

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO ETHEPHON NA MATURAÇÃO E NA
INIBIÇÃO DA FLORAÇÃO SOB CONDIÇÕES
NATURAIS DE INDUÇÃO FOTOPERIÓDICA EM CANA-
DE-AÇÚCAR.**

Luiz Eduardo Bertollo

Agrônomo

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO ETHEPHON NA MATURAÇÃO E NA
INIBIÇÃO DA FLORAÇÃO SOB CONDIÇÕES
NATURAIS DE INDUÇÃO FOTOPERIÓDICA EM CANA-
DE-AÇÚCAR.**

Luiz Eduardo Bertollo

Orientadora: **Dr.ª Luciana Rossini Pinto**

Coorientador: **Dr. Maximiliano Salles Scarpari**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2020**

B546e

Bertollo, Luiz Eduardo

Efeito do Ethephon na maturação e na inibição da floração sob condições naturais de indução fotoperiódica em cana-de-açúcar / Luiz Eduardo Bertollo. -- Jaboticabal, 2020
55 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Maximiliano Salles Scarpari

1. Ethephon. 2. Etileno. 3. Floração. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DO REGULADOR DE CRESCIMENTO NA MATURAÇÃO E NA INIBIÇÃO DA FLORAÇÃO SOB CONDIÇÕES NATURAIS DE INDUÇÃO FOTOPERIÓDICA EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR

AUTOR: LUIZ EDUARDO BERTOLLO

ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO

COORIENTADOR: MAXIMILIANO SALLES SCARPARI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. MICHAEL DOS SANTOS BRITO
Instituto de Ciência e Tecnologia-Unifesp / São José dos Campos/SP

Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Vice-Diretoria / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de agosto de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUIZ EDUARDO BERTOLLO – nascido em vinte e três de junho de 1993 em Pirassununga (SP), Brasil, ingressou em 2011/2, no curso de Agronomia na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Durante a graduação fez Iniciação Científica Voluntária (PVIC) no projeto Parâmetros Genéticos e Fenotípicos na Seleção de Genótipos Segregantes de Arroz de Terras Altas e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq. Foi membro do Núcleo de Estudos em Cana-de-Açúcar (NECANA) e também do Núcleo de Estudos em Arroz e Cereais de Inverno (NEACI). Executou o estágio curricular obrigatório na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) em Melhoramento Genético de Milho sob a supervisão do Prof. Dr. Gustavo Vitti Moro, no ano de 2017. Ainda no ano de 2017 recebeu o grau de bacharel em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Em março de 2018 ingressou no curso de mestrado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) no programa de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dra. Luciana Rossini Pinto e Dr. Maximiliano Salles Scarpari pelos ensinamentos e confiança durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Dilermando Perecin, pelas análises estatísticas do experimento.

Ao Dr. Júlio César Garcia, pelos ensinamentos e auxílio na adubação do experimento de campo.

Ao Ozéias, pela análise tecnológica.

Ao Paulo Henrique da Silva Santos, pela amizade e auxílio nas análises laboratoriais.

Aos funcionários do Centro-de-Cana, pela ajuda na condução do experimento.

A todos meus companheiros e amigos do Centro de Cana, Carol, Carolina, Naty, Michele, Marina, Marcel, Lucas, Alexandre, Izadora, Renato e João.

Ao Maicon, Thais e Juliana, pela ajuda nas técnicas laboratoriais realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Cana.

Ao auxílio financeiro da CAPES e CNPq, pela bolsa de mestrado.

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

MUITO OBRIGADO.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Cana-de-açúcar	3
3.2. Floração	5
3.3. Rede gênica da floração	9
3.4. Ethephon e a rede gênica do etileno.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Material	14
4.2. Plantio dos genótipos.....	15
4.3. Delineamento experimental	15
4.4. Manutenção dos genótipos	16
4.5. Aplicação do Ethephon	17
4.6. Coleta de material para análise de expressão gênica.....	18
4.7. Análise tecnológica	19
4.8. Análise de isoporização	19
4.9. Avaliação histológica do meristema	20
4.10. RT-qPCR dos genes <i>ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)</i> e <i>FLOWERING LOCUS T (FT)</i>	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Análise tecnológica	22
5.2. Isoporização.....	24
5.3. Histologia do meristema apical	25
5.4. Eficiência dos pares de <i>primers</i> dos genes <i>ScEIL1</i> e <i>ScFT3</i>	27
5.5. Análise da expressão do gene <i>ScEIL1</i>	29

5.6. Análise da expressão do gene <i>ScFT3</i>	35
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

EFEITO DO ETHEPHON NA MATURAÇÃO E NA INIBIÇÃO DA FLORAÇÃO SOB CONDIÇÕES NATURAIS DE INDUÇÃO FOTOPERIÓDICA EM CANA-DE-AÇÚCAR.

RESUMO – A cana-de-açúcar é uma importante fonte de alimento e energia renovável, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Essa cultura tem capacidade de sintetizar, transportar e armazenar sacarose em grandes quantidades em seus colmos. Os reguladores de crescimento são comumente usados para melhorar a qualidade da matéria-prima, o acúmulo de sacarose e a inibição da floração. O Ethephon é o regulador de crescimento mais utilizado em cana-de-açúcar, além de atuar como maturador, estimula a produção da biossíntese de etileno endógeno. O *ETHYLENE INSENSITIVE3 LIKE 1 (EIL1)* é o principal precursor de sinal na via do etileno e, portanto, os genes que regulam essa via interferem no crescimento e na maturação da cana-de-açúcar. Por outro lado, o gene *FLOWERING LOCUS T (FT)* tem papel fundamental na indução da floração. Neste trabalho, avaliamos o efeito do Ethephon nas características de qualidade (Brix%, Pol%, Fibra%, Pureza% e ATR Kg^{t-1}) de duas cultivares de cana-de-açúcar, RB855156 e SP81-3250, respectivamente, de maturação precoce e médio-tardio, bem como a expressão por RT-qPCR dos genes *ScEIL1* (ortólogo ao *EIL1* em cana-de-açúcar) e o *ScFT3* (ortólogo ao *FT* em cana-de-açúcar) na folha imatura aos 15 e 30 dias após aplicação do produto. A cultivar SP81-3250 apresentou uma melhora significativa em todas as características de qualidade após a aplicação do Ethephon, enquanto na RB855156 houve aumento significativo apenas da fibra (% de cana). A expressão do gene *ScEIL1* diferiu significativamente entre tratamentos (Ethephon e controle) entre as cultivares, sendo maior aos 15 dias, na cultivar SP81-3250 e aos 30 dias na RB855156. Entretanto, a expressão do gene *ScFT3* nas folhas imaturas não foi significativa aos 15 e 30 dias. Concluímos que as cultivares se comportaram diferentemente ao Ethephon, tanto em relação as características de qualidade, quanto a expressão do gene *ScEIL1*, o qual respondeu a aplicação do produto. Este é o primeiro trabalho a relatar alteração da expressão do gene *ScEIL1* em resposta a aplicação do maturador em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Ethephon, etileno, floração, regulador de crescimento, *ScEIL1*, *ScFT3*.

ETHEPHON EFFECT ON RIPENESS AND FLOWERING INHIBITION UNDER NATURAL PHOTOPERIODIC INDUCTION CONDITIONS IN SUGARCANE.

ABSTRACT – Sugarcane is an important food and renewable energy source, worldwide and Brazil is the largest producer. This crop has the ability to synthesize, transport and storage sucrose in large quantities in their stalks. Growth regulators are commonly used to improve the quality of sugarcane raw material, sucrose accumulation and flower inhibition. Ethephon, one of the most used sugarcane growth regulators, in addition to acting as a ripener also stimulates the endogenous ethylene biosynthesis production. *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1* (*ScEIL1*) is the main signal precursor in the ethylene pathway and, hence, genes that regulate the ethylene pathway interfere in sugarcane growth and ripening. On the other hand, the *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) gene has a fundamental role in flowering induction. Here, we evaluate the Etephon effect on the quality traits (Brix%, Pol %, Fiber%, Purity% and ATR Kg^{t-1}) of two sugarcane cultivars, RB855156 and SP81-3250, respectively early and middle-late ripening. Also, we evaluated the *ScEIL1* and one of the *FT* orthologue in sugarcane (*ScFT3*) expression by RT-qPCR at spindle leaf at two sampling times (15 and 30 days after Etephon application). The SP81-3250 cultivar had a significant improvement for all the quality traits after Etephon application, while RB855156 a significant increase only on Fiber (% cane). *ScEIL1* expression differed significantly between treatments and cultivars, being highest at 15 days in cultivar SP81-3250 and at 30 days in RB855156. However, *ScFT3* gene expression at spindle leaf was not significant at 15 and 30 days in both cultivars. We conclude that the cultivars differentially respond to Etephon, either in relation to quality traits or *ScEIL1* expression, which was affected by Etephon application. This is the first study to report changes in *ScEIL1* gene expression in response to ripener application in sugarcane.

Keywords: Etephon, ethylene, flowering, growth regulator, *ScEIL1*, *ScFT3*.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas de importância econômica do país, tendo como principal produto o açúcar e o álcool, além da produção de energia elétrica através da queima do bagaço.

A safra da cana-de-açúcar, na região Centro-Sul, é de abril a novembro, e está sujeita a ocorrência da floração. A floração da cana-de-açúcar é um processo indesejável para o produtor, sendo seu principal fator a redução no volume de caldo e aumento no teor de fibras, afetando assim diretamente o seu produto final, ocorrendo em algumas cultivares a “isoporização” ou “chochamento” do colmo (Caputo et. al, 2007). Porém, o processo de floração é muito importante para os programas de melhoramento, pois através dele torna-se possível a hibridação para a obtenção de novas cultivares (Moore e Berding, 2013).

O desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar é de extrema importância econômica sendo de interesse coletivo maiores informações sobre a floração. O processo de floração é fisiológico e também é formado por vários estádios de desenvolvimento, sendo que cada estágio tem sua própria necessidade fisiológica e ambiental. Depois de formada, a inflorescência pelo desenvolvimento da gema terminal (folhífera passa a ser florífera), a cana-de-açúcar estaciona o seu crescimento, independente das condições fisiológicas e ambientais (Almeida et al., 1945). Portanto, o início da floração interrompe o crescimento dos internódios e do colmo, limitando assim o crescimento da cultura. Há o deslocamento da energia que estava armazenada no colmo na forma de sacarose para formação da haste floral, flores e brotação lateral (Caputo et al., 2007). Durante o cultivo foram estimadas perdas na produção devido ao início da floração, essas perdas variam de 6,8% a 9,4% para produção, conteúdo de açúcar e produção de açúcar, sendo que as perdas em kg ATR/t foram estimadas em até 8% devido à “isoporização” (Rocha et al., 2015).

O processo de floração da cana-de-açúcar pode ser contornado através do melhoramento genético ou por meio dos reguladores de crescimento. O sistema de produção de cana depende fortemente da maturação da cana para promover um fornecimento contínuo de matéria-prima para a indústria, tornando os maturadores químicos uma parte essencial do processo. Os maturadores, também conhecidos como reguladores de crescimento, alteram a morfologia e fisiologia da planta (Caputo et al., 2007). O Ethephon foi o primeiro regulador de crescimento a ser utilizado, atuando para interromper o crescimento da planta, inibir o florescimento, aumentar o teor de sacarose, a qualidade da matéria-prima, o amadurecimento precoce e o aumento da produtividade (Caputo et al., 2007; Cunha et al., 2017; Jain et al., 2017). Além disso, possui propriedades sistêmicas, penetrando nos tecidos das plantas, estimulando a biossíntese endógena de etileno e posteriormente sendo degradada nessa forma (Caputo et al., 2007; Wang et al., 2013; Cunha et al., 2017).

O entendimento da sinalização dos genes *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)* e *FLOWERING LOCUS T (FT)*, respectivamente da via do etileno e via de floração, vieram principalmente de estudos realizados em *Arabidopsis* (Hiraga et al., 2009; Jaeger et al., 2013). A família de proteínas *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL / EIN3)* pode servir como um fator crucial para o crescimento e desenvolvimento das plantas sob várias condições ambientais (Salih et al., 2020) e é o principal precursor de sinal da via que pode ativar ou restringir a expressão gênica na resposta ao etileno (Zhu e Guo, 2008; Wang et al., 2019). Como o etileno tem efeitos profundos em diferentes aspectos durante o crescimento das plantas, sua via de transdução e mecanismos de ações moleculares têm atraído muito interesse. Em relação ao *FLOWERING LOCUS T (FT)*, que é expresso nas folhas das plantas, integra a via floral, codifica uma proteína/fator de transcrição nas células companheiras do floema, a qual migra para o meristema apical das plantas desencadeando a floração em diversas espécies (Corbesier et al., 2007; Lee e Imaizumi, 2018; Lu et al., 2012). O gene *FLOWERING LOCUS T (FT)* é tratado como o principal regulador da via de floração.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do regulador de crescimento Ethephon na melhora da qualidade tecnológica de duas cultivares contrastantes quanto a maturação, bem como na expressão dos genes *ScEIL1* (ortólogo ao *EIL1* em cana-de-açúcar) e o *ScFT3* (ortólogo ao *FT* em cana-de-açúcar).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de matéria prima para alimentação e o fornecimento de biocombustível, tornando-se um componente significativo para a economia de países tropicais e subtropicais. O seu valor econômico é baseado em três atributos, sendo eles a alta produtividade, a utilização eficiente dos insumos agrícolas (fertilizantes, água, pesticidas) e sua capacidade de ser processado no local em produtos de valor agregado (açúcar, melado, etanol e energia), sendo todos passíveis de armazenamento ou transporte (Moore et al., 2013). Juntos, esses atributos da cultura ajudam a cana-de-açúcar a se tornar uma *commodity* dos países onde é cultivada.

