).

Vale destacar que, em todos os tratamentos as plantas se encontravam no ponto de colheita ideal ($^{\circ}\text{Brix} \geq 18$). No entanto, ao se considerar a maturação fisiológica, as plantas tratadas com os produtos podem estar menos propensas ao florescimento (FIGURA 23). Os resultados mostraram que as plantas mantiveram níveis ideais de açúcares na base do colmo, e reduziram os açúcares próximo ao meristema. Esses dados sugerem que as plantas se mantiveram em estágio de crescimento vegetativo por mais tempo. As plantas sem aplicação ficaram mais próximas do limite de maturação, estando mais sujeitas à degradação de açúcares e ao florescimento. As indicações para os valores de IM são: menor que 0,60 para a cana verde; entre 0,60 e 0,85 para a cana em processo de maturação; entre 0,85 e 1 para a cana madura; maior que 1 para a cana em processo de declínio de sacarose (CESNIK, et al., 2004).

Figura 23 - Índice de maturação (IM) de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina.

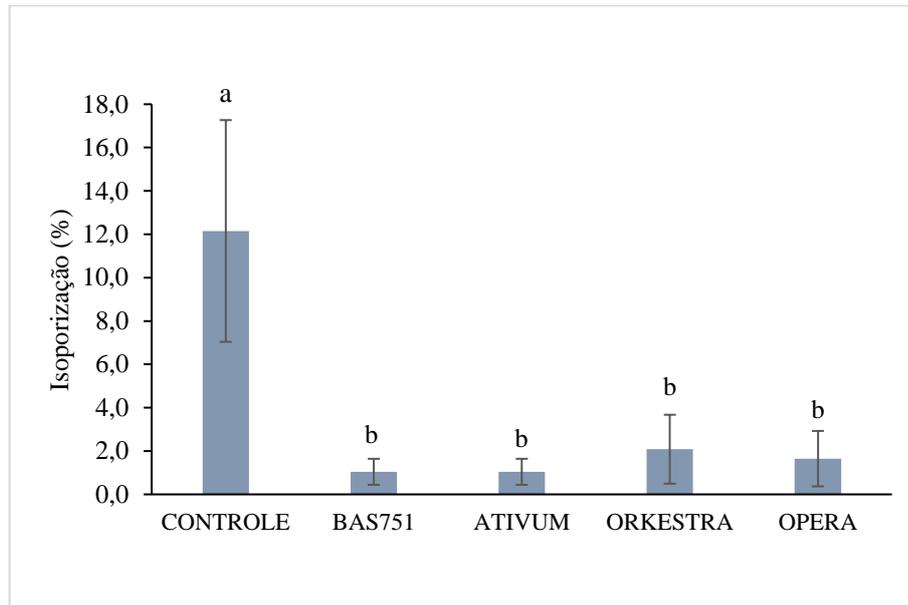


Legenda: A1: Plantas que receberam 1 aplicação; A2: Plantas que receberam 2 aplicações; A3: Plantas que receberam 3 aplicações. As medidas foram realizadas previamente antes da colheita, no mês de setembro (2018). Letras maiúsculas nas colunas indicam diferença significativa entre o número de aplicações em cada tratamento. Valores médios (IM) representados pela relação entre entrenós da base (EB) e do ápice (EA). Letras minúsculas nas colunas indicam diferença significativa entre os produtos em cada nível de aplicação ($p \leq 0,05$).

4.8 Isoporização

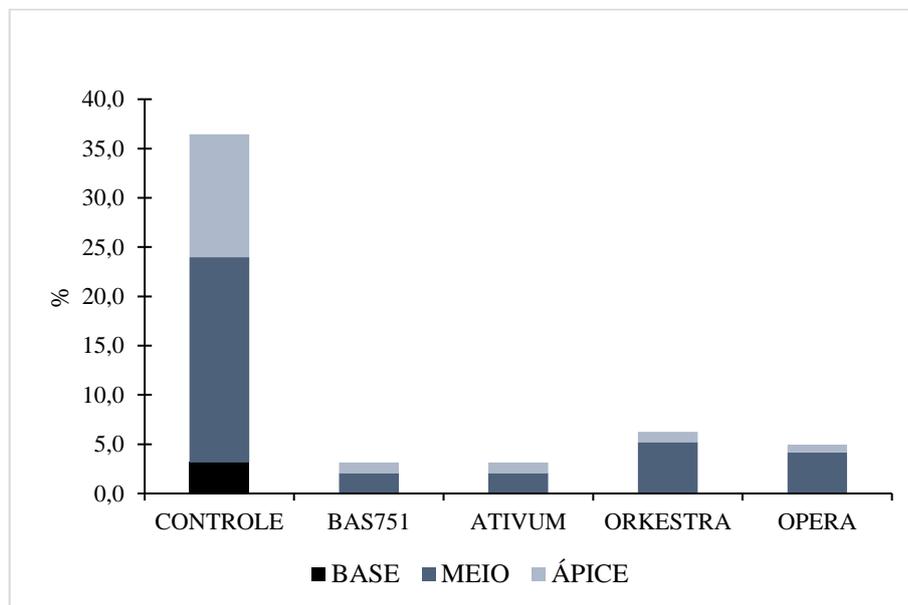
A aplicação dos produtos promoveu redução significativa da isoporização do colmo da cana-de-açúcar, o que pode significar em ganhos finais do açúcar (FIGURA 24). Nas plantas sem aplicação, a isoporização ocorreu ao longo da base, do meio e da extremidade do colmo (FIGURA 25). Não houveram diferenças significativas entre o número de aplicação. No entanto, os dados brutos em todos os níveis de aplicação mostraram que os produtos apresentam mais de 50% de inibição da isoporização.

Figura 24 - Isoporização de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina.



Legenda: Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os produtos em todos os níveis de aplicação (1, 2 e 3 aplicações). 1A: Plantas que receberam 1 aplicação; 2A: Plantas que receberam 2 aplicações; 3A: Plantas que receberam 3 aplicações.

Figura 25 – Distribuição da isoporização ao longo da base, do meio e do ápice do colmo de plantas de cana-de-açúcar (SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina.



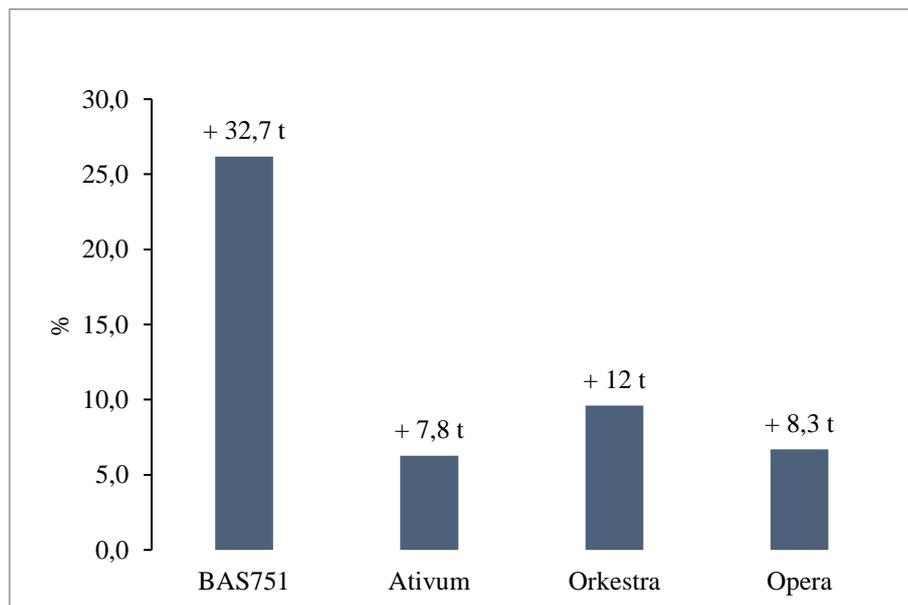
Legenda: Dados expressos em porcentagem relativa de isoporização na base, no centro e no ápice do colmo.

4.9 TCH

Os dados quanto a produção média, incluindo a tonelada de colmo por hectare (TCH) e análises tecnológicas realizadas em usina, ainda estão em fase de análises. Em geral, tomadas em conjunto as médias dos 3 níveis de aplicações, foi possível constatar que os produtos promovem um ganho final de biomassa da cana-de-açúcar (FIGURA 26).

Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas, sobre plantas controle, a partir de duas aplicações. As diferenças não foram significativas entre os produtos e nem entre o número de aplicações. Maiores efeitos sobre o TCH foram promovidos pelo BAS751, com aumento médio de 32,6 t ha⁻¹ a mais em relação às plantas sem aplicação. O Ativum promoveu aumento de 7,8 t ha⁻¹, o Orkestra 12 t ha⁻¹, o Opera 8,3 t ha⁻¹.

Figura 26 - Incremento do TCH (%) de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina, em relação às plantas sem aplicação.



Legenda: Diferença média para todos os produtos nos 3 níveis de aplicações (média das plantas com 1, 2 e 3 aplicações).

4.10 Florescimento

Os dados quanto ao florescimento foram registrados por meio de análise visual a partir de imagens da sessão longitudinal da região meristemática. Das plantas observadas em cada parcela, foi contabilizada a ocorrência de meristema apical da parte aérea diferenciado (ou início de ponto de vela²) (TABELA 1). Detalhes da região meristemática podem ser observadas na figura 27.

Tabela 1 - Contagem de meristemas diferenciados em plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina, no momento da colheita.

	Controle	BAS751	Ativum	Orkestra	Opera
1A	4	4	3	1	3
2A	3	2	2	2	3
3A	4	1	1	0	0

Legenda: 1A: Plantas que receberam 1 aplicação; 2A: Plantas que receberam 2 aplicações; 3A: Plantas que receberam 3 aplicações (n = 4)

² Termo agrônomo referente ao início do desenvolvimento da inflorescência em cana-de-açúcar; estrutura em forma de chama de vela relativo ao início da imissão do pendão floral.

Figura 27 - Detalhe da região meristemática da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de produtos à base de piraclostrobina.

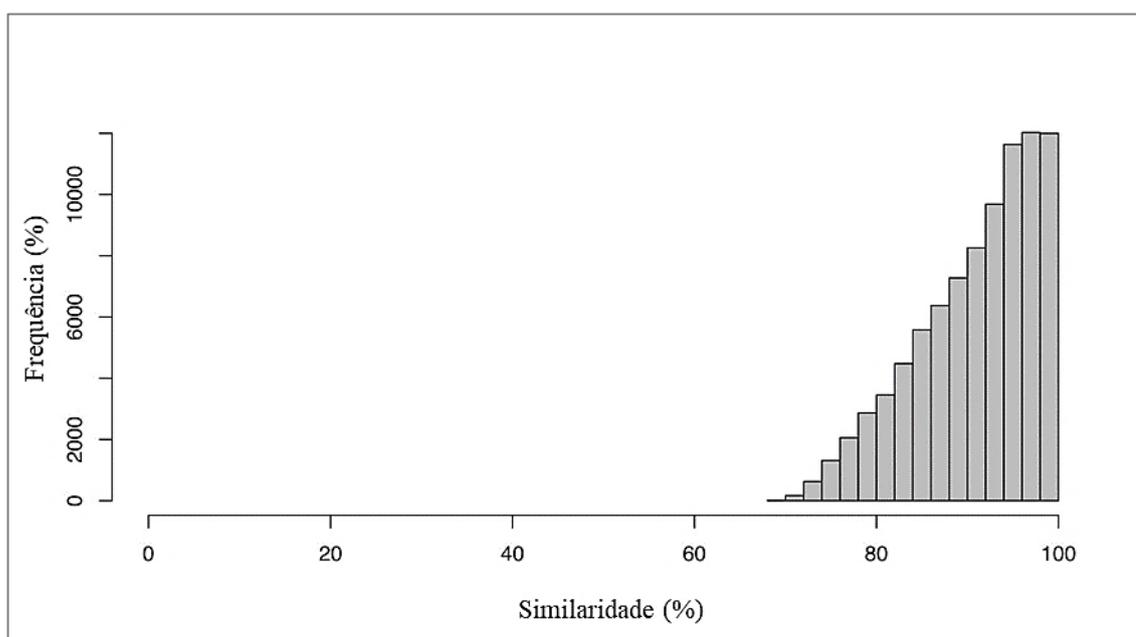


Legenda: Corte longitudinal do ápice do colmo de plantas com 1, 2 e 3 aplicações dos produtos. Imagens obtidas previamente antes da colheita. Setas indicam a presença de “ponto de vela”, caracterizado como o início a emissão da inflorescência.

4.10 RNA-seq

Foram identificados 148.923 genes codificadores de RNAs com um total de 280.090 isoformas. O valor N50 para a maioria das isoformas de cada gene foi 1.367. Neste caso, 50% das isoformas dos genes preditos tiveram um tamanho igual ou superior a 1.367 pares de bases. O tamanho médio dos genes foi 1.021 pb, sendo a proximidade dos valores dessas métricas um indicativo que diversos genes foram preditos em toda sua extensão. Um total de 267.951 isoformas (aproximadamente 96%) possuíram similaridade média de 91% com alguma sequência nucleotídica depositada no NCBI até a data de 22/02/2020 (FIGURA 28).

