

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/08/2022.

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

**SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA
EM CONDIÇÕES DE FOTOPERÍODO ARTIFICIAL PARA
INDUÇÃO DO FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR.**

Paulo Henrique da Silva Santos

Biólogo

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA
EM CONDIÇÕES DE FOTOPERÍODO ARTIFICIAL PARA
INDUÇÃO DO FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR.**

Paulo Henrique da Silva Santos

Orientadora: Dra. Luciana Rossini Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Michael dos Santos Brito

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

S237s

Santos, Paulo Henrique da Silva

Seleção e validação de genes de referência em condições de fotoperíodo artificial para indução do florescimento em Cana-de-açúcar / Paulo Henrique da Silva Santos. -- Jaboticabal, 2020
82 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Michael dos Santos Brito

1. Genes de Referência. 2. Florescimento. 3. Cana-de-açúcar. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



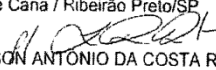
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

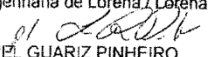
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA EM CONDIÇÕES DE FOTOPERÍODO ARTIFICIAL PARA INDUÇÃO DO FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR

AUTOR: PAULO HENRIQUE DA SILVA SANTOS
ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO
COORIENTADOR: MICHAEL DOS SANTOS BRITO

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. ELISSON ANTONIO DA COSTA ROMANEL (VIDEOCONFERÊNCIA)
Escola de Engenharia de Lorena / Lorena/SP


Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de agosto de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULO HENRIQUE DA SILVA SANTOS – nascido em 13 de fevereiro de 1992 em Barrinha (SP), Brasil, iniciou o curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas no ano de 2014, no Centro Universitário Barão de Mauá. Durante a graduação foi aluno de iniciação científica bolsista FAPESP no projeto “Caracterização dos alvos de regulação do fator de transcrição SHN por ChIPqPCR” no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC-Centro de Cana-Ribeirão Preto-SP) sob a supervisão do pesquisador Dr. Michael dos Santos Brito no ano de 2016. Em 2017 recebeu o grau de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas e também em 2017 o grau de Bacharel no mesmo curso pelo Centro Universitário Barão de Mauá. Em março de 2018 ingressou na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o curso.

“Nós podemos explicar o azul-pálido desse pequeno mundo que conhecemos muito bem. Se um cientista alienígena, recém-chegado às imediações de nosso Sistema Solar, poderia fidedignamente inferir oceanos, nuvens e uma atmosfera espessa, já não é tão certo. Netuno, por exemplo, é azul, mas por razões inteiramente diferentes. Desse ponto distante de observação, a Terra talvez não apresentasse nenhum interesse especial. Para nós, no entanto, ela é diferente. Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos que conhecemos de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas. Toda a nossa mistura de alegria e sofrimento, todas as inúmeras religiões, ideologias e doutrinas econômicas, todos os caçadores e saqueadores, heróis e covardes, criadores e destruidores de civilizações, reis e camponeses, jovens casais apaixonados, pais e mães, todas as crianças, todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, "superastros", "líderes supremos", todos os santos e pecadores da história de nossa espécie, ali - num grão de poeira suspenso num raio de sol. A Terra é um palco muito pequeno em uma imensa arena cósmica. Pensem nos rios de sangue derramados por todos os generais e imperadores para que, na glória do triunfo, pudessem ser os senhores momentâneos de uma fração desse ponto. Pensem nas crueldades infinitas cometidas pelos habitantes de um canto desse pixel contra os habitantes mal distinguíveis de algum outro canto, em seus frequentes conflitos, em sua ânsia de recíproca destruição, em seus ódios ardentes. Nossas atitudes, nossa pretensa importância de que temos uma posição privilegiada no Universo, tudo isso é posto em dúvida por esse ponto de luz pálida. O nosso planeta é um pontinho solitário na grande escuridão cósmica circundante. Em nossa obscuridade, no meio de toda essa imensidão, não há nenhum indício de que, de algum outro mundo, virá socorro que nos salve de nós mesmos. (...)"

(Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP - Jaboticabal), pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (FAPESP 2016/02679-9; FAPESP 2018/08380-0) para execução do Projeto;

Aos meus orientadores Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto e Prof. Dr. Michael dos Santos Brito pelas orientações, apoio e disponibilidade;

Aos colaboradores do projeto: Me. João Manechini, Prof. Dr. Renato Vicentini, Prof. Dr. Elisson Romanel e Prof. Dr. Stephen Jackson;

À Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza e ao Dr. Marcos Guimarães de Andrade Landell por ceder toda estrutura Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, em Ribeirão Preto - SP para realização do projeto;

Aos colegas de pós-graduação Luiz e Carol, pelo companheirismo durante os eventos científicos e disciplinas;

Aos membros da banca do exame geral de qualificação e comissão examinadora: Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto, Dra. Andressa Peres Bini, Dr. Marcel Fernando da Silva, Prof. Dr. Elisson Romanel e Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, muito obrigado pela disponibilidade e pelas correções;

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, em Ribeirão Preto, que de alguma maneira colaboraram para realização do trabalho;

E por último, porém não menos importante, toda a minha família pelo suporte durante os estudos.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

Sumário

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A cultura cana-de-açúcar.....	4
2.2. Fotoperíodo.....	4
2.3. Aspectos Moleculares do Florescimento	6
2.4. Genes de referência em Cana-de-Açúcar	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Material Biológico e Condições Experimentais:.....	13
3.2. Extração de RNA total e Síntese de cDNA	14
3.3. Seleção e Validação de Genes de Referência	14
3.4. Desenvolvimento de <i>primers</i> para genes diferencialmente expressos...16	
3.5. Estudo de expressão relativa do gene <i>ScFT3</i> ao longo do tempo.....18	
3.6. Condições da Reação de PCR quantitativa – PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) :	19
4. RESULTADOS	19

4.1. Dados de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) dos candidatos a genes de referência.....	19
4.2. Análise de estabilidade dos candidatos a genes de referência por condição experimental	22
4.3. Validação de genes de referência.....	25
4.4. Validação de transcritos diferencialmente expressos.....	28
4.6. Estudo de expressão relativa ao longo do tempo (<i>timecourse</i>) gene ScFT3	36
5. DISCUSSÃO.....	38
5.1. Genes de Referência.....	38
5.2. Expressão relativa de genes alvos diferencialmente expressos.....	40
5.3. Expressão relativa de <i>ScFT3</i> ao longo do desenvolvimento	43
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS.....	45
Apêndice A.....	50
Tabela Suplementar 1A. Dados completos algoritmos <i>NormFinder</i> e <i>BestKeeper</i>	51
Tabela Suplementar 2A. Dados completos algoritmo <i>RefFinder</i>	57
Sequência dos transcritos utilizados para desenhar os <i>primers</i> dos genes diferencialmente expressos:	57