A cana-de-açúcar é caracterizada por ser uma gramínea, que se desenvolve em condições de alta intensidade de luz solar, altas temperaturas e altas quantidades de água (Moore et al., 2013). A produção de cana-de-açúcar está próxima a 2 bilhões de toneladas com 30 milhões de hectares plantados (Figura 1) (FAOSTAT, 2020). O Brasil é o maior produtor mundial, com 622 milhões de toneladas processadas na safra 2019/2020, com redução de 0,3% em relação à safra anterior (CONAB, 2019). As Américas são responsáveis pela maior parte da produção (51,1%), seguidas pela Ásia (40,7%), África (5,8%), Oceania (2,4%) e Europa (0%) (Figura 2) (FAOSTAT, 2020).

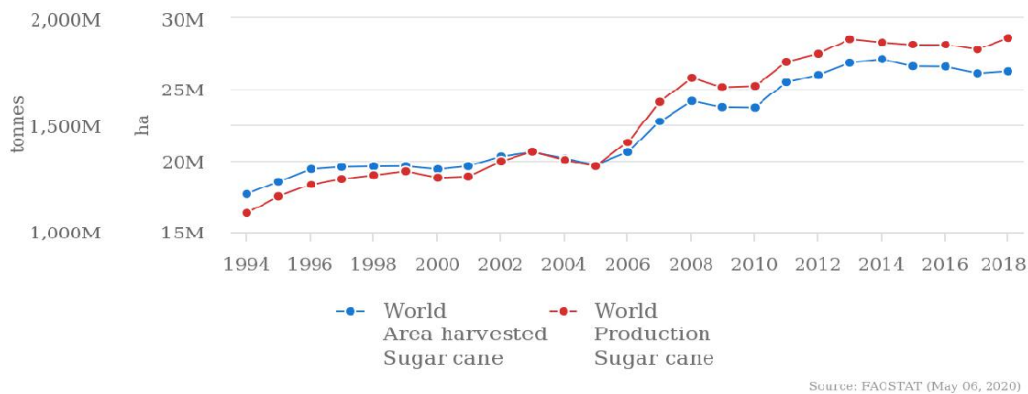


Figura 1. Produção/Área cultivada de cana-de-açúcar no mundo (FAOSTAT, 2020).

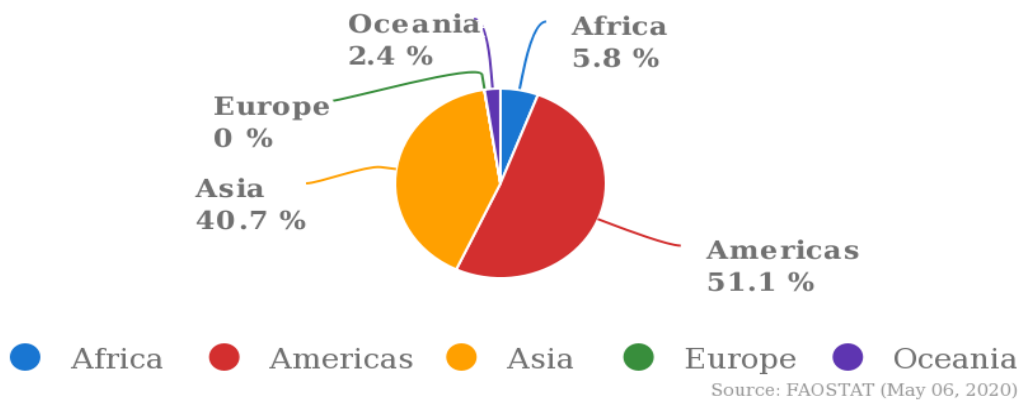


Figura 2. Produção de cana-de-açúcar por continentes (FAOSTAT, 2020).

A origem da cana-de-açúcar remonta ao Sudeste Asiático, o Arquipélago Malaio, Nova Guiné e a Índia. Sendo que as evidências indicam que a domesticação da cana-de-açúcar ocorreu na Nova Guiné com a seleção de *S. officinarum* a partir da espécie selvagem *S. robustum* (Moore et al., 2013). Uma das características mais importantes da cana-de-açúcar é a sua capacidade especializada de sintetizar, transportar e armazenar a sacarose em grandes quantidades (Moore et al., 2013) no colmo. Além disso, o mesmo autor menciona que a capacidade de gerar novos colmos em safras subsequentes após a colheita, constitui parte importante do ciclo agrícola de produção. A cana se desenvolve em forma de touceira, com a parte aérea

dividida em colmos, folhas e inflorescência, e a parte subterrânea formada por raízes e rizomas (Araldi et al., 2010).

No melhoramento genético da cana-de-açúcar, a obtenção das plântulas faz-se a partir da germinação de sementes (sexuais) e na produção agrícola, as plantas são geradas pela propagação assexuada das gemas laterais, provenientes do colmo cortado em segmentos (Moore et al., 2013). A planta adulta da cana-de-açúcar possui na parte aérea um ramo segmentado formado por unidades repetidas (fitômeros), cada uma contendo um nó, uma folha anexa e um internódio, as lâminas foliares possuem nervura rígida, a qual está relacionada com a captação da luz (Moore et al., 2013). Durante a indução à floração, a morfologia da planta muda totalmente. Durante a fase reprodutiva da planta é produzido a folha bandeira, que normalmente é menor que as outras folhas e a inflorescência (Moore et al., 2013). A cana-de-açúcar utiliza o tipo de fotossíntese C4 da enzima málica Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfato (NADP), tendo uma eficiência superior a plantas C3 em relação ao uso de radiação, água e nitrogênio, sendo assim mais produtiva (Moore et al., 2013).

3.2. Floração

A floração na cana-de-açúcar é um processo natural marcado pelo crescimento final da planta, período vegetativo. Esse processo tem que ser interpretado de forma que o colmo da cana-de-açúcar atingiu o seu ápice de crescimento e não a sua maturação, esta última corresponde ao estado de máxima riqueza sacarina da cana (Almeida et al., 1945). A floração ocorre pelo menos uma vez por ano, sendo possível apenas depois do colmo ter atingido uma idade mínima e sendo capaz de responder a fatores endógenos (Araldi et al., 2010). Nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar, as cultivares são selecionadas contra a floração, pois podem causar perdas de rendimento. Segundo Moore e Berding (2013) a floração de algumas cultivares pode ser

inibida para aumentar o seu rendimento, principalmente, com o uso de inibidores.

Na cultura da cana, o processo de floração é prejudicial para o acúmulo da sacarose pois a mesma é drenada do colmo para a formação da inflorescência (Caputo et al., 2007). Ainda segundo Caputo et al. (2007), esse processo de drenagem da sacarose do colmo para a formação da inflorescência é conhecido como “isoporização”, ou seja, o secamento do interior do colmo a partir da sua parte superior. A cultivar e o clima interferem na intensidade do processo de floração e na qualidade da matéria-prima, sendo a redução do volume de caldo, o principal fator atingido (Araldi et al., 2010). Após iniciado o desenvolvimento da gema terminal, que passa de folhífera para florífera, o crescimento da planta é interrompido, independentemente dos fatores climáticos e fisiológicos (Almeida et al., 1945).

A floração é um evento crítico no ciclo de vida de uma planta, na cultura da cana-de-açúcar pode ser tanto benéfico quanto prejudicial. Para os melhoristas, a floração se torna benéfica para a ampliação de variabilidade genética para o desenvolvimento de novas cultivares, já para os produtores é prejudicial, pois prejudica o rendimento e a qualidade da matéria-prima, principalmente em regiões tropicais onde as altas temperaturas favorecem o crescimento vegetativo e o acúmulo de sacarose (Moore e Berding, 2013).

O processo de floração envolve muitos estágios de desenvolvimento e exige condições ambientais favoráveis, como a temperatura, umidade e a duração do dia (fotoperíodo) (Hale et al., 2017). A formação da inflorescência é um processo difícil de se definir, pois depende do genótipo, do clima e das mudanças que ocorrem durante a época de crescimento (Melloni et al., 2015). O estímulo floral ocorre entre 18 e 25 dias, sendo que no Hemisfério Sul a modificação do meristema para a formação da inflorescência ocorre em fevereiro, março e abril, e a floração ocorre em abril, maio e junho (Srivastava, 2006). O número de ciclos indutivos para alterar o meristema apical do estado vegetativo para o reprodutivo varia muito com a cultivar de cana-de-açúcar envolvida (Arceneaux, 1967).

Sem crescimento contínuo da parte aérea, o colmo perderá a área foliar e a sua capacidade fotossintética, envelhecendo e levando o mesmo a morte, resultando em uma redução da biomassa e produção da cana-de-açúcar. Com a perda da dominância apical da parte aérea, as gemas axilares começam a germinar, consumindo a sacarose armazenada no colmo (Moore e Berding, 2013).

Distanciando-se da linha do Equador, a floração torna-se sazonal, seguindo as mudanças na duração do dia. Nas regiões equatoriais são encontradas as melhores condições para o processo de floração, onde ocorre pequenas variações de temperatura (Araldi et al., 2010). Em campos comerciais, a floração é variável de ano para ano e lugar para lugar, indicando que o estímulo de floração é condicionado por estímulos ambientais (Pereira et al., 1983).

O fotoperíodo, a temperatura, a maturidade e a umidade são os fatores críticos que controlam o mecanismo de floração na cana-de-açúcar, sendo que cada um desses fatores tem efeitos separados no processo individual de produção do estímulo floral devendo-se ocorrer simultaneamente para que a floração ocorra (Coleman, 1969). Ou seja, todos fatores devem estar adequados, caso contrário o processo de floração não ocorrerá. Segundo Lang (1965), a incapacidade das plantas juvenis em produzir flores pode ser devido a incapacidade de produzir hormônios da floração ou da incapacidade para responder ao hormônio. A maioria das cultivares comerciais de cana-de-açúcar devem ter cerca de três entrenós bem desenvolvidos, expostos acima do limite do solo quando o período fotoindutivo ocorre, assim a indução começará pelas plantas que já atingiram certa maturidade (Coleman, 1969).

Temperaturas diurnas altas, acima de 31°C, causam impactos negativos na floração em cana-de-açúcar (Berding e Moore, 2001). Dos fatores externos que influenciam na indução do processo de floração, o fotoperíodo é o de maior importância. Mesmo a cana-de-açúcar sendo uma planta de dia curto, noites longas também são necessárias para induzir a floração (Taiz e Zeiger, 2006). Para a maioria das cultivares de cana-de-açúcar

cultivadas em todo mundo foi adotado 12 horas e 55 minutos como a duração ideal do dia para a floração (Berding et al., 2007). Tanto o período de luz, quanto o período noturno e os processos da fase de fotoindução ocorrem nas folhas, sendo que as folhas mais jovens são as mais eficientes na produção do estímulo para floração (Coleman, 1969). O estímulo produzido pela noite indutiva se move em direção ao ápice, onde pode ser acumulado (Coleman, 1969). Mesmo em locais onde o fotoperíodo indutivo é ideal, pode ocorrer a não uniformidade no aparecimento da inflorescência devido à temperatura, fator este importante para a floração (Melloni et al., 2015). A temperatura mínima ideal não pode ser abaixo de 18°C (Berding et al., 2007). Temperaturas abaixo de 21°C podem retardar o crescimento e a emergência da panícula, além das temperaturas noturnas abaixo dos 15°C que afetam negativamente a viabilidade do grão de pólen (Berding, 1981). A umidade é outro fator importante que afeta a floração, sua falta pode atrasar esse processo, inibindo a translocação de fotoassimilados para o ápice da planta (Moore e Nuss, 1987). Uma menor amplitude de temperaturas externas, maior precipitação e mais dias chuvosos no período indutivo da cana-de-açúcar, favorecem o processo intenso de floração (Yeu, 1980).

A umidade está intimamente relacionada a temperatura para que ocorra o movimento da água no interior da planta e a regulação do ambiente interno, onde ocorrem certas reações bioquímicas (Coleman, 1969). A importância da umidade para a floração é proporcionar um suprimento adequado de água, permitindo a continuidade na translocação dos metabólitos. O estresse da umidade tem mostrado afetar a fotossíntese, e assim pode ser um fator limitante à floração, já que afeta a absorção de luz (Hartt, 1967). Áreas de alta umidade tem uma maior taxa de floração do que em outras áreas, por outro lado, áreas mal irrigadas ou com menor umidade tem uma taxa menor de floração (Gosnell, 1973).

A ocorrência de um período de crescimento vegetativo vigoroso antes do período de indução, favorece o início da floração (Arceneaux, 1967). O papel do manejo do nitrogênio requer atenção, pois seu aumento demonstra

redução no processo de floração (Berding et al., 2004). Altos teores de nitrogênio são essenciais para uma alta taxa fotossintética, porém são inibitórios para o processo de floração (Hale et al., 2017). De acordo com Brunkhorst (2003), a fase reprodutiva, de crescimento e desenvolvimento das panículas da cana-de-açúcar possuem uma melhor resposta quando há uma manutenção constante dos nutrientes.

A transição da fase vegetativa para reprodutiva ocorre via interação de sinais endógenos com sinais exógenos (Levy e Dean, 1998). O estímulo indutivo é coordenado pelo fitocromo do tipo I (phy A) que estimula a floração e pelo fitocromo do tipo II (phy B, C, D, E, F) que inibe a floração (Araldi et al., 2010).

3.3. Rede gênica da floração

As plantas monitoram constantemente as mudanças ambientais, sendo a principal a duração do dia (fotoperíodo), que é a maneira mais confiável da planta conhecer a época específica do ano em que irá florescer (Shim et al., 2017).

Para facilitar a identificação e caracterização de genes ortólogos relacionados à floração na cana-de-açúcar, foram feitos estudos comparativos com plantas de outras espécies (Coelho et al., 2014). Em arroz, o gene ortólogo ao *FLOWERING LOCUS T (FT)* mais estudado é o *HEADING DATE3a (HD3a)* e recentemente o *RICE FLOWERING LOCUS T1 (RFT1)* (Pasriga et al., 2019; Tamaki et al., 2015; Zhu et al., 2017). Entretanto em tomate, seu ortólogo é o gene *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* (Cao et al., 2016). O período de floração das plantas é fortemente ligado a fatores promotores e repressores. O nível de expressão desses genes é maior nas folhas imaturas e vai diminuindo com o avanço da idade da folha (Glassop e Rae, 2019). Durante a floração, o meristema apical é modificado para formar a inflorescência em vez de folhas.