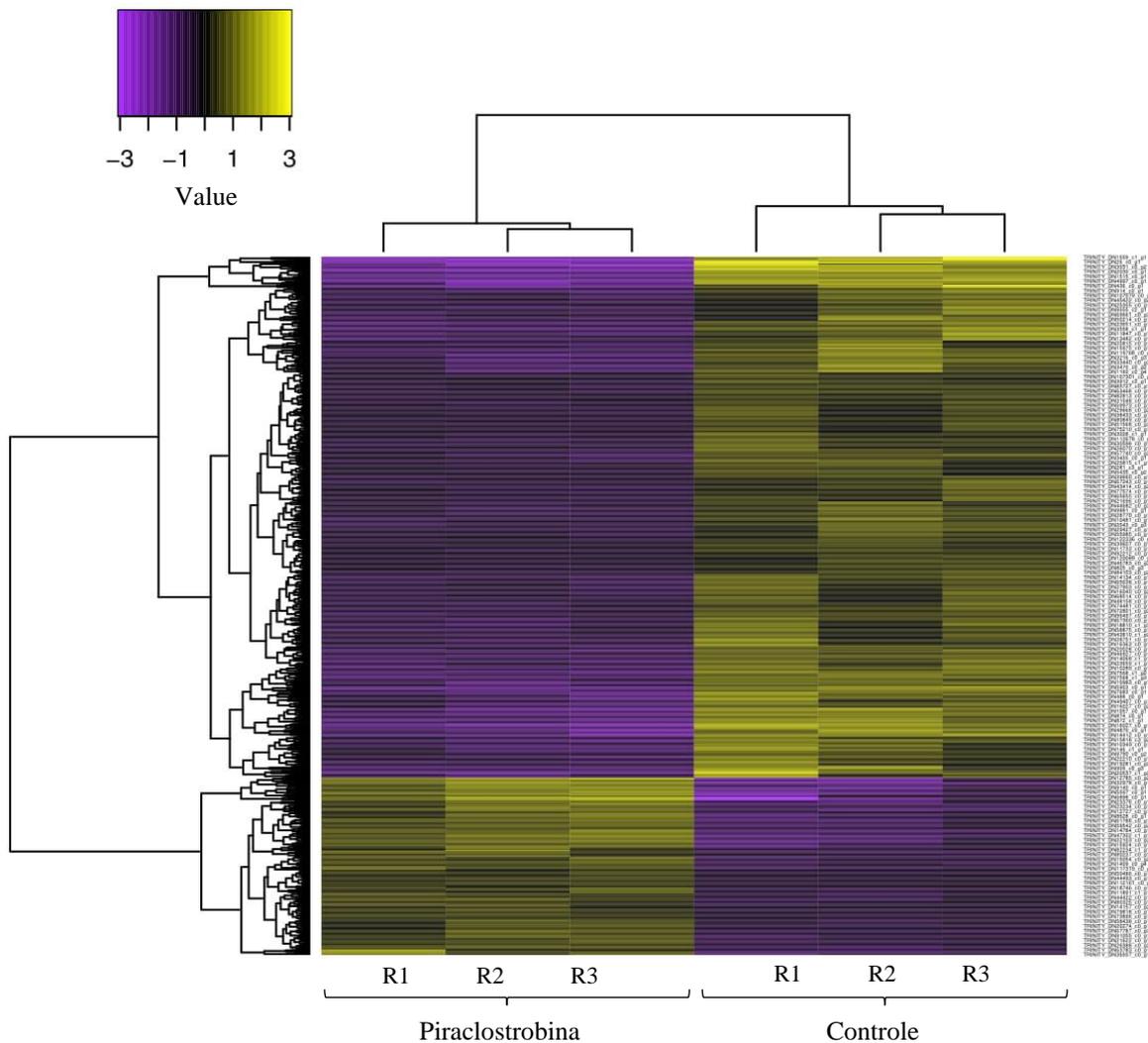
Figura 28 – Relação de similaridade das sequências obtidas do RNA-seq da folha de cana-de-açúcar preditas por meio do RefSeq (NCBI).



Foram observados 213 genes desconhecidos (não alinhados pelo *blast*) diferencialmente expressos do total de genes diferencialmente expressos, apresentando regulação descendente (*down-regulation*) para as plantas tratadas com piraclostrobina. Em contrapartida, a piraclostrobina aumentou a expressão de 223 genes. Cerca de 30 genes ligados ao cloroplasto, foram diferencialmente expressos. Cerca de 6 genes mitocondriais foram diferencialmente expressos. Outros genes possivelmente ligados à resposta para auxina, etileno, giberelina também foram positivamente regulados. A maioria dos conjuntos de dados tinha alta

homologia com genes no genoma de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), auxiliando na identificação da identidade e relações entre eles (FIGURA 29).

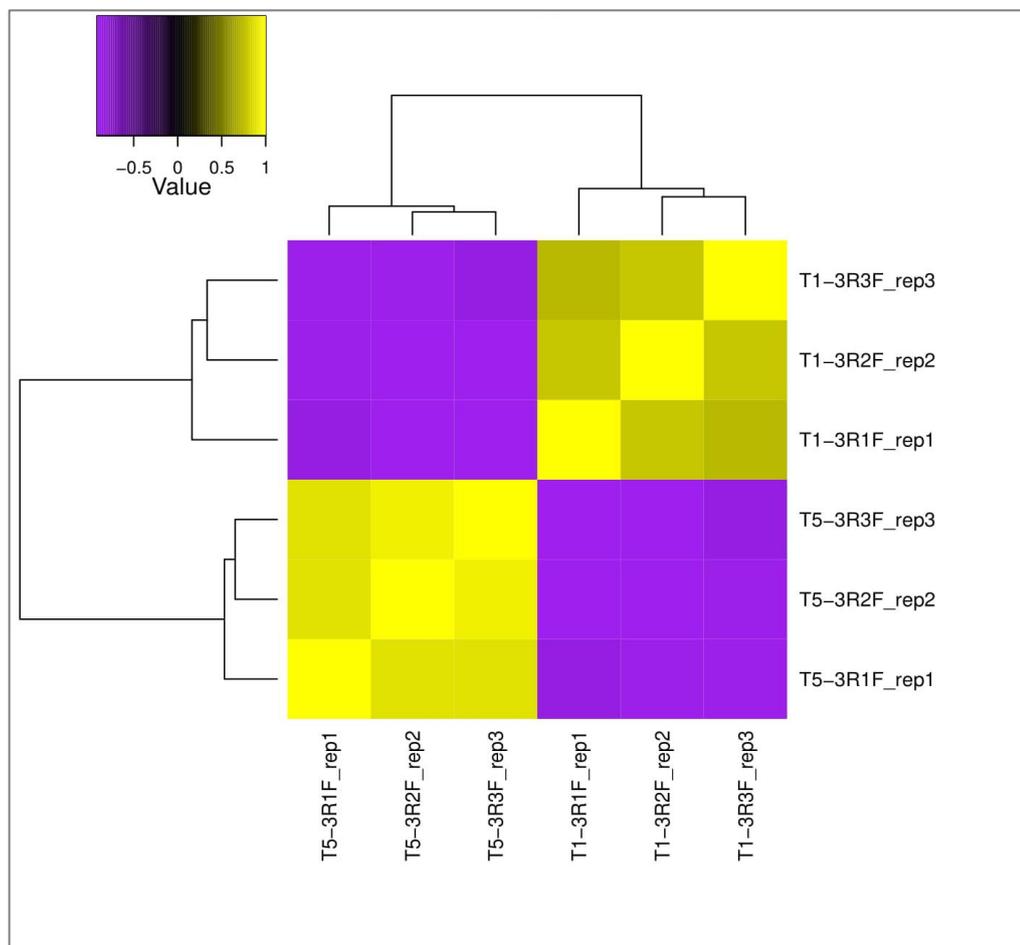
Figura 29 – Mapa de calor de assinaturas moleculares e agrupamento hierárquico, indicando genes diferencialmente expressos, a partir das análises dos dados de RNA-seq, de folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de Piraclostrobina (Opera[®]).



Legenda: A cor gradiente purpura ao amarelo representa a proporção da variação de expressão gênica absoluta, em contagem por milhão (CPM). As anotações na parte superior do mapa de calor mostram o agrupamento das amostras (bibliotecas), as anotações na parte lateral mostram o agrupamento entre os genes.

Os dados de expressão para cada amostra sequenciada mostraram que havia uma boa distribuição entre as repetições biológicas. Cada tratamento continha 3 repetições biológicas, constituídas de um pool de 4 plantas por repetição o que garantiu uma melhor consistência dos resultados (FIGURA 30). As análises em T1 (tratamento controle) representam a expressão negativa dos genes promovidas pelo tratamento T2 (tratamento com piraclostrobina) e as análises em T2 representam a expressão positiva dos genes. O que foi positivamente expresso em T1 indica que foi negativamente expresso em T2.

Figura 30 – Representação da variabilidade da expressão gênica entre as amostras de cada tratamento.

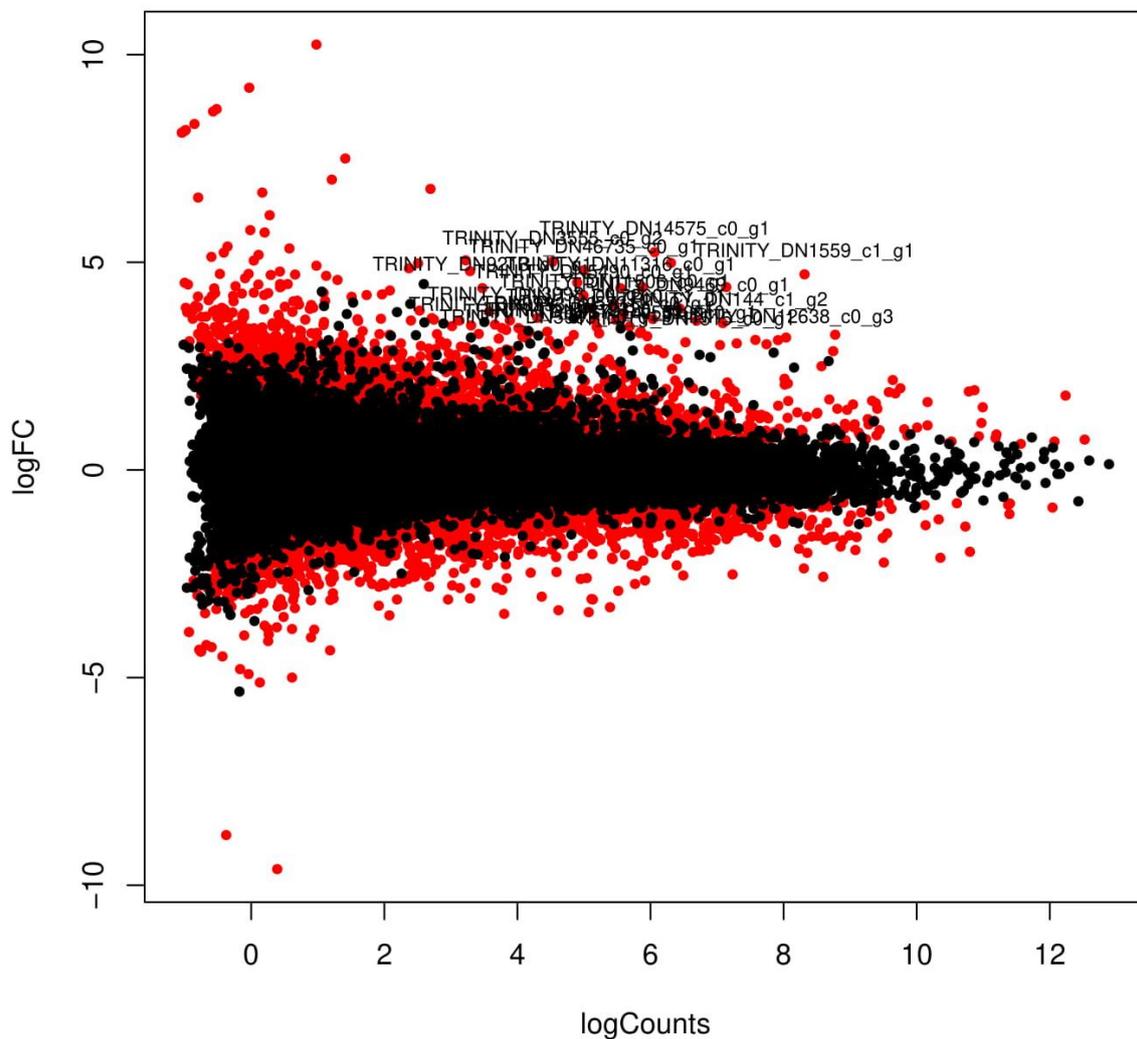


Legenda: A cor gradiente purpura ao amarelo representa a proporção da variação de expressão gênica entre repetições dos tratamentos pelo coeficiente de correlação. As anotações na parte superior do mapa de calor mostram o agrupamento hierárquico das amostras, as anotações na parte lateral mostram o agrupamento entre os genes. T1-: plantas sem aplicação de piraclostrobina; T5-: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®).

