

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS À INDUÇÃO DO
FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR EM CÂMARA DE
FOTOPERÍODO**

Maria Letícia Guindalini Melloni
Engenheiro Agrônomo

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS À INDUÇÃO DO
FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR EM CÂMARA DE
FOTOPERÍODO**

**Maria Letícia Guindalini Melloni
Orientadora: Dr. ^a Luciana Rossini Pinto
Co-orientador: Dr. Maximiliano Salles Scarpari**

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

2015

M527i Melloni, Maria Leticia Guindalini
Identificação de genes candidatos a indução do florescimento em cana-de-açúcar em câmara de fotoperíodo / Maria Leticia Guindalini Melloni – – Jaboticabal, 2015
xii, 54 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Banca examinadora: Michael dos Santos Brito, Elisson Antônio da Costa Romanel, Maria Inês Tiraboschi Ferro, Miguel Angelo Mutton
Bibliografia

1. cDNA-AFLP. 2. Fragmentos diferencialmente expressos. 3. Inflorescência. 4. RNA 5. Câmara de fotoperíodo. 6. Indução artificial.
I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA LETÍCIA GUINDALINI MELLONI – nascida em três de janeiro de 1986 em Sertãozinho (SP), Brasil, ingressou em 2005, no curso de Agronomia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal. Durante a graduação estagiou no Laboratório de Pós Colheita de 2005 a 2006 sob orientação do Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz e no período de 2006 a 2009 estagiou no Laboratório de Fisiologia Vegetal sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Durvalina Maria Mathias dos Santos. Executou o estágio curricular obrigatório no Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas sob a supervisão do pesquisador Dr. Maximiliano Salles Scarpari no ano de 2009. Neste mesmo ano recebeu o grau de Eng.^o Agrônomo pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal. Em março de 2010 ingressou nesta mesma Universidade 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. Iniciou o curso de doutorado em março de 2012 pelo mesmo programa e universidade, sendo bolsista CAPES e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Do Estado De São Paulo).

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

*"Dedico aos meus pais e irmãos que são dádivas de Deus e
sempre estão presentes em minha vida".*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, Senhor da vida, por todas as oportunidades a mim oferecidas, por sempre me conceder força e saúde e a **Nossa Senhora** pela intercessão nos momentos de mais necessidade.

À minha **família**, principalmente aos meus pais, **Milton Carlos S. Melloni e Dulcinea Ap. Guindalini Melloni** pela motivação e incentivo durante toda minha formação, pessoal e acadêmica, acreditando na minha capacidade. Agradeço o amor, carinho e atenção despendidos a mim que com certeza formaram a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, anjos na minha vida, **Maria Natália G. Melloni e Felício J. G. Melloni** pelo amor e paciência fazendo dos meus dias mais agradáveis e felizes, aliviando os momentos de estresse e cansaço.

À minha Avó, **Ofélia Melloni**, por todo amor e por sempre estar ao meu lado me apoiando das mais diferentes maneiras

Ao meu namorado, **Fabio Borba Ferrari**, por todo amor, apoio e dedicação, bem como pela paciência nos dias difíceis, o que tornou minha caminhada mais suave e feliz.

Aos meus tios e tias que me incentivaram e ajudaram nos momentos de nervosismo e angústia. Aos meus primos e primas, por acreditarem em mim e me apoiarem desde a nossa infância.

A **Dr.ª Luciana Rossini Pinto**, minha orientadora, pela dedicação, pelos momentos de amizade, carinho, atenção e orientação, além dos memoráveis ensinamentos relacionados à vida profissional e pessoal.

Ao **Dr. Maximiliano Salles Scarpari** pela oportunidade, amizade e excelente co-orientação, bem como pelos conhecimentos passados a mim neste período que serão de grande valia na minha vida profissional.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas, em especial ao Centro de Cana e a toda equipe do Programa Cana, principalmente ao Dr. Marcos Guimarães de Andrade Landell, pela cooperação, pela confiança, pelo apoio intelectual, estrutural, operacional e financeiro.

Ao pesquisador **Jeremias de Mendonça**, pessoa especial que com sua amizade e amplo conhecimento me mostrou a importância do estudo e a beleza da vida.

Ao pesquisador **Dr. Júlio Garcia** pela amizade construída nestes anos e pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos.

Aos pesquisadores, **Dr. Michael dos Santos Brito** e **Dra. Paula Macedo Nobille**, por toda a dedicação, paciência e contribuição no meu trabalho. Sem esta valiosa ajuda, este trabalho não seria possível.

Ao pesquisador **Dr. Renato Vicentini**, pela imensa colaboração nas análises desenvolvidas neste trabalho.

Aos funcionários da fazenda experimental do Centro de Cana do IAC, **Hector, Célia, Rô, Ozéias, Roberto e Rômulo**, pela atenção que disponibilizaram ao longo de nossa convivência e por dividirem comigo as experiências de campo que tornaram mais tranquilo o desenvolvimento dos trabalhos.

A todos os meus companheiros do laboratório de Biologia Molecular, em especial aos amigos **Cibele, Carol, Larissa, Camila, Débora, Rafael, Izadora, Natália, Silvan, Alisson, João e Alexandre, Renata, Fernanda, Marcel** que tornaram o período do doutorado maravilhoso e inesquecível, mostrando um novo sentido à palavra amizade. Com certeza aprendi muito com todos vocês!

Aos técnicos dedicados, **Maicon, Juliana e Thaís**, por toda a imensa ajuda, pela dedicação ao bom funcionamento do laboratório, mas principalmente pela amizade construída durante todos estes anos.

Aos demais pesquisadores do Centro de Cana pelos bons momentos de convívio e pelos valiosos ensinamentos.

À todos os **professores** da FCAV – Unesp – Jaboticabal, especialmente aos membros das bancas de qualificação e de doutoramento.

À todos os **funcionários** da FCAV – Unesp – Jaboticabal, principalmente aqueles que marcaram toda a minha vida acadêmica.

Ao curso de Pós-graduação em **Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)** e **Universidade Estadual Paulista (UNESP)** pelo embasamento teórico e científico fornecido a mim durante a minha formação acadêmica.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** (Processo 2013/24020-0) por todo o investimento fornecido e por acreditarem em meu trabalho.

Aos membros da banca pela excelente contribuição para a versão final desta dissertação.

Aos alunos e amigos do curso de pós-graduação em Agronomia - Genética e Melhoramento de plantas.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Cana-de-açúcar:.....	4
2.2 Floração	5
2.3 Indução artificial da floração de cana-de-açúcar	16
2.4 Técnica do cDNA-AFLP na busca de genes candidatos.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Material	21
4.2 Delineamento experimental.....	21
4.3 Plantio dos cultivares	22
4.4 Tratamentos Fotoperiódicos.....	23
4.5 Coleta do material vegetal para extração de RNA.	24
4.6 Extração do RNA total.....	25
4.7 Síntese dos cDNAs Dupla-Fita.....	25
4.8 Obtenção dos marcadores cDNA-AFLP.....	26
4.9 Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDEs ((fragmentos diferencialmente expressos)	27
4.10 Purificação e Clonagem dos FDEs.....	29
4.11 Sequenciamento e análise dos FDEs.	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Ensaio Biológico: Indução ao florescimento dos cultivares estudados..	31

5.2 Técnica de cDNA-AFLP	36
5.3 Análise das sequências	37
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS.....	46

IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS À INDUÇÃO DO FLORESCIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR EM CÂMARA DE FOTOPERÍODO

RESUMO- Com o intuito de aumentar o conhecimento da rede gênica envolvida no controle do florescimento em cana-de-açúcar, diferentes cultivares de cana-de-açúcar foram submetidos a tratamentos fotoperiódicos de indução e não indução do florescimento em câmara de fotoperíodo. Aos 5, 10 e 20 dias de indução, a folha +1 e a bainha foliar foram coletadas para a identificação de fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) por meio da técnica de cDNA-AFLP entre e dentro dos tratamentos fotoperiódicos. Um total de 162 fragmentos foram selecionados e reamplificados. Destes, 63 FDEs tiveram sucesso na reação de reamplificação e foram clonados e sequenciados. As sequências foram confrontadas com seis bancos de sequências: 1. Transcritos do projeto SUCEST ;2. Proteínas do genoma de sorgo; 3. BAC de cana-de-açúcar; 4. Proteínas do genoma de arroz, 5. Proteínas presentes no Phytozome e 6. NCBI. A busca por similaridade se deu pelo uso da ferramenta BLASTn (e-value 1e-5) nos casos do banco SUCEST e dos BACs de cana-de-açúcar e BLASTx (e-value 1e-5) para os demais bancos. Dentre os 63 FDEs, 23 corresponderam a sequências de genes enquanto os outros 40 representam sequências que não estão depositadas nestes bancos (no hits). A maioria das 23 sequências apresenta similaridade com genes que codificam proteínas hipotéticas ou preditas em diversos organismos. Com base na análise do domínio da proteína realizada pelo Pfam, seis sequências podem estar associadas ao metabolismo da indução do florescimento. Dentre estas as sequências LM-19, LM-40 e LM-53 se destacaram. A LM-19 possui similaridade com o gene que codifica uma proteína com o domínio DNAJ sendo que proteína com este domínio é considerada mediador da integração dos sinais do florescimento em *Arabidopsis thaliana*. LM-40 possui similaridade com o gene que codifica proteína de domínio (F-BOX); estudos indicam forte relação deste domínio aos processos de indução ao florescimento. LM-53 tem um domínio de proteína predita semelhante ao domínio da proteína codificada pelo gene CONSTANS que regula a expressão de FLOWERING LOCUS T (FT), que codifica o florígeno em *Arabidopsis thaliana* e em algumas outras espécies. De maneira geral, a técnica do cDNA-AFLP foi eficiente, na identificação de FDEs ao longo dos tratamentos fotoperiódicos de indução e não indução do florescimento. Os resultados obtidos sugerem que as sequências LM-19, LM-40 e LM-53 estão vinculadas aos metabolismos de indução do florescimento. É provável que a maioria dos FDEs obtidos possam estar envolvidos nos metabolismos da indução do florescimento, porém ainda não foram identificados na literatura.

Palavras-chave: cDNA-AFLP, fragmentos diferencialmente expressos, inflorescência, RNA, Câmara de fotoperíodo, Indução artificial.

IDENTIFICATION OF CANDIDATES GENES FOR FLOWERING INDUCTION IN SUGARCANE IN PHOTOPERIOD CHAMBER

ABSTRACT- In order to increase the knowledge of the gene network involved in sugarcane flowering induction, sugarcane cultivars were submitted to different photoperiod treatments of flowering induction and non-induction in a photoperiod facility. At 5, 10 and 20 days of induction, the +1 leaf and the leaf sheath were collected for the identification of different transcript-derived fragments (TDFs) within and between the photoperiod treatments to apply the cDNA-AFLP technique. A total of 162 TDFs were selected and re-amplified. Of these, 63 TDFs were successful in re-amplification and were cloned and sequenced. The sequences were confronted against 6 sequence databanks (SUCEST transcripts; Sorghum genome proteins; Sugarcane BACs; proteins from rice genome; Phytozome and NCBI). Similarity search was done by using the BLASTn (e-value $1e-5$) tool for the SUCEST databank and sugarcane BACs while BLASTx (e-value $1e-5$) was use for the other banks. Among the 63 TDFs, 23 corresponded to gene sequences while the remaining 40 represent sequences that are not deposited in these banks (no hits). The majority of the 23 sequences showed similarity with genes coding for hypothetical or predicted proteins of different organisms. Based on the protein domain analysis conducted by Pfam, six sequences may be associated with flowering induction metabolism. Among these: LM-19, LM-40 and LM-53 sequences stood out. LM-19 has similarity to the gene encoding a protein with DnaJ domain. Proteins having this domain are considered as an integrating floral signals mediator in *Arabidopsis thaliana*. LM-40 has similarity to the gene encoding a protein with (F-BOX) domain. This domain has a strong relationship in flowering induction processes. LM-53 has one of the predicted protein domain similar to the domain of the protein encoded by the CONSTANS gene which governs the expression of FLOWERING LOCUS T (FT), this later one encodes the florigen. Generally the cDNA-AFLP technique was effective in identifying TDFs across the flowering inductive and non-inductive photoperiodic treatments. The results suggest that LM-19, LM-40 and LM-53 sequences are linked to flowering induction metabolisms. Probably, most of the TDF here obtained may be involved in the flowering induction metabolism, although not yet been identified in the literature.