Apesar da *Arabidopsis thaliana*, uma dicotiledônea, e a cana-de-açúcar, uma monocotiledônea, serem de espécies diferentes, os principais reguladores da transição do estágio vegetativo para o reprodutivo são amplamente conservados (Jaeger et al., 2013). A Phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP) é um domínio de proteína que caracteriza as famílias dos genes *FLOWERING LOCUS T (FT)* e *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* que agem através do *FLOWERING LOCUS D (FD)* para regular essa transição (Jaeger et al., 2013; Jung et al., 2017) em *Arabidopsis*. Em particular, o gene *FLOWERING LOCUS T (FT)* que é expresso nas folhas das plantas, codifica um fator de transcrição nas células companheiras do floema, a qual migra para o meristema apical das plantas, desencadeando a floração em diversas espécies (Corbesier et al., 2007; Lee e Imaizumi, 2018; Lu et al., 2012). O fator de transcrição codificado pelo *FLOWERING LOCUS T (FT)* forma um complexo com o fator de transcrição bZIP codificado pelo *FLOWERING LOCUS D (FD)*, desencadeando a floração pela ativação de genes dos meristemas florais, como o *APETALA 1 (AP1)* no meristema apical (Figura 3) (Abe et al., 2005). Além disso, o fator de transcrição codificado pelo gene *LEAFY (LFY)* tem um papel importante juntamente com o *FLOWERING LOCUS T (FT)* para integrar os sinais da floração e ativá-los (Abe et al., 2005). O *FLOWERING LOCUS T (FT)* é capaz de ativar a expressão do *LEAFY (LFY)* através do fator de transcrição *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* (Lee et al., 2008).

O *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* atua de maneira antagônica ao *FT* mantendo o meristema apical no estágio vegetativo (Jaeger et al., 2013). O *TFL1* atua reprimindo também o *LFY* e *AP1*. Na sua ausência, os tecidos do meristema apical são convertidos de vegetativo para reprodutivo, fazendo com que a planta passe de um crescimento indeterminado para determinado (Kaufmann et al., 2010). *CONSTANS (CO)* é um ativador da indução do *FT*, enquanto o *TFL1* pode reduzir sua expressão mesmo quando o *CO* está super expresso (Takada e Goto, 2003). A regulação do *CO* é o principal mecanismo de medição fotoperiódica, que ocorre nas células do floema nas folhas (Shim et al., 2017). Em *Arabidopsis*, a transcrição do *CO* ocorre no final da tarde para

o amanhecer. Dois fitocromos (phyA e phyB) agem na regulação da proteína codificada pelo *CO* em *Arabidopsis* (Figura 3), sendo que phyA aumenta a abundância dessas proteínas através da luz vermelha e phyB as degrada durante a manhã (Valverde et al., 2004).

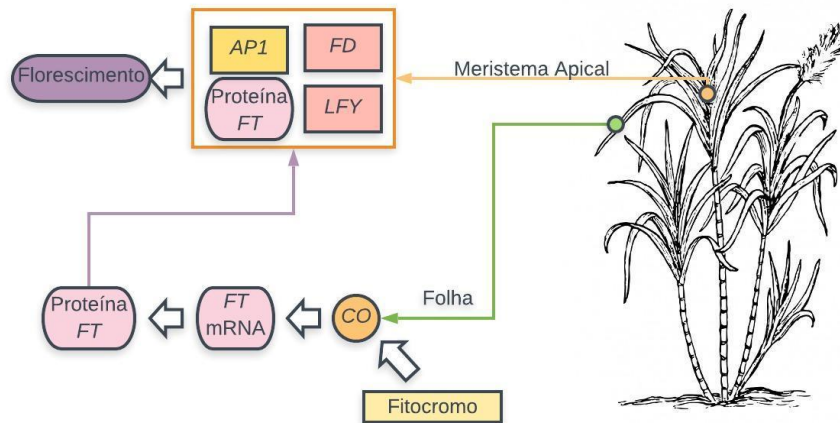


Figura 3. Modelo simples e resumido da via de floração. A luz solar é percebida pelos fitocromos, aumentando a expressão do gene *CONSTANS* (*CO*) (principal mecanismo de medição fotoperiódica) que estimula a expressão do gene *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). Por sua vez, o gene *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) codifica uma proteína/fator de transcrição junto às células do floema que migra para o meristema apical, formando um complexo com os genes *FLOWERING LOCUS D* (*FD*), *APETALA 1* (*AP1*) e *LEAFY* (*LFY*) desencadeando a floração.

3.4. Ethephon e a rede gênica do etileno

Inúmeros métodos foram utilizados no controle do processo de floração, entretanto para se ter sucesso inibindo a floração precisam ser aplicados durante o período crítico da indução floral. O controle da floração pode ser feito através dos reguladores de crescimento, podendo ser de grande importância econômica em regiões onde cultivares com altos índices de floração estão sendo plantadas e, em situações nas quais não é possível o plantio de cultivares com baixo potencial de floração (Araldi et al., 2010).

O sistema de produção da cana-de-açúcar depende fortemente de sua maturação, para que haja o fornecimento contínuo da matéria-prima para a indústria, sendo assim é necessário o uso de maturadores químicos. Os maturadores, também conhecidos como reguladores de crescimento vegetal, alteram a morfologia e fisiologia da planta (Caputo et al., 2007).

O Ethephon (ácido 2-cloroetil fosfônico) foi o primeiro regulador de crescimento a ser utilizado, atuando na interrupção do crescimento da planta, possibilitando incrementar o teor de sacarose (Jain et al., 2017), precocidade na maturação e aumento de produtividade (Caputo et al., 2007; Cunha et al., 2017), além de propiciar uma melhora na qualidade da matéria-prima (Caputo et al., 2007). O Ethephon é o produto mais utilizado e com melhor eficiência em prevenir a floração na cana-de-açúcar (Nickell, 1982). Lavanholi (2001) relatou redução de 56% na inibição da floração, em cana-de-açúcar, com a aplicação do Ethephon. Para o Estado de São Paulo, o período mais indicado para a aplicação dos reguladores químicos é a partir da segunda quinzena do mês de fevereiro (Barbieri et al., 1984). O Ethephon possui propriedades sistêmicas, penetrando nos tecidos da planta, estimulando a biossíntese do etileno endógeno e posteriormente é degradado nesta forma (Caputo et al., 2007; Cunha et al., 2017; Wang et al., 2013).

O etileno é um fito-hormônio gasoso, sua função é crucial na regulação de vários processos de desenvolvimento da planta, além de ser um importante regulador de crescimento (Zhu e Guo, 2008). A família das proteínas codificadas pelo *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL/EIN3)* pode servir como um fator crucial para o crescimento e desenvolvimento das plantas sob várias condições ambientais (Salih et al., 2020). De acordo com o modelo de transcrição de sinal, o etileno é percebido por uma família de receptores e o sinal é mediado a jusante de diferentes genes, incluindo o *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL/EIN3)*, *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)* e *ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF)* (Yin et al., 2008). *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL)* é um fator de transcrição na via de sinalização do etileno, que desencadeia uma cascata transcricional de

respostas hormonais (Nieuwenhuizen et al., 2015) e é o principal precursor do sinal da via que pode ativar ou restringir a expressão gênica em resposta ao etileno (Zhu e Guo, 2008; Wang et al., 2019). *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL)* são reguladores positivos da sinalização do etileno, atuando como um fator ativador das respostas de acionamento de etileno, principalmente por meio do *ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERFs)* (Li et al., 2012). Os receptores de etileno regulam sua resposta de maneira negativa (Figura 4), essa repressão ocorre devido à ausência de ligação ao etileno e é alcançada através da conexão com o *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)*, que regula negativamente a via (Chang, 2016). O etileno é percebido pelo *ETHYLENE RECEPTOR (ETR)*, que são reguladores negativos da resposta ao etileno. Na ausência de etileno os receptores ativam o *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)*, mantendo o *ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3)* reprimido, interrompendo a transcrição dos genes em resposta ao etileno (Liu et al., 2020). Na presença de etileno, *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)* é reprimido e ocorre aumento da expressão do *ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3)*, que estabiliza os fatores de transcrição do *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL)*, levando à expressão do *ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERP)* (Liu et al., 2020). Quando o etileno é detectado pelo receptor, o *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)* é reprimido e consequentemente o *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)* tem um aumento na sua expressão, levando a resposta da planta ao etileno (Chang, 2016). Quando o *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)* interage com as proteínas do tipo *ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF)*, elas formam um complexo transcricional que regula a maturação na cana-de-açúcar (Debbarma et al., 2019). Outro gene importante que pode interagir com o *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)* é o *GIBERELLIN INSENSITIVE (GAI)*, responsável pela regulação do crescimento e desenvolvimento do colmo na cana-de-açúcar (Tavares et al., 2018).

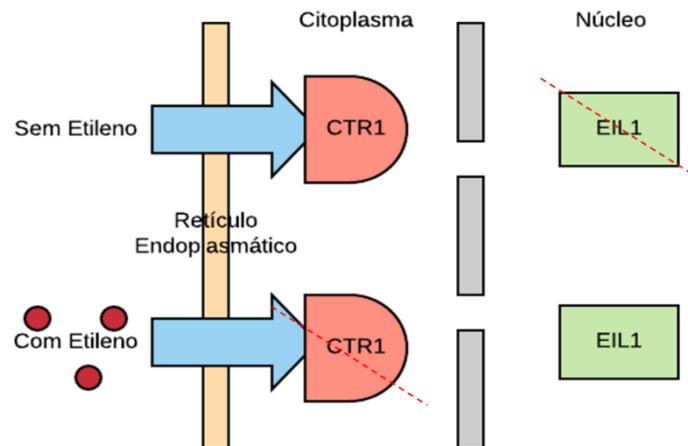


Figura 4. O etileno é percebido pelo *ETHYLENE RECEPTOR (ETR)*, na sua ausência o gene *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)* é ativado mantendo o *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)* reprimido e interrompendo a transcrição de genes de resposta ao etileno. Na presença do etileno, ocorre o inverso, onde o *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1)* é reprimido e ocorre o acúmulo de transcritos do *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)*, levando a planta a ter resposta ao etileno. O *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)* forma um complexo com o *ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERFs)* regulando a maturação na cana-de-açúcar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O experimento foi conduzido no Centro de Cana (Latitude: 21° 12' 22.007" S, Longitude: 47° 52' 28.409" W), em Ribeirão Preto – São Paulo, pertencente ao Instituto Agrônomo (IAC), no período de dezembro de 2017 até julho de 2019. Foram utilizados dois genótipos para o ensaio, sendo eles as cultivares SP81-3250 e a RB855156. A cultivar SP81-3250 tem característica de alta produtividade, floração regular e maturação média/tardia. Já a cultivar RB855156 possui produtividade média, floração frequente e maturação precoce. Ambas cultivares foram escolhidas por terem características distintas de floração e maturação.

4.2. Plantio dos genótipos

As gemas das cultivares SP81-3250 e RB855156 foram plantadas em caixas de marfilites (30 cm x 50 cm) em 28 de dezembro de 2017 e colocadas para germinar em estufa com ambiente controlado para permitir a uniformização da germinação. Nesse plantio foi utilizado apenas o substrato Plantmax® até a brotação, pois o uso de adubo pode prejudicar o desenvolvimento da raiz. Após 12 dias (09 de janeiro de 2018) as mudas foram transferidas e individualizadas para os tubetes. O plantio de grande quantidade de gemas permite a seleção das melhores plantas preservando a uniformidade entre elas. Após a brotação, 200 mudas de cada cultivar foram selecionadas e individualizadas em tubetes de 64 mL com Plantmax® para rustificação e pegamento durante o período de 45 dias. No período de 01 a 06 de março, foram selecionadas plantas visualmente saudáveis e uniformes para plantio em tubetes do tipo citro-pote (3,8 L). O substrato utilizado no plantio destas mudas foi uma mistura de Plantmax® e terra nas mesmas proporções. A adubação foi realizada de acordo com análise de solo realizada previamente, na formulação de 08-28-16 de NPK.

Em cada um dos citro-potes foram mantidos um perfilho por planta. Semanalmente, os perfilhos adjacentes foram retirados com tesoura de poda para a manutenção de apenas um colmo por planta, e conseqüentemente, a obtenção da mesma idade fisiológica entre as plantas.

4.3. Delineamento experimental

As cultivares, juntamente aos tratamentos com a aplicação de Ethephon e sem a sua aplicação (controle) formaram uma estrutura fatorial (2X2), ou seja, dois cultivares e dois tratamentos, em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e os resultados foram analisados pelo software SAS®

(*Statistical Analysis System*) versão 9.3. Ambos tratamentos estiveram sujeitos à indução natural fotoperiódica. As plantas foram irrigadas 8 vezes ao dia por meio de aspersores e foram utilizadas 100 plantas por tratamento (Figura 5).



Figura 5. Vagão à direita com a cana-de-açúcar que recebeu o tratamento de Ethephon e a esquerda o controle. A) plantas com 3 meses de idade; B) plantas com 8 meses de idade.

4.4. Manutenção dos genótipos

As cultivares foram tutoradas com o auxílio de cordas de plástico para evitar o tombamento das plantas ao longo do ensaio. Para a manutenção dos genótipos foi verificado diariamente a irrigação, presença de pragas, doenças, retirada dos perfilhos secundários e limpeza dos vasos (Figura 6). A cada 30 dias realizou-se uma adubação de cobertura com 5 g/vaso do adubo formulado 20-05-20 de NPK. A adubação de cobertura foi realizada mensalmente, devido a lixiviação de nutrientes decorrentes da irrigação diária. Entretanto, no período indutivo da cana-de-açúcar a adubação foi conduzida com a diminuição do nível de nitrogênio para não interferir no processo de floração, adotando-se 10 g/vaso na formulação 4-14-08 de NPK.