A análise preliminar do transcriptoma da cana-de-açúcar foi realizada no RNA total derivado de amostras individuais de folhas de plantas tratadas com o Opera® em contraste com

o controle. Os resultados da expressão diferencial mostraram que, muitos genes tiveram uma enorme mudança na expressão quando as plantas foram tratadas com piraclostrobina. As diferenças de magnitude entre a expressão dos genes estão representadas na Figura 31, indicando o total de transcritos e o impacto biológico da diferença de expressão, em relação ao nível de expressão gênica dada em log2 de Fold Change e a expressão absoluta.

Figura 31 - Expressão diferencial de genes em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de Piraclostrobina (Opera®), determinada a partir de análises de RNA-seq.



Legenda: Os genes que foram diferencialmente expressos significativamente são indicados pelos pontos vermelhos. Os genes que não apresentaram diferença significativa na expressão estão representados pelos pontos pretos. Os dados são organizados ao longo das dimensões biológicas (dada em $-\log$ de Fold Change entre o controle e tratamento) e o valor de significância estatística em FDR ($n = 3$). O eixo x indica o impacto biológico da diferença de expressão, enquanto o eixo “y” indica o nível de expressão gênica em log de Fold Change.

estatística da diferença de expressão. Quanto maior o valor de $-1*\log_{10}(\text{FDR})$ maior foi o nível de significância na diferença de expressão relativa desses genes.

A partir da análise de expressão diferencial foram identificados 877 genes sendo expressos diferencialmente. A aplicação de piraclostrobina causou a redução na expressão de 654 genes, muitos deles codificadores de proteínas de choque térmico (*heat shock* - HSP). Genes negativamente regulados foram observados com identidade para diversos fungos, tais como *Zymoseptoria tritici*, *Polysphondylium pallidum*, *Isaria fumosorosea*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Lachnellula hyalina* e outros. Muitos genes que respondem ao estresse reduziram a expressão, como genes envolvidos em ubiquitinação ligados a sinalização de defesa.

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeitos da piraclostrobina na eficiência fotossintética e no acúmulo de óxido nítrico

O rendimento energético potencial da cana-de-açúcar é uma de suas principais qualidades, tornando-a alvo de pesquisas que vão desde de programas de melhoramento varietal até os programas de manejo para aumento da produtividade, sustentabilidade e lucratividade de mercado. Um dos grandes desafios para aumentar a produtividade dessa cultura é a expansão de fronteiras agrícolas e as consequências ambientais desse processo. A perspectiva principal nesse contexto tem sido otimizar e melhorar parâmetros do rendimento energético metabólico, explorando mais a cultura em menos tempo e espaço agrícola. Esses parâmetros incluem em destaque os aspectos ligados ao potencial de rendimento fotossintético da cultura.

A melhoria em parâmetros do potencial de rendimento tem sido uma das perspectivas com a piraclostrobina, para otimizar e usufruir das capacidades biológicas da cana-de-açúcar. No presente trabalho, a assimilação líquida de carbono P_N foi potencializada com a aplicação de piraclostrobina. A P_N desempenha um papel importante na melhoria da produção vegetal. Os resultados mostraram que esse desempenho em P_N , a partir das curvas de resposta à luz, se estendeu desde alta intensidade luminosa ($P_{(I_{max})}$) até os pontos de baixa fluência após a inclinação máxima da curva, a qual é limitada por assimilação de CO_2 . Esses dados garantem um passo importante no estabelecimento fotossintético da planta, uma vez que, folhas localizadas em regiões mais inferiores consigam melhorar a eficiência na assimilação de carbono mesmo estando sombreadas.

A vantagem de melhores respostas à luminosidade inclui ganhos de rendimentos energético em situações de espaçamento em linha assimétrico e, conseqüente, fechamento de dossel, o que são comuns em diversos canaviais. O resultado disso pode levar ao melhor desempenho fisiológico e contribuir com a produtividade final. Estudos anteriores já mostraram que folhas de cana-de-açúcar com baixa incidência luminosa, devido ao sombreamento, têm concentrações de clorofilas a/b e nitrogênio foliares afetadas negativamente, além de reduções na capacidade de carboxilação da Rubisco (MARCHIORI, et al., 2014). Diante dessa abordagem, outras pesquisas já buscaram o desenvolvimento de modelos para quantificar o impacto potencial do espaçamento assimétrico no ganho de carbono para a cana-de-açúcar (WANG et al 2017), além de outras culturas (SONG; Zhu, 2012). Assim, o manejo estratégico

com piraclostrobina pode permitir a extrapolação dos limites da plasticidade fisiológica da cana-de-açúcar.

As plantas tratadas com piraclostrobina apresentaram respostas mais rápidas à variação da intensidade de luz. Após o ponto de inclinação da curva de resposta à luz, mesmo ao atingirem o platô, os dados mostram que a resposta continuou levemente ascendente, não apresentando evidências de fotoinibição e nem declínios acentuados em P_N . Adicionalmente, os tratamentos apresentaram valores semelhantes quanto ao *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (dados não mostrados), não havendo provavelmente fatores danosos ao aparato fotoquímico que interferiram entre os resultados. No campo, as plantas frequentemente sofrem flutuações frequentes da luz e levam certo tempo para responder. Tal fato reduz a eficiência fotossintética, uma vez que, a redução da luminosidade exige o relaxamento dos processos de energia dissipativa, isto é, NPQ, enquanto que, as mudanças no aumento da intensidade da luz requerem aumento da g_s e, sobretudo, a ativação da Rubisco (WANG et al., 2020). Assim, estudos futuros devem ser incrementados nessa pesquisa para se investigar as relações entre temperatura foliar e temperatura ambiente, g_s e déficit de pressão de vapor.

O aumento da eficiência fotossintética nas plantas tratadas pode ser verificado com a estimativa de P_{gmax} e P_N . Entretanto, mesmo que os valores de P_{gmax} não possam ser considerados como variável resposta para determinar a capacidade fotossintética máxima entre os tratamentos, ela ainda é um indicativo para as inferências na estimativa da R_d . Esses dados se justificam uma vez que a R_d foi superior nas plantas tratadas. Esses resultados contribuíram para maiores atividades respiratórias tanto diurnas, a partir das estimativas de R_d feita a partir de análises realizadas durante o dia, quanto noturnas, a partir da coleta de dados realizadas na madrugada.

É interessante salientar que, as medias de R_d no presente estudo, referem-se aos efeitos da piraclostrobina em curto prazo, de 1 a 5 dias após a aplicação. Esses efeitos não estão em consonância com resultados já relatados na literatura, os quais observaram a redução da R_d longo prazo (LOPES et al., 2018). Além disso, a respiração no escuro pode ainda ser mascarada, já que, o CO_2 produzido pela respiração mitocondrial também pode ser reassimilado, principalmente no ciclo fotossintético C4. Ainda assim, mesmo em curto prazo, a atividade respiratória pode ter papel importante, tanto para a respiração de manutenção quanto para a respiração de crescimento, atendendo a demanda dos drenos. Esses aumentos em R_D , embora menores à noite (atrelado possivelmente à redução da condutância estomática), indicam que o tratamento influencia no metabolismo de açúcares não apenas durante o dia. Isto pode ter levado

à maiores taxas de exportação e disponibilidade de energia e hexoses para sustentar maiores demandas bioquímicas ao amanhecer

Vale ressaltar que, mesmo sendo o colmo o dreno mais interessante para mensurar a produtividade da cana-de-açúcar, as respostas imediatas da aplicação de piraclostrobina sobre a fotoquímica puderam ser verificadas rapidamente nas folhas. As respostas no colmo podem ser secundárias e resultantes do metabolismo foliar. Entretanto, estudos reforçam a ideia da melhoria da força dos drenos em induzir o aumento da sua própria demanda, para estimular o descarregamento de carboidratos no floema e estimular a fotossíntese (ROOPENDRA et al., 2019). Tais observações podem ser confirmadas em trabalhos anteriores em que o efeito da piraclostrobina na produção e partição de carboidratos se deu em curtos períodos, em menos de 24 h após a aplicação, intensificando o teor de carboidratos, tanto na folha como ao longo do colmo (SMOZINSKY, 2017). Sendo uma via de mão dupla, esses dados podem responder sobre a prolongação dos efeitos da piraclostrobina a longos prazos.

Diante disso, as perguntas iniciais se norteavam em saber como os fatores supracitados controlam uns aos outros. Mais especificamente, se a melhoria na eficiência quântica fotossintética é controlada por fatores moleculares ligados ao metabolismo de carboidratos ou o inverso disso. Sabe-se que a cana-de-açúcar tratada com piraclostrobina já apresentou grandes variações nos níveis não apenas de açúcares a curto prazo, como também nos níveis de nitrogênio, aminoácidos e proteínas totais (SMOZINZKY, 2017). Isso pode ter incrementado primordialmente a robustez do aparato fotoquímico, levando aos maiores fluxos fotossintéticos.

As diferenças entre os tratamentos, para a eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII), indicaram que as folhas de plantas tratadas com piraclostrobina, tendo maiores razões Fv/Fm, apresentaram maior eficiência na absorção de luz pelos complexos antena e conversão dessa energia em energia química. As medições de fluorescência da clorofila realizadas à noite mostraram que o leve aumento na eficiência quântica do PSII parece não ter provocado grandes alterações no transporte de elétrons, pelo método utilizado no experimento do presente estudo. Ainda assim, isso contribuiu consequentemente com a maior assimilação de CO₂ e teve contribuição com a elevação do conteúdo de pigmentos. A partir do quinto dia após a aplicação, não foi verificado aumento progressivo ou diferença com plantas sem aplicação. Em decorrência disso, pode ter ocorrido equilíbrio no tamanho das antenas ou regulação negativa devido à dissipação não-fotoquímica posteriormente, incluindo o aumento dos carotenoides, atuando na regulação do fluxo de energia dos estados excitados da clorofila (CHEN et al., 2017), ou devido ao decaimento da ação da piraclostrobina na planta.

O conteúdo de clorofilas na folha é um fator importante para ajudar na compreensão de estimativas da capacidade fotossintética e tem impactos potenciais na fotossíntese. A resposta no incremento de pigmentos fotossintéticos foi maior no primeiro dia, possivelmente devido a uma maior interferência da piraclostrobina nos estágios iniciais de difusão no mesófilo. Quando a concentração de pigmentos diminuiu, o investimento no uso de nitrogênio para a biossíntese de clorofilas *a* e *b* pode ter sido alterado e direcionado para outros metabolitos. Por participar estrutural em anéis tetrapirróicos de clorofilas, parece ter havido uma rápida demanda na assimilação ou na remobilização de nitrogênio nesse período. As altas atividade fototoquímicas da fotossíntese podem ter contribuído com a assimilação do nitrogênio, disponibilizando poder redutor (ferredoxina reduzida) para a atividade da redutase do nitrato.

Estudos apontam que maior atividade na assimilação de nitrogênio acarreta no acúmulo de óxido nítrico (NO) intracelular (HUANG et al., 2002). Neste contexto, os dados do presente trabalho fornecem indícios de que a aplicação de piraclostrobina promoveu o aumento na produção de NO intracelular em cana-de-açúcar. Esse aumento de NO parece ser uma possível relação da piraclostrobina com sinalizações que acarretaram, inicialmente, na melhoria da capacidade fotossintética em cana-de-açúcar. Nessa hipótese, o NO pode ser produzido tanto em vias de assimilação de nitrato, a partir da redutase do nitrato, quanto pela sintase do óxido nítrico, além de poder ser gerado direto pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (SELIGMAN et al., 2008; GUPTA et al., 2018).

No presente estudo, é possível que a piraclostrobina interage diretamente com o complexo do citocromo-bc1 interrompendo a transferência de elétrons no local de oxidação do quinol, tal como atua em fungos (BECKER et al., 1981), inibindo, conseqüentemente, a síntese de ATP. Isso possivelmente estaria intensificando a entrada de malato na mitocôndria, em troca de fosfato inorgânico, para equilibrar o pH no espaço intermembranas mitocondrial e na matriz. A entrada de malato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) pode fornecer maiores quantidade de piruvato e oxaloaceto, via Enzima Málica e Desidrogenase do Malato, respectivamente. Isso poderia acarretar em maiores níveis de 2-oxoglutarato, o qual é um bom regulador da assimilação de nitrogênio, corroborando com o papel importante do ciclo TCA na assimilação de nitrogênio (FOYER et al., 2011). Tais observações são congruentes com o aumento verificado na atividade respiratória em plantas com aplicação, uma vez que, grande parte do CO₂ liberado é proveniente da atividade do ciclo TCA.

Considerando uma possível regulação negativa do citocromo-bc1 por piraclostrobina, isso acarretaria em maiores atividades da via alternativa ao citocromo mitocondrial, pela enzima

oxidase alternativa (AOX). Em outras perspectivas, existem evidências de que o aumento da atividade da AOX também pode induzir à produção de NO mesmo dentro das mitocôndrias (GUPTA et al., 2018; VISHWAKARMA et al., 2018). Adicionalmente, outros estudos apoiam a hipótese de que os tecidos vegetais também sintetizam NO via redução não enzimática do nitrito apoplástico (BETHKE et al., 2004), o que foi qualitativamente evidenciado nas imagens de epifluorescência, indicando uma possível intensificação na difusão do NO. Nesse sentido, etapas paralelas do presente trabalho têm sido realizadas para a elucidação da atuação celular e mitocondrial da piraclostrobina em plantas, sob uma ótica bioquímica e molecular.