Keywords: cDNA-AFLP, differentially expressed fragments, inflorescence, RNA, Photoperiod Chamber, Artificial induction.

1. INTRODUÇÃO

O controle do florescimento é de fundamental importância, tanto para os programas de melhoramento, em que novas cultivares são desenvolvidas a partir de cruzamentos dirigidos, como também na produção e produtividade da maioria das culturas agrícolas, em que as sementes ou frutos são os alvos da comercialização.

Dada a importância do florescimento, estudos relacionados a fisiologia e também aos genes que regulam o florescimento estão em evidência em diversas culturas na atualidade. Os trabalhos com genes envolvidos na regulação do florescimento foram elucidados a partir de estudos realizados em *Arabidopsis thaliana*, uma dicotiledônea de dia longo (KOORNNEEF et al., 1998; COUPLAND, 1995; PUTTERILL et al., 1995). Nesta espécie, o sinal de indução é percebido pela folha, que possui pigmentos como os fitocromos, criptocromos e proteínas receptoras da luz azul codificadas por genes tais como *F-box ZEITLUPE (ZTL)* e o *FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1)*, além do *CONSTANS (CO)*, onde, o gene e a proteína são dirigidas pelo relógio circadiano (JACKSON, 2009).

A abundância de transcritos do gene *CO* se acumula no final do dia de acordo com o fotoperíodo percebido pela planta (PUTTERILL et al., 2004; FU et al., 2014) atingindo altos níveis no final do período de luz, em regime de dia longo. O gene *CO* possui um papel muito importante na indução do florescimento. Ele induz a transcrição do gene *FLOWERING TIME LOCUS (FT)* cuja proteína desloca-se da folha para o meristema apical, onde ocorre a mudança do estágio vegetativo para o reprodutivo. Mathieu et al. (2007) demonstraram que a exportação de proteína *FT* a partir de células do floema é suficiente para induzir a floração. Tanto a proteína *FT* como a *TSF* (proveniente do gene *TWIN SISTER OF FT*, parálogo de *FT*) interagem com a proteína *FD (FLOWERING LOCUS D)* que constitui o fator de transcrição que pertence à família bZIP o qual é fortemente e amplamente expresso no meristema apical antes da transição floral (TORTI et al., 2012). O complexo *FT-FD* ativa os chamados “flower type genes” tais como o gene *APETALA 1 (AP1)* promovendo o florescimento em *A. thaliana*. (XU et al., 2012). *Arabidopsis thaliana* possui as vias metabólicas que regem

o florescimento em conhecimento avançado e muito do repertório gênico já é conhecido.

Em cana-de-açúcar, cultura de alta complexidade genética, pouco se sabe a respeito dos genes envolvidos nas vias de indução do florescimento, sendo que muitas lacunas ainda não foram preenchidas (GLASSOP et al., 2014; COELHO et al., 2014; COELHO et al., 2013).

Enquanto *Arabidopsis thaliana*, planta dicotiledônea, floresce em resposta a dias longos, acima do crítico (8 hs), a cana-de-açúcar é uma planta que floresce em resposta a dias curtos, abaixo do crítico, 12 hs e 55 min (MOORE; NUSS, 1987; BERDING, 2007). Assim como a cana, o arroz também responde a dias curtos e tem sido utilizado como modelo de estudos em monocotiledôneas (TSUJI et al., 2013). Em arroz, as proteínas Hd3a e OsFD1, com homologia, respectivamente, as proteínas dos genes *FT* e *FD* de *A. thaliana* interagem via a proteína 14-3-3 nas células do meristema apical (XU et al., 2012). A formação deste complexo triplo de proteínas é essencial para promover o florescimento pela proteína Hd3a (TAOKA et al., 2013). Apesar de algumas similaridades com *A. thaliana*, principalmente quanto a rede gênica da rota fotoperiódica, que é bastante conservada, (MATSUBARA et al., 2014), o arroz difere em alguns mecanismos que promovem a indução ao florescimento. O controle da expressão do gene que codifica a proteína Hd3a é feito pela proteína Hd1 (ortólogo ao gene *CO* em *Arabidopsis thaliana*), que ao contrário da proteína *CO*, não é degradada sob as condições de dias curtos. Entretanto, a atividade regulatória do Hd1 na transcrição da Hd3a passa a ser repressora em condições de dias longos (TSUJI et al., 2013).

Em relação a cana-de-açúcar, um recente trabalho identificou genes putativos envolvidos na via de indução de sinal do florescimento (*GI*, *CO*, *EHD1*, *GHD7* e *FT*) no banco do SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tag Project) (COELHO et al., 2013) via análise *in silico*. Nesta busca, candidatos para os genes *Ehd1* e *Ghd7*, os quais são específicos de monocotiledôneas foram identificados no banco, além de sequências candidatas para os genes *FT* contendo o domínio PEBP e apresentando alta similaridade com a superfamília ZCN de milho (*Zea mays CENTRORADIALIS*) que codifica proteínas homólogas ao gene *FT* (COLASANTI; CONEVA, 2009).

Apesar do banco do SUCEST englobar sequências expressas derivadas de bibliotecas provenientes de flores, ou seja, cDNAs representando genes expressos nas flores em diferentes estádios de desenvolvimento, como também na haste floral (FIGUEIREDO et al. 2001), não foram contempladas neste banco bibliotecas de cDNAs especificamente obtidas durante a indução do florescimento sob condições controladas de fotoperíodo, no tecido foliar, alvo inicial do sinal de indução. Em cana-de-açúcar, trabalhos que envolvam a busca dos genes durante a indução do florescimento sob condições controladas de fotoperíodo são poucos, até o presente momento, e uma abordagem inicial seria de grande valia para indicar genes candidatos nesta via metabólica tão importante. Uma das técnicas mais utilizadas na busca de genes candidatos é a técnica do cDNA-AFLP. Esta técnica vem sendo utilizada para investigar diversos aspectos fisiológicos no florescimento em outras plantas (XIAO et al., 2012; ČECHOVÁ et al., 2012; XING; LIU, 2012; HAJIZADEH et al., 2011; YU et al., 2011).

Nesse sentido, a técnica de cDNA-AFLP foi utilizada como uma abordagem inicial para identificar, pela primeira vez em cana-de-açúcar, fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) no tecido foliar e bainha, durante o processo de indução sob condições controladas de fotoperíodo. Prováveis relações dos FDEs aqui identificados, com os genes e proteínas envolvidas no processo de indução ao florescimento, em outras espécies, são apresentadas e discutidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar:

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical que tem sido cultivada desde 2000 a.C. e tem sua origem no Sudeste Asiático (FERRARI, 2010). Atualmente, esta espécie é um dos vegetais mais cultivados no Mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo o Brasil o maior produtor mundial, seguido por Índia, Tailândia e Austrália.

Esta cultura chama atenção pela sustentabilidade, flexibilidade e multiplicidade de seus derivados. Apesar dos muitos produtos que esta planta da origem, os de maior impacto econômico no país ainda são o açúcar e o álcool. O Brasil lidera a produção de cana-de-açúcar e é responsável por mais da metade do açúcar produzido no mundo, além disso, em 2019, a produção do Brasil chegará 58,8 milhões de litros de álcool (MAPA, 2015), o que será considerado um recorde mundial.

A produção da cana-de-açúcar para esta safra, 2014/2015, totalizará 655,2 milhões de toneladas, o que representará um incremento de 3,21% da safra anterior (CONAB, 2015). Este incremento não foi maior pela redução de 0,6% da área plantada no estado de São Paulo, bem como a queda de produtividade nos canaviais neste estado (CONAB, 2015). Segundo a CONAB, São Paulo possui 51,8 % da área de plantio de cana-de-açúcar do país e a queda na produtividade agrícola deste estado possui grande influência no balanço econômico desta cultura. A falta de investimento no setor e a atual crise hídrica que se faz presente, foram as principais responsáveis pela queda na produtividade (UNICA, 2015).

Neste contexto, o incremento na área cultivada bem como a garantia do setor privado em investir em novas indústrias está na estabilidade e adaptação da cultura no Brasil, bem como no suporte fornecido pela pesquisa na área de produção e melhoramento genético da cultura. Porém, apesar dos grandes avanços nas pesquisas estes não são proporcionais à importância desta cultura, haja vista a queda da produtividade e encerramento antecipado das safras nos anos anteriores.

Desta forma, estudos que proporcionem o maior conhecimento dos metabolismos envolvidos na cana-de-açúcar podem contribuir para o surgimento de novos materiais mais produtivos e adaptados o que pode acarretar em maior produtividade.

2.2 Floração

A inflorescência da cana-de-açúcar, conhecida como bandeira ou flecha, é uma panícula aberta com flores hermafroditas. Os pistilos têm a terminação com estigmas roxos ou avermelhados, de aspecto plumoso da panícula, e o androceu é constituído por três estames sustentando uma antera cada (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008) (Figura 1).



Figura 1. Estruturas da inflorescência e flores da cana-de-açúcar. **A.** Inflorescências da Cana-de-açúcar; **B.** Flores de cana-de-açúcar fechadas; **C.** Flor de cana-de-açúcar em abertura; **D.** Flor de cana-de-açúcar aberta; **E.** Órgãos florais da flor da cana-de-açúcar (Androceu e Gineceu); **F.** Antera da flor da cana-de-açúcar; **G.** Ovário, estiletes e estigmas.

O processo de formação da inflorescência é de difícil definição, pois depende do genótipo, do clima, da região e das mudanças que ocorrem nos anos agrícolas. O estímulo para a floração pode ocorrer durante 18 a 25 dias (CLEMENTES; AWADA, 1965) e para o hemisfério sul, os meses em que ocorre a diferenciação do meristema para a formação da inflorescência são os de fevereiro, março e abril, sendo que a emissão ocorre nos meses de abril, maio e junho (HUMBERT, 1974; SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

A floração pode ser dividida em algumas fases. O início se dá com a transformação do meristema apical em gema floral e com a transformação da gema floral em inflorescência. Após o desenvolvimento da inflorescência e da folha bandeira finalmente ocorre a emissão da inflorescência.