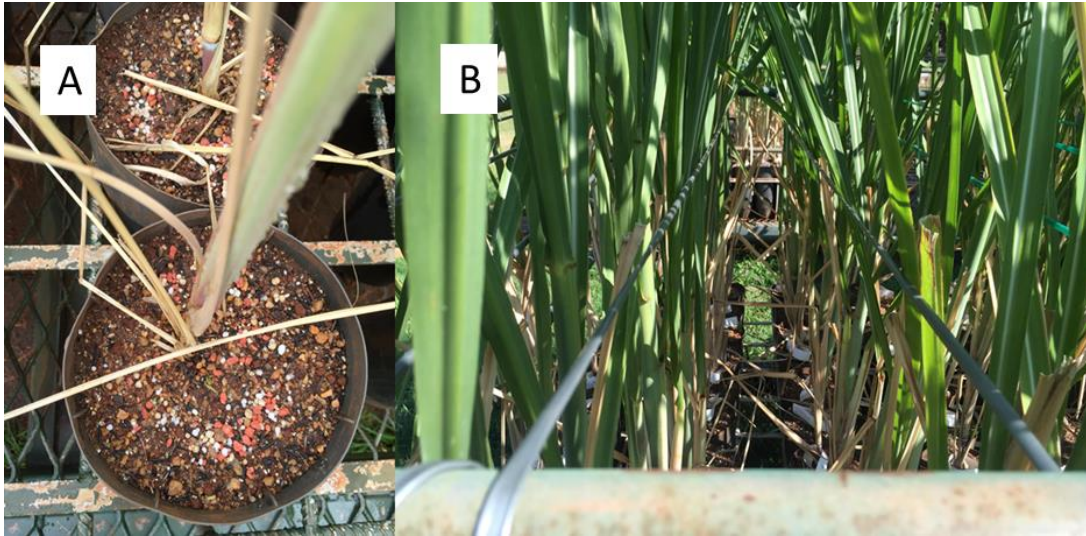


Figura 6. Manutenção dos genótipos. A) presença de um único perfilho por planta/citropote; B) tutoramento das plantas.

4.5. Aplicação do Ethephon

A aplicação do inibidor de floração (Ethephon – Ethrel 720®) foi realizada no dia 22/02/2019 às 9 horas, data em que a cana-de-açúcar estava em seu período indutivo natural. O inibidor foi aplicado com equipamento de pulverizador costal pressurizado por cilindro de CO₂ comprimido, com calda preparada, sustentado por uma barra de ferro de 3 metros em forma de “T”, com seis bicos TT 110.02 espaçados de 50 cm, suspenso por uma pessoa.

Para o emprego correto do produto, foi usado o Equipamento de Proteção Individual (EPI) e a recomendação do fabricante do produto, como a temperatura, umidade e vento. A dosagem do produto foi de 0,652 ml em 9,73 m², já a calda preparada foi de 240 l/ha. No início da aplicação (9 horas), constava uma temperatura de 26,6 °C, vento de 0,5 km/h, umidade de 76% e nebulosidade de 80%. No término, constava o horário de 9 horas e 6 minutos, temperatura de 28,5 °C, vento de 0,3 km/h, umidade de 75,6% e nebulosidade de 80%.

4.6. Coleta de material para análise de expressão gênica

As coletas foram realizadas em duas épocas 1) 15 dias após a aplicação do produto; 2) 30 dias após a aplicação. Em cada época foi realizada as 8 horas da manhã a coleta do meristema apical e da folha imatura (*spindle leaf*) de 3 plantas cada (réplicas biológicas) de cada um dos tratamentos. O meristema apical (Figura 7A) após coleta foi imerso em solução fixadora a 50% (formalina, ácido acético e álcool etílico). Dez centímetros acima do meristema apical correspondente foi realizada a coleta da folha imatura (*spindle leaf*) ou palmito, perfazendo 5 cm de altura (Figura 7B). Esta folha imatura foi colocada em tubo eppendorff de 5 mL, o qual foi imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido (Figura 7B). O meristema apical foi dissecado com auxílio de um estereomicroscópio e mantido em geladeira até a realização dos cortes histológicos.

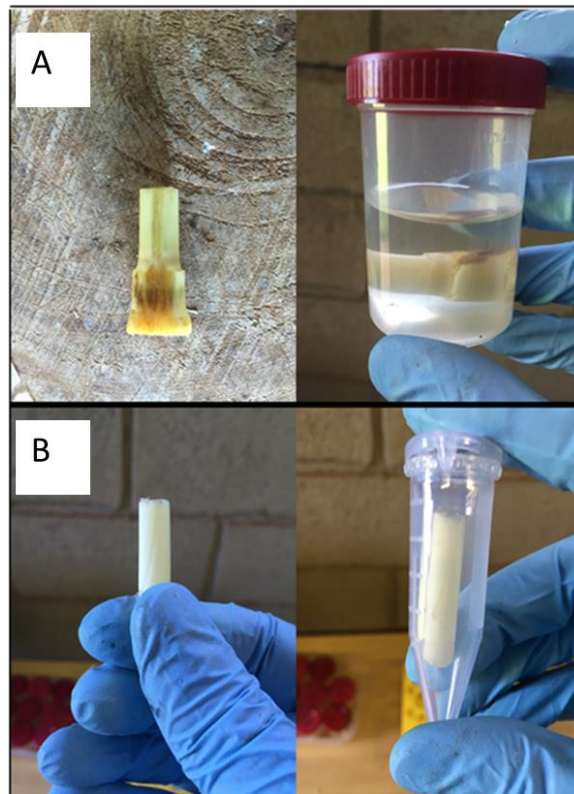


Figura 7. Partes apicais utilizadas na coleta. A) coleta do meristema apical e armazenamento em frasco contendo solução fixadora; B) segmento da folha imatura ("leaf roll") e armazenamento em tubo eppendorf de 5 mL.

4.7. Análise tecnológica

Para análise tecnológica realizada 38 dias após a aplicação do Ethephon (01 de junho de 2019) foram coletados 3 feixes de 10 colmos aos 12 meses de idade (Figura 8). A análise tecnológica foi realizada no laboratório de análise tecnológica do Centro de Cana, conforme o protocolo descrito em CONSECANA (Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo). As canas de cada feixe foram trituradas com objetivo de obter uma única amostra e posteriormente foi pesado 500g de cada material triturado. O material triturado foi prensado e obtido o peso do bolo seco, bolo úmido e o caldo. Após essa etapa, o caldo foi colocado no refratômetro, onde foi obtido o Brix (% caldo). No restante do caldo foi adicionado o produto OCTAPOL, com a finalidade de clarear a amostra para ser feita a leitura no polarímetro e obter os outros parâmetros de qualidade: Pol (% cana), Fibra (% cana), Pureza (% cana) e ATR Kg^{t-1} .

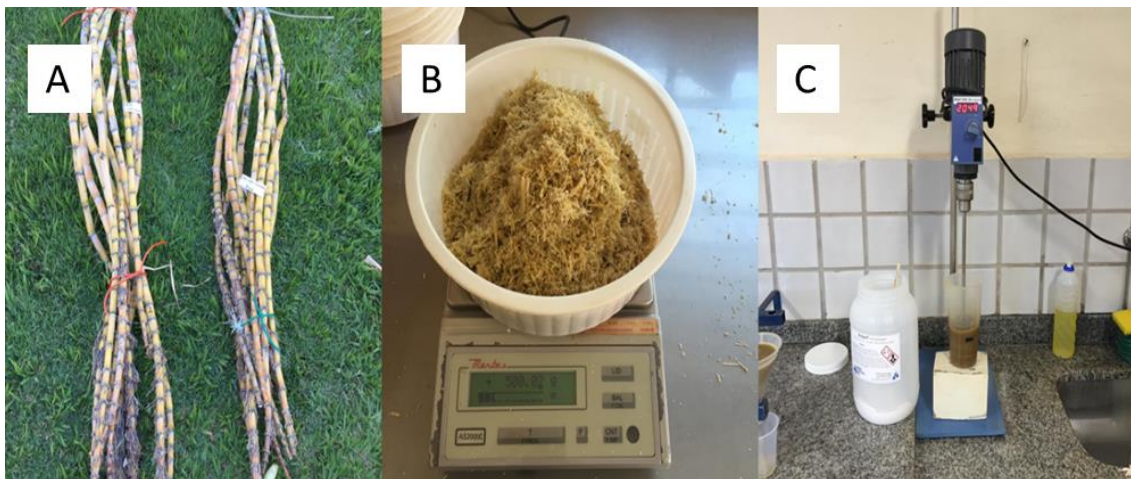


Figura 8. A) feixes coletados para análise tecnológica; B) bolo seco dos feixes triturados; C) adição do OCTAPOL com finalidade de clarear a amostra.

4.8. Análise de isoporização

Para a análise de isoporização (realizada no dia 03/04/2019 às 8 horas), foram avaliadas 5 canas de cada tratamento, as quais foram divididas em base, meio e topo do colmo, devidamente identificados para realizar o teste de isoporização pelo densímetro (Figura 9). Os colmos das canas foram pesados e posteriormente mergulhados no densímetro, verificando-se o quanto de água (volume) foi deslocado. A isoporização foi obtida através da densidade.

$$Densidade = \frac{Peso (g)}{Volume (ml)}$$

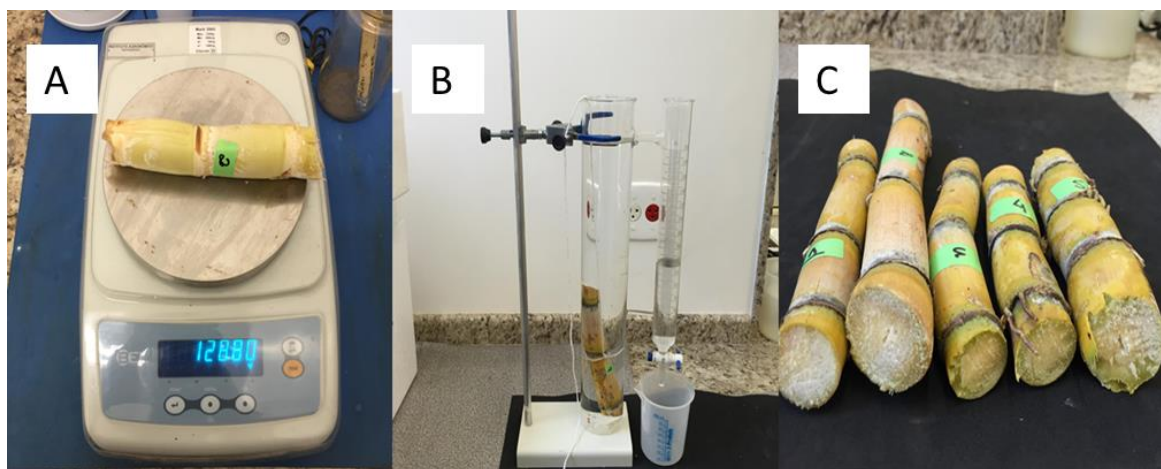


Figura 9. A) colmo sendo pesado para análise tecnológica; B) avaliação do volume de água deslocado pelo colmo; C) colmos de cana-de-açúcar.

4.9. Avaliação histológica do meristema

Para a obtenção dos cortes histológicos do meristema apical em micrótomo, os meristemas previamente dissecados com auxílio de uma lupa foram submetidos em uma série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e 100%) para desidratação por 60 minutos. Em seguida, os meristemas foram submetidos a etapa de clarificação em uma série álcool : xilol (3:1, 1:1, 1:3 e só xilol) por 60 minutos. Após a clarificação os meristemas foram submetidos a impregnação com parafina com gradual substituição do xilol pela parafina em estufa por 2 horas e 30 minutos à 60°C (Figura 10A).

A fita de parafina contendo os cortes histológicos com os meristemas (Figura 10B) foi colocada em uma lâmina umedecida e distendida em placa aquecedora a 50°C e, posteriormente, colocadas para secar em temperatura ambiente. Depois de bem aderidos na lâmina, os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e corados com azul de toluidina (Figura 10C e 10D). Posteriormente, as lâminas foram observadas em microscópio para observação da morfologia do meristema apical.

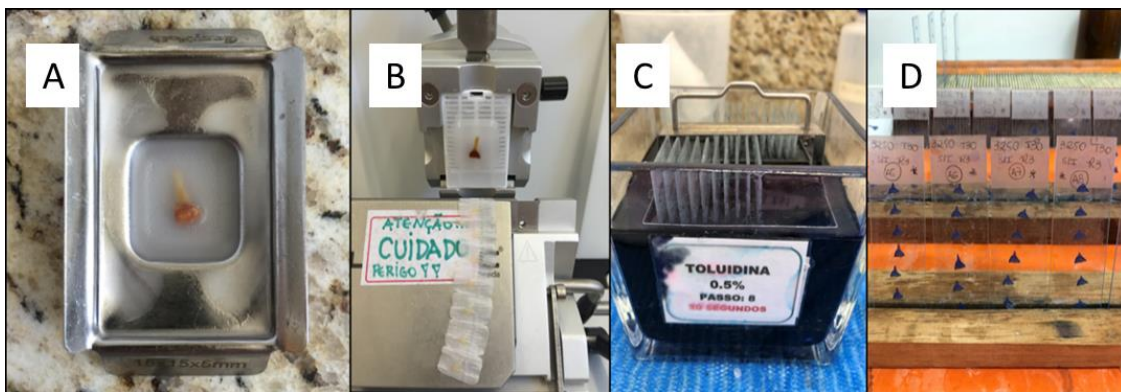


Figura 10. Etapas para avaliação histológica. A) emblocamento do meristema; B) corte em micrótomo; C) coloração das lâminas; D) secagem das lâminas.