O padrão fisiológico desempenhado nas variáveis fotossintéticas avaliadas e a produção de NO pode ter sido decorrente da promoção de fatores não apenas ligados aos pigmentos fotossintéticos, mas também de outras moléculas inerentes aos sistemas de antenas. Esses resultados sugerem que uma regulação molecular cloroplastídica mais profunda não está descartada e precisa ser investigada. Outro passo importante nesse estudo é a possível contribuição do NO como um sinalizador em potencial para a transição da fase vegetativa para a reprodutiva em cana-de-açúcar. Isso sugere que há uma integração entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio com os sinais moleculares envolvidos no florescimento.

5.2 Manejo com piraclostrobina beneficia o crescimento e o desenvolvimento da cana-de-açúcar.

O crescimento vegetativo é um interessante indicativo para a melhoria de produção. Parâmetros ligados ao crescimento podem ser estudados de duas maneiras, seja aumentando as capacidades orgânicas para a distribuição e o armazenamento de carboidratos, e/ou aumentando capacidade físico-química e estrutural em biomassa. A dinâmica de crescimento das plantas tratadas com piraclostrobina teve uma relação positiva entre o número de folhas verdes, a altura e o diâmetro dos colmos, estendendo-se entre o período de maturação até o momento da colheita. Levando-se em conta a busca de cultivares de boa qualidade, uma estrutura morfofisiológica que evite o tombamento e dá maior suporte para o armazenamento de sacarose garantem grandes prerrogativas para a busca de maiores produtividades. Essa relação representa um fator importante no estabelecimento de cultivares que apresentam boas características. Por exemplo, cultivares com boa maturação e baixa tendência ao florescimento, porém, sem boa produção final, seja pelo crescimento reduzido ou estruturas de colmo sujeitas ao tombamento.

Diâmetro do colmo chega no período de colheita com o diâmetro maior nas plantas com piraclostrobina, contudo, sem grandes diferenças na altura em relação ao número de aplicações. Ainda assim, as plantas com 1, 2 ou 3 aplicações apresentaram altura de colmo maiores que plantas sem aplicação. Isso pode ser favorável para maiores armazenamento de açúcares, sem riscos com tombamento de colmos muito altos. A grande vantagem da terceira aplicação, em relação ao manejo convencional, neste caso, é o investimento maior no diâmetro do colmo. Vale ressaltar que, uma diminuição na taxa de crescimento estrutural do colmo caracteriza a fase lenta e tardia do crescimento, e acarreta, possivelmente, no maior armazenamento de carboidratos nessa fase.

Provavelmente, os mecanismos de atuação da piraclostrobina se estendem não apenas ao metabolismo de carboidratos, como sacarose, glicose, frutose e amido (SMOZINSKY, 2017), mas também à carboidratos estruturais. Em análises no campo também foi verificada uma elevada rigidez da casca em plantas com aplicação, principalmente com os tratamentos com Opera[®]. Tais observações fornecem grande vantagem em se tratando do mercado para Cana-energia, o qual visa maiores quantidades de bagaço, fibra e toneladas de biomassa por hectare. Tais características têm grande valor para os custos de produção e tornam mais competitivos os projetos que venham a utilizar esse tipo de cana-de-açúcar como matéria-prima.

A dinâmica foliar é também crucial na determinação da produtividade da cana-de-açúcar. Os resultados sobre o grau de senescência podem demonstrar que mecanismos envolvidos na regulação do desenvolvimento foliar devem ter contribuído diretamente no rendimento da cultura. Parâmetros ligados a isto, melhoraram, conseqüentemente, a eficiência de interceptação e absorção da irradiação solar incidente, acarretando em acúmulos de biomassa. O ganho em TCH é um reflexo disso (LOPES et al., 2018) e parece ser um fator adjacente para indicar o rendimento lucrativo sobre os efeitos da piraclostrobina em campo.

As plantas tratadas com os diferentes produtos parecem ter mantido o estágio vegetativo por mais tempo, ao longo do período de maturação da cultivar estudada. Esse padrão é mais pronunciado em plantas que receberam 3 aplicações, sobretudo, dos produtos Opera e Ativum. Isso é importante para o produtor e para a indústria, uma vez que, sendo difícil se mensurar o percentual de plantas que se encontram em estágio ideal de maturação no momento da colheita. Nesse caso, o produtor corre o risco de colher plantas que ainda estão verdes, levando ao maior conteúdo de fibras e dificuldades na extração do ATR (Açúcares Totais Recuperáveis). Por outro lado, os riscos também incluem plantas que já passaram do ponto de maturação, levando aos maiores níveis de açúcares indesejáveis para a indústria, além da ocorrência de

isoporização. Neste último caso, os riscos incluem, tanto a desidratação dos colmos, o que dificulta ainda mais a obtenção do ATR nas usinas, quanto a remobilização e consumo da sacarose pra sustentar transição da fase vegetativa para a reprodutiva.

Nesses casos, verifica-se nesse trabalho que as plantas sob aplicação, mantiveram seus níveis ideais de maturação e reduziram a quantidade de açúcares no ponteiro (verificados no último entrenó imaturo, próximo aos meristemas intercalares abaixo do meristema apical da parte aérea). Esses dados confirmam a hipótese de que menos açúcares estariam suprindo o desenvolvimento apical para a transição para o meristema de inflorescência, o qual consumiria elevadas quantidades de energia. Nesse contexto, os dados sobre a maturação se tornam importantes na análise do florescimento, uma vez que, estão sendo investigados, em paralelo a esta pesquisa, aspectos ligados à disponibilidade de açúcares sinalizadores para o meristema e a efeitos na indução do florescimento.

Os incrementos obtidos em TCH e isoporização justificam ainda mais a adição de mais uma aplicação de piraclostrobina pelos produtores, visando um novo objetivo, inibir o florescimento. Os custos de aplicação podem ainda ser inferiores ao lucro, considerando-se os ganhos em toneladas por hectare convertidos em valor de safra. Tendo em vista, os fatores climáticos, bem como o ajuste fino da regulação gênica do florescimento, o estabelecimento do manejo com 3 aplicações ainda necessita de mais investigações em nível molecular para uma efetiva adequação nos métodos.

5.3 Perspectivas sobre o florescimento e o manejo com piraclostrobina

Os dados visuais indicaram uma maior ocorrência de diferenciação meristemática nas plantas sem aplicação, ao se avaliar a presença de “ponto de vela”, isto é, desenvolvimento do meristema de inflorescência. Plantas que receberam aplicação dos produtos apresentaram pouca ou nenhuma ocorrência de diferenciação, especialmente quando houveram 3 aplicações. Uma possível relação poderia estar ligada ao elevado grau de isoporização nas plantas sem aplicação. Esses resultados foram registrados com 30 dias após a 2ª aplicação (mês de março), 30 dias após a 3ª aplicação (mês de abril) e no momento antes da colheita (mês de setembro). Dados adicionais, sobre a importância do açúcar nesse contexto, sugerem uma possível relação envolvida na sinalização de carboidratos na folha para a indução ou repressão floral em cana-

de-açúcar, como uma via de regulação pós-transcricional ligada à trealose-6-fosfato e fotoperíodo (SCHUMAKER, 2019).

Embora a área experimental tenha chegado ao fim do período de safra, a colheita impossibilitou as observações fenotípicas subsequentes, como o desenvolvimento parcial ou total do pendão floral. Contudo, todo o material vegetal – referente ao colmo, folha e meristema apical da parte aérea – foi armazenado para futuras pesquisas bioquímicas e moleculares. Os resultados quanto ao IM e as análises visuais da região meristemática indicaram que uma terceira aplicação dos produtos pode retardar a transição da fase vegetativa para a reprodutiva e ainda contribuir com ganhos de produtividade final.

Nesse cenário, os produtos à base de piraclostrobina ganham uma nova perspectiva de mercado como inibidores do florescimento da cana-de-açúcar, além da sua atuação na prevenção fitossanitária e no ganho de biomassa. Com isso, uma das possibilidades promissoras é o posicionamento comercial desses produtos, em paralelo a produtos concorrentes no mercado, tais como como maturadores e inibidores do florescimento. Nesse caso, tanto as melhorias na eficiência energética como o controle da indução floral expandem o espectro de ação da piraclostrobina no agronegócio.

Mais especificamente, foi confirmado aqui que a aplicação do fungicida piraclostrobina altera significativamente a expressão de genes de diferentes vias metabólicas e do crescimento e desenvolvimento em cana-de-açúcar. A capacidade da cana-de-açúcar de acumular grandes quantidades de açúcares depende de atividades metabólicas complexas que ocorrem de forma dinâmica e coordenada (WANG et al. 2013), a depender do órgão e da maturidade em que se encontra. Estudos anteriores identificaram diferenças transcricionais de cana-de-açúcar, no entanto, este estudo é o primeiro a examinar o transcriptoma da cana-de-açúcar sob os efeitos da piraclostrobina.

5.4 Expressão diferencial por RNA-seq: uma visão holística de funcionalidades

A técnica de RNA-seq foi empregada com o objetivo de identificar o padrão de expressão gênica da cana-de-açúcar submetida à aplicação de piraclostrobina, em condições de campo e sob condições fotoperiódicas ideais para a indução do florescimento. Dos produtos à base de piraclostrobina utilizados nessa etapa da pesquisa foi selecionado o Opera[®], uma vez tendo efeitos mais pronunciados em relação à transição do estágio vegetativo para o

reprodutivo, considerando-se os dados de maturação. A seguir, foram discutidos aspectos ligados à fatores genéticos que controlam vias principais do estresse, metabolismo, crescimento e desenvolvimento reprodutivo. As diferenças de expressão absoluta de alguns genes abordados estão apresentadas no Apêndice A.

5.4.1 A piraclostrobina está envolvida na regulação contra estresses

A principal recomendação para a aplicação da piraclostrobina é atribuída à sua atuação contra doenças. Por ser um fungicida com modo de ação protetivo e sistêmico, a piraclostrobina possui amplo espectro de alvos fúngicos, proporcionando uma boa garantia fitossanitária. A efetividade do efeito fungicida foi observada a partir do sequenciamento do RNA total das amostras, uma vez que, foram detectadas várias sequências preditas correspondentes a diferentes espécies de fungos nas plantas sem aplicação. Nesse sentido, espera-se que mecanismos de estresse bióticos ligados ao ataque de fungos sejam poupados em plantas tratadas. Isso verificado com algumas enzimas diferencialmente expressas.

Foram identificados 2 genes relacionados ao metabolismo da glutaciona com função de transferase, prováveis isoformas de Transferases da S-Glutaciona (GST) negativamente regulados pela piraclostrobina. A GST constitui uma classe de enzimas versáteis, as quais catalisam uma ampla gama de reações, sobretudo em processos fisiológicos como desintoxicação xenobiótica, tolerância ao estresse e metabolismo secundário. Isso repercute em seu envolvimento na síntese de compostos contendo enxofre, como compostos voláteis e glucosinolatos, bem como na conjugação, transporte e armazenamento de oxilipinas, fenólicos e flavonoides reativos (DIXON et al. 2010). Essa regulação negativa de expressão de GSTs pode ser o reflexo da atividade antifúngica da piraclostrobina na prevenção de doenças nas folhas.

Pesquisas anteriores suportam a hipótese de que o metabolismo da glutaciona controla o acúmulo e o transporte de NO. Entretanto, embora o NO tem seus níveis aumentados com a superexpressão de GST em animais, ainda não se tem estudos suficientes que corroborem isto em plantas. O que é mais coerente é o aumento do NO em situações de resistência exigidas pelas plantas contra fatores ambientais, como seca, estresse salino e, especialmente, na resposta hipersensível e sistêmica à infecção com patógenos (KRASYLENKO et al., 2010). Nesses casos, a sinalização de NO, em plantas, pode ser por interação com íons de cálcio e proteína

quinases. Neste mecanismo, o NO pode promover a ativação de proteínas quinase e maiores os níveis de cátions de cálcio citosólico, acarretando em eventos dependentes da fosforilação (LAMOTTE et al., 2006; COURTOIS et al., 2008).

Doze genes regulados positivamente, com a aplicação de piraclostrobina, são codificadores de proteínas quinases, sendo uma delas dependente de cálcio (CPK7). Essas evidências estão atreladas à participação do NO com a termotolerância, visto que, este sinalizador pode estimular a atividade de ligação dos fatores de transcrição do choque térmico ao DNA, bem como o acúmulo desses fatores (XUAN et al. 2010). Isso pode ter grande relação com o desempenho no crescimento e no desenvolvimento das plantas sob aplicação.

5.4.2 Mecanismos de tolerância térmica e repercussão na produção vegetal

Do total de genes negativamente regulados, destacam-se 42 que foram identificados como codificadores de proteínas de choque térmico (*heat chocks* - HSPs). As HSPs são detectadas em células procarióticas e eucarióticas, e aumentam de maneira transitória seus níveis em presença de agente estressores como forma de proteção (JESPERSEN, 2020). As HSPs são alvos para o a engenharia no melhoramento de culturas agrícolas, porque têm alta diversificação funcional distinta e sobreposta na resistência ao estresse e no desenvolvimento vegetal (JACOB et al., 2016). Essas proteínas já têm sido alvos de estudos de clonagem gênica em cana-de-açúcar, com o intuito de explorar o mecanismo de resistência ao estresse (LIANG et al., 2017).