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de alto impacto no agronegócio do Brasil, principalmente pela produção de açúcar, álcool e bioeletricidade. O florescimento é um processo fisiológico importante para os programas de melhoramento genético na realização de cruzamentos, e indesejável aos produtores por proporcionar, em algumas cultivares, perda de acúmulo de sacarose prejudicando diretamente o rendimento dos canaviais. Desta forma, o conhecimento da expressão dos genes envolvidos no processo de indução (transição do meristema vegetativo para reprodutivo) é de extrema importância para o desenvolvimento de novas cultivares de cana-de-açúcar. Entretanto, o estudo da expressão de genes via PCR quantitativo em tempo (RT-qPCR) requer a escolha correta de genes de referência para normalizar a expressão dos genes alvos e, consequentemente, proporcionar a sua correta interpretação. O objetivo deste trabalho foi identificar genes de referência estáveis para validação de genes diferencialmente expressos via RT-qPCR. A partir de um experimento de RNA-Seq que investigou genes envolvidos na indução floral fotoperiódica na cultivar comercial de cana-de-açúcar IACSP96-7569 foi selecionado os genes alvos para validação. Oito diferentes candidatos a genes de referência (*UBQ1*, *UBQ2*, *RPL*, *GAPDH*, *25SrRNA1*, *TUB*, *EF1- α* e *TIPS-41*) foram testados sob dois tratamentos fotoperiódicos (dia curto e dia longo), em dois momentos de desenvolvimento (correspondentes aos estágios iniciais da indução floral e formação de primórdios florais) em dois tecidos foliares (folha madura e folha imatura). A estabilidade dos candidatos a genes de referência em todas as condições foi avaliada pelos algoritmos *NormFinder*, *BestKeeper* e *RefFinder* e mostrou que *UBQ1* e *TUB* foram os genes de referência mais estáveis. O par de genes de referência mais estável (*UBQ1/TUB*) e o menos estável (*GAPDH/25SrRNA1*) foi utilizado para normalizar a expressão de dois transcritos identificados como expressos diferencialmente a partir dos dados de RNA-Seq, *PIL5* (“*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5*”) e *LHP1* (“*LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1*”) evidenciando os seus efeitos na resposta da expressão destes alvos. A comparação entre os resultados de expressão diferencial para estes dois alvos via RNA-Seq (FPKM) e RT-qPCR mostrou certa divergência sinalizando a importância da utilização de genes de referência adequados para validar os resultados do RNA-Seq. Além da seleção e validação de genes de referência, 13 genes alvos incluindo dois transcritos de função desconhecida foram avaliados via RT-qPCR, bem como a expressão do gene ortólogo ao *FLOWERING LOCUS T (FT)* ao longo de seis tempos de coleta em folha madura. A seleção e validação de genes de referência foram essenciais para a correta interpretação dos dados de RT-qPCR e servirão como um guia nos estudos de florescimento em cana-de-açúcar, especialmente aqueles voltados para a indução fotoperiódica da floração.

Palavras-chave: Cana-de-Açúcar, Florescimento, PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), Genes de Referência, Fotoperiodismo, RNA-Seq.

ABSTRACT

Sugarcane is an important economic crop worldwide, highlighting in Brazil's agribusiness mainly for sugar, ethanol, and bioelectricity production. The flowering induction process, marked by the apical meristem transition from vegetative to reproductive stage, negatively impacts sugarcane production and quality traits. Despite its importance, the knowledge of the genes involved in the flowering induction pathway as well as its expression in the beginning of the induction process is still scarce in this high complex polyploid crop. Reverse transcription quantitative real-time (RT-qPCR) is the most used technique for gene expression analysis and requires the selection of reliable reference genes to normalize the expression of target genes and for correct interpretation of the RT-qPCR data. The aim of this work was to identify stable reference genes for RT-qPCR validation of differentially expressed genes previously identified in a RNA-Seq experiment investigating genes involved with photoperiodic floral induction in the commercial sugarcane cultivar IACSP96-7569. Eight different candidate reference genes (*UBQ1*, *UBQ2*, *RPL*, *GAPDH*, *25SrRNA1*, *TUB*, *EF1- α* , and *TIPS-41*) were tested under two photoperiodic treatments (short day and long day), at two developmental time points (corresponding to the early stages of floral induction and floral primordia formation) in two leaf tissues (mature leaf and spindle leaf). The stability of the candidate reference genes in all conditions was evaluated with *NormFinder*, *BestKeeper*, and *RefFinder* algorithms and showed that *UBQ1* and *TUB* were the most stable reference genes. The most stable reference gene pair (*UBQ1/TUB*) and the least stable pair (*GAPDH/25SrRNA1*) were used to normalize the expression of two transcripts identified as being differentially expressed from our RNA-Seq data: *PIL5* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5*) and *LHP1* (*LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN*) highlighting its effect on the expression of the targets. The comparison between the results of differential expression of these two target genes via RNA-Seq (FPKM) and RT-qPCR showed some divergence signaling the importance of using appropriate reference genes to validate the RNA-Seq results. Additionally, 13 target genes including two transcripts of unknown function were evaluated via RT-qPCR, as well as the developmental timecourse relative expression of *FLOWERING LOCUS T (FT)* gene over six time points in mature leaf. The selection and validation of reference genes were essential for the correct interpretation of RT-qPCR data and can be used as a guide in sugarcane flowering studies, especially those of photoperiodic flowering induction.