4.10. RT-qPCR dos genes *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1)* e *FLOWERING LOCUS T (FT)*

O RNA total foi isolado da folha imatura das duas cultivares de cana-de-açúcar coletadas aos 15 e 30 dias após a aplicação do Ethephon utilizando o reagente Brazol (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil), quantificado pelo NanoDrop 2000c e verificado sua integridade no gel de agarose à 1%. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit Promega® conforme as instruções do fabricante. A reação de RT-qPCR foi conduzida em um volume final de 10 uL contendo 5 uL Syber Green (GoTaq® qPCR Master Mix), 3 uL de cDNA (diluição 1:10) e respectivo pares de *primers* a 0,2 uM. Foram utilizadas 3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas. O par de *primers* utilizados para avaliação do gene *ScEIL1* foi descrito por Wang et al. (2019) e o par de *primers* do *ScFT3* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Elisson Romanel da

Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP) (Tabela 1). Os genes de referência (normalizadores) utilizados foram a *Ubiquitina 1 (UBQ1)* (de Andrade et al., 2017) e o *Elongation Factor 1 (EF1)* (Medeiros et al., 2016). As reações de RT-qPCR foram conduzidas pelo equipamento BioRad iQ5. Os passos de amplificação foram a ativação da enzima polimerase a 95 ° C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 ° C por 10 segundos e 60 ° C por 30 segundos. A curva de *melting* foi iniciada a 55°C aumentando 0,5°C por segundo até atingir 95°C. Os dados da expressão foram avaliados usando o programa REST (*Relative Expression Software Tool* - REST®).

Tabela 1. Gene alvo, sequência nucleotídica e tamanho previsto

Gene	Forward primer	Reverse primer	Pb
<i>ScEIL1</i>	GCAGCAGTTCTTCATCCGT	TGGTCCCGTCGTTCTTCT	147
<i>ScFT3</i>	-	-	93
¹ <i>UBQ1</i>	AGCCTCAGACCAGATTCCAA	AATCGCTGTCGAACTACTTGC	110
² <i>EF1</i>	AAGGCCCGTTATGATGAGTTGTG	CAAACCCAGAGATTGGGACGAAAG	N/D

-: sequência sob sigilo. 1: de Andrade et al., (2017); 2: Medeiros et al., (2016). N/D: não disponível.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise tecnológica

As cultivares SP81-3250 e RB855156 diferiram entre si quanto aos parâmetros de qualidade obtidos no tratamento controle, demonstrando que há diferença de uma cultivar para outra (Tabela 2). No controle, os valores dos caracteres tecnológicos foram maiores na RB855156. Houve uma melhora dos parâmetros de qualidade na cultivar SP81-3250 com o tratamento de Ethephon em relação ao controle evidenciados pelos valores obtidos para sacarose, Brix (% caldo), Fibra (% cana), Pureza (% cana), Pol (% cana) e ATR Kg^{t-1} no tratamento com Ethephon. Na cultivar RB855156, apenas o valor de Fibra (% cana) diferiu significativamente do tratamento com Ethephon em relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Médias da análise tecnológica entre as cultivares RB855156 e SP81-3250. Letras iguais $p \leq 0,05$ pelo teste fatorial

Parâmetros Tecnológicos	RB855156		SP81-3250		Valores de P		
	Ethephon	Controle	Ethephon	Controle	Cultivar	Tratamento	Cult*Trat
Sacarose	72,99 a	74,60 a	73,92 a	64,20 b	0,002*	0,005*	0,0007*
Brix (% caldo)	20,03 a	20,38 a	20,28 a	18,31 b	0,002*	0,004*	0,0005*
Fibra (% cana)	16,32 a	15,74 b	16,00 a	14,74 b	0,005*	0,0007*	0,08
Pureza (% cana)	87,71 a	87,99 a	87,65 a	85,00 b	0,01*	0,03*	0,02*
Pol (% cana)	13,78 a	14,21 a	14,02 a	12,56 b	0,002*	0,01*	0,0004*
ATR Kg^{t-1}	135,78 a	139,85 a	138,12 a	124,95 b	0,002*	0,01*	0,0003*

Melhora nos parâmetros de qualidade foram observados também por Karmollachaab et al. (2016), em uma cultivar iraniana de cana-de-açúcar. No Brasil, as cultivares IAC87-3410, IAC87-3396, IAC89-3124, IAC91-2195, IAC91-5155 e SP80-1842, com diferentes características de maturação (precoce, média e tardia), tiveram um incremento significativo nos parâmetros de qualidade com aplicação do Ethephon (Caputo et al., 2007). De fato, Silva e Caputo (2012) observaram que após a aplicação do regulador de crescimento, o produto é absorvido pelas folhas e translocado para áreas de atividade meristemática, onde inibe o alongamento dos entrenós e ocorre a maturação, melhorando a qualidade da matéria-prima. Ao contrário dos resultados obtidos por Caputo et al. (2007), em nosso trabalho a Fibra (% cana) teve um aumento significativo nas duas cultivares com aplicação do Ethephon e a sacarose permaneceu alta. Do ponto de vista para produção de açúcar e para geração de energia, esse efeito duplo se torna interessante, sabendo-se que a Fibra (% cana) é uma característica genética correlacionada inversamente com o teor de sacarose. Nas cultivares IAC87-3396 e IAC87-3410 observou aumento de 0,76 a 1,15 para Pol (% cana) respectivamente (Caputo et al., 2007). Para Pureza (% cana) os valores padrões são entre 80%

e 85%, a cultivar IAC89-3124 com aplicação do Ethephon obteve valores acima dos 80% (Caputo et al., 2007). Ainda em seu trabalho, Caputo et al. (2007) observou valores semelhantes de ATR Kg^{t-1} nas cultivares IAC87-3410 e IAC91-5155 (maturação média/tardia) e identificou que a variação das médias de Fibra (% cana) dentro e entre as cultivares pode ser atribuída as características genéticas. Assim como em nosso trabalho, onde não houve uma melhora significativa nos parâmetros tecnológicos para a RB855156, Leite et al. (2009) observou que o Ethephon se mostrou ineficiente para a cultivar RB855453.

Pode-se inferir que as cultivares RB855156 e SP81-3250 respondem diferentemente ao Ethephon. A cultivar SP81-3250 de maturação média/tardia teve uma resposta positiva à aplicação do Ethephon, com uma melhora significativa na qualidade tecnológica. A curva de maturação da cultivar RB855156 de maturação precoce, começa a declinar em outubro/novembro, sendo assim, em virtude da aplicação do produto ter ocorrido em fevereiro, coincidindo com o declínio na curva de maturação, não houve resposta significativa com a aplicação do Ethephon, mesmo sendo uma cultivar com excelente resposta ao produto (EMBRAPA). Por outro lado, na SP81-3250, uma cultivar de maturação média/tardia, houve um aumento significativo na qualidade tecnológica com a aplicação do Ethephon, mesmo sendo esta uma cultivar de resposta instável ao produto (EMBRAPA).

5.2. Isoporização

Para os valores da densidade avaliados no topo, meio e na base dos colmos, não foram observadas alterações significativas na cultivar SP81-3250. Entretanto, os valores de densidade do colmo para a cultivar RB855156, mostraram que a isoporização foi significativamente menor apenas na base dos colmos com a aplicação do Ethephon ($1,06 \text{ g/cm}^3$) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do Ethephon na densidade (“isoporização”) dos colmos entre as cultivares RB855156 e SP81-3250 ($p \leq 0,05$)

Cultivares	Tratamentos	Densidade (g/cm ³)		
		TC	MC	BC
RB855156	Ethephon	1,06 a	1,10 a	1,06 a
	Controle	1,04 a	1,10 a	1,02 b
SP81-3250	Ethephon	1,03 a	1,06 a	1,07 a
	Controle	1,01 a	1,06 a	1,05 a

Notas: TC – topo do colmo; MC – meio do colmo; BC – Base do colmo.

Caputo et al. (2007), observou que nas cultivares IAC87-3410 (maturação tardia), IAC91-5155 (maturação média/tardia) e PO88-62 (maturação média) não houve diferença significativa na “isoporização” entre o controle e as parcelas tratadas com o Ethephon, pois não houve floração. Houve correlação positiva entre a floração e a “isoporização” para as cultivares IAC89-3124, IAC91-2195 e SP80-1842 (todas de maturação precoce). Ainda, o tratamento controle apresentou maior porcentagem de inflorescência e de “isoporização” em relação ao tratamento com o regulador de crescimento. Na cultivar IAC87-3396 (maturação média) houve um elevado índice de “isoporização” com pouca floração enquanto nas cultivares IAC91-5155 e PO88-62 apesar da “isoporização”, não houve floração. A “isoporização” está aparentemente relacionada com a floração, e devido a diferença entre as cultivares, a “isoporização” das canas com inflorescência leva a um aumento no teor de Fibra (% cana) (Caputo et al., 2007).

5.3. Histologia do meristema apical

Os cortes histológicos do meristema apical das cultivares, nas épocas de coleta de 15 e 30 dias dos tratamentos com aplicação do Ethephon e controle são apresentados nas Figuras 11 e 12. Na cultivar RB855156 foi observado alteração do meristema apical sugerindo a ocorrência de indução e modificação do estágio vegetativo para o reprodutivo aos 15 dias no tratamento com aplicação de Ethephon (Figura 11A), no tratamento controle

(Figura 11D). Na cultivar SP81-3250 também foi observado alteração no meristema apical no tratamento com Ethephon e controle aos 15 dias (Figura 12B) e aos 30 dias no tratamento controle (Figura 12F). No tratamento com Ethephon na cultivar SP81-3250, houve um atraso na emergência da folha bandeira até 43 dias e na emergência da inflorescência em 40 dias em relação ao controle, demonstrando uma queda de 20% na taxa de floração (Tabela 4). Na cultivar RB855156 não foi observada emissão da folha bandeira e inflorescência tanto no tratamento com Ethephon como no controle (Tabela 4).

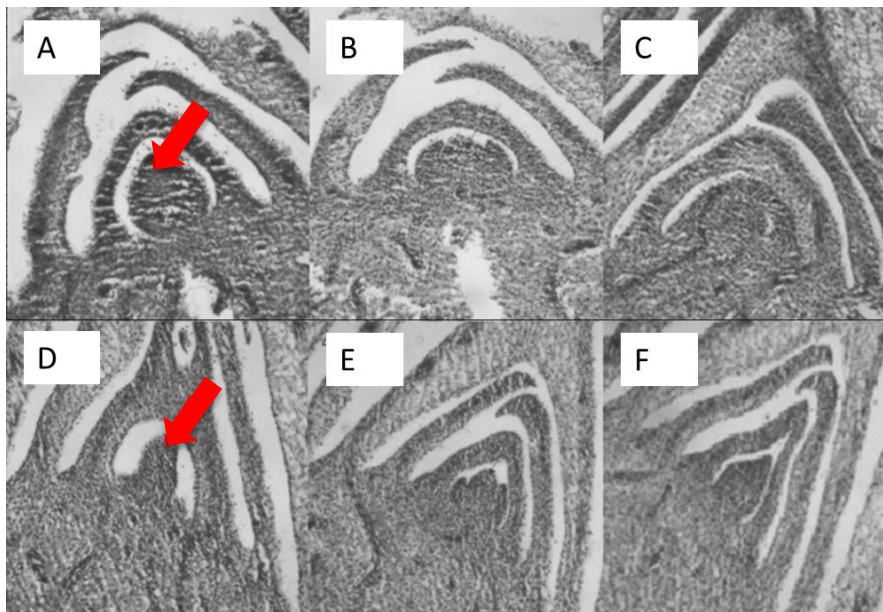


Figura 11. Corte histológico do meristema apical da cultivar RB855156. A e B – tempo 15 dias do tratamento com aplicação de Ethephon; C e D – tempo 15 dias do tratamento controle; E e F – tempo 30 dias do tratamento controle. Setas indicando o meristema apical em mudança do estágio vegetativo para o reprodutivo.

Relatos comprovam a eficiência do Ethephon no atraso da floração (Moore e Osgood, 1989; Humm, 2001), assim como reportado na cultivar SP81-3250 aqui avaliada, onde houve um atraso de até 40 dias na emissão da inflorescência. O Ethephon mostrou-se como um bom maturador e inibidor de floração na cultivar SP81-3250, devido ao aumento significativo da qualidade tecnológica e ao atraso na emissão da inflorescência.

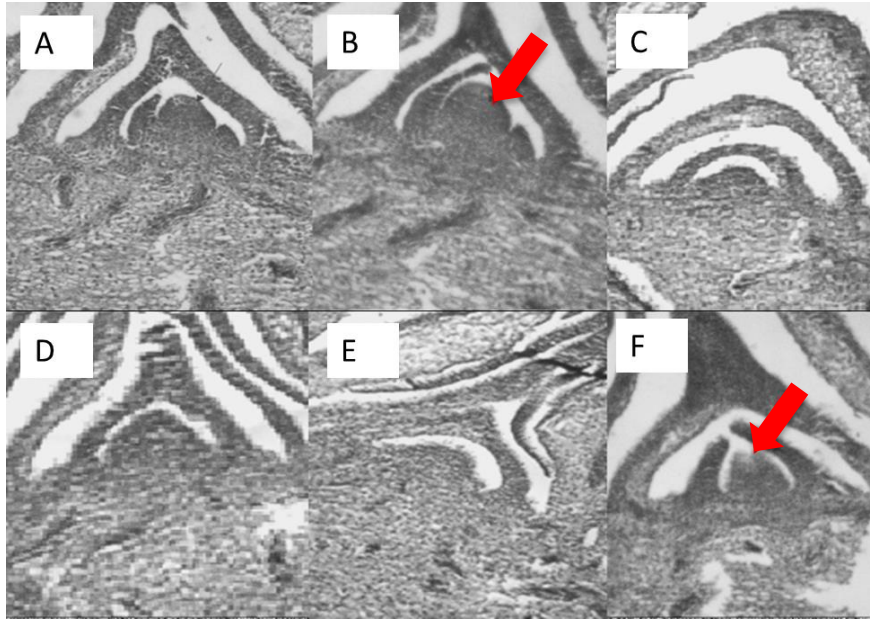


Figura 12. Corte histológico do meristema apical da cultivar SP81-3250. A e B – tempo 15 dias do tratamento com Ethephon; C e D – tempo de 15 dias do tratamento controle; E e F – tempo 30 dias do tratamento controle. Seta indicando o meristema apical em mudança do estágio vegetativo para o reprodutivo.