No presente estudo, genes importantes, ligados às HSPs com expressão reduzida, foram identificados como fatores de transcrição RAP2-1 e ERF. Eles são responsivos não apenas ao estresse térmico, contudo também à seca, em vias de sinalização com o etileno (HINZ et al., 2010). A relação entre os dois genes, tendo ainda regulação descendente em cana-de-açúcar, é que RAP2 possui um domínio AP2 (*APETALA2*) que se liga a elementos responsivos à desidratação (conhecidos como DREs) e um motivo de repressão anfifílica (conhecido como EAR) associados ao ERF (DONG; Liu, 2010). Plantas de *A. thaliana*, por exemplo, quando superexpressaram o RAP2.1, mostraram elevação da sensibilidade ao estresse pelo frio e pela seca. (DONG; Liu, 2010). Além disso, esses fatores de transcrição podem ter relação com os resultados de fotossíntese em cana-de-açúcar, já que estão ligados às respostas ao aumento de irradiância, revelando efeitos genotípicos associadas à aclimatação para a manutenção da eficiência fotossintética (VAN ROOIJEN et al., 2018).

Embora a separação da resposta fisiológica, para o tecido fotossinteticamente ativo, entre temperatura e irradiância não seja trivial, as alterações sobre os genes de HSPs representam um indicativo para essa resposta. Nesse contexto, sugere-se que as plantas com aplicação de piraclostrobina se ajustaram em parâmetros térmicos e hídricos e fotoquímicos, mantendo o balanço homeostático e minimizando a atuação de fatores de transcrição de choque térmico.

Em resposta à grande alteração na regulação de HSPs, as próximas etapas desta pesquisa devem ser alcançadas quanto ao reflexo das mudanças no transcriptoma da cana-de-açúcar em análise. Diante dos produtos proteicos e metabólitos gerados, considera-se que o metabolismo do carbono é um indicador central para refletir as capacidades de aclimatação da planta. Um importante direcionamento a seguir está nos produtos gênicos indicadores que refletem a eficiência da capacidade fotossintética e toda a trajetória de influências que culminem na melhoria de produção vegetal.

5.4.3 Mecanismos fotossintéticos regulatórios

Relacionado ao cloroplasto, o tratamento com piraclostrobina resultou na regulação positiva de 11 genes e regulação negativa de 19 genes. Esses dados sugerem que a piraclostrobina está fortemente ligado ao controle da fotossíntese. Isto pode determinar respostas inerentes aos índices de produtividade em decorrência de melhorias na eficiência na captação e conversão de energia fotossintética, o que leva aos incrementos de variáveis do crescimento vegetativo, além de maior produção de açúcares na folha.

O aproveitamento da energia luminosa pode levar em conta o “efeito verde”, o qual é observado em campo nas plantas de cana-de-açúcar que receberam produtos à base de piraclostrobina. Aqui, foi verificado uma possível regulação pós-transcricional, a partir da redução da expressão do gene cloroplastídico ligado à degradação de clorofilas, RCCR, o qual codifica a enzima (RED CHLOROPHYLL CATABOLITE REDUCTASE) que realiza a clivagem de porfirina (WUETHRICH et al., 2000). Por outro lado, em relação a carotenoides, foi verificada alta expressão para o gene *CA2* que codifica a Hidroxilase do beta-Caroteno-2 cloroplastídica, contribuindo com o aumento do papel de fotoproteção.

Outro gene positivamente regulado no cloroplasto foi o *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 1 (DXS)* que está diretamente conectado com o desenvolvimento

cloroplastídico. A enzima DXS catalisa a reação de condensação entre piruvato e gliceraldeído-3-fosfato para produzir 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). A DXS é limitadora da biossíntese de isoprenóides plastídicos e essencial para o desenvolvimento de cloroplasto (ESTEVEZ et al., 2000; ESTEVEZ et al., 2001). Essa relação está no envolvimento com o gene responsável pelo desenvolvimento de cloroplasto *CLI*. Este gene regula uma enzima DXS, pela via do C-metil-D-eritritol-4-fosfato. O CLA1 é positivamente regulado pela luz e tem efeitos sobre diferentes nos níveis de RNA de genes fotossintéticos (MANDEL et al., 1996). Isso sugere um papel importante da piraclostrobina na regulação cloroplastídica, em que pode se estender desde aspectos fotoquímicos até aspectos ligados ao descarregamento de açúcares.

5.4.3 Impactos nas relações fonte-dreno

A aplicação de piraclostrobina pode ter influência direta na regulação transcricional para o sistema fonte-dreno. Foram detectadas diferenças de expressão para o gene *Sucrose Export Defective 1 (SXD1)*, o qual foi positivamente regulado. Esse gene é considerado de grande importância na regulação da estruturação de células companheiras e elementos crivado, modulando a carga do floema (YAN; LIU, 2019). É possível que o tratamento tenha promovido alterações na modulação do desenvolvimento da cana-de-açúcar como um todo. Isso vai em direção aos processos envolvidos no particionamento e alocação de nutrientes, o que representa grande importância para a qualidade interna dos colmos.

Em milho por exemplo, parente próximo da cana-de-açúcar, mutantes *sxd1* exibem distúrbios de plasmodesmos entre a bainha do feixe vascular e células parenquimáticas. Isso se deve à interrupção da sinalização do cloroplasto para o núcleo, causando efeitos pleiotrópicos na folha, e resultando na obstrução desses plasmodesmos. Nesse contexto, plantas com folhas afetadas, em relação ao *SDXI* estão sujeitas a morte celular do parênquima vascular e não conseguem exportar sacarose com eficiência (PROVENCHER et al., 2001). Esses estudos fornecem evidências de que o aumento da expressão de *SDXI* em cana-de-açúcar pode ter influências benéficas, diretas e indiretas, sobre a exportação de fotossintatos a partir do cloroplasto e, conseqüentemente, no crescimento vegetativo e na maturação.

O crescimento ótimo da cana-de-açúcar está sujeito a vários fatores, sejam eles edafoclimáticos ou internos, sendo responsável pela qualidade da produção. Nos últimos anos tem havido grande interesse em biocombustíveis, que podem ser obtidos a partir de biomassa

lignocelulósica, no caso da cana, pelo bagaço (ASGHER et al., 2013). Um dos genes positivamente regulados pela piraclostrobina foi *CESAI*, correspondente à subunidade catalítica 1 da enzima Sintase da Celulose A. O *CESAI* está relacionado com a formação e expansão da parede celular primária, incluindo formações mais complexas da parede celular epidérmica e de células-guarda (DESPREZ et al., 2007). Isso fornece informações importantes como ferramenta de estudo promissora na manipulação do metabolismo de carboidratos, para a modulação entre biossíntese de açúcares e de fibras, a depender de característica das variedades de cana-de-açúcar e da demanda industrial.

Os impactos sobre o crescimento ainda se estendem para a regulação de elementos de catálise em reações redox. Outro gene envolvido no crescimento, positivamente regulado por piraclostrobina, codifica uma provável Oxidoreductase-1 dependente de NAD(P)H. Esta enzima pode estar envolvida com o crescimento celular, induzido por auxina, gerando radicais hidroxila que tendem a aumentar o afrouxamento da parede celular (OGUCHI et al., 2004). Ressalta-se que, as oxidoreductases dependentes de NAD(P)H compreendem diferentes classes de enzimas, sendo capazes de atuar promiscuamente em vários substratos para catalisar reações de transferência de elétrons (VIDAL et al., 2018). Esses aspectos dão suporte para futuras investigações acerca do envolvimento dessas enzimas em resposta às atividades de transporte de elétrons, especialmente em cloroplastos e mitocôndrias.

5.4.4 Sinalização mitocondrial e metabolismo de sacarose

Em relação a genes mitocondriais, um dos genes positivamente regulados com a piraclostrobina codifica um transportador integral de membrana mitocondrial, com função específica ainda desconhecida (CGI-69). O outro gene se refere a um RNA da subunidade pequena ribossômica metiltransferase, o qual tem a capacidade de modificar o dinucleotídeo AA nos nucleotídeos de rRNA 18S mitocondrial, envolvido no desenvolvimento radicular (RICHTER et al., 2010; WIECKOWSKI; SCHIEFELBEIN, 2012). Dos genes mitocondriais negativamente regulados, dois genes codificam HSPs, um gene codifica uma chaperona mitocondrial sem ligação com estresse térmico e outro gene codifica um tipo de invertase alcalina/neutra (*A/N-Inv*) exclusiva da mitocôndria.

As Invertases são enzimas fundamentais para a coordenação do balanço de carboidratos na planta, sobretudo, por apresentarem diferentes isoformas e estarem em vários locais. Em *A.*

thaliana, a invertase mitocondrial (INV) pode ocorrer em raízes, em partes aéreas (brotos e folhas) e flores e vem a ser uma grande novidade para os estudos com cana-de-açúcar. Em *A.thaliana* já foram caracterizados três genes *A/N-Inv*: *A/N-InvA* e *A/N-InvC* e *A/N-InvH*. Uma análise fenotípica detalhada de plantas de *A.thaliana* mutantes de perda de função (*inv*) revela um fenótipo de crescimento prejudicado, sem comprometimento do desenvolvimento radicular. Curiosamente, mutante *inv* apresentou atrasos significativos na floração que se estenderam ao longo do período de produção de flores (MARTÍN et al., 2013; BATTAGLIA et al., 2017). Esses dados sugerem uma possível relação entre a hipótese de atuação mitocondrial da piraclostrobina com a participação na regulação da transição do estágio vegetativo para o reprodutivo em cana-de-açúcar.

Embora a invertase mitocondrial tenha sido regulada negativamente pela piraclostrobina, outras invertases, incluindo a citosólica, vacuolar e de parede celular, já demonstraram desempenho aprimorado em cana-de-açúcar. Esses efeitos contribuíram especialmente para uma aceleração no particionamento e realocação do carbono em entrenós com diferentes estádios de desenvolvimento no colmo (SMOZINSKY, 2017). As novas informações sobre invertase mitocondrial em cana-de-açúcar elevam as possibilidades para mais esclarecimentos sobre a relação da piraclostrobina com o metabolismo e florescimento da cultura.

5.4.5 Impactos sobre o florescimento

Os resultados desse transcriptoma indicaram evidências de a aplicação de piraclostrobina em cana-de-açúcar acarreta em alterações em genes da rota de indução do florescimento. O gene que codifica a proteína UFC (Protein UPSTREAM OF FLC) foi positivamente regulado com a aplicação. Ele é parte de um agrupamento de genes, contendo *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), os quais são regulados coordenadamente, inibindo genes necessários para a mudança do meristema vegetativo para o floral. O *FLC* contém sequências que se ligam a um fator responsivo à vernalização, o que facilita a disseminação da cromatina repressiva do *FLC* para genes de ambos os lados, incluindo o *UFC* (em *A. thaliana*: *UPSTREAM OF FLC-like protein, At5g10150*) (FINNEGAN et al., 2004; YAN et al., 2010).

A repressão de genes ligados ao florescimento também foi percebida com genes importantes da via fotoperiódica. A constatação de uma regulação negativa do gene *GIGANTEA*

(*GI*) e positiva para *CONSTANS* (*CO*), reforça a hipótese de participação da piraclostrobina nesse contexto. Ainda assim, o modo como esses fatores se conectam ainda permanece em profunda análise genotípica e fenotípica, e envolve ortólogos contrastantes de função em cana-de-açúcar, tais como genes repressores e indutores homólogos de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*).

A expressão de *GI* está sob controle do relógio circadiano e promove controle sobre *CO* na indução de genes do florescimento. Em pesquisas realizadas com *A. thaliana*, o *GI* resgata o fenótipo de floração tardia do mutante de perda de função *gi-2*, tanto em condições de dia curto e dia longo. Mais interessante é que *GI* (expresso no mesófilo ou nos tecidos vasculares) aumenta a expressão do florígeno principal *FT-like*, sem mesmo regular a expressão de *CO* em fotoperíodo reduzido, isto é, de forma direta com *FT* em dias curtos (SAWA; Kay, 2011). Esses dados parecem ser razoáveis para a cana-de-açúcar que é uma “planta de dia encurtando”, uma vez tendo *FTs* indutores e repressores putativos em análise de estudos decorrentes (COELHO et al., 2014; SCHUMAKER, 2019).

Assim, a instigante inibição de *GI* por piraclostrobina pode reprimir a indução floral via *FTs* indutores como é o caso do *ScFT6*, ao passo que a promoção de *CO* também pode reprimir a indução floral via *FTs* repressores, como é caso do *ScFT2*. Em outra perspectiva, esse aumento na expressão de *CO* por piraclostrobina também pode atrasar o florescimento em condições de dias curtos, assim como em *A. thaliana*, via inibição de *FT* (LUCCIONE et al., 2019) e do seu homólogo em *Oriza sativa* que é uma “planta de dia curto” (HAYAMA et al 2003). Em virtude da complexa arquitetura genotípica, na qual as cultivares de cana-de-açúcar se caracterizam, muitas perguntas vão continuar para a elucidação dessa rede regulatória.