A fase inicial é curta, e logo após a percepção da indução ocorre o desenvolvimento do eixo principal das ramificações e ramos secundários. Também nesta fase surge o tecido meristemático que dá origem a bainha da folha bandeira, que tem por função, proteger a inflorescência. Após isso, ocorre o alongamento da bainha da folha bandeira e o desenvolvimento da inflorescência, cujo eixo principal pode chegar a mais de 60cm (CLEMENTS, 1975). Neste período, ocorre o completo desenvolvimento das espiguetas e finalmente ocorre a emissão da inflorescência que é seguida pela abertura das flores e da polinização. Para a completa emissão são necessárias de 4 a 5 semanas (CLEMENTS; AWADA, 1965), enquanto a abertura das flores, polinização, formação de frutos e maturação, não mais que 2 a 3 semanas.

As inflorescências das diferentes genótipos variam em cor e tamanho. Em relação a cor, a variação geralmente ocorre entre branco, cinza, vermelho, roxo, rosado até tons de verde. O tamanho da inflorescência emitida varia muito entre os genótipos, porém, não é somente a genética que rege esta característica, mas também a temperatura no período de indução e formação da inflorescência (ARALDI et al., 2010).

A floração em cana-de-açúcar é sazonal, e muitos são os fatores que regem sua ocorrência, dentro destes estão os ambientais, tais como: fotoperíodo, temperatura e a umidade de solo. O controle ambiental relacionado à indução artificial da floração, em qualquer planta passível de indução, assim como na cana-de-açúcar, deve ser muito bem estabelecido. Desta forma, o conhecimento das exigências da

cultura que será manipulada é essencial. Os estudos dos fatores que influenciam a floração da cana-de-açúcar são antigos e poucos, porém são bem consolidados.

A floração envolve modificações específicas no metabolismo do vegetal. Em plantas que são induzidas à floração, estímulos ambientais são percebidos e desencadeiam sinais que tornam uma planta de estágio vegetativo para o reprodutivo. Um dos fatores que se destaca é o fotoperíodo. De fato, a soma do número de horas de luz e escuro no dia destaca-se por ser um dos principais fatores determinantes do metabolismo da floração nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2013; ALEXANDER, 1973). A muito sabe-se da influência deste no estímulo ao florescimento.

Em relação ao fotoperíodo, para que as plantas percebam as menores mudanças de luz, estas possuem diferentes pigmentos. Estes pigmentos não somente percebem a presença da luminosidade, mas também a diferença na sua intensidade como ocorre no amanhecer e no entardecer (TAIZ; ZEIGER, 2013). Ainda, além destes sinais, estes pigmentos são sensíveis a pequenas mudanças no comprimento do dia, desta forma são responsáveis por reger o relógio circadiano endógeno nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013; IMAIZUMI et al., 2004).

Muitos estudos apontam o fitocromo como o pigmento relacionado à floração. Este pigmento é azul, com massa molecular 150 KDa, consistindo em um polipeptídeo (apoproteína) carregando um cromóforo (fitocromobilina) o qual é um tetrapirrol linear (TAIZ; ZEIGER, 2013). O cromóforo é a porção não protéica do fitocromo, responsável pela absorção da luz (TAIZ; ZEIGER, 2013). De maneira geral, na maioria das plantas, com algumas variações, cinco genes de fitocromo são encontrados: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*. Estes codificam as apoproteínas: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*, as quais, após se ligarem ao cromóforo, formam os fitocromos *phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD* e *phyE*, respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em relação a absorção da luz, o fitocromo responde principalmente ao espectro da luz vermelha (V), ficando em estado ativo, e ao da luz vermelho-extremo (VE), em que ocorre a inativação do pigmento. A ausência de luz também torna o pigmento inativo. É importante ressaltar que os efeitos de ambos os espectros são reversíveis, ou seja, uma vez ativado o pigmento pelo espectro vermelho, este pode ser inativado pelo espectro vermelho-extremo e assim sucessivamente. Este balanço entre fitocromos na forma ativa e inativa é que vai desencadear os metabolismos envolvidos

na floração. O número de fitocromos ativados e o tempo que ficam inativados são diferentes para plantas de dia curto e dia longo.

Existe divergências entre pesquisadores quanto à classificação da cana-de-açúcar em relação a indução fotoperiódica, mais precisamente ao fotoperíodo crítico. Para alguns autores como Moore (1987) as mudanças do meristema apical para transformar-se em inflorescência, ocorrem durante o período de dias curtos, porém para outros como Clements (1968) e Clements e Awada (1965) há uma tendência em se classificar a cana-de-açúcar como sendo intermediária em relação ao fotoperíodo. Desta forma, existe a possibilidade desta planta não possuir um fotoperíodo crítico estabelecido e sim uma faixa em que esta é induzida ao florescimento. Porém, estudos em câmaras que controlam todos os fatores ambientais para estímulo da floração na cultura demonstram que a redução gradativa do período de luz diária a partir de 12 h e 55 min estimula o florescimento de muitos genótipos (MELLONI et al., 2015).

Pode-se dizer que as melhores condições para a floração acontecem nas regiões equatoriais do globo terrestre, onde tem-se fotoperíodos próximos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com pequenas variações de temperatura. Segundo Berding (1981), o fotoperíodo ideal para a floração de cana-de-açúcar parece ser abaixo de 12 horas a 12 horas e 55 min, e a maioria dos genótipos são induzidos neste intervalo nas diferentes regiões do mundo.

De fato, o fotoperíodo possui grande influência na indução da floração, porém a oscilação da temperatura pode afetar o desenvolvimento da inflorescência. Estudos revelam que nos locais de ocorrência abundante da floração a temperatura mínima raramente fica abaixo de 18°C e as máximas nunca ultrapassam os 32-35°C (ARALDI et al., 2010; BERDING, 1981) e que temperaturas abaixo de 21°C podem atrasar o crescimento e a emergência da panícula (CLEMENTS; AWADA, 1965). Ainda, a temperatura também afeta a morfologia das panículas, como o tamanho. No geral, segundo Araldi et al. (2010), temperaturas amenas em Poaceae, aumentam o tamanho das inflorescências. A experiência revela que em anos que ocorre baixa amplitude de temperatura no período de indução floral os genótipos florescem em abundância, ainda, aqueles que não florescem facilmente, respondem aos estímulos da indução.

Pesquisas relatam que em locais onde temperaturas e fotoperíodos indutivos ocorriam naturalmente geralmente não há inibição da floração da cana-de-açúcar. Quando este fenômeno não ocorria, notava-se mudanças nas precipitações anuais (MOORE, 1987).

Desta forma, a adequada umidade de solo é crítica não somente para a indução da panícula, mas também no tempo que se leva para que a mesma se desenvolva completamente, pois garante a antese e, conseqüentemente, a produção das sementes (MOORE; NUSS, 1987). Isso se deve principalmente pelo fato da água ser o agente transportador dos fotoassimilados para a panícula. A abertura da flor e a exposição das anteras também são afetadas pela umidade relativa do ar e esses fenômenos ocorrem durante várias horas antes do amanhecer, quando a planta está totalmente hidratada e a umidade relativa é elevada (MOORE; NUSS, 1987) tornando a viabilidade do pólen em grande parte dos genótipos.

Muitos autores, quando citam fatores ambientais que afetam a floração em cana-de-açúcar, relatam que a latitude como um desses fatores. Menores latitudes proporcionam maiores incidência de floração (ARALDI et al., 2010). O fotoperíodo e a temperatura estão muito relacionados a latitude, por isso que estações de hibridação no Brasil estão localizadas em regiões de menores latitudes, mais especificamente no Nordeste. Esta região tem como características o fotoperíodo e a temperatura que estimulam a floração em certo período do ano (meses de fevereiro/março/abril), o que resulta em abundância de inflorescência, possibilitando assim as hibridações. Além da latitude, a altitude influencia muito a temperatura. Altas altitudes apresentam baixas temperaturas. Desta forma, diversos autores apontam a altitude como fator influente na floração da cana-de-açúcar.

Sabe-se que os nutrientes no solo também podem influenciar a indução da floração em cana. Estudos com diferentes doses de nitrogênio mostraram que altas doses na época onde ocorre indução pode atrasar ou inibir a floração (BERDING et al., 2004; NUSS; BERDING, 1999). São poucos e antigos os trabalhos que estudaram os efeitos dos nutrientes na indução da floração. No entanto, já é consolidado que uma planta com crescimento vigoroso e bem nutrida tem maior possibilidade de florescer. Ainda, pode ser facilmente observado em alguns genótipos que receberam o estímulo para a floração, por apresentarem sinais claros de diferenciação, como a

folha bandeira, a não emissão da inflorescência. Nestes casos, quando o meristema apical é exposto, este apresenta-se necrosado. Isso pode ocorrer por razões nutricionais. As exigências nutricionais para a floração podem variar de genótipo para genótipo, já que o fato da necrose do meristema apical pode ocorrer em um genótipo em condições de adubação semelhante a um que floresceu normalmente.

Como apresentado anteriormente, os fatores ambientais são de grande influência na floração da cana-de-açúcar. Porém, estes de nada valem se a planta não tiver condições endógenas para perceber estes estímulos de modo a passar do estágio vegetativo para o reprodutivo.

Dentre os fatores endógenos, a maturidade fisiológica destaca-se como um fator limitante à indução floral. Quando a planta atinge a este estágio, independentemente da idade cronológica, esta é capaz de responder aos sinais indutivos a formação da inflorescência. Antes da planta atingir a maturidade fisiológica existe o estágio chamado “juvenil”. Neste estágio a planta não responde os estímulos externos de indução, embora cana-de-açúcar com idade de três a seis meses podem responder à estes estímulos (VIVEROS et al., 1991). Uma vez atingida a maturidade, a combinação dos sinais do ambiente e também dos níveis de hormônios endógenos são percebidos pela planta, a qual entra na fase de floração.

Estes estímulos são percebidos primeiramente na folha, pelos pigmentos já citados anteriormente. De acordo com Jackson (2009) a habilidade de responder ao fotoperíodo requer um mecanismo de detectar o comprimento do dia, o qual envolve a interação de sinais de luz que são percebidos pelos fotorreceptores, tais como os fitocromos, criptocromos e receptor de luz azul.

A iniciação floral nas plantas que são induzidas ao florescimento, é controlada por uma sofisticada rede gênica que é monitorada por estímulos externos, como mudanças fotoperiódicas, temperatura e umidade de solo, além dos fatores endógenos da planta, destacando-se os fitoreguladores como as giberelinas e a idade da planta (MATÍAS-HERNÁNDEZ et al., 2014).

Em *Arabidopsis thaliana*, uma planta dicotiledônea, que responde ao fotoperíodo longo, com fotoperíodo crítico de 8 h, o metabolismo do florescimento, bem como a rede de genes neste envolvido, tanto na rota facultativa como a regida pelo fotoperíodo já foram bastante explorados.

Nesta planta, como nas que são induzidas a florescer por fotoperíodo, a iniciação ocorre na folha quando sinais desencadeados por meio deste ativam uma rede de genes (FORNARA et al., 2010). O gene *GIGANTEA* (*GI*), primeiro a ser expresso, está envolvido na transcrição do gene *CONSTANS* (*CO*), que por sua vez codifica uma proteína (fator de transcrição) que promove a ativação dos genes *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) e do *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*), gene este parálogo do *FT* (FORNARA et al., 2010).

A proteína *CO* é considerada o regulador principal do florescimento fotoperiódico, sendo a sua quantidade fator limitante na indução do florescimento. O gene *CONSTAS* (*CO*) codifica uma proteína similar aos fatores de transcrição do tipo Zinc Finger (PUTTERILL et al., 1995).