Tabela 4. Período de emissão da folha bandeira e inflorescência nas cultivares RB855156 e SP81-3250

Cultivares	Tratamentos	Emissão da Folha Bandeira	Emissão da Inflorescência	Floração (%)
RB855156	Controle	-	-	-
RB855156	Ethephon	-	-	-
SP81-3250	Controle	20/06/2019	17/07/2019	24%
SP81-3250	Ethephon	02/08/2019	27/08/2019	4%

5.4. Eficiência dos pares de *primers* dos genes *ScEIL1* e *ScFT3*

O cálculo da eficiência dos *primers* foi realizado em *pools* dos tecidos das folhas imaturas estimado por intermédio da fluorescência extraída do RT-qPCR (ΔR_n) pelo programa LinRegPCR 7.5 (Ruijter et al., 2009). O *pool* contendo os cDNAs dos tecidos na concentração de 1:10 foi formado de 24 amostras de cDNA, correspondentes as cultivares RB855156 e SP81-3250 no

tratamento com aplicação do Ethephon e controle, e nas épocas de coleta de 15 e 30 dias. Para os genes *ScEIL1* e *ScFT3* foi usado a concentração de *primers* de 0,2 µM. A eficiência e coeficiente de correlação (R^2) dos pares de *primers* na folha imatura variaram de 1,85 a 1,94 (E) e 0,90 a 0,99 (R^2), respectivamente, para *ScEIL1* e *ScFT3* (Tabela 5). Para os genes de referência variaram de 1,97 a 1,99 (E) e 0,99 (R^2), respectivamente, para *UBQ1* e *EF1* (Tabela 5). A análise da curva de dissociação (“*melting curve*”) mostrou a presença de um único pico, com temperatura de dissociação de 80°C (*ScFT3* e *EF1*) e 85°C (*ScEIL1* e *UBQ1*) demonstrando a especificidade do produto amplificado e o não aparecimento de dímero de primer (Figura 13).

Tabela 5. Genes *ScEIL1*, *ScFT3*, *UBQ1* e *EF1* com suas respectivas Eficiência (E) e Coeficiente de correlação (R^2) em *pool* de cDNA de folha imatura.

Símbolo do Gene	Eficiência (E)	R^2
<i>ScEIL1</i>	1,85	0,99
<i>ScFT3</i>	1,94	0,90
<i>UBQ1</i>	1,99	0,99
<i>EF1</i>	1,97	0,99

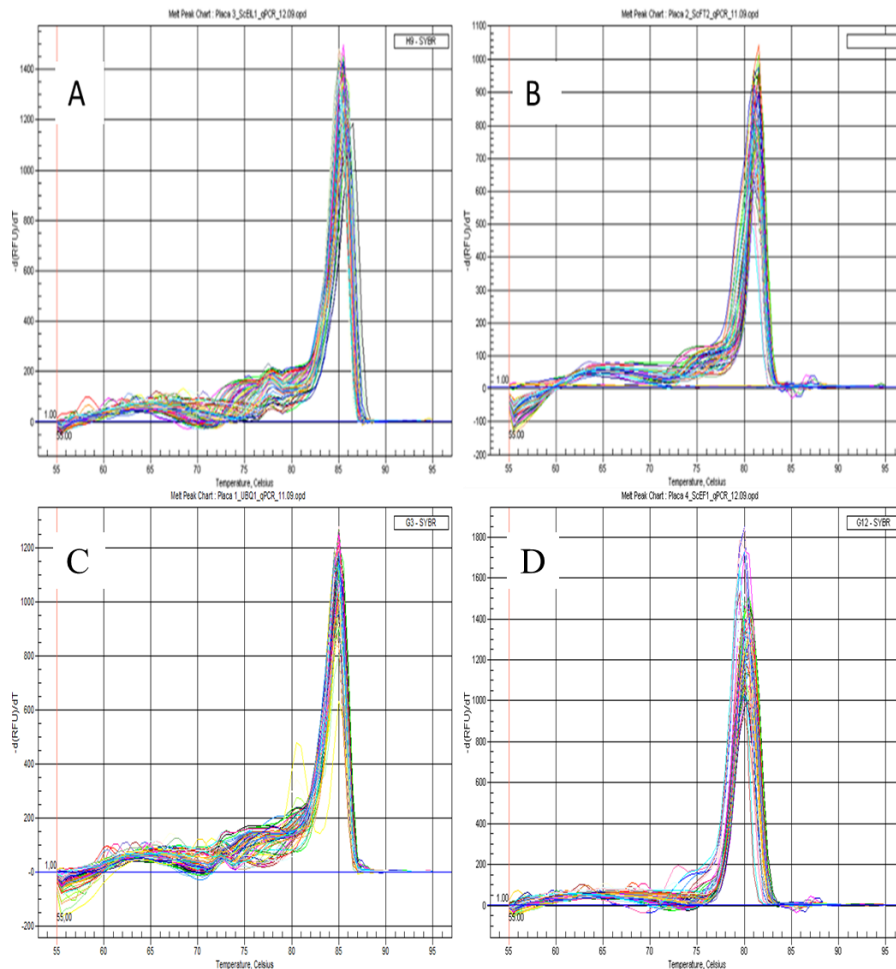


Figura 13. Picos das curvas de dissociação (“melting curve”) referentes às triplicatas técnicas dos 4 genes na concentração de $0,2 \mu\text{M}$ em folha imatura. A) gene *ScEIL1*; B) gene *ScFT3*; C) gene *UBQ1*; D) gene *EF1*.

5.5. Análise da expressão do gene *ScEIL1*

O *ScEIL1* mostrou-se expresso nas folhas imaturas das duas cultivares (RB855156 e SP81-3250) de cana-de-açúcar. As amplitudes, medianas e quartis dos valores de *Ct* (*Threshold Cycle* ou limiar do ciclo) obtidos para o *ScEIL1* (com base nas 3 réplicas biológicas e respectivas triplicatas técnicas) em cada tratamento, nos dois tempos de amostragem (15 e 30 dias) são apresentados na Figura 14 na forma de um gráfico de caixa (*box plot*). Os valores de *Ct* variaram de 21,34 a 26,02 e 21,24 a 23,81, respectivamente, para as cultivares RB855156 e SP81-3250 (Figura 14). Estes

valores de *Ct* são adequados para a análise de expressão de um gene alvo, cuja expressão não deve ser muito baixa ($Ct > 30$) ou muito alta ($Ct < 15$) (Goulao et al., 2012).

Na cultivar RB855156, o valor de *Ct* referente à mediana foi de 21,93 e 24,08, respectivamente para o tratamento com Ethephon e controle aos 15 dias, respectivamente, enquanto aos 30 dias foi de 24,85 e 25,74 para o tratamento com Ethephon e controle, respectivamente (Figura 14A). Para a cultivar SP81-3250 (Figura 14B), aos 15 dias, os valores medianos de *Ct* foram de 22,36 e 22,48, respectivamente para o tratamento com Ethephon e controle, enquanto aos 30 dias foram de 22,88 e 22,99, respectivamente para ambos tratamentos. Em virtude do gene normalizador *UBQ1* ter apresentado menor variação de *Ct*, este foi utilizado na análise de expressão pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool* - REST©) bem como no cálculo do $2^{-\Delta Ct}$.

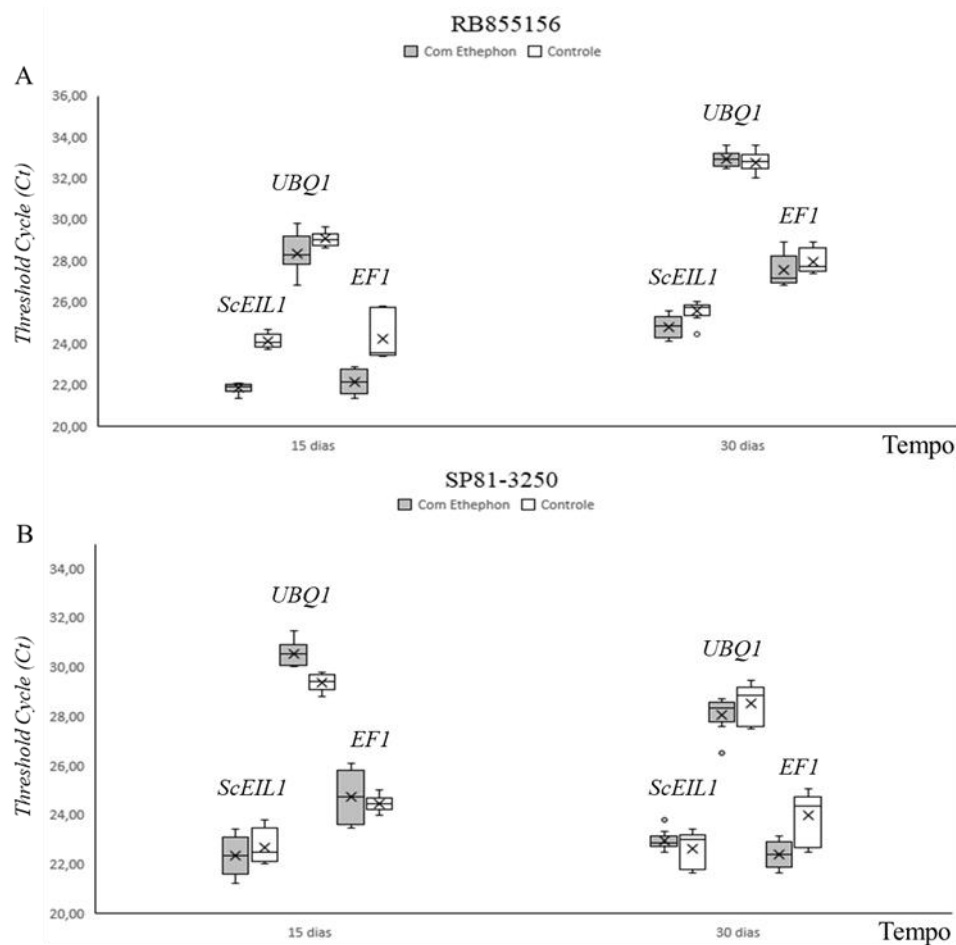


Figura 14. *Box plot* representando a média do *Ct* (*Threshold Cycle*) para os genes *ScEIL1*, *UBQ1* e *EF1* no tratamento com aplicação de Ethephon e controle aos 15 e 30 dias nas cultivares A) RB855156 e B) SP81-3250. As barras superiores e inferiores representam, respectivamente, os limites máximos e mínimos de *Ct*. O segundo quartil (barra central) representa a mediana e o primeiro e terceiro quartil representam, respectivamente, 25% dos menores valores e 75% dos maiores valores de *Ct*.

Os resultados obtidos pela RT-qPCR, evidenciaram que o gene *ScEIL1* foi significativamente mais expresso no tratamento com Ethephon em relação ao controle, em ambos os tempos de amostragem (15 e 30 dias), na cultivar RB855156 e na cultivar SP81-3250 apenas aos 15 dias. Ainda na cultivar RB855156, a expressão deste gene mostrou-se 3,01 e 1,88 mais expresso e induzido, em relação ao controle, quando da aplicação do Ethephon aos 15 e 30 dias, respectivamente (Tabela 6). Entretanto, na cultivar SP81-3250 a expressão do gene *ScEIL1* mostrou-se 2,84 mais expresso e induzindo aos 15

dias do tratamento com Ethephon e 1,78 mais reprimido em relação ao controle aos 30 dias (Tabela 6).

Tabela 6. Expressão gênica relativa do gene *ScEIL1* das cultivares RB855156 e SP81-3250

Gene	Tempo	Pvalor	Resposta	Expressão Relativa (Trat. Ethephon/Controle)
<i>ScEIL1</i>				
RB855156	15 dias	0,01	Induzido**	3,01
RB855156	30 dias	0,01	Induzido**	1,88
SP81-3250	15 dias	0,01	Induzido**	2,84
SP81-3250	30 dias	0,001	Reprimido***	1,78

Notas: Ns – não significativo. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Analisando a expressão relativa do gene *ScEIL1*, entre as cultivares (Tabela 7) observou-se que no tratamento com Ethephon, aos 15 dias, a expressão deste gene na cultivar RB855156 em relação a cultivar SP81-3250 foi 3,20 menor. Entretanto, aos 30 dias foi 8,08 mais expresso na cultivar RB855156 em relação a SP81-3250. Ainda, na Tabela 7, verifica-se que a resposta do tratamento controle foi semelhante à anterior, sendo aos 15 dias, o gene *ScEIL1* menos expresso (3,40 vezes) na cultivar RB855156 em relação a SP81-3250, e aos 30 dias, mais expresso (2,40) na cultivar RB855156 em relação a SP81-3250.

Tabela 7. Expressão gênica relativa do gene *ScEIL1* entre as cultivares RB855156 e SP81-3250

<i>ScEIL1</i>	Tratamento	Tempo	Pvalor	Expressão Relativa	Resposta
RB855156 / SP81-3250	Com Ethephon	15 dias	0,001	3,20	Reprimido***
RB855156 / SP81-3250		30 dias	0,001	8,08	Induzido***
RB855156 / SP81-3250	Controle	15 dias	0,001	3,40	Reprimido***
RB855156 / SP81-3250		30 dias	0,001	2,40	Induzido***

Notas: *P<0,05 e ***P<0,001.