A regulação por *GI* ainda pode bloquear a sinalização floral via giberelina (GA) (através da estabilização das proteínas DELLA) em *A. thaliana* (NOHALES et al., 2019). Curiosamente, verificou-se que, o gene que codifica a enzima GA20-Oxidase 1 foi regulado negativamente em plantas com piraclostrobina. As GAs promovem a floração através da ativação de genes que codificam os integradores florais, *SUPRESSOR DE SUPEREXPRESSÃO DE CONSTANS 1* (*SOCI*), *LEAFY* (*LFY*) e *FT*, (MUTASA-GOTTGENS; HEDDEN, 2009), essenciais para o desenvolvimento de meristemas e órgãos florais (OLIMPIERI et al., 2011). Portanto, mesmo não sendo essencial para a indução floral, esse tipo de sinalização pode afetar as etapas iniciais da transição do meristema de inflorescência da cana-de-açúcar (agronomicamente visto como “ponto de vela”) ou segurando a formação dos primórdios florais e até o desenvolvimento da panícula.

Este estudo fornece evidências do papel direto da piraclostrobina nas respostas fotossintéticas, envolvendo melhoria na plasticidade fisiológica em resposta a luz, possivelmente decorrente do incremento no metabolismo mitocondrial. Essas respostas incluem o aumento nos teores de pigmentos fotossintéticos, podendo estar relacionado à intensificação do metabolismo do nitrogênio, verificado pelo aumento dos teores de NO. O NO constitui uma peça chave para o entendimento da relação entre o metabolismo energético e a transição da fase vegetativa para a reprodutiva em cana-de-açúcar.

Neste trabalho, informações relevantes são fornecidas sobre o transcriptoma de cana-de-açúcar expresso após a aplicação de piraclostrobina (Opera[®]). O sistema de manejo integrado com 3 aplicações foi efetivo para o desempenho no crescimento, na manutenção da maturação, levando à fortes evidências do seu potencial para regulação da indução do florescimento e na inibição do florescimento. Considerando-se a medida da expressão gênica apenas indicativa do controle biológico, mais investigações são necessárias para confirmar padrões de expressão e suas correlações com atividade de enzimas-chaves do metabolismo energético, no crescimento e desenvolvimento reprodutivo.

6 CONCLUSÕES

A piraclostrobina promove o aumento da eficiência fotossintética, aumento da respiração diurna e noturna, e aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos, em cana-de-açúcar. Esses efeitos foram acompanhados pelo acúmulo de óxido nítrico intracelular nas folhas e no meristema apical da parte aérea.

Os efeitos metabólicos da piraclostrobina apresentam repercussões no crescimento e desenvolvimento a longo prazo. A aplicação de produtos comerciais à base de piraclostrobina, em condições de campo, promove o aumento do crescimento de colmos, em diâmetro e altura, reduz a isoporização e a senescência foliar, e acarreta no aumento da produtividade final. O estágio vegetativo das plantas foi prolongado durante a safra, mantendo, ainda, os níveis ideais de açúcares durante a maturação. Esses resultados foram mais intensos com o acúmulo de três aplicações consecutivas dos produtos. O manejo com uma terceira aplicação, no período de indução do florescimento, inibiu ou atrasou a transição da fase vegetativa para a reprodutiva da cana-de-açúcar.

As alterações verificadas na expressão gênica mostraram uma intrincada rede regulatória promovida por piraclostrobina, entre múltiplos genes com identidades altamente importantes para estudos que busquem maiores ganhos de produção. Com isso, os resultados permitiram identificar alvos putativos para uma investigação mais aprofundada acerca das vias metabólicas, do crescimento e desenvolvimento e, especialmente, envolvidas na indução floral.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente estudo, identificamos um papel importante da piraclostrobina no metabolismo vegetal e no desenvolvimento reprodutivo da cana-de-açúcar mediados por vias multigênicas. Esses aspectos compreendem níveis jamais estudados até o momento, trazendo impactos relevantes para várias pesquisas nessa área, além de fornecer evidências para futuros estudos. Outros aspectos do desenvolvimento e da regulação metabólica da piraclostrobina em plantas ainda precisam ser investigados, em nível pós-transcricional e pós-traducional. Assim, são fornecidos subsídios para novas investigações sobre os efeitos da piraclostrobina no balanço de carbono e nitrogênio vegetal, visando melhorias no rendimento energético e controle do florescimento em cana-de-açúcar.

O entendimento total do transcriptoma será essencial na interpretação dos elementos funcionais do genoma da cana-de-açúcar. Futuros trabalhos devem ser desenvolvidos para a anotação funcional em trabalhos de ontologia genética com os dados gerados pelo RNA-seq. Em outras etapas, esses dados serão explorados quanto ao reflexo transcricional em cana-de-açúcar durante fotoperíodo indutivo do florescimento, atrelando-se o zoneamento climático e o manejo com piraclostrobina. Com isso, podem ser revelados constituintes moleculares-chaves para o ajuste do manejo e previsão de possíveis padrões de modificações transcricionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, P., Arora, R., Ray, S., Singh, A. K., Singh, V. P., Takatsuji, H., & Tyagi, A. K. (2007). Genome-wide identification of C₂H₂ zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant molecular biology*, *65*(4), 467-485.
- Aitken, K., Berkman, P., & Rae, A. (2016). The first sugarcane genome assembly: how can we use it. In *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol* *38*(1), 193-199.
- Asgher, M., Ahmad, Z., & Iqbal, H. M. N. (2013). Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*, *44*, 488-495.
- Balba, H. (2007). Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, *42*(4), 441-451.
- BASF. (2018). COMET_bula_rev01_27.02.2018. Produtos & Indústria. Disponível em: <<https://agriculture.basf.com/br/pt/Protec%CC%A7a%CC%83o-de-Cultivos/Comet.html>> Acesso em: junho de 2018.
- BASF. (2020). Manejo eficiente na plantação de cana-de-açúcar. Disponível em: <<https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/cultivos/cana-de-acucar.html>> Acesso em: março de 2020.
- Battaglia, M. E., Martin, M. V., Lechner, L., Martinez-Noel, G. M., & Salerno, G. L. (2017). The riddle of mitochondrial alkaline/neutral invertases: A novel Arabidopsis isoform mainly present in reproductive tissues and involved in root ROS production. *PloS one*, *12*(9).
- Beck, C., Oerke, E. C., & Dehne, H. W. (2002). Impact of strobilurins on physiology and yield formation of wheat. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, *67*(2), 181-187.
- Becker, W. F., Von Jagow, G., Anke, T., & Steglich, W. (1981). Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc 1 segment of the respiratory chain with an E-β-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS letters*, *132*(2), 329-333.

- Bencke, C. S., & Morellato, L. P. C. (2002). Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Brazilian Journal of Botany*, 269-275.
- Bento, CB, Filoso, S., Pitombo, LM, Cantarella, H., Rossetto, R., Martinelli, LA, e do Carmo, JB (2018). Impactos da expansão da agricultura canavieira sobre a pastagem de baixa intensidade de gado no Brasil sobre gases de efeito estufa. *Jornal de gestão ambiental*, 206, 980-988.
- Bethke, P. C., Badger, M. R., & Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, 16(2), 332-341.
- Bizzo, W. A., Lenço, P. C., Carvalho, D. J., & Veiga, J. P. S. (2014). The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29, 589-603.
- Butterfield, M. K., D'hont, A., & Berding, N. (2001). The sugarcane genome: a synthesis of current understanding, and lessons for breeding and biotechnology. In *Proc S Afr Sug Technol Ass* (Vol. 75, pp. 1-5).
- Campbell, L. G., Klotz Fugate, K., & Smith, L. J. (2012). Effect of pyraclostrobin on postharvest storage and quality of sugarbeet harvested before and after a frost. *Journal of Sugar Beet Research*, 49(1), 1.
- Chen, C., Gong, N., Li, Z., Sun, C., & Men, Z. (2017). Concentration effect on quenching of chlorophyll a fluorescence by all-trans- β -carotene in photosynthesis. *Molecules*, 22(10), 1585.
- Coelho, C. P. (2010). Identification and partial characterization of the flowering time gene ID1 in sugarcane.
- Coelho, C. P., Minow, M. A., Chalfun-Júnior, A., & Colasanti, J. (2014). Putative sugarcane FT/TFL1 genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 5, 221.
- Coelho, C. P., Minow, M. A., Chalfun-Júnior, A., & Colasanti, J. (2014). Putative sugarcane FT/TFL1 genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 5, 221.

Colasanti, J., Tremblay, R., Wong, A. Y., Coneva, V., Kozaki, A., & Mable, B. K. (2006). The maize INDETERMINATE1 flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. *Bmc Genomics*, 7(1), 158.

Colasanti, J., Tremblay, R., Wong, A. Y., Coneva, V., Kozaki, A., & Mable, B. K. (2006). The maize INDETERMINATE1 flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. *Bmc Genomics*, 7(1), 158.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:

<<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: março de 2020.

Coneva, V., Zhu, T., & Colasanti, J. (2007). Expression differences between normal and indeterminate1 maize suggest downstream targets of ID1, a floral transition regulator in maize. *Journal of Experimental Botany*, 58(13), 3679-3693.

Cristofolletti, P. T., Kemper, E. L., Capella, A. N., Carmago, S. R., Cazoto, J. L., Ferrari, F., ... & Santos, N. Z. (2018). Development of Transgenic Sugarcane Resistant to Sugarcane Borer. *Tropical Plant Biology*, 1-14..

Crusciol, C. A. C., Leite, G. H. P., de Siqueira, G. F., & de Almeida Silva, M. (2017). Response of Application of Growth Inhibitors on Sugarcane Productivity and Sucrose Accumulation in the Middle of Cropping Season in Brazil. *Sugar tech*, 19(2), 155-164.

Dal-Bianco, M., Carneiro, M. S., Hotta, C. T., Chapola, R. G., Hoffmann, H. P., Garcia, A. A. F., & Souza, G. M. (2012). Sugarcane improvement: how far can we go?. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 265-270.

Daros, E., Oliveira, R. A. D., Zambon, J. L. C., Brasileiro, B. P., Ido, O. T., Ruaro, L., & Weber, H. (2017). RB036088-a sugarcane cultivar for mechanical planting and harvesting. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 17(1), 84-88.

Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E. F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., ... & Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15572-15577.

- Dias, M. O. S, Maciel Filho, R., Mantelatto, P. E., Cavalett, O., Rossell, C. E. V., Bonomi, A., & Leal, M. R. L. V. (2015). Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environmental Development*, 15, 35-51.
- Dixon, D. P., & Edwards, R. (2010). Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8, 1-15.
- Doehlert, D. C., & Huber, S. C. (1983). Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiology*, 73(4), 989-994.
- Doehlert, D. C., & Huber, S. C. (1984). Phosphate inhibition of spinach leaf sucrose phosphate synthase as affected by glucose-6-phosphate and phosphoglucoisomerase. *Plant physiology*, 76(1), 250-253.
- Dong, C. J., & Liu, J. Y. (2010). The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2. 1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BMC plant biology*, 10(1), 47.
- Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22901-22909.
- Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22901-22909.
- Fagan, E. B., Dourado Neto, D., Vivian, R., Franco, R. B., Yeda, M. P., Massignam, L. F., ... & Martins, K. V. (2010). Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. *Bragantia*, 69(4), 771-777.
- Ferreira, R. A., Souza, J. L. D., Lyra, G. B., Escobedo, J. F., & Santos, M. V. (2015). Energy conversion efficiency in sugarcane under two row spacings in northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(8), 741-747.

- Finnegan, E. J., Sheldon, C. C., Jardinaud, F., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2004). A cluster of Arabidopsis genes with a coordinate response to an environmental stimulus. *Current Biology*, 14(10), 911-916.
- Foyer, C. H., Noctor, G., & Hodges, M. (2011). Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1467-1482.
- Goes, T., Marra, R., de Araújo, M., Alves, E., & Souza, M. O. D. (2011). Sugarcane in Brazil current technologic stage and perspectives. *Revista de Política Agrícola*, 20(1), 52-65.
- Gupta, K. J., Kumari, A., Florez-Sarasa, I., Fernie, A. R., & Igamberdiev, A. U. (2018). Interaction of nitric oxide with the components of the plant mitochondrial electron transport chain. *Journal of experimental botany*, 69(14), 3413-3424.
- Gupta, K. J., Shah, J. K., Brotman, Y., Jahnke, K., Willmitzer, L., Kaiser, W. M., ... & Igamberdiev, A. U. (2012). Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1773-1784.
- Hardiansyah, A. N., Sulistyaningsih, E., & Putra, E. T. S. (2017). Effects of pyraclostrobin on growth and yield of curly red chili (*Capsicum Annum* L.). *Ilmu Pertanian: Agricultural Science*, 2(1), 009-014.
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., & Shimamoto, K. (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, 422(6933), 719-722.
- He, Y., Tang, R. H., Hao, Y., Stevens, R. D., Cook, C. W., Ahn, S. M., ... & Fiorani, F. (2004). Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science*, 305(5692), 1968-1971.
- Hinz, M., Wilson, I. W., Yang, J., Buerstenbinder, K., Llewellyn, D., Dennis, E. S., ... & Dolferus, R. (2010). Arabidopsis RAP2. 2: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant physiology*, 153(2), 757-772.