Keywords: Sugarcane, Flowering, Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), Reference Genes, Photoperiodism, RNA-Seq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da via de indução do florescimento baseado em *Arabidopsis thaliana* e culturas cereais. Abaixo da figura do sol estão os genes relacionados com fotoperíodo, dentro do círculo estão os genes relacionados com relógio circadiano. As setas em verde indicam regulação positiva e em vermelha regulação negativa. Fonte: Glassop (2018).....7

Figura 2. Estádios de desenvolvimento do meristema apical da cultivar IACSP96-7569 submetido a tratamento fotoperiódico de indução. A. Seção longitudinal do meristema apical no estágio indutivo (coleta 7); B. Estágio de formação do primórdio da inflorescência (coleta 13).....14

Figura 3. Box Plot com os CTs médios na condição geral representando o perfil de variação de cada candidato. No gráfico é possível observar o *outlier* mínimo e máximo. O quadrante inferior da caixa representa o primeiro quartil (25%) e o superior o terceiro quartil (75%), linha horizontal na caixa representa a mediana. Gráfico desenvolvido pelo *template* cedido por vertex42.21

Figura 4. Curvas de dissociação dos candidatos a genes de referência em folha madura.21

Figura 5. Curvas de dissociação dos candidatos a genes de referência em folha imatura.....22

Figura 6. Dados de expressão relativa dos genes alvos pelo programa REST 2009. $P < 0.001$ (***), $P < 0.01$ (**), e $P < 0.05$ (*). Comparação entre a expressão gênica dos genes *PIL5* e *LHP1* (Dia curto em relação a dia longo) quanto normalizados com os pares de candidatos a normalizadores mais e menos estáveis. As barras de erro indicam erro padrão. U.A: Unidades arbitrárias.26

Figura 7. Dados em Log *fold change* de FPKM em folha madura na 7ª coleta advindos de RNA-Seq comparando a quantidade de transcritos encontrado dos genes *LHP1* e *PIL5* em tratamentos de dia curto (DC) e dia longo (DL).27

Figura 8. Dados referentes à expressão relativa de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) dos genes <i>PIL5</i> e <i>LHP1</i> em folha madura na 7 ^a coleta avaliado com REST 2009. $P < 0.001$ (***), $P < 0.01$ (**), e $P < 0.05$ (*). As barras de erro indicam erro padrão. U.A: Unidades arbitrárias.....	28
Figura 9. Curvas de dissociação dos genes alvos diferencialmente expressos em folha madura na 7 ^a coleta com os valores de eficiência (E) e coeficiente de correlação (R^2).	30
Figura 10. Curvas de dissociação dos genes alvos diferencialmente expressos em folha madura na 13 ^a coleta com os valores de eficiência (E) e coeficiente de correlação (R^2).	32
Figura 11. Curvas de dissociação dos genes alvos diferencialmente expressos em folha imatura na 7 ^a coleta com os valores de eficiência (E) e coeficiente de correlação (R^2).	34
Figura 12. Curvas de dissociação dos genes alvos diferencialmente expressos em folha imatura na 13 ^a coleta com os valores de eficiência (E) e coeficiente de correlação (R^2).	36
Figura 13. Expressão relativa do gene <i>ScFT3</i> ao longo do desenvolvimento do florescimento em folha madura avaliada com REST 2009 $P < 0.001$ (***), $P < 0.01$ (**), e $P < 0.05$ (*).	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes de referência com suas respectivas sequências, tamanho do amplicon (S) em pares de base (pb) e número de acesso.....	16
Tabela 2. Genes diferencialmente expressos com respectivos pares de <i>primers</i> e tamanho esperado do <i>amplicon</i> em pares de bases (pb).....	17
Tabela 3. Relação dos candidatos a genes de referência com suas respectivas melhores concentrações em μM , Eficiência (E) e Coeficiente de correlação (R^2) em pool de cDNA de folha madura e imatura.....	20
Tabela 4. Coeficiente de variação (CV) segundo algoritmo <i>BestKeeper</i> para os 8 candidatos a genes de referência, em folha madura e imatura, tempo de coleta, fotoperíodo de dia curto (DC) e dia longo (DL).....	23
Tabela 5. Dados resumidos dos algoritmos <i>NormFinder</i> e <i>BestKeeper</i> nas diferentes condições experimentais analisadas.	23
Tabela 6. Candidato a gene de referência mais e menos estável segundo dados do algoritmo <i>RefFinder</i> para as diferentes condições experimentais.	25
Tabela 7. Expressão relativa em genes alvos e transcritos de função desconhecida diferencialmente expressos em folha madura na 7 ^a coleta.	29
Tabela 8. Expressão relativa em genes alvos diferencialmente expressos em folha madura 13 ^a coleta.....	31
Tabela 9. Expressão relativa em genes alvos diferencialmente expressos em folha imatura 7 ^a coleta.....	33
Tabela 10. Expressão relativa em genes alvos diferencialmente expressos em folha imatura 13 ^a coleta.....	35