Paralelamente a análise realizada pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool* - REST©), foi realizado uma análise da expressão

relativa considerando o cálculo do $2^{-\Delta Ct}$. De acordo com os resultados obtidos por esta análise ($2^{-\Delta Ct}$) pode-se detectar uma diferença significativa pelo teste T ($p \leq 0,05$) na expressão relativa entre as cultivares, tanto no tratamento com Ethephon como no controle (Figura 15), sendo que, para a cultivar RB855156 a expressão aumentou dos 15 dias para os 30 dias, enquanto na cultivar SP81-3250 o comportamento foi inverso.

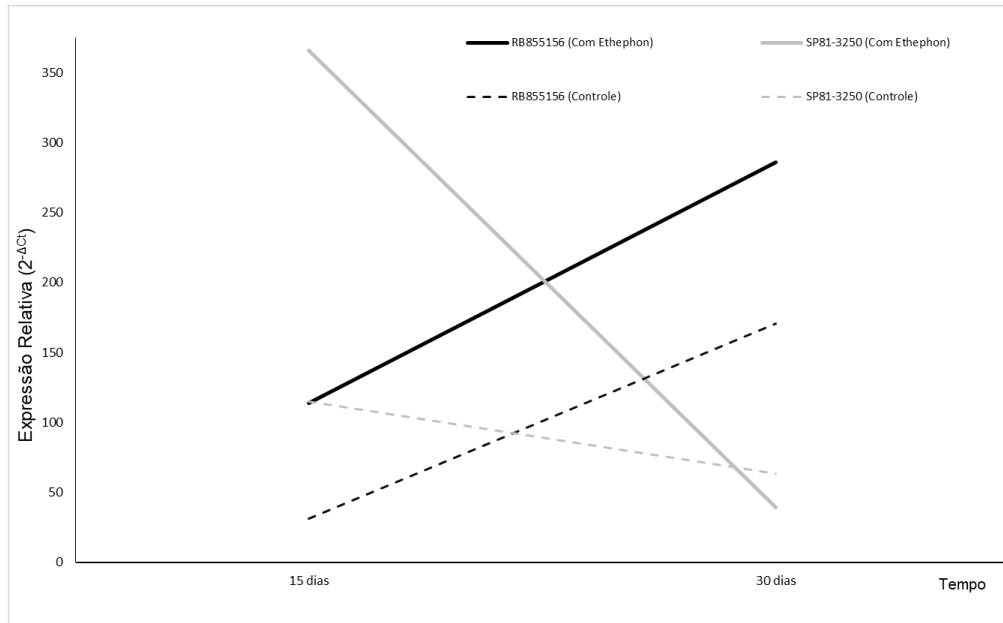


Figura 15. Análise de Expressão Relativa do gene *ScEIL1* pelo método do $2^{-\Delta Ct}$ entre as cultivares RB855156 e SP81-3250, nos tratamentos com Ethephon e controle, nas duas épocas de amostragem ($p \leq 0,05$).

O *ScEIL1* é um fator de transcrição que pode ativar ou restringir a expressão de genes de resposta ao etileno, e seu papel ainda continua desconhecido (Tavares et al., 2018). A expressão do gene *ScEIL1*, que atua na via metabólica do etileno (mesma via de atuação do Ethephon) pode mudar de acordo com a cultivar e possui maior expressão em cultivares de maturação tardia na folha imatura e no colmo (Wang et al., 2019). De fato, em nosso trabalho, os dados referentes a abundância de transcritos de *ScEIL1* em folha imatura analisados por duas metodologias, REST (*Relative Expression Software Tool* - REST©) e $2^{-\Delta Ct}$ evidenciaram diferença na expressão do mesmo entre as cultivares, aos 15 e 30 dias, sendo aos 15 dias mais expresso

na SP81-3250 (média-tardia) e aos 30 dias na RB855156 (precoce), tanto no tratamento com a aplicação do Ethephon, como no tratamento controle. Desta forma, a maior expressão do *ScEIL1* em folha imatura na cultivar SP81-3250 de maturação média-tardia, em relação a RB855156 de maturação precoce aos 15 dias corrobora com o observado por Wang et al. (2019). Este mesmo autor relatou níveis de transcritos de *ScEIL1* maiores nas folhas imaturas das cultivares de maturação tardia em relação as cultivares precoces, atribuindo diminuição do nível de expressão do gene devido a senescência foliar.

Em folhas imaturas de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos com Ethephon foram observados aumentos significativos nos níveis de biossíntese de etileno endógeno (Wang et al., 2015). Em kiwi, o resultado foi o mesmo, onde o tratamento com Ethephon aumentou significativamente a produção de etileno (Ampa et al., 2016).

De acordo com as especificações técnicas do produto (Ethephon), o intervalo de segurança é de 50 dias. Visto que sua eficiência diminui com o passar do tempo, até ser degradado por completo pela planta, provavelmente aos 15 dias foi observado um nível maior na biossíntese de etileno endógeno, o qual, diminuiu ao decorrer do tempo (30 dias). Embora não foram medidos os níveis de etileno, após esse período de 30 dias pode ter ocorrido um decréscimo na produção do etileno endógeno, o que explicaria o aumento da expressão do gene *ScEIL1* na cultivar RB85156 (precoce) em relação ao seu controle. Entretanto, na cultivar SP81-3250 (tardia) observou-se a diminuição da expressão do *ScEIL1* aos 30 dias em relação ao seu controle, provavelmente, atribuído a senescência foliar.

Em cana-de-açúcar, a expressão do *ScEIL1* está relacionada com a produção de etileno nas folhas. Acredita-se que a expressão de *ScEIL1* possa estar relacionada negativamente com a produção de etileno nas folhas (Wang et al., 2019) visto que na cultivar RB855156 o gene *ScEIL1* teve maior expressão aos 30 dias, quando teoricamente os níveis de etileno na planta teriam diminuído. Entretanto, em *Arabidopsis*, Peng et al. (2014) verificaram que o etileno endógeno pode aumentar a expressão do *ScEIL1*.

Ainda que, em nosso trabalho foi possível verificar alteração na expressão do gene *ScEIL1* em resposta a aplicação do Ethephon, estudos futuros com ampla gama de cultivares ainda se faz necessário para ajudar a entender melhor a regulação gênica do *ScEIL1* em cana-de-açúcar. De acordo com os resultados aqui apresentado, a expressão do gene *ScEIL1* provavelmente está relacionada com a produção de etileno nas folhas imaturas e com a característica de maturação das cultivares, embora não tenha sido mensurado os níveis de etileno endógeno nas cultivares nos tempos de coleta avaliados.

5.6. Análise da expressão do gene *ScFT3*

Os valores do *Threshold Cycle (Ct)* das 3 réplicas biológicas e suas triplicatas variaram de 33,44 a 37,40 e 33,07 a 37,41, respectivamente, para as cultivares RB855156 e SP81-3250 (Figura 16). De acordo com Goulao et al. (2012), os valores de *Ct* não devem ser maiores que 30 (pouco expresso) ou menores que 15 (muito expresso).

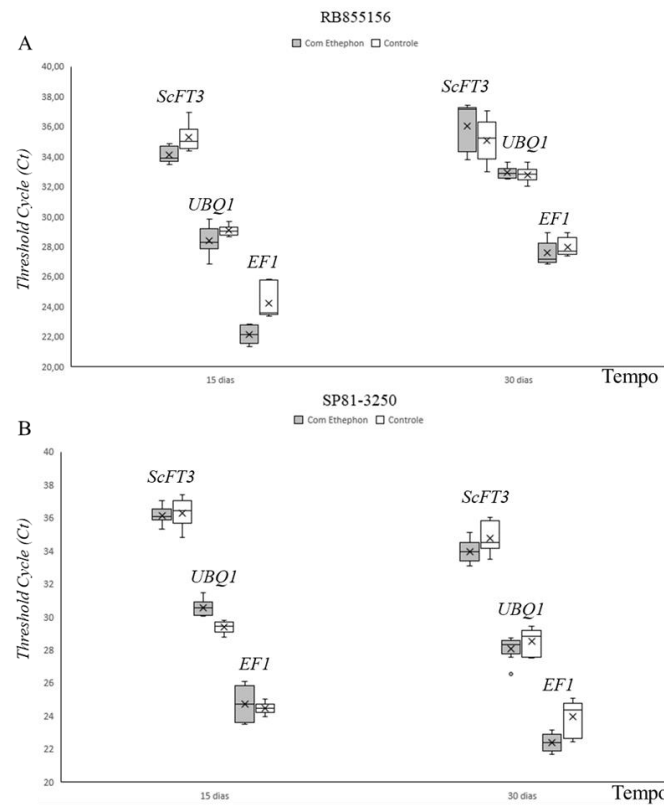


Figura 16. *Box plot* representando a média do *Ct* (*Threshold Cycle*) para os genes *ScFT3*, *UBQ1* e *EF1* no tratamento com aplicação de Ethephon e controle aos 15 e 30 dias nas cultivares A) RB855156 e B) SP81-3250. As barras superiores e inferiores representam, respectivamente, os limites máximos e mínimos de *Ct*. O segundo quartil (barra central) representa a mediana e o primeiro e terceiro quartil representam, respectivamente, 25% dos menores valores e 75% dos maiores valores de *Ct*.

Na figura 16, a distribuição dos valores de *Ct* nos permitiu uma visualização da variação dos níveis de expressão dos genes. A cultivar RB855156 apresentou valores de medianas 33,90 (com Ethephon) e 34,99 (controle) para o tempo de 15 dias, aos 30 dias os valores foram, respectivamente, de 37,15 e 35,21. Todos *Cts* do gene *ScFT3* na cultivar RB855156 estão fora dos valores adequados, definidos por Goulao et al. (2012).

Ainda na figura 16, os valores de *Cts* da mediana na cultivar SP81-3250 variaram de 33,93 a 36,45 em ambos tratamentos aos 15 e 30 dias. Os valores de *Cts* do gene *ScFT3* na cultivar SP81-3250 tiveram comportamento

semelhante aos da cultivar RB855156, sendo todos acima de 30 e fora dos valores adequados (Goulao et al., 2012).

A expressão relativa do gene *ScFT3* (Tabela 8), em folhas imaturas não foi significativa aos 15 e 30 dias (Tabela 8).

Tabela 8. Expressão gênica relativa do gene *ScFT3* das cultivares RB855156 e SP81-3250

Gene	Tempo	Pvalor	Expressão Relativa (Trat. Ethephon/Controle)
<i>ScFT3</i>			
RB855156	15 dias	0,494	Ns
RB855156	30 dias	0,592	Ns
SP81-3250	15 dias	0,434	Ns
SP81-3250	30 dias	0,515	Ns

Notas: Ns – não significativo. *P<0,05 e ***P<0,001.

Em cana-de-açúcar, Glassop e Rae (2019) analisaram a expressão gênica do *FT-A* (correspondente ao *ScFT3*) e *FT-C* em um ciclo de 24 horas em condições de fotoperíodo não indutivo, em folhas imaturas e meristema apical da cultivar Q174. O *FT-A* mostrou maior expressão nas folhas imaturas com pico de expressão ao amanhecer com o início do período de luz. Entretanto, o *FT-C* não mostrou diferença significativa em nenhum tecido durante as 24 horas. Segundo Glassop e Rae (2019), existem cultivares que respondem ou não a indução fotoperiódica, sendo necessários 15 dias de condições ideais para que isso ocorra na cana-de-açúcar.

Apesar de apenas 13 dias da janela indutiva natural terem sido favoráveis à indução (temperaturas máximas abaixo dos 31°C e as mínimas acima dos 18°C), observou-se nos cortes histológicos do meristema apical de ambas as cultivares alterações na morfologia sugerindo a transição do estágio vegetativo para o reprodutivo. Particularmente, na cultivar SP81-3250 também foi observada a emissão da folha bandeira e inflorescência. Entretanto, não foi detectada expressão significativa do gene *ScFT3*, nas amostras coletadas no tratamento com Ethephon e controle nos dois tempos investigados.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral pôde-se inferir que as cultivares RB855156 e SP81-3250 avaliadas nos tempos 15 e 30 dias após aplicação do produto respondem de forma diferente ao Ethephon, bem como em relação a expressão do gene *ScEIL1*. A cultivar SP81-3250 (maturação média/tardia) respondeu a aplicação do Ethephon, com uma melhora significativa na qualidade tecnológica e atraso na floração. Quanto à expressão relativa do *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE1 (ScEIL1)* na folha imatura, houve diferença significativa entre as cultivares (RB855156 e SP81-3250) tanto aos 15 como aos 30 dias após a aplicação do produto. Sugere-se que resultados obtidos estejam relacionados com as características de maturação das cultivares, a produção de etileno nas folhas imaturas, assim como seus níveis naturais de expressão relativa do gene *ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE1 (ScEIL1)*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., ... & Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science**, 309(5737), 1052-1056.
- Almeida Silva, M., & Caputo, M. M. (2012). Ripening and the use of ripeners for better sugarcane management. **Crop Management—cases and tools for higher yield and sustainability**, 1.
- Almeida, J.R., Valsechi, O. and Gomes, F.P. (1945). **O florescimento da cana-de-açúcar**. Anais Ese. Super. Agric. Luiz de Queiroz, 2: 49--114.
- Ampa, K., Ikeura, H., Saito, T., Okawa, K., Ohara, H., & Kondo, S. (2016). Effects of pre-harvest application of ethephon or abscisic acid on 'Kohi'kiwifruit (*Actinidia chinensis*) ripening on the vine. **Scientia horticulturae**, 209, 255-260.
- Araldi, R., Silva, F. M. L., Ono, E. O., & Rodrigues, J. D. (2010). Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, 40(3), 694-702.
- Arceneaux, G. Flowering of sugarcane. In **Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists**, 12., 1965, San Juan. Anais... Amsterdam: Elsevier, 1967. p.780-784.
- Barbieri, V., Maniero, M. A., & Matsuoka, S. (1984). O florescimento da cana-de-açúcar e suas implicações no manejo agrícola. In **Congresso Nacional da STAB**. São Paulo. Anais (Vol. 3, pp. 273-276).
- Berding, N. (1981). Improved Flowering and Pollen Fertility in Sugarcane under Increased Night Temperatures 1. **Crop Science**, 21(6), 863-867.
- Berding, N. (1995). Improving flowering through breeding: progress and prospects. In **International Society of Sugar Cane Technologists** (Vol. 17, pp. 162-171).
- Berding, N. I. L. S., & Moore, P. H. (2001). Advancing from opportunistic sexual recombination in sugarcane: Lessons from tropical photoperiodic research. In **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol** (Vol. 24, pp. 482-487).
- Berding, N. I. L. S., Dunne, V. I. V. I. E. N., Swain, R. S., & Owens, W. G. (2004). Tropical, managed initiation of sugarcane flowering: optimisation of non-photoperiodic variables. In **Proceedings-Australian Society of Sugar Cane Technologists** (pp. 49-70). PK Editorial Services; 1999.
- Berding, N., & Hurney, A. P. (2005). Flowering and lodging, physiological-based traits affecting cane and sugar yield: What do we know of their control mechanisms and how do we manage them?. **Field crops research**, 92(2-3), 261-275.