- Huang, S., Raman, A. S., Ream, J. E., Fujiwara, H., Cerny, R. E., & Brown, S. M. (1998). Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 118(3), 773-781.
- Huang, X., von Rad, U., & Durner, J. (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*, 215(6), 914-923.
- Jackson, P. A. (2005). Breeding for improved sugar content in sugarcane. *Field Crops Research*, 92(2-3), 277-290.
- Jacob, P., Hirt, H., & Bendahmane, A. (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant biotechnology journal*, 15(4), 405-414.
- Jaeger, K. E., Pullen, N., Lamzin, S., Morris, R. J., & Wigge, P. A. (2013). Interlocking feedback loops govern the dynamic behavior of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, tpc-113.
- Jansson, C., Vogel, J., Hazen, S., Brutnell, T., & Mockler, T. (2018). Climate-smart crops with enhanced photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, ery213.
- Jaworski, E. G. (1971). Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 43(6), 1274-1279.
- Jespersen, D. (2020). Heat shock induced stress tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of acquired tolerance. In *Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants* (pp. 161-174). Academic Press.
- Kanungo, M., & Joshi, J. (2014). Impact of pyraclostrobin (F-500) on crop plants. *Plant Science Today*, 1(3), 174-178.
- Khan, M. F., & Smith, L. J. (2005). Evaluating fungicides for controlling *Cercospora* leaf spot on sugar beet. *Crop Protection*, 24(1), 79-86.
- Krasnylenko, Y. A., Yemets, A. I., & Blume, Y. B. (2010). Functional role of nitric oxide in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(4), 451-461.

- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2006). Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca^{2+} concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(8), 1369-1376.
- Liang, P., Jiangtao, Z. H. O. U., Huang, X., & Yangrui, L. I. (2017). Cloning of Small Heat-shock Protein (sHSP) Gene from sugarcane and analysis of its expression under drought stress. *Agricultural Biotechnology (2164-4993)*, 6(2).
- Ling, H., Wu, Q., Guo, J., Xu, L., & Que, Y. (2014). Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. *PloS one*, 9(5), e97469.
- Long, S. P., Marshall-Colon, A., & Zhu, X. G. (2015). Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, 161(1), 56-66.
- Lopes A. M., Schumacher, P. V., Martínez, A. T. P., Netto A. P. C., Chalfun-Junior., A. (2018) Insights into the Positive Effect of Pyraclostrobin on Sugarcane Productivity. *Agronomy*, 8 (7), 142-122
- Lopes, L. (2018) Efeito da aplicação de piraclostrobina sobre as trocas gasosas e análise quantitativa de crescimento da cultivar RB 867515 de cana-de-açúcar. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Lavras. 43p
- Lowell, C. A., Tomlinson, P. T., & Koch, K. E. (1989). Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiology*, 90(4), 1394-1402.
- Luccioni, L., Krzymuski, M., Sánchez-Lamas, M., Karayekov, E., Cerdán, P. D., & Casal, J. J. (2019). CONSTANS delays Arabidopsis flowering under short days. *The Plant Journal*, 97(5), 923-932.
- Ma, T., & Zuazaga, G. (1942). Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. A new indicator and an improved rapid method. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 14(3), 280-282.
- Ma'ruf, A., Putra, E. T. S., & Waluyo, S. (2016). Effect of pyraclostrobin concentration on quality shoots of assamica tea. *Agriculture – Science and Practice*.

- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., & León, P. (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *The Plant Journal*, 9(5), 649-658.
- Manfredi, A. P., Ballesteros, I., Sáez, F., Perotti, N. I., Martínez, M. A., & Negro, M. J. (2018). Integral process assessment of sugarcane agricultural crop residues conversion to ethanol. *Bioresource technology*, 260, 241-247.
- MAPA – Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/producao>. Acesso em julho de 2018.
- Marchiori, P. E., Machado, E. C., & Ribeiro, R. V. (2014). Photosynthetic limitations imposed by self-shading in field-grown sugarcane varieties. *Field Crops Research*, 155, 30-37.
- Martinazzo, E. G., Perboni, A. T., Tejada, M. T., Posso, D. A., Galdino, A. C. S., & Bacarin, M. A. (2016). Efeito da aplicação de nitrogênio e de piraclostrobina em plantas de tomateiro cultivar Micro-Tom. *Ceres*, 63(5).
- Matsoukas, I. G., Massiah, A. J., & Thomas, B. (2012). Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant and Cell Physiology*, 53(11), 1827-1842.
- Mattiello, L., Riaño-Pachón, D. M., Martins, M. C. M., da Cruz, L. P., Bassi, D., Marchiori, P. E. R., ... & Menossi, M. (2015). Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. *BMC plant biology*, 15(1), 300.
- Medeiros, A. L., Furtado, C. M., Leite, F. S., Souto, V. S., de Setta, N., Van Sluys, M. A., & Scortecci, K. C. (2016). Molecular genetic dissection of sugarcane flowering under equatorial field conditions. *Tropical Plant Biology*, 9(4), 252-266.
- Moura, B., Boller, W., & Deuner, C. C. (2016). In vitro determination of fungicide Inhibitory Concentration for *Phakopsora pachyrhizi* isolates. *Summa Phytopathologica*, 42(2), 170-171.
- Mutasa-Göttgens, E., & Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 60(7), 1979-1989.

Nohales, M. A., & Kay, S. A. (2019). GIGANTEA gates gibberellin signaling through stabilization of the DELLA proteins in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(43), 21893-21899).

O'hara, L. E., Paul, M. J., & Wingler, A. (2013). How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Molecular plant*, 6(2), 261-274.

Olimpieri, I., Caccia, R., Picarella, M. E., Pucci, A., Santangelo, E., Soressi, G. P., & Mazzucato, A. (2011). Constitutive co-suppression of the GA 20-oxidase1 gene in tomato leads to severe defects in vegetative and reproductive development. *Plant Science*, 180(3), 496-503.

Park, J. Y., Canam, T., Kang, K. Y., Ellis, D. D., & Mansfield, S. D. (2008). Over-expression of an arabidopsis family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. *Transgenic research*, 17(2), 181-192.

Pereira, L. F., Ferreira, V. M., Oliveira, N. G., Sarmiento, P. L., Endres, L., & Teodoro, I. (2017). Sugars levels of four sugarcane genotypes in different stem portions during the maturation phase. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(2), 1231-1242.

Pesqueira, A. D. S., Bacchi, L. M. A., & Gavassoni, W. L. (2016). Fungicide association in the control of anthracnose in the soybean in Mato Grosso do Sul. *Revista Ciência Agronômica*, 47(1), 203-212.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Provencher, L. M., Miao, L., Sinha, N., & Lucas, W. J. (2001). Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *The Plant Cell*, 13(5), 1127-1141.

Richter, U., Kühn, K., Okada, S., Brennicke, A., Weihe, A., & Börner, T. (2010). A mitochondrial rRNA dimethyladenosine methyltransferase in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 61(4), 558-569.

Roopendra, K., Chandra, A., & Saxena, S. Increase in sink demand in response to perturbed source–sink communication by partial shading in sugarcane. *Sugar Tech*, 1-6.

Sawa, M., & Kay, S. A. (2011). GIGANTEA directly activates Flowering Locus T in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11698-11703.

Schumacher, P. V., Rossato, M., Costa Netto, A. P., D'Abadia, A. C. A., & Reis, E. D. (2017). Resposta de híbridos de milho ao uso de piraclostrobina na ausência de doenças. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 84, 1-8.

Schumaker, P.V. Perspectivas sobre o florescimento da cana-de-açúcar: integrando fotoperíodo e metabolismo energético, Tese, UFLA, 2019, p. 91.

Seligman, K., Saviani, E. E., Oliveira, H. C., Pinto-Maglio, C. A. F., & Salgado, I. (2008). Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1112-1121.

Silva, V. N. B. (2016) Expressão de genes da rota do florescimento de cana de açúcar sob influência da aplicação de piraclostrobina na cultivar RB867515. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras.

Silva, V. S. G., de Oliveira, M. W., Oliveira, T. B. A., Mantovanelli, B. C., da Silva, A. C. I., Soares, A. N. R., & Clemente, P. R. A. I. (2017). Leaf area of sugarcane varieties and their correlation with biomass productivity in three cycles. *African Journal of Agricultural Research*, 12(7), 459-466.

Silveira, N. M., Hancock, J. T., Frungillo, L., Siasou, E., Marcos, F. C., Salgado, I., ... & Ribeiro, R. V. (2017). Evidence towards the involvement of nitric oxide in drought tolerance of sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 354-359.

Smozinsky C. V. (2017) Metabolismo de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar de diferentes idades em resposta à aplicação de Piraclostrobina - Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. 43p.

Solís-Guzmán, M. G., Argüello-Astorga, G., López-Bucio, J., Ruiz-Herrera, L. F., López-Meza, J. E., Sánchez-Calderón, L., & Martínez-Trujillo, M. (2017). *Arabidopsis thaliana*

sucrose phosphate synthase (SPS) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene Expression Patterns*, 25, 92-101.

Song, Q., & Zhu, X. G. (2012). A model of canopy photosynthesis in rice that combines sub-models of 3D plant architecture, radiation transfer, leaf energy balance and C3 photosynthesis. In *2012 IEEE 4th International Symposium on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications* (pp. 360-366). IEEE.

Vai, T., Marra, R., de Araújo, M., Alves, E., e Souza, MOD (2011). Cana-de-açúcar no Brasil Estágio tecnológico atual e perspectivas. *Revista de Política Agrícola*, 20 (1), 52-65.

Valle Lozano, E., Blanco, L. I. M., Alcantara, G. U., Nogueira, L. C., Ciaramello, S., & Costa, G. H. G. (2018). Effect of application of flowering inhibitor on sweet sorghum. *African Journal of Agricultural Research*, 13(4), 196-201.

Van Handel, E. (1968). Direct microdetermination of sucrose. *Analytical biochemistry*, 22(2), 280-283.

Van Rooijen, R., Harbinson, J., & Aarts, M. G. (2018). Photosynthetic response to increased irradiance correlates to variation in transcriptional response of lipid-remodeling and heat-shock genes. *Plant direct*, 2(7), e00069.

Vidal, L. S., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., & Heap, J. T. (2018). Review of NAD (P) H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1866(2), 327-347.

Vishwakarma, A., Kumari, A., Mur, L. A., & Gupta, K. J. (2018). A discrete role for alternative oxidase under hypoxia to increase nitric oxide and drive energy production. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 40-51.

Waclawovsky, A. J., Sato, P. M., Lembke, C. G., Moore, P. H., & Souza, G. M. (2010). Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnology Journal*, 8(3), 263-276.

Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., ... & Schmid, M. (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120), 704-707.

Wang, J., Nayak, S., Koch, K., & Ming, R. (2013). Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 4, 201.

Wang, J., Zhao, T., Yang, B., & Zhang, S. (2018). Sucrose metabolism and regulation in sugarcane. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 2017.

Wang, Y., Burgess, S. J., De Becker, E., & Long, S. P. (2020). Photosynthesis in the fleeting shadows: An overlooked opportunity for increasing crop productivity?. *The Plant Journal*.

Wickland, D. P., & Hanzawa, Y. (2015). The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 gene family: functional evolution and molecular mechanisms. *Molecular plant*, 8(7), 983-997.

Wieckowski, Y., & Schiefelbein, J. (2012). Nuclear ribosome biogenesis mediated by the DIM1A rRNA dimethylase is required for organized root growth and epidermal patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(7), 2839-2856.

Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309(5737), 1056-1059.

Wüthrich, K. L., Bovet, L., Hunziker, P. E., Donnison, I. S., & Hörtensteiner, S. (2000). Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. *The Plant Journal*, 21(2), 189-198.

Wüthrich, K. L., Bovet, L., Hunziker, P. E., Donnison, I. S., & Hörtensteiner, S. (2000). Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. *The Plant Journal*, 21(2), 189-198.

Xuan, Y., Zhou, S., Wang, L., Cheng, Y., & Zhao, L. (2010). Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 153(4), 1895-1906.

Yan, D., & Liu, Y. (2019). Diverse regulation of plasmodesmal architecture facilitates adaptation to phloem translocation. *Journal of Experimental Botany*.