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro constituindo a matéria-prima para produção, principalmente de açúcar e etanol. Ao final da safra 2019/20 houve um aumento de 3,6% em relação à 2018/19, culminando em uma produção de 642,7 milhões de toneladas. A produção de açúcar foi de 29,8 milhões de toneladas e etanol total de cana-de-açúcar 34 bilhões de litros, um crescimento de 2,6% e 5,1%, respectivamente, quando comparado à safra anterior (Conab, 2020).

Em termos do cultivo da cana-de-açúcar, o florescimento é um processo fisiológico que prejudica diretamente o rendimento dos canaviais, uma vez que, a produção de estruturas florais redireciona os assimilados de carbono do colmo para inflorescência e resulta em perda de acúmulo de sacarose (Berding e Hurney, 2005) além de proporcionar, em algumas cultivares, a chamada isoporização que causa o secamento do interior do colmo (Capputto et al., 2007). Por outro lado, para os programas de melhoramento genético, o florescimento é de grande importância para permitir as hibridações e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novas cultivares.

O processo do florescimento envolve várias etapas, marcadas por modificações do meristema apical, iniciando pela indução até a formação e emissão da inflorescência (Clements, 1975). A indução, mudança do estágio vegetativo para o reprodutivo é marcada por uma alteração na morfologia do meristema apical, isto é, alongamento do domo apical caracterizando-se como meristema indutivo propriamente dito (Clements, 1975; Rodrigues, 1995) e sendo esta modificação perceptível via observações em microscópio óptico de cortes histológicos do meristema apical.

O florescimento é um processo complexo dependente de vários fatores endógenos, tais como fitormônios, estímulos fotossensíveis e regulação gênica. E também fatores exógenos, tais como o fotoperíodo, temperatura, umidade, nutrição e latitude sendo que, dentre os fatores que influenciam a indução ao florescimento, o fotoperíodo é o mais importante. (Araldi et al., 2010).

Em relação aos aspectos moleculares de indução do florescimento, o gene *FLOWERING LOCUS T (FT)* descrito em *Arabidopsis thaliana* é um indutor do florescimento expresso nas células companheiras do floema foliar (Araki et al. 1998; Golembeski et al. 2015) enquanto o gene *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* também descrito em *Arabidopsis*, atua de forma antagônica ao *FT* reprimindo o florescimento (Hanano & Goto, 2011). Possíveis ortólogos a estes dois genes em cana-de-açúcar (*ScFT* e *ScTFL1*) já foram identificados por Coelho et al. (2013; 2014). A expressão do gene *ScTFL1* no meristema apical, em folhas maduras e folhas imaturas (“spindle leaf”) de cana-de-açúcar foi relatado por Coelho et al. (2014). Estes autores observaram também variação na expressão do *ScFT* em condições de fotoperíodo indutivo e não indutivo em casa de vegetação, sem o uso de câmara de fotoperíodo. Em condição de fotoperíodo não indutivo foi observado a expressão do *ScFT* na folha imatura e região do meristema apical, sendo a expressão deste gene em folha madura observada também em condições de fotoperíodo indutivo.