Redução dos níveis desta proteína à metade tem mostrado atraso do florescimento em *A. thaliana* (JACKSON, 2009). O gene *CO* integra o ritmo circadiano e a entrada de sinal de luz para induzir a transcrição do gene *FT* (JACKSON, 2009). A abundância de transcritos do gene *CO* se acumula no final do dia de acordo com o fotoperíodo percebido pela planta (FU et al., 2014; PUTTERILL et al., 2004) atingindo altos níveis no final do período de luz em regime de dia longo. A exposição da planta a luz é requerida para ativar a função da proteína *CO* (MATHIEU et al., 2007), a qual é estabilizada pela luz e degradada quando a expressão do gene coincide com o período de escuro, como no caso de dias curtos (MATÍAS-HERNÁNDEZ et al., 2014).

Sabe-se que diferenças duração do dia, que implica na abundância transcrição *CO* sob condições de luz estão fortemente correlacionados com a formação à montante do complexo FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) – *GIGANTEA* (*GI*). Este complexo formado é dependente da luz azul e medeia a degradação dos repressores transcricionais do gene *CO*. Estes fatores são conhecidos como CYCLING DOF FACTORS (CDFs) (FORNARA et al. 2009).

Dos membros da família do CDFs (CDF1, CDF2, CDF3, CDF4 e CDF5) o CDF1 tem sua função de repressor de floração melhor caracterizada. Isto ocorre por meio da repressão direta da transcrição de *CO* (SUAREZ-LOPES et al., 2001). Esta repressão que ocorre pela manhã é uma característica importante que permite que plantas de *A. thaliana* diferencie dias longos e dias curtos (SONG et al., 2014).

As expressão do *CDF1* é regulada por componentes do relógio circadiano. (GENDRON et al., 2012). Dois fatores de transcrição codificados pelos genes *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* e *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, induzem a expressão de *CDF1* pela manhã (SCHAFFER et al., 1998). À tarde, a transcrição do *CDF1* é reprimida pelos fatores de transcrição oriundos do gene *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)* (GENDRON et al., 2012).

Em *A. thaliana*, após a ativação do gene *FT* pelo *CO*, a proteína FT move da folha para o meristema apical iniciando o processo de florescimento. Mathieu et al. (2007) demonstraram que a exportação de proteína FT a partir de células do floema é suficiente para induzir a floração. Tanto a proteína FT como a TSF interagem com a proteína FD (*Flowering locus D*) que constitui o fator de transcrição bZIP, o qual é fortemente e amplamente expresso no meristema apical antes da transição floral (TORTI et al., 2012). O complexo FT-FD ativa os chamados “flower type genes” tais como o gene *APETALA 1 (AP1)* promovendo o florescimento em *A. thaliana* (XU et al., 2012). Outros genes, tais como o *SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1)* e o *FUL (FRUITFULL)* são ativados em resposta à presença da proteína FT no meristema. O *SOC1* é ativado mais cedo no meristema e codifica o fator de transcrição MADS box que exerce papel importante como promotor floral no meristema (TORTI et al., 2012).

Estudos em *Arabidopsis thaliana* e em outras espécies demonstram grande envolvimento do gene *FT* na indução do florescimento, e sua ativação está envolvida com estímulos ambientais como fotoperíodo, temperatura e vernalização (CORBESIER; COUPLAND, 2005). Além disso, a proteína FT que apresenta aproximadamente 20 kDa (XU et al., 2012) tem sido apontada como o componente principal do chamado “florigeno” (COELHO et al., 2014). O *FT* codifica uma proteína de ligação fosfatidiletanolamina (phosphatidylethanolamine-binding protein) membro da família PEBP, similar à de mamíferos (TAOKA et al., 2013).

Homólogos do gene *FT* identificados em diferentes espécies tem demonstrado o envolvimento deste gene no processo de indução do florescimento (KOJIMA et al., 2002; BÖHLENIUS et al., 2006, FAURE et al., 2007; LIFSCHITZ et al., 2006; FU et al., 2014)

Colasanti e Coneva (2009) ressaltam que, apesar de partes das vias e genes envolvidos no florescimento de *Arabidopsis thaliana* também terem sido encontrados nas gramíneas, estas também desenvolveram mecanismos únicos de regulação do florescimento.

Em arroz, as proteínas Hd3a e OsFD1, com ortologia, respectivamente, as proteínas dos genes *FT* e *FD* de *A. thaliana*, interagem via a proteína 14-3-3 nas células do meristema apical (XU et al., 2012). A formação deste complexo triplo de proteínas é essencial para promover o florescimento em arroz pela proteína Hd3a (TAOKA et al., 2013). O arroz, considerado facultativo à indução ao florescimento sob fotoperíodo curto (TSUJI et al., 2013) possui algumas diferenças no funcionamento da rede de genes que promovem a indução ao florescimento em Relação a *Arabidopsis thaliana*. Essa diferença ocorre principalmente nas rotas facultativas a indução do florescimento, já que sabe-se que as rotas controladas pelo fotoperíodo (Luz) são bastante conservadas (MATSUBARA et al., 2014). O controle da expressão do gene que codifica a proteína Hd3a é feito pela proteína Hd1 (cujo gene é ortólogo ao gene *CO* em *A. thaliana*), que ao contrário da proteína *CO*, não é degradada sob as condições de dias curtos. Entretanto, a atividade regulatória do *Hd1* na transcrição da *Hd3a* passa a ser repressora em condições de dias longos (TSUJI et al., 2013).

Ainda, em arroz, outro gene do florígeno foi caracterizado por Komiya et al. (2008). O gene *RFT1* tem maior expressão em condições de dia longo, o que indica que *RFT1* codifica um florígeno específico para essa condição. Atualmente, sabe-se que alguns genes envolvidos no florescimento de arroz não possuem ortologia definida com os genes de *A. thaliana* para este metabolismo. *Ehd1* é um promotor floral que codifica um regulador de resposta do tipo B-Type (MATSUBARA, et al., 2014). Este regula *Hd3a* e *RFT1* em arroz. Ainda, o gene *Ghd7*, que codifica uma proteína de domínio CCT (*CO*, *CO-LIKE*, *CAB1*), afeta os níveis de transcrição dos genes *Ehd1* e *Hd3a*, mas não afeta os níveis de mRNA HD1 (XUE et al., 2008). *Ghd7* reprime *Ehd1*, *Hd3a*, e *RFT1* em condições de dia longo, atrasando assim a floração (MATSUBARA et al., 2014). Assim, duas vias independentes de floração estão presentes em arroz, a via *HD1-Hd3a* (conservada) e a via *Ghd7-Ehd1-Hd3a/RFT1*. O papel dos genes estudados até a atualidade e que estão envolvidos no metabolismo do florescimento em arroz (*Oryza sativa*) sob condições de dias curtos e longos e em

Arabidopsis thaliana sob dias longos está esquematizada na Figura 2. Esta figura foi adaptada do trabalho de Matsubara et al. (2014) (FIGURA 2).

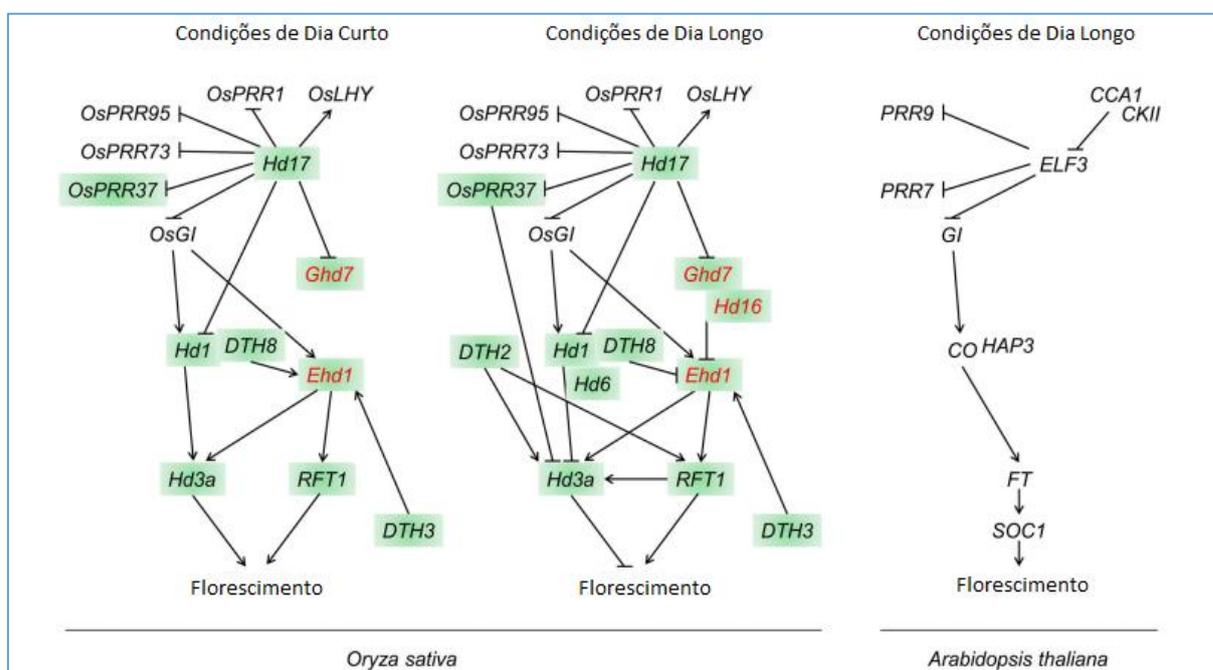


Figura 2. Representação esquemática de papéis de genes dentro das rotas da indução do florescimento em *Oryza sativa* (arroz) e *Arabidopsis thaliana*. Genes que são marcados em vermelho não estão presentes em *A. thaliana*. Figura adaptada de Matsubara et al., 2014.

Em cana-de-açúcar, cultura de alta complexidade genética, as vias de indução do florescimento ainda não foram elucidadas por completo e pouca literatura se tem disponível a respeito (COELHO et al., 2014; GLASSOP et al., 2014; COELHO et al., 2013) e mesmo em relação aos genes envolvidos no desenvolvimento floral (DORNELAS; RODRIGUES, 2001, FIGUEIREDO et al., 2001), em face à importância econômica desta cultura.

Em uma análise *in silico*, genes homólogos putativos envolvidos na via de indução de sinal do florescimento (*GI*, *CO*, *Ehd1*, *Ghd7* e *FT*) foram identificados no banco do SUCEST por Coelho et al. (2013). Nesta busca, candidatos para os genes *Ehd1* e *Ghd7*, os quais são específicos de monocotiledôneas foram identificados no banco, além de sequências candidatas para os genes *FT* contendo o domínio PEBP e apresentando alta similaridade com a superfamília ZCN de milho (*Zea mays CENTRORADIALIS*) que codifica proteínas ortólogas ao gene *FT*. O gene *Ehd1* (*Early heading date 1*) em arroz, ativa a expressão do gene *Hd3a* de forma independente do

gene *Hd1* em dias curtos, enquanto o *Ghd7* suprime a expressão do *Ehd1* em condições de dias longos (COLASANTI; CONEVA, 2009).

Em 2014, Coelho et al. identificaram proteínas do tipo phosphatidylethanolamine-binding (PEBP) em cana-de-açúcar semelhantes as proteínas codificadas pelos genes *FT* e *TFL1* de *Arabidopsis thaliana*. Nesta planta, estas proteínas desempenham um papel essencial no controle da transição da fase vegetativa para reprodutiva. O gene *TFL1* é responsável por manter a inflorescência em estado indeterminado. Quando ocorre perda da função do *TFL1* ocorre a formação das flores terminais (BRADLEY et al., 1997). Sabe-se que a sequência do gene *TFL1* é muito semelhante ao gene *FT* (gene que codifica o florígeno), porém, *TFL1* atua de forma antagonista ao *FT*, pois este atrasa a floração (HANZAWA et al., 2005).