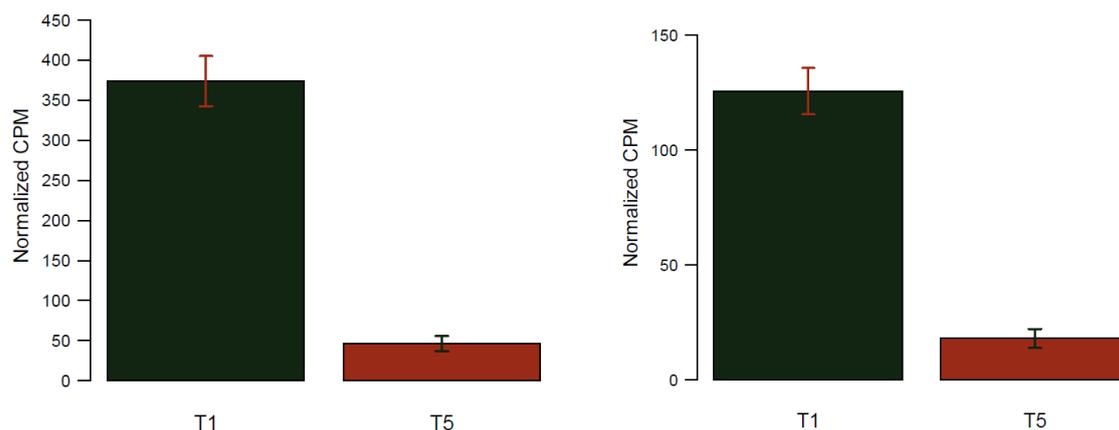
Yan, Z., Liang, D., Liu, H., & Zheng, G. (2010). FLC: a key regulator of flowering time in *Arabidopsis*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(2), 166-174.

Zanandrea, I., Alves, J. D., Deuner, S., de FP Goulart, P., Henrique, P. D. C., & Silveira, N. M. (2010). Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. *Australian Journal of Botany*, 57(8), 661-669.

Zhu, X. G., Long, S. P., & Ort, D. R. (2010). Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annual review of plant biology*, 61, 235-261.

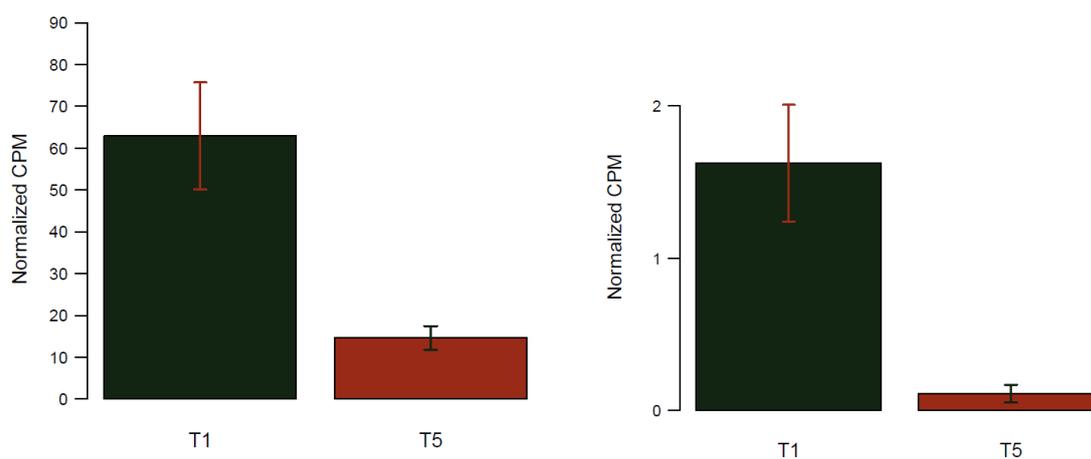
APÊNDICE A – Expressão diferencial de alguns genes putativos identificados em cana-de-açúcar (cv. SP801842) partir das análises de RNA-seq.

Figura 1 - Expressão diferencial de dois prováveis genes que codificam isoformas de Glutathione-S-transferases (GSTs) em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



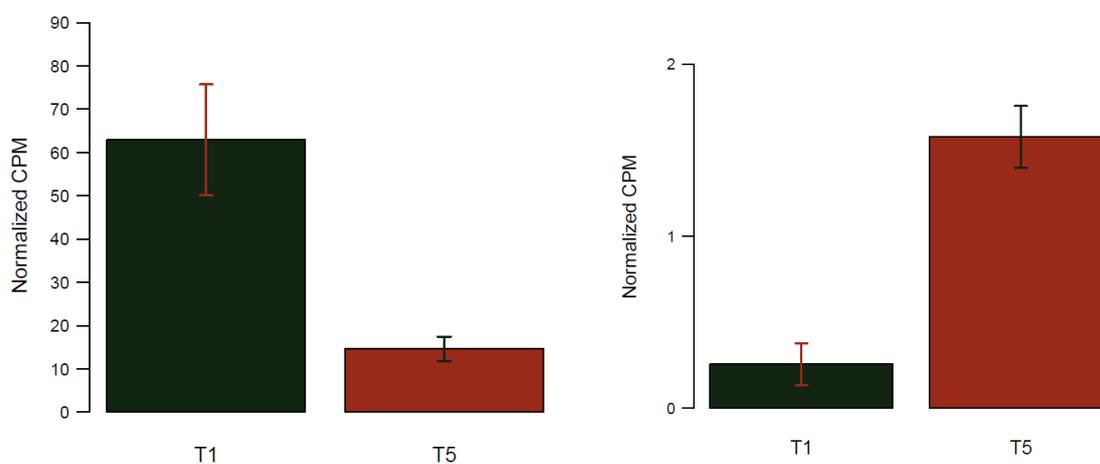
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: Plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®).

Figura 2 - Expressão absoluta dos genes *RAP2-1* e *ERF* em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



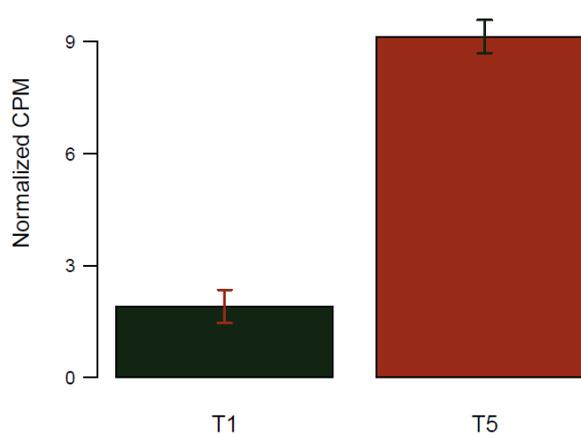
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®); gráfico à esquerda: *RAP2-1*; gráfico à direita: *ERF*.

Figura 3 - Expressão absoluta dos genes *RCCR* e *CA2* encontrados em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



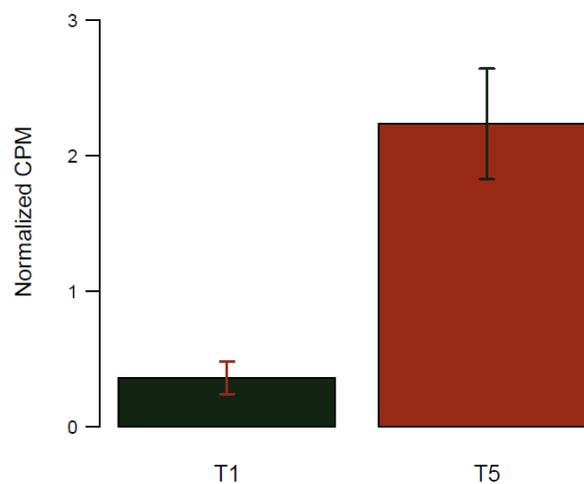
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera[®]); gráfico à esquerda: *RCCR*; gráfico à direita: *CA2*.

Figura 4 - Expressão absoluta do gene *1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (DXS)* em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



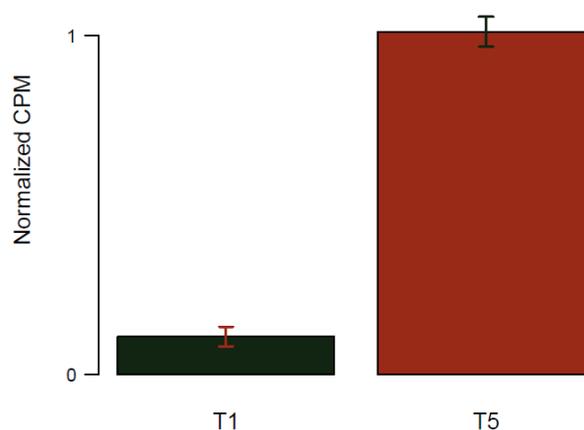
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera[®]).

Figura 5 – Expressão absoluta do gene *SUCROSE EXPORT DEFECTIVE 1* (*SXD1*), em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



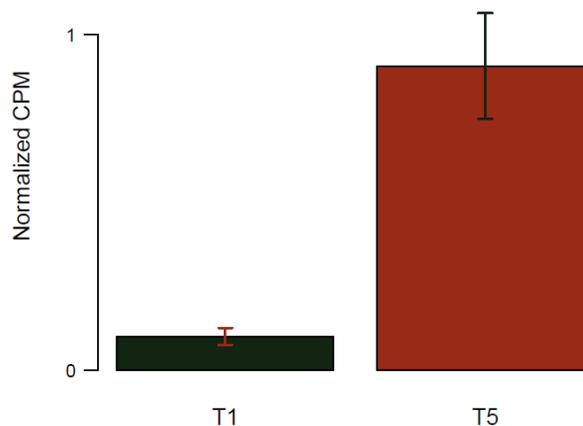
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®).

Figura 6 – Expressão absoluta do gene *CELLULOSE SYNTHASE A* (catalytic subunit 11 – *CESA1*), em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



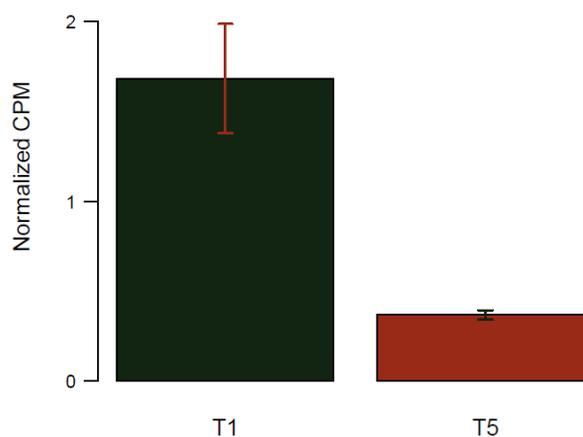
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®).

Figura 7 – Expressão absoluta do gene *CGI-69* (necessário para o acúmulo de coenzima A na matriz mitocondrial) em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



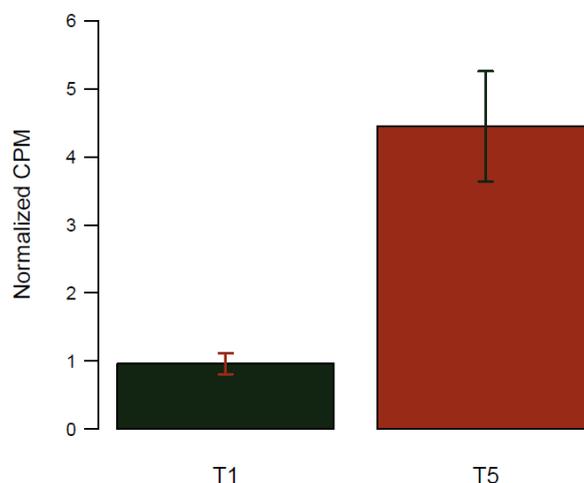
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®).

Figura 8 – Expressão absoluta do gene *A/N-INV* (*NEUTRAL/ALKALINE INVERTASE 1* mitocondrial) em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



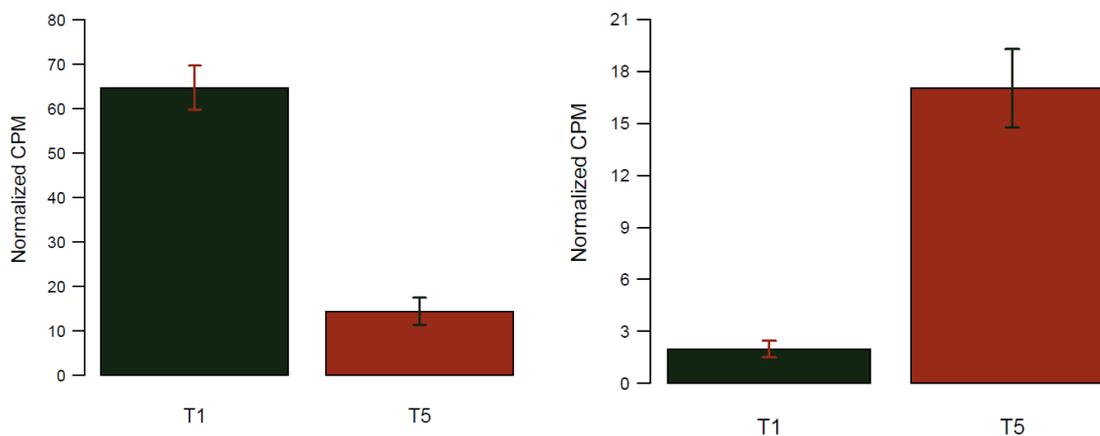
Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®).

Figura 9 – Expressão absoluta do gene *UFC* (codifica a proteína UPSTREAM OF FLC) em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®).

Figura 10 – Expressão absoluta do gene *GI* (*GIGANTEA*) e *CO* (*CONSTANS*) em folhas de cana-de-açúcar (cv. SP801842) submetidas à aplicação de piraclostrobina.



Legenda: Dados expressos em contagem por milhão (Normalized CPM); T1: plantas sem aplicação; T5: plantas com aplicação de piraclostrobina (Opera®); gráfico à esquerda: *GI*; gráfico à direita: *CO*.