Segundo Glassop et al. (2014;2018) a compreensão dos genes envolvidos na via de florescimento, em cana-de-açúcar, bem como de sua expressão poderá auxiliar na identificação de pontos chaves desta via que poderão ser manipulados para assegurar o florescimento. Entretanto, a validação da expressão de genes alvos via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) requer a escolha correta de genes de referência para normalizar a expressão dos mesmos e, consequentemente, proporcionar a sua correta interpretação de acordo com MIQE (“Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments”) (Bustin et al., 2009). Em cana-de-açúcar, estudos da expressão de genes relacionados ao florescimento foram realizados em ensaios conduzidos em campo sob condições naturais de fotoperíodo, temperatura e umidade, em plantas amostradas no estágio de “vela”, i.e., primórdio da inflorescência, o qual é posterior ao estágio de início de indução propriamente dito (Papini-terzi et al. 2005; Medeiros et al. 2016).

O Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), atualmente, é o único programa de melhoramento, no Brasil, que possui uma Câmara de Fotoperíodo, totalmente automatizada que permite induzir o florescimento em condições controladas de luz, temperatura e

umidade, simulando as condições fotoperiódicas naturais para o florescimento da cana-de-açúcar (Melloni et al., 2015). Recentemente, esta câmara de fotoperíodo foi utilizada para estudar o processo de indução fotoperiódica ao florescimento via RNA-Seq (“RNA-Sequencing”) da cultivar de cana-de-açúcar IACSP96-7569 (projeto FAPESP 2016/02679-9). Amostras foliares e os respectivos meristemas apicais desta cultivar foram coletadas ao longo de dois tratamentos fotoperiódicos indutivo e não indutivo. A dissecação do meristema apical seguida da avaliação histológica permitiu acompanhar as modificações ocorridas no meristema apical, tais como o início da indução (alongamento do domo apical) e o desenvolvimento do primórdio da inflorescência, associando as coletas foliares realizadas aos respectivos estágios de desenvolvimento. Os genes alvos diferencialmente expressos advindos do RNA-Seq, necessitam de validação de via RT-qPCR, para tanto é imprescindível uma normalização com bons genes de referência.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes de referência que apresentam perfil de expressão estáveis em condição experimental de fotoperíodo indutivo (dia curto) e não indutivo (dia longo), em dois estádios do florescimento em cana-de-açúcar, respectivamente, no estágio inicial do processo de indução e, na formação do primórdio da inflorescência (observação da “vela”) tanto em folha madura como folha imatura (“spindle leaf”). Para tanto, foram utilizadas amostras foliares do ensaio mencionado anteriormente. Os genes de referência selecionados foram posteriormente utilizados para avaliar a expressão de dois genes alvos diferencialmente expressos via RNA-Seq envolvidos na regulação do florescimento *PIL5* (“*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5*”) e *LHP1* (“*LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1*”). Além disso, foram validados via RT-qPCR mais 13 genes alvos relacionados com florescimento identificados por RNA-Seq (Projeto FAPESP 2016/02679-9) bem como a avaliação da expressão relativa ao longo do tempo com um potencial gene florigeno em cana-de-açúcar *ScFT3*, expresso em folha madura.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados aqui obtidos é possível concluir que os genes de referência *UBQ1/TUB* são os mais estáveis para normalizar dados de genes alvos relacionados com indução fotoperiódica em cana-de-açúcar via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) . Uma vez que na etapa de validação ficou evidente sua sensibilidade para captar até mesmo pequenas diferenças na expressão relativa dos genes alvos. Na contramão, *GAPDH/25SrRNA1* são os menos estáveis para as mesmas condições propostas.

Dentre os genes alvos diferencialmente expressos, há de se notar que possa ocorrer uma relação entre os genes diferencialmente expressos de forma significativa com uma especificidade em estágio de desenvolvimento e tempo de fotoperíodo. Os genes alvos desconhecidos se mostram promissores, no entanto são necessários mais estudos para desvendar sua real função na indução ao florescimento em cana-de-açúcar.

A expressão relativa de *ScFT3* ao longo do desenvolvimento deixou claro que, este é um potencial florigeno e possui uma grande importância tanto nas etapas iniciais e indutivas do florescimento quanto em etapas mais avançadas do florescimento. De forma geral os dados aqui gerados são inéditos e compõe um novo capítulo nesta história visando o completo entendimento dos mecanismos relacionados ao processo de indução floral em cana de açúcar.