O antagonismo está em que *FT*, como mencionado anteriormente, interage com a proteína FLOWERING LOCUS D (FD) para promover a floração (ABE et al., 2005), já a proteína codificada por *TFL1* liga-se à FD para reprimir genes a jusante, tais como APETALA 1 (AP1) e LEAFY (LFY) na zona central do meristema (HANANO; GOTO, 2011) atrasando a formação da inflorescência.

Coelho et al. (2014) analisaram a expressão de proteínas homologas putativas de *TFL1* e *FT* (*ScTFL1* e *ScFT1*) em diferentes tecidos (ápice, folhas maduras e folhas imaturas) de plantas de cana-de-açúcar sob condições indutivas e não indutivas ao florescimento. Estas análises mostraram que a expressão de *ScTFL1* apresentou transcritos ao redor do ápice das folhas em desenvolvimento, mas não no próprio ápice. A proteína *ScFT1* foi detectada em folhas imaturas e regiões apicais de plantas que cresciam vegetativamente. Após a transição floral, a expressão de *ScFT1* também ocorreu nas folhas maduras. Coelho et al. (2014) também estudaram a sobre-expressão ectópica de *ScTFL1* em *A. thaliana*. Estes autores perceberam o atraso da floração nesta planta, como seria de esperar para um gene relacionado com *TFL1*. Porém, o mesmo estudo em *FT* mostrou um resultado inesperado, a sobre-expressão de *ScFT1* (maior semelhança com a proteína codificada por *FT* em *A. thaliana*) também causou um atraso na floração. Os autores sugeriram que os padrões de expressão destes genes e os papéis que estes possuem na transição floral divergiu do papel previsto de membros semelhantes da família PEBP em *A. thaliana* (COELHO et al., 2014).

É evidente que na atualidade há poucos trabalhos que abordam a regulação das vias do florescimento em cana-de-açúcar. Ainda, dados da literatura apontam que alguns passos desta via possam ser espécie-específicos, como mostrado nas diferenças entre *Oryza sativa* (arroz) e *Arabidopsis thaliana*. Assim, é possível que a cana-de-açúcar apresente diferenças na regulação do florescimento, o que justifica a busca do conhecimento de novos genes.

2.3 Indução artificial da floração de cana-de-açúcar

Apesar das incógnitas em relação as rotas e da regulação dos genes envolvidos na indução do florescimento em cana-de-açúcar, os fatores ambientais que controlam a indução do florescimento foram bastante estudados e explorados. Isto permite um certo controle do florescimento quando se é possível controlar artificialmente esses fatores ambientais.

Para um programa de melhoramento de cana-de-açúcar, a abundância e a qualidade das flores são essenciais, porém, isto de nada adianta se não existir o sincronismo da época da floração entre genótipos que permitam a obtenção de sementes de alto valor genético.

A indução e sincronismo da floração de diferentes genótipos para a obtenção da hibridação requer alguns requisitos tais como, o tempo de floração e condições ambientais adequadas para a floração de cada genótipo, instalações adequadas para o avanço ou atraso da floração, bem como o conhecimento dos efeitos do atraso e/ou antecipação da floração dos diferentes genótipos.

O conhecimento dessas informações se torna extremamente necessário para que se possa induzir a floração de diferentes genótipos de forma sincronizada. Para isto, deve-se conhecer antecipadamente o comportamento dos genótipos que serão induzidos em um vasto número de tratamentos fotoperiódicos. No Brasil, pouco se conhece sobre o fotoperíodo indutivo dos genótipos utilizados nos programas de melhoramento, pois não são muitos os trabalhos desenvolvidos na área de sincronismo de floração em Câmara de Fotoperíodo. Melloni et al. (2015) estudaram três diferentes decaimentos fotoperiódicos em diferentes genótipos e seus efeitos

sobre a floração. Os autores obtiveram diferentes respostas à indução da floração desses genótipos quanto ao decaimento, sendo que o decaimento de 45 segundos diários foi considerado o de melhor resposta (MELLONI et al., 2015). Os autores também perceberam que há genótipos que respondem somente há um dos estímulos fotoperiódicos, ou seja, os genótipos diferem em relação a sensibilidade do decaimento da luz (MELLONI et al., 2015).

Sabe-se que fotoperíodos artificiais podem fazer com que genótipos que atrasem a floração naturalmente possam adiantar este evento em condições artificiais (NUSS, 1978). Por hora, estudos envolvendo o fotoperíodo indicam que a floração precoce é obtido quando plantas de época de floração tardia são transferidas para uma câmara escura antes do pôr do sol durante 15 min (MACCOLL, 1977). Assim, se propõe que em latitudes equatoriais, aonde o comprimento do dia natural, não chega a 12 h e 30 min, a iniciação precoce da floração pode ser alcançada pela iluminação das plantas por 20 min antes do amanhecer e, posteriormente, redução gradual do tempo entre a madrugada artificial e natural antecipando a emissão floral em algumas semanas (MOORE, 1957 citado por MOORE; NUSS, 1987). Ainda, para induzir a floração na cana-de-açúcar pode-se fazer, em condições artificiais, uma pequena diminuição de 30 a 60 segundos por dia do fotoperíodo de aproximadamente 12h e 30 min (MOORE; NUSS, 1987; BERDING, 2007), ajustando para mais ou para menos o comprimento do dia para o local que se deseja induzir a floração.

Para o sincronismo da floração é necessário atrasar ou retardar a emissão da inflorescência dos genótipos. Apesar disso, os melhoristas que utilizam desta ferramenta para obter os cruzamentos de cana-de-açúcar têm percebido que se tem mais sucesso quando se atrasa a floração dos genótipos de floração precoce do que quando se tenta adiantar a floração de genótipos que florescem mais tardiamente (MOORE, 1987).

A utilização de luzes artificiais (lâmpadas) que aumentem o comprimento do dia pode atrasar a floração de genótipos precoces (BRETT; HARDING, 1974). Outro método muito utilizado por melhoristas para atrasar a floração de genótipos de floração precoce é interromper o período de escuro com luz. Midmoore (1980) interrompeu o período de escuro com 2 h de luz no meio da noite, impedindo o florescimento de genótipos expostas à um fotoperíodo indutivo. Este mesmo

pesquisador percebeu que em fotoperíodo indutivo natural o desenvolvimento da panícula é bem mais rápido, porém, a viabilidade do pólen é baixa e em condições de atraso do fotoperíodo indutivo se observa um lento desenvolvimento da panícula, com alta viabilidade do pólen (ROACH, 1978 citado por MOORE, 1987).

O manejo fotoperiódico é uma ferramenta já conhecida pelos melhoristas de cana-de-açúcar, porém é sempre conciliada com o manejo da temperatura e umidade de solo a fim de não ter interferência na translocação de fotoassimilados para a formação da inflorescência.

Em câmaras de fotoperíodo os cultivares ficam expostos a temperaturas na faixa de 21 a 31 °C, e umidade de solo em torno da capacidade de campo do substrato (BERDING, 1981; CLEMENTS; AWADA, 1965).

2.4 Técnica do cDNA-AFLP na busca de genes candidatos

A técnica do cDNA-AFLP é uma das técnicas mais robustas e sensíveis para encontrar genes diferencialmente expressos (AQUEA et al., 2008; VUYLSTEKE et al.; 2007).

Proposta por BACHEM em 1996, esta técnica se baseia na PCR, e permite a identificação de genes pouco expressos, pois não há competição entre os fragmentos mais ou menos transcritos, isso pelo fato de após a digestão ser possível a ligação de adaptadores conhecidos, eliminando a amplificação inespecífica.

Por meio desta técnica muitos trabalhos são realizados atualmente com a finalidade de identificar genes diferencialmente expressos em plantas em diversas situações. Dentre elas, genes diferencialmente expressos em plantas em condições adversas como ambientes de estresse, sob ataque de pragas e doenças (GUIMARÃES, 2007; ECKEY et al., 2004). Além disso, o uso do cDNA-AFLP é capaz de gerar informações quanto ao diferente comportamento metabólico de plantas distintas sob as mesmas condições ambientais.

Esta técnica, segundo BREYNE et al., 2003 gera um grande número de fragmentos diferencialmente expressos e apresenta elevado nível de reprodutibilidade. Ainda, possui como principal vantagem, permitir a descoberta de

genes ainda desconhecidos (BREYNE et al.; 2003), pelo fato de não haver necessidade do conhecimento prévio da sequência.

Esta metodologia possibilita uma simples e rápida verificação da identidade da banda no gel de poliacrilamida que pode representar diferentes fragmentos expressos entre dois ou mais materiais. Além disso, permite a avaliação sistemática de quase todos os transcritos em um dado sistema biológico utilizando pequenas quantidades de material inicial (BACHEM et al., 1998).

A síntese do cDNA é realizada pela ação da enzima transcriptase reversa, uma enzima de origem viral que tem a capacidade de produzir uma molécula de DNA dupla fita a partir da cópia de uma molécula de RNA mensageiro. Ou seja, faz o caminho contrário daquele percorrido pela RNA polimerase, a qual, a partir de uma molécula dupla fita de DNA, produz o RNA.

Presumindo que as diferenças existentes entre o comportamento de diferentes cultivares de cana-de-açúcar às mesmas condições de indução ao florescimento e que tais diferenças decorram de genes diferencialmente expressos, com o auxílio da técnica de cDNA-AFLP é possível identificar fragmentos de genes relacionados à este evento nesta espécie, colaborando para futuros estudos mais aprofundados. Ou seja, esta técnica auxilia estudos iniciais das redes gênicas que regem os metabolismos.

O cDNA-AFLP vem sendo utilizado para muitos estudos iniciais de expressão na linha de defesa de planta à doenças e patógenos, tolerância a ambientes inóspitos bem como outros metabolismos como na identificação de genes diferencialmente expressos nos processos fisiológicos do florescimento de muitas espécies (ČECHOVÁ et al., 2012, XIAO et al., 2012; XING; LIU; 2012).

Em cana-de-açúcar, até o presente momento há poucos trabalhos que visam identificar genes envolvidos na via de indução do florescimento.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo encontrar possíveis genes candidatos a indução ao florescimento em cana-de-açúcar sob condições controladas, bem como testar a eficiência da técnica de cDNA-AFLP para este experimento. Ainda, verificar o comportamento de dois grupos de cultivares de diferentes respostas a indução fotoperiódica ao florescimento sobre regime artificial de indução em Câmara de Fotoperíodo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Neste trabalho foram utilizados dois grupos de cultivares contrastantes, em relação à indução do florescimento, quando expostas a condições naturais de indução. Estas foram escolhidas com base na classificação dos melhoristas do Centro de Cana do Instituto Agronômico de Campinas. Os materiais de fácil indução IACSP96-7569 e IACSP95-5094 são materiais que apresentam inflorescência mesmo com poucos dias naturalmente indutivos e os materiais de difícil indução IACSP94-2101 e IACSP96-3060 foram escolhidos pelo motivo de pouco se observar o florescimento, mesmo em anos de alta somatória de dias indutivos.

4.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado no Centro de Cana do Instituto Agronômico de Campinas, localizado em Ribeirão Preto-SP, Brasil, no período de maio de 2012 a março de 2014 em Câmara de Fotoperíodo Automatizada. Os cultivares receberam diferentes tratamentos fotoperiódicos (indução e não indução do florescimento) por um período que compreende o início da indução até o florescimento (os tratamentos iniciaram em setembro de 2012 e terminaram em fevereiro de 2013), onde foram realizadas 3 coletas (aos 5, 10 e 20 dias após o início dos tratamentos) da folha +1 completa para cada cultivar para extração do RNA total.

Foram utilizadas 5 replicatas (réplicas biológicas) de cada cultivar para cada tempo de coleta (5, 10 e 20 dias) dentro de cada um dos tratamentos fotoperiódicos (indução e não-indução). Isto foi realizado para que, após o término do experimento, o máximo de réplicas apresentando sinal de indução (folha bandeira) pudessem ser utilizadas para a extração de RNA e utilizadas no ensaio de cDNA-AFLP. Além disso, para cada cultivar e, em cada tratamento fotoperiódico, uma planta foi mantida intacta (testemunha) para comprovação ou não do florescimento (emissão da inflorescência) no final da indução (Figura 3). Isto ocorreu pela desconfiança de que o processo de

retirada de folhas poderia influenciar no processo de indução. O número total para cada cultivar foi de 12 plantas (tubetes de 3,880 L de capacidade) por tratamento fotoperiódico. Os tubetes com os cultivares foram colocados nos vagões da câmara de fotoperíodo em completa casualização (DIC) (Figura 3).

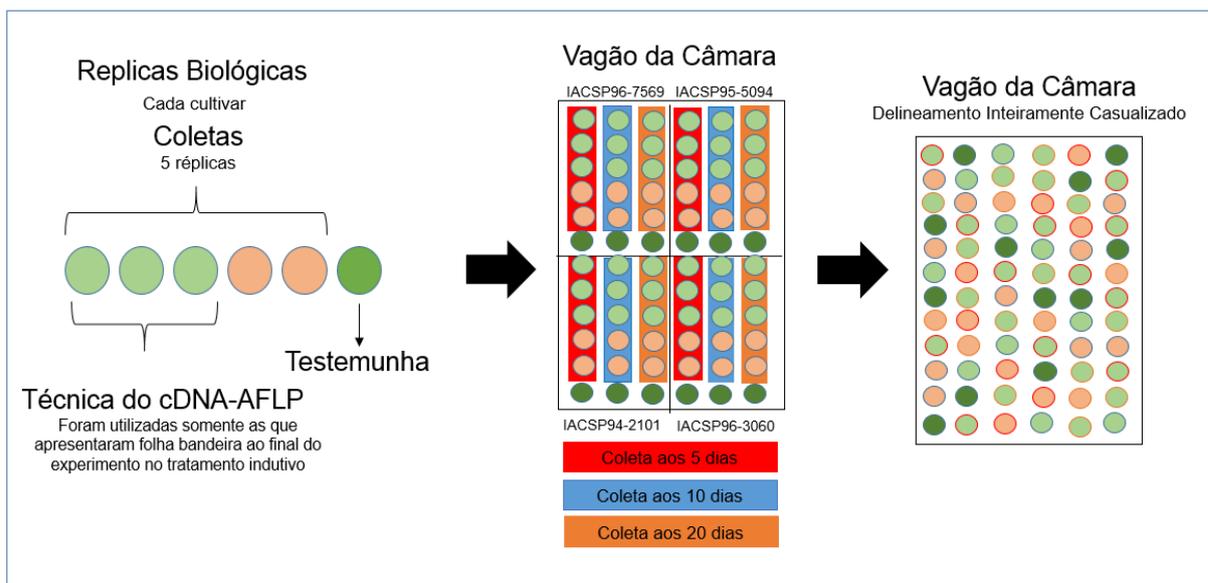


Figura 3. Esquema do Delineamento Experimental.

4.3 Plantio dos cultivares

As gemas utilizadas para multiplicação das cultivares utilizadas neste experimento foram extraídas dos 4 entrenós localizados no meio dos colmos, com a finalidade de obter uniformidade no brotamento. Após o brotamento, estas foram mantidas em tubetes de 64 mL no período de um mês em substrato Plantmax®. Após este período, as mudas foram selecionadas visualmente para sanidade, vigor e uniformidade.

Uma vez selecionadas, uma muda de cada réplica biológica foi replantada em vasos do tipo Citros-pote (volume de 3,880 L) para crescimento e desenvolvimento. O plantio dos cultivares foi realizado de forma uniforme; ainda, somente o perfilho principal foi mantido até o final do experimento com a finalidade de obter a mesma idade fisiológica entre as réplicas biológicas. O substrato utilizado foi constituído por terra, areia e Plantmax® em mesma proporção. A mesma quantidade de substrato foi

minuciosamente colocada em cada citro-pote. A mistura (substrato) foi adubada de acordo com a recomendação (análise de solo). No momento da adubação ocorreu a pesagem dos componentes da adubação com a finalidade de todos os perfilhos obterem a mesma quantidade de adubo. Isto foi realizado para que não ocorresse interferência nos resultados de expressão.

As plantas foram submetidas aos tratamentos fotoperiódicos após atingirem um número médio de 5 a 6 entrenós bem desenvolvidos (período entorno de 6 meses), correspondendo à maturidade fisiológica para indução floral (Figura 4).



Figura 4. Plantio dos cultivares e manutenção de um perfilho por réplica.

4.4 Tratamentos Fotoperiódicos

Dois tratamentos fotoperiódicos, um de indução e outro de não-indução ao florescimento foram programados na Câmara de Fotoperíodo automatizada. Quando as plantas apresentaram 6 meses de idade, estas foram expostas aos tratamentos fotoperiódicos. Os tratamentos iniciaram em setembro de 2012 e terminaram em fevereiro de 2013 (esta época não é indutiva ao florescimento natural). Inicialmente, estas ficaram expostas por 7 dias a 12 hs e 55 min para então se iniciar os tratamentos. O tratamento de indução partiu de 12 hs e 55 min de fotoperíodo

decaindo diariamente 45 s de luz (tratamento já testado para genótipos brasileiros) (Melloni et al., 2015). O tratamento de não-indução partiu de 12 hs e 55 min acrescentando diariamente 15 s de luz (foram acrescentados somente 15 s diários neste tratamento para que ao final do experimento não ocorresse estresse por excesso de luz).

A temperatura foi controlada no intervalo de 23 a 31 °C, com ponto ótimo de controle a 27 °C no interior da câmara de fotoperíodo para os dois tratamentos, sendo correlata com a temperatura externa. As plantas foram irrigadas 8 vezes ao dia até a capacidade de campo, por meio de aspersores instalados no exterior da câmara de fotoperíodo.

4.5 Coleta do material vegetal para extração de RNA.

As coletas foram realizadas aos 5, 10 e 20 dias considerando as informações a respeito do tempo de indução médio que ocorre em condições naturais indutivas ao florescimento. Os dias de coleta se concentraram no início da indução. Em cada uma das coletas foram retiradas a folha +1 e a bainha desta folha para cada réplica biológica (3 replicatas). Os tecidos coletados foram envolvidos em papel alumínio, colocados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da extração do RNA total. Os tecidos foram analisados separadamente, pois a bainha se difere da folha em morfologia e composição, porém esta também tem seu metabolismo muito ativo em cana-de-açúcar (Figura 5).

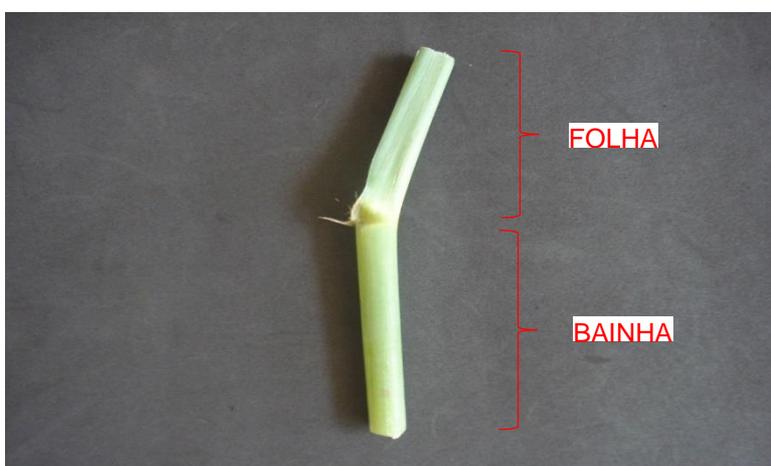


Figura 5. Fragmento da Folha + 1 (Bainha e parte do Limbo foliar).

4.6 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído separadamente para cada réplica utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Depois disso, foi realizada a quantificação, a mensuração da pureza do RNA extraído por meio de análise de absorvância (260/280nm) em NanoDrop® (Thermo)®, assim como a verificação da integridade por eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK et al., 2001) de cada réplica biológica. Quantidades iguais de RNA foram misturadas para obter uma amostra final que representou a união das três réplicas biológicas para cada cultivar nas diferentes coletas e tratamentos fotoperiódicos (Figura 6). O restante do RNA extraído de cada réplica biológica encontra-se em ultrafreezer (-80 °C).

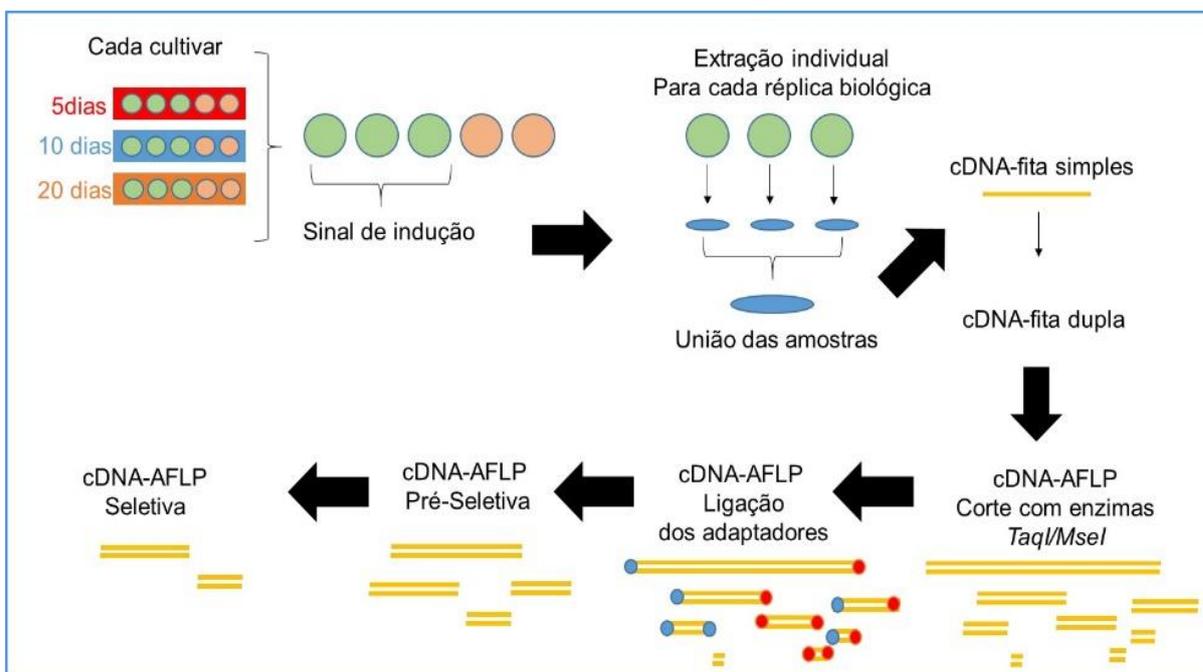


Figura 6. Fluxograma de execução do experimento incluindo as etapas de extração de RNA e técnica do cDNA-AFLP.

4.7 Síntese dos cDNAs Dupla-Fita

Após a extração de RNA, cada amostra foi tratada com DNase por meio do Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Alemanha). Este procedimento foi realizado para que não houvesse interferência de DNA genômico nos resultados da técnica do cDNA-

AFLP. A síntese da primeira fita dos cDNAs foi realizada por meio do Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lituânia) a partir de 1,0 µg do RNA total, e a segunda fita foi sintetizada conforme as orientações do fabricante (Figura 6).

4.8 Obtenção dos marcadores cDNA-AFLP

Os marcadores do tipo cDNA-AFLP foram obtidos segundo o protocolo de VOS et al. (1995) com adaptação para cana-de-açúcar. Para isto, 300 ng do cDNA foram digeridos com as enzimas de restrição *TaqI* e *MseI* e os fragmentos obtidos foram ligados a adaptadores específicos. As reações de pré-amplificação foram realizadas com iniciadores com uma base seletiva e as amplificações seletivas com primers de duas bases seletivas (Figura 7). Foram avaliadas 64 combinações de primers seletivos entre os diferentes cultivares para seleção das combinações mais polimórficas. As selecionadas foram *TaqAG/MseCT*, *TaqAG/MseTC*, *TaqAG/MseGT*, *TaqAG/MseTG* (somente para limbo foliar) e *TaqAG/MseGA* por apresentarem grande número de fragmentos diferencialmente expressos.

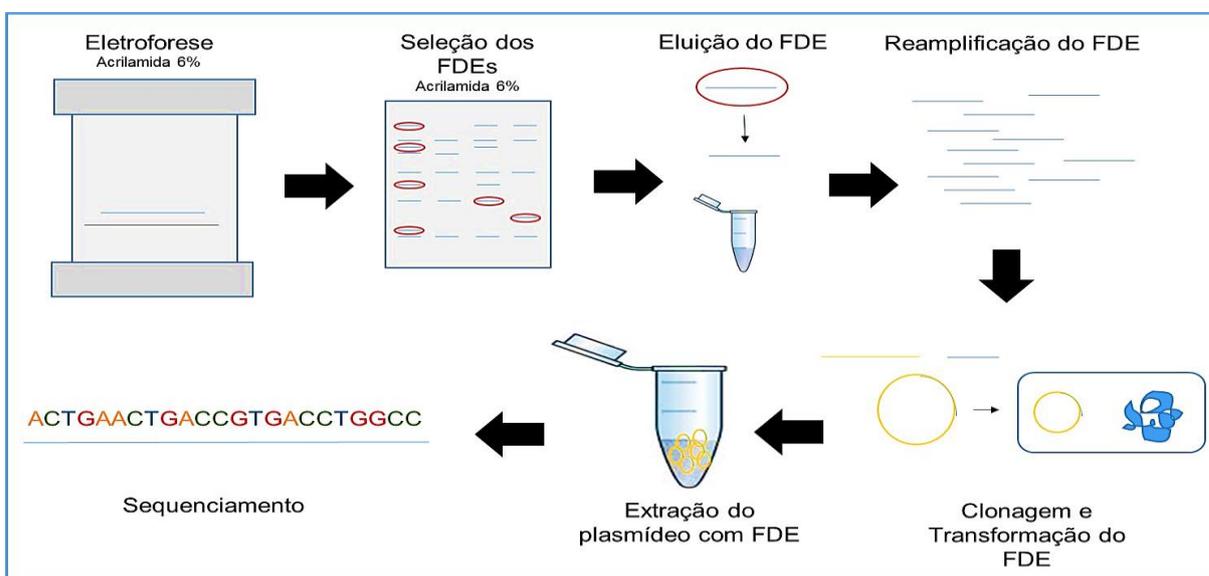


Figura 7. Fluxograma de execução do experimento incluindo as etapas de seleção dos FDEs (Fragmentos diferencialmente expressos), eluição, reamplificação, clonagem, transformação e sequenciamento

Aos produtos amplificados foram adicionados tampão formamida a 98% (v/v) contendo 10 mM EDTA, 0.025% (p/v) de azul de bromofenol e 0.025% (p/v) de xileno cianol (2:1). Após desnaturação à 90°C por 4 minutos os fragmentos foram separados por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% e revelados pela coloração com prata segundo protocolo descrito por Creste et al. (2001).

4.9 Detecção, Recuperação e Reamplificação dos FDEs ((fragmentos diferencialmente expressos)

Os FDEs foram selecionados com base na comparação dos perfis moleculares obtidos nos tratamentos fotoperiódicos de indução e não indução dentro de cada cultivar e entre os cultivares avaliados. Diante da genotipagem, foram recortados somente os fragmentos que possuíam boa resolução no gel ocorrendo nas seguintes situações (Tabela 1):

Tabela 1. Seleção dos fragmentos diferencialmente expressos (FDES) nas diferentes situações.

Seleção dos FDES	Cultivares de Fácil indução Natural				Cultivares de Difícil indução Natural			
	IACSP96-7569		IACSP95-5094		IACSP94-2101		IACSP96-3060	
Situações	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI
1	1	0	1	0	1	0	1	0
2	0	1	0	1	0	1	0	1
3	1	0	1	0	0	0	0	0
4	0	1	0	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1	0	1	0
6	0	0	0	0	0	1	0	1
7	1	0	1	0	0	1	0	1
8	0	1	0	1	1	0	1	0

Sendo que: I: Tratamento de fotoperíodo Indutivo; NI: Tratamento de fotoperíodo Não Indutivo; 1: presença de fragmento e 0: ausência do fragmento

1) presente nos cultivares submetidos ao tratamento fotoperiódico de indução ao florescimento e ausentes no tratamento fotoperiódico de não indução ao florescimento (genes ativados pelo estímulo do tratamento fotoperiódico de indução);

2) presente nos cultivares submetidos ao tratamento fotoperiódico de não indução ao florescimento e ausentes no tratamento fotoperiódico de indução ao florescimento (genes desligados pelo estímulo do tratamento fotoperiódico de indução). Estas duas situações (1 e 2) foram desmembradas para melhor exploração dos dados obtidos. Assim outras situações foram consideradas:

3) presente nos cultivares considerados de fácil indução submetidos ao tratamento fotoperiódico de indução ao florescimento e ausentes no tratamento de não indução (genes ativados no tratamento de indução somente para cultivares de fácil indução);

4) presente nos cultivares considerados de fácil indução submetidos ao tratamento fotoperiódico de não indução ao florescimento (genes desligados nas cultivares de fácil indução);

5) presente nos cultivares considerados de difícil indução quando submetidos ao tratamento fotoperiódico de indução ao florescimento (genes ativados no tratamento de indução somente para cultivares de difícil indução);

6) presente nos cultivares considerados de difícil indução quando submetidos ao tratamento fotoperiódico de não indução ao florescimento (genes desligados nas cultivares de fácil indução);

7) presente nos cultivares considerados de fácil indução quando submetidos ao tratamento fotoperiódico de indução ao florescimento e necessariamente presentes nos de difícil indução ao tratamento de não indução ao florescimento (genes presentes no tratamento controle nas cultivares de difícil indução no tratamento controle, mas ativados pelo tratamento fotoperiódico indutivo somente nas cultivares de fácil indução);

8) presente nos cultivares considerados de difícil indução quando submetidos ao tratamento fotoperiódico de indução ao florescimento e necessariamente presentes nos de fácil indução ao tratamento de não indução ao florescimento (genes presentes no tratamento controle nas cultivares de fácil indução no tratamento controle, mas

ativados pelo tratamento fotoperiódico indutivo somente nas cultivares de difícil indução).

Os FDEs foram retirados do gel reidratado *overnight* em água destilada, com o auxílio de lâmina de bisturi. Os fragmentos foram eluídos em 50 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0) e incubados *overnight* a 4°C. Posteriormente, foram submetidos a temperatura de 60°C por 2h e em seguida a três ciclos de congelamento e descongelamento e centrifugação do restante da poliacrilamida (PATHAN et al. 2007). O sobrenadante do FDE eluído teve alíquota de 10 µL utilizada para a sua reamplificação, por meio da combinação de primers seletivos correspondente à respectiva amplificação seletiva.

4.10 Purificação e Clonagem dos FDEs

A reamplificação resultou em 50 µL de reação. Desta, 8 µL foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % para verificar o sucesso da reamplificação. Após isto, o restante de 42 µL do material reamplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8 % para purificação utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean up system kit (Promega, Alemanha). Após quantificação por espectrofotometria foram ligados ao vetor de clonagem (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega, Alemanha) por meio do protocolo descrito pelo fabricante e utilizados na transformação de bactérias eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B. A transformação das bactérias foi realizada por meio da eletroporação e as bactérias transformadas cresceram em placas de Petri com meio SOC (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) e ampicilina a 50 mg. L⁻¹, acrescido de 20 µL de X-Gal e 80 µL de IPTG nas placas sólidas (Figura 7).

A seleção dos transformantes foi realizada por meio de antibiótico ampicilina (colônias brancas). A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o NucleoSpin® Plasmid kit (MACHEREY-NAGEL, Alemanha).

4.11 Sequenciamento e análise dos FDEs.

O sequenciamento dos FDEs foi realizado no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo por meio do método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems - PE, Inc., CA, USA).

As sequências foram confrontadas com seis bancos de sequências: 1. Transcritos do projeto SUCEST (<http://sucest-fun.org>); 2. Proteínas do genoma de sorgo (<http://phytozome.jgi.doe.gov>, versão 1.4); 3. BAC de cana-de-açúcar (SETTA et al., 2014); 4. Proteínas do genoma de arroz (<http://phytozome.jgi.doe.gov>); 5. Proteínas presentes no Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov>, versão 10.3); e 6. NCBI (banco de dados NR, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em outubro de 2015). A busca por similaridade se deu pelo uso da ferramenta BLASTn (e-value $1e-5$) nos casos do banco SUCEST e dos BACs de cana-de-açúcar, e BLASTx (e-value $1e-5$) para os demais bancos. Para melhor compreensão dos resultados encontrados via BLAST nos referidos bancos, as proteínas codificadas pelos genes que apresentaram similaridade com as sequências dos FDEs foram confrontadas com o banco de domínio de proteínas Pfam (<http://pfam.xfam.org/>, versão 28.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio Biológico: Indução ao florescimento dos cultivares estudados.

O experimento realizado em Câmara de fotoperíodo foi finalizado quando todos os cultivares que estavam sob regime fotoperiódico indutivo emitiram a folha bandeira (garantia da indução ao florescimento). Todos os dias de permanência dos cultivares sobre regime fotoperiódico decrescente foram considerados indutivos, sem nenhuma interrupção. Assim como todos os dias em que os cultivares permaneceram em tratamento fotoperiódico crescente foram considerados não indutivos.