Berding, N., Pendrigh, R. S., & Dunne, V. (2007). Can flowering in sugarcane be optimised by use of differential declinations for the initiation and development phases. In **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists** (Vol. 26, pp. 699-711).

Brunkhorst, M. J. (2003). Investigation into the flowering of sugarcane variety N29 grown under different nutrient regimes. **Proc S Afr Sugar Technol Assoc**, 77, 306-12.

Cao, K., Cui, L., Zhou, X., Ye, L., Zou, Z., & Deng, S. (2016). Four tomato FLOWERING LOCUS T-like proteins act antagonistically to regulate floral initiation. **Frontiers in plant science**, 6, 1213.

Caputo, M. M., Silva, M. A. D., Beauclair, E. G. F. D., & Gava, G. J. C. D. (2007). Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana-de-açúcar sob reguladores vegetais. **Interciencia**, 834-840.

Chang, C. (2016). Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance?. **BMC biology**, 14(1), 7.

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.

Coleman, R. E. (1969). Physiology of flowering in sugarcane. **Physiology of flowering in sugarcane**.

Companhia Nacional de Abastecimento 2019. CONAB. **Indicadores da Agropecuária**. <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Last accessed: 14 dez 2019.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. & Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. **Science**, 316(5827), 1030-1033.

Cunha, C. P., Roberto, G. G., Vicentini, R., Lembke, C. G., Souza, G. M., Ribeiro, R. V., ... & Menossi, M. (2017). Ethylene-induced transcriptional and hormonal responses at the onset of sugarcane ripening. **Scientific reports**, 7, 43364.

de Andrade, L. M., dos Santos Brito, M., Junior, R. F. P., Marchiori, P. E. R., Nóbile, P. M., Martins, A. P. B., ... & Creste, S. (2017). Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods**, 13(1), 28.

Debbarma, J., Sarki, Y. N., Saikia, B., Boruah, H. P. D., Singha, D. L., & Chikkaputtaiah, C. (2019). Ethylene response factor (ERF) family proteins in abiotic stresses and CRISPR–Cas9 genome editing of ERFs for multiple abiotic stress tolerance in crop plants: a review. **Molecular biotechnology**, 61(2), 153-172.

Food and Agricultural Organization of the United Nations 2018. FAO. <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC/visualize>>. Last accessed: 06 mai. 2020.

Garcia Tavares, R., Lakshmanan, P., Peiter, E., O'Connell, A., Caldana, C., Vicentini, R., ... & Menossi, M. (2018). ScGAI is a key regulator of culm development in sugarcane. **Journal of experimental botany**, 69(16), 3823-3837.

Glassop, D., & Rae, A. L. (2019). Expression of sugarcane genes associated with perception of photoperiod and floral induction reveals cycling over a 24-hour period. **Functional Plant Biology**, 46(4), 314-327.

Gosnell, J. M. (1973). Some factors affecting flowering in sugarcane. In **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association** (Vol. 47, pp. 144-147).

Goulao, L. F., Fortunato, A. S., & Ramalho, J. C. (2012). Selection of Reference Genes for Normalizing Quantitative Real-Time PCR Gene Expression Data with Multiple Variables in Coffea spp. **Plant Molecular Biology Reporter**, 30(3), 741-759.

Hale, A. L., White, P. M., Webber III, C. L., & Todd, J. R. (2017). Effect of growing media and fertilization on sugarcane flowering under artificial photoperiod. **PloS one**, 12(8).

Hanzawa, Y., Money, T., & Bradley, D. (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102(21), 7748-7753.

Hartt, C. E. (1967). Effect of moisture supply upon translocation and storage of 14C in sugarcane. **Plant Physiology**, 42(3), 338-346.

Hiraga, S., Sasaki, K., Hibi, T., Yoshida, H., Uchida, E., Kosugi, S., Kato, T., Mie, T. Ito, H, Katou, S., Seo, S., Matsui, H., Ohashi, Y., Mitsuhashi, I. (2009). Involvement of two rice ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE genes in wound signaling. **Molecular Genetics and Genomics**, 282(5), 517.

Humm, M. (2001). Observations on the Suppression of Sugarcane Flowering Using Ethephon on the Kwazulu-natal South Coast. In **Proc S Afr Sug Technol Ass** (Vol. 75, pp. 187-191).

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**, 25(3), 820-833.

Jain, R., Singh, S. P., Singh, A., Singh, S., Kishor, R., Singh, R. K., Chandra, A. & Solomon, S. (2017). Soluble Acid Invertase (SAI) Activity and Gene Expression Controlling Sugar Composition in Sugarcane. **Sugar Tech**, 19(6), 669-674.

Jung, C., Pillen, K., Staiger, D., Coupland, G., & von Korff, M. (2017). Recent advances in flowering time control. **Frontiers in plant science**, 7, 2011.

Júnior, L. C. T., Marques, M. O., da Silva Neto, H. F., Camilotti, F., Bernardi, J. H., & Nogueira, T. A. R. (2009). Variação genotípica no florescimento, isoporização e características tecnológicas em seis cultivares de cana-de-açúcar. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 9(1), 12-18.

Karmollachaab, A., Bakhshandeh, A., Telavat, M. M., Moradi, F., & Shomeili, M. (2016). Sugarcane yield and technological ripening responses to chemical ripeners. **Sugar Tech**, 18(3), 285-291.

Kaufmann, K., Wellmer, F., Muiño, J. M., Ferrier, T., Wuest, S. E., Kumar, V., & Angenent, G. C. (2010). Orchestration of floral initiation by APETALA1. **Science**, 328(5974), 85-89.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., & Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science**, 286(5446), 1960-1962.

Lang, A. (1965). Physiology of flower initiation. In **Differenzierung und Entwicklung/Differentiation and Development** (pp. 1380-1536). Springer, Berlin, Heidelberg.

Lavanholi, M. D. G. D. P. (2001). Aplicação de ethephon e imazapyr como inibidores de florescimento em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp, var. SP70-1143).

Lee, J., Oh, M., Park, H., & Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. **The Plant Journal**, 55(5), 832-843.

Lee, N., & Imaizumi, T. (2018). Uncoupling FT protein transport from its function. **Plant and Cell Physiology**, 59(8), 1487.

Leite, G. H. P., Crusciol, C. A. C., Lima, G. P. P., & de Almeida Silva, M. (2009). Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, 39(3), 718-725.

Levy, Y. Y., & Dean, C. (1998). The transition to flowering. *The Plant Cell*, 10(12), 1973-1989.

Li, J., Li, Z., Tang, L., Yang, Y., Zouine, M., & Bouzayen, M. (2012). A conserved phosphorylation site regulates the transcriptional function of ETHYLENE-INSENSITIVE3-like1 in tomato. **Journal of experimental botany**, 63(1), 427-439.

Liu, Y., Tang, M., Liu, M., Su, D., Chen, J., Gao, Y., Bouzayen, M. & Li, Z. (2020). The Molecular Regulation of Ethylene in Fruit Ripening. **Small Methods**, 1900485.

Lu, K. J., Huang, N. C., Liu, Y. S., Lu, C. A., & Yu, T. S. (2012). Long-distance movement of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T RNA participates in systemic floral regulation. **RNA biology**, 9(5), 653-662.

Marin, F., R. (2020). **Árvore do Conhecimento Cana-de-Açúcar**. Agência Embrapa de Ciência e Tecnologia. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html>. Acesso em: Ago 2020.

Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., & Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. **Current biology**, 17(12), 1055-1060.

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.

Melloni, M. L. G., Melloni, M. N. G., Scarpari, M. S., Garcia, J. C., Landell, M. G., & Pinto, L. R. (2015). Flowering of sugarcane genotypes under different artificial photoperiod conditions. **American Journal of Plant Sciences**, 6(03), 456.

Moore, P. H., & Berding, N. (2013). Flowering. Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology, 379-410.

Moore, P. H., & Nuss, K. J. (1987). Flowering and flower synchronization. In **Developments in Crop Science** (Vol. 11, pp. 273-311). Elsevier.

Moore, P. H., & Osgood, R. V. (1989). Prevention of flowering and increasing sugar yield of sugarcane by application of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid). **Journal of Plant Growth Regulation**, 8(3), 205.

Moore, P. H., Paterson, A. H., & Tew, T. (2013). Sugarcane: the crop, the plant, and domestication. **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**, 1-17.

Nickell, L. G. (1982). Plant growth regulators in the sugarcane industry. **Proceedings-Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham**.

Nieuwenhuizen, N. J., Chen, X., Wang, M. Y., Matich, A. J., Perez, R. L., Allan, A. C., Green S. A. & Atkinson, R. G. (2015). Natural variation in monoterpene synthesis in kiwifruit: transcriptional regulation of terpene synthases by NAC and ETHYLENE-INSENSITIVE3-like transcription factors. **Plant Physiology**, 167(4), 1243-1258.

Pasriga, R., Yoon, J., Cho, L. H., & An, G. (2019). Overexpression of RICE FLOWERING LOCUS T 1 (RFT1) Induces Extremely Early Flowering in Rice. **Molecules and cells**, 42(5), 406.

Peng, J., Li, Z., Wen, X., Li, W., Shi, H., Yang, L., ... & Guo, H. (2014). Salt-induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in Arabidopsis. **PLoS Genet**, 10(10), e1004664.

Pereira, A. R., Barbieri, V., & Nova, N. A. V. (1983). Climatic conditioning of flowering induction in sugarcane. **Agricultural Meteorology**, 29(2), 103-110.

Rocha, J. V.; Picoli, M. C. A.; Duft, D. G.; Rocha, A. M.; Moreira, M. E. M. **Monitoramento da Cultura de Cana-de-Açúcar no Estado de São Paulo**. Boletim No: 07 – Maio, 2015, 6p.

Ruijter J, Van Der Velden S, Ilgun A. LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR data [computer program]. Version 11.0. Amsterdam, the Netherlands: Heart Failure Research Center, Academic Medical Centre. 2009.

Salih, H., He, S., Li, H., Peng, Z., & Du, X. (2020). Investigation of the EIL/EIN3 Transcription Factor Gene Family Members and Their Expression Levels in the Early Stage of Cotton Fiber Development. **Plants**, 9(1), 128.

Shim, J. S., Kubota, A., & Imaizumi, T. (2017). Circadian clock and photoperiodic flowering in Arabidopsis: CONSTANS is a hub for signal integration. **Plant physiology**, 173(1), 5-15.

Srivastava, R. P., Singh, S. P., Singh, P. R. A. T. A. P., & Singh, S. B. (2006). Artificial induction of flowering in sugarcane under sub-tropical conditions - a successful approach. **Sugar Tech**, 8(2-3), 184-186.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). **Plant Physiology** Sinauer Associates. **Inc., Sunderland, MA.**

Takada, S., & Goto, K. (2003). TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. **The Plant Cell**, 15(12), 2856-2865.

Tamaki, S., Tsuji, H., Matsumoto, A., Fujita, A., Shimatani, Z., Terada, R., Sakamoto, T., Kurata, T. & Shimamoto, K. (2015). FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(8), E901-E910.

Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. **Science**, 303(5660), 1003-1006.

Wang, A. Q., Huang, W. J., Niu, J. Q., Liu, M., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2013). Effects of ethephon on key enzymes of sucrose metabolism in relation to sucrose accumulation in sugarcane. **Sugar Tech**, 15(2), 177-186.

Wang, A. Q., Ye, X. Z., Huang, J. L., Niu, J. Q., Liu, M., Pan, Y. B., ... & Li, Y. R. (2015). Molecular cloning and functional analysis of an ethylene receptor gene from sugarcane (*Saccharum* spp.) by hormone and environmental stresses. **Sugar Tech**, 17(1), 22-30.

Wang, F. W., Yu, J. B., Xiao, D., Li, Y. R., He, L. F., & Wang, A. Q. (2019). Molecular Cloning and Expression Analysis of Ethylene-Insensitive3-Like 1 (ScEIL1) Gene in Sugarcane. **Sugar Tech**, 21(6), 891-897.

Yeu, W. K. (1980). Studies on flowering of sugar cane in the South of Haiwan, China. In **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol** (Vol. 17, pp. 1301-1306).

Zhu, Y. J., Fan, Y. Y., Wang, K., Huang, D. R., Liu, W. Z., Ying, J. Z., & Zhuang, J. Y. (2017). Rice Flowering Locus T 1 plays an important role in heading date influencing yield traits in rice. **Scientific reports**, 7(1), 1-10.

Zhu, Z., & Guo, H. (2008). Genetic basis of ethylene perception and signal transduction in Arabidopsis. **Journal of integrative plant biology**, 50(7), 808-815.