7. REFERÊNCIAS

- Abe M (2005) FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. **Science** 309:1052–1056.
- Alexander AG (1973) **Sugarcane physiology**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing, 752p.
- Araki, Takashi, Yasushi Kobayashi, Hidetaka Kaya, and Masaki Iwabuchi. (1998) The flowering-time gene FT and regulation of flowering in Arabidopsis. **Journal of plant research** 111.2: 277-281.
- Berding N, Hurney AP (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** 92:261–275.
- Bottcher A, Cesarino I, et al. (2013) Lignification in Sugarcane: Biochemical Characterization, Gene Discovery, and Expression Analysis in Two Genotypes Contrasting for Lignin Content. **PLANT PHYSIOLOGY** 163:1539–1557.
- Büche C, Poppe C, Schäfer E, Kretsch T (2000) eid1 : A New Arabidopsis Mutant Hypersensitive in Phytochrome A–Dependent High-Irradiance Responses. **The Plant Cell** 12:547–558.
- Bustin S (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology** 25:169–193.
- Caputo MM, Silva MA, Beauclair EGF, Gava GJC (2007) Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana-de-açúcar sob reguladores vegetais. **InterCiência** 32:834-840.
- Carla P, Minow MAA, Chalfun-júnior A, Colasanti J (2014) Putative sugarcane FT / TFL1 genes delay flowering time and alter reproductive architecture in Arabidopsis. 5:1–12.
- Coelho CP, Netto APC, Colasanti J (2013) A proposed model for the flowering signaling pathway of sugarcane under photoperiodic control. 12:1347–1359.
- Conab- Companhia Nacional de Abastecimento. Cana-de-Açúcar, Safra 2020/2021. Primeiro levantamento, Maio de 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>
- Corbesier L, Coupland G (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. **Journal of Experimental Botany** 57:3395–3403.

Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, et al. (2007) FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis. **Science** 316:1030–1033.

Clements HF (1975) **Flowering of sugarcane: mechanics and control**. Hawaii: University Hawaii, 60 p. (Technical Bulletin.No. 92.).

de Andrade LM, dos Santos Brito M, Fávero Peixoto Junior R, Marchiori PER, Nóbile PM, Martins APB, Ribeiro RV, Creste S (2017) Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods** 13:28.

Dieterle M (2001) EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. **Genes & Development** 15:939–944.

Duek PD, Fankhauser C (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. **Trends in Plant Science** 10:51–54.

Fedoroff N, Schläppi M, Raina R (1995) Epigenetic regulation of the maize Spm transposon. **BioEssays** 17:291–297.

Feng J, Lu J (2017) LHP1 Could Act as an Activator and a Repressor of Transcription in Plants. **Frontiers in Plant Science** 8: 2041.

Fornara F, Panigrahi KCS, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA, Coupland G (2009) Arabidopsis DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce CONSTANS Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering Response. **Developmental Cell** 17:75–86.

Garner WW, Allard HA (1920) Effect of the Relative Length of Day and Night and Other Factors of the Environment on Growth and Reproduction in Plants 1. **Monthly Weather Review** 48:415–415.

Glassop D, Rae AL, Bonnett GD (2014) Sugarcane Flowering Genes and Pathways in Relation to Vegetative Regression. **Sugar Tech** 16:235–240.

Glassop D, Rae AL (2018) Expression of sugarcane genes associated with perception of photoperiod and floral induction reveals cycling over a 24-hour period. **Functional Plant Biology** 46:314.

Hanano S, Goto K (2011) Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 Is Involved in the Regulation of Flowering Time and Inflorescence Development through Transcriptional Repression. **The Plant Cell** 23:3172–3184.

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** 102:7748–7753.

Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM (2004) Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter** 22:325–337.