Apesar de terem sido utilizadas três réplicas de cada cultivar para extração do RNA nos ensaios de cDNA-AFLP, 5 réplicas (mais 3 testemunhas) para cada tempo foram estudadas na câmara para cada tempo de coleta. Essas foram identificadas e avaliadas no final do experimento, para que a extração do RNA fosse realizada somente no tecido de plantas que apresentaram sinal de indução (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação do sinal de indução ao florescimento das réplicas dos cultivares IACSP96-7569, IACSP95-5094, IACSP96-3060, IACSP94-2101 aos 154 dias após o início do tratamento de indução fotoperiódica.

Dias De Indução	Réplicas	IACSP96-7569 Avaliação	IACSP95-5094 Avaliação	IACSP96-3060 Avaliação	IACSP94-2101 Avaliação
Coleta 1 (5 dias)	1	I	I	I	F
	2	I	I	I	F
	3	I	NI	I	F
	4	I	I	I	F
	5	I	I	I	F
Coleta 2 (10 dias)	1	I	NI	I	F
	2	I	I	I	F
	3	NI	I	I	F
	4	I	NI	I	F
	5	NI	I	I	F
Coleta 3 (20 dias)	1	I	I	I	F
	2	I	NI	I	F
	3	NI	I	I	NI
	4	I	I	I	NI
	5	NI	I	I	F

As letras I, NI e F correspondem a Induziu (apresentou folha bandeira), Não Induziu e Floresceu (emitiu a inflorescência) respectivamente.

Foram necessários 154 dias de indução ao florescimento até que todos os cultivares apresentassem a emissão da folha bandeira (Figura 8).

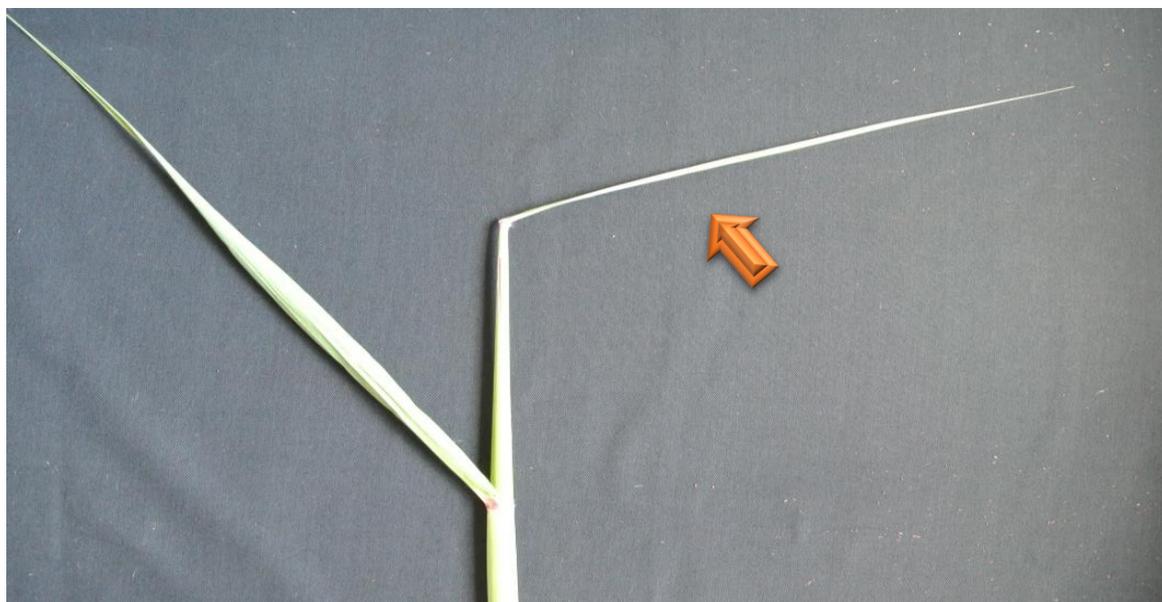


Figura 8. Folha bandeira apresentada pelas cultivares expostas ao fotoperíodo indutivo ao florescimento.

O primeiro material a apresentar este sinal foi o IACSP95-5094 aos 142 dias após o início da indução. Logo após, aos 144 dias, o IACSP94-2101 emitiu a folha bandeira, aos 147 dias, o cultivar IACSP96-7569. E por último, a IACSP96-3060, aos 154 dias. Dentro do período da realização do experimento, o único cultivar que emitiu a inflorescência foi o IACSP94-2101, aos 152 dias após a indução fotoperiódica. Porém, a folha bandeira é considerada um indício concreto de indução ao florescimento, não sendo necessária a completa emissão da inflorescência.

A indução da cultivar IACSP96-3060 (emissão da folha bandeira) assim como o florescimento da cultivar IACSP94-2101 não era esperado, já que pertencem ao grupo de classificação “difícil indução” (classificação realizada pelos melhoristas do Centro de Cana do IAC com base no comportamento desses materiais quando expostos ao regime de indução natural) não respondendo facilmente aos estímulos ambientais naturais que levam a indução do florescimento.

Segundo Pereira (1985) são necessários de 18 a 25 dias indutivos (somatória) para que haja alta resposta ao florescimento por parte dos genótipos de cana-de-açúcar, porém, 10 dias indutivos já causam indução em algumas cultivares. Sabe-se

que dias indutivos para essa planta são aqueles que possuem fotoperíodo menor que o crítico, 12 h 55 min, e que a temperatura deve permanecer entre 21°C à 31°C (BERDING, 1981). Na natureza, em anos considerados muito indutivos ao florescimento as somatórias de dias que estimulam a floração não ultrapassam 60 dias. Isto ocorre pois os dias de fotoperíodo curtos (fotoperíodo abaixo de 12 hs 55 min) que estimulam a indução ao florescimento ocorrem nas estações de outono e inverno no Brasil onde ocorrem estiagens (baixa precipitação) e baixas temperaturas noturnas (menores que 18 °C). Dias com estas características não são considerados indutivos e não entram na somatória de dias que estimulam a floração mesmo com fotoperíodo abaixo do crítico.

Em contra mão ao que ocorre naturalmente, na câmara de fotoperíodo todos os 154 dias em que ocorreu a exposição dos cultivares ao tratamento de indução fotoperiódica foram considerados estimulante ao florescimento (fotoperíodo abaixo do crítico, temperatura adequada e água no substrato). Desta forma, a exposição dos cultivares de difícil indução ao estímulo para florescer ocorreu por maior número de dias do que ocorre naturalmente e isto pode ser a razão destes materiais terem apresentado os sinais de indução e florescimento.

Apesar da folha bandeira ser considerada um indício concreto de indução ao florescimento, após o término do experimento biológico (154 dias), o ápice de todas as cultivares foram expostos para observação da formação da inflorescência. Todas as cultivares já possuíam o meristema apical diferenciado em inflorescência. Isto indica o sucesso da câmara de fotoperíodo na indução do florescimento em todas as cultivares sob o regime de decaimento fotoperiódico.

De forma geral, em condições naturais, quando a cana-de-açúcar está exposta a fatores ambientais que estimulam o florescimento, a emissão completa da inflorescência ocorre após 100 dias (em média) do início da indução. O estímulo começa no meio de fevereiro e termina (principalmente pelas baixas temperaturas e estiagem) em começo de abril. O florescimento ocorre no final do mês de maio até começo do mês de junho para a maioria dos genótipos de cana-de-açúcar. É evidente que a câmara de fotoperíodo foi eficiente na indução dos cultivares, já que todos apresentaram sinal de indução, porém, houve um atraso da emissão da folha-bandeira e da inflorescência em relação ao tempo médio (60-90 dias) que ocorre em resposta

aos estímulos naturais. Este atraso pode ter ocorrido pela diferença na qualidade de luz no início e final do período de luz (quando os cultivares necessariamente permaneciam dentro da câmara) em relação a qualidade da luz solar, que somente era utilizada no experimento quando a temperatura externa estava na faixa programada. É evidente que a luz solar tem qualidade superior ao conjunto de luz artificial utilizada na Câmara de fotoperíodo.

Em relação à câmara em regime fotoperiódico crescente (não indutivo) não houve qualquer sinal de indução ao florescimento por parte dos cultivares estudados durante todos os 154 dias de experimento (Figura 9). Os cultivares apresentaram-se vigorosos e de aspecto comum ao encontrados nos campos comerciais.

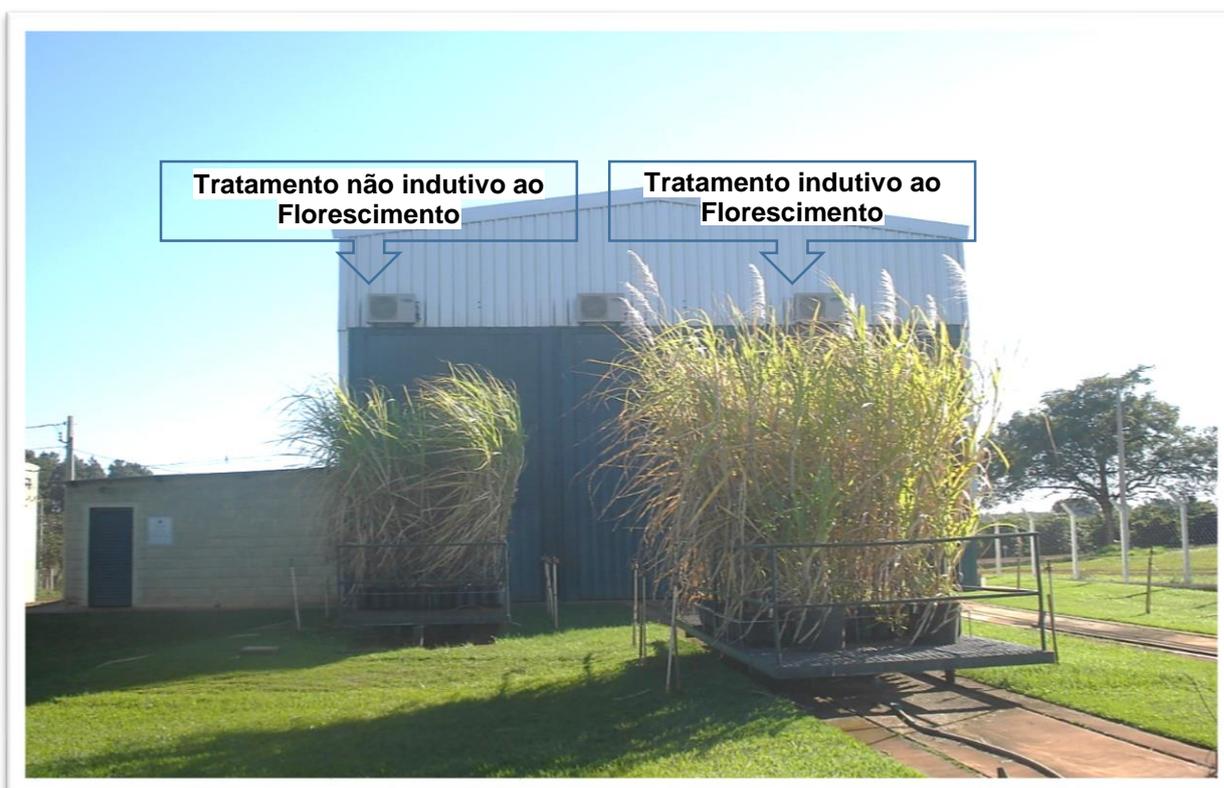


Figura 9. Tratamento não indutivo (não apresentam sinal de indução), e Indutivo ao florescimento (apresentam inflorescências).

Apesar de não ter sido quantificado, quando os cultivares foram comparados visualmente entre os tratamentos fotoperiódicos