- Jackson SD (2009) Plant responses to photoperiod. **New Phytologist** 181:517–531.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications** 345:646–651.
- Karlgrén A, Gyllenstrand N, Källman T, Sundström JF, Moore D, Lascoux M, Lagercrantz U (2011) Evolution of the PEBP Gene Family in Plants: Functional Diversification in Seed Plant Evolution. **Plant Physiology** 156:1967–1977.
- Liu H, Gu F, Dong S, Liu W, Wang H, Chen Z, Wang J (2016) CONSTANS-like 9 (COL9) delays the flowering time in *Oryza sativa* by repressing the Ehd1 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 479:173–178.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods** 25:402–408.
- Makino S, Matsushika A, Kojima M, Oda Y, Mizuno T (2001) Light Response of the Circadian Waves of the APRR1/TOC1 Quintet: When Does the Quintet Start Singing Rhythmically in Arabidopsis? **Plant and Cell Physiology** 42:334–339.
- Medeiros AL, Furtado CM, Leite FS, Souto VS, de Setta N, Van Sluys M-A, Kitajima JP, Costa APP, Benedito VA, Scortecci KC (2016) Molecular Genetic Dissection of Sugarcane Flowering under Equatorial Field Conditions. **Tropical Plant Biology** 9:252–266.
- Melloni MLG, Melloni MNG, Scarpari MS, Garcia JC, Landell MGA, Pinto LR (2015) Flowering of Sugarcane Genotypes under Different Artificial Photoperiod Conditions. **American Journal of Plant Sciences** 06:456–463.
- Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, Blum M, Bork P, Bridge A, Brown SD, Chang H-Y, El-Gebali S, Fraser MI, et al. (2019) InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research** 47:D351–D360.
- Mizuno T, Nakamichi N (2005) Pseudo-Response Regulators (PRRs) or True Oscillator Components (TOCs). **Plant and Cell Physiology** 46:677–685.
- Moraes MAFD de (2007) Introdução - As profundas mudanças institucionais ao longo da história da agroindústria canavieira e os desafios atuais. **Economia Aplicada** 11.
- Nakamura Y, Kato T, Yamashino T, Murakami M, Mizuno T (2007) Characterization of a Set of Phytochrome-Interacting Factor-Like bHLH Proteins in *Oryza sativa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 71:1183–1191.
- OCDE-FAO. (Org.). Chapter 5. Sugar. In: **OECD/FAO (2019): OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028**. Paris: OCDE Publishing, 2019. Cap. 5. p. 139-139. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/19991142>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

Oda A, Fujiwara S, Kamada H, Coupland G, Mizoguchi T (2004) Antisense suppression of the Arabidopsis PIF3 gene does not affect circadian rhythms but causes early flowering and increases FT expression. **FEBS Letters** 557:259–264.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29:45e – 45.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters** 26:509–515.

Premier biosoft (California). Bioinformatics Company. **Netprimer**. 1994. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/index.html>>. Acesso em: 13 set. 2018

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995) The CONSTANS gene of arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. **Cell** 80:847–857.

Rodrigues JD (1995) **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995. 100p. (Apostila).

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research** 37:e45–e45.

Sandercock DA, Coe JE, Di Giminiani P, Edwards SA (2017) Determination of stable reference genes for RT-qPCR expression data in mechanistic pain studies on pig dorsal root ganglia and spinal cord. **Research in Veterinary Science** 114:493–501.

Silver, N., Best, S., Jiang, J. *et al.* (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biol** 7:33

Song YH, Shim JS, Kinmonth-Schultz HA, Imaizumi T (2015) Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. **Annual Review of Plant Biology** 66:441–464.

Tapia-López R, García-Ponce B, Dubrovsky JG, Garay-Arroyo A, Pérez-Ruíz R V., Kim S-H, Acevedo F, Pelaz S, Alvarez-Buylla ER (2008) An AGAMOUS -Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. **Plant Physiology** 146:1182–1192.

Tsuji, H.; Taoka, K.; Shimamoto, K. (2013) Florigen in rice: complex gene network for florigen transcription, florigen activation complex, and multiple functions. **Current Opinion in Plant Biology** 16:228–235.

Vandesompele J, Preter K De, Poppe B, Roy N Van, Paepe A De (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 3:1–19.

Vicentini R, Bottcher A, Brito M dos S, dos Santos AB, Creste S, Landell MG de A, Cesarino I, Mazzafera P (2015) Large-Scale Transcriptome Analysis of Two Sugarcane Genotypes Contrasting for Lignin Content (S Amancio, Ed). **PLOS ONE** 10:e0134909.

Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology** 80:75–84.

Wolabu TW, Tadege M (2016) Photoperiod response and floral transition in sorghum. **Plant Signaling & Behavior** 11:e1261232.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics** 13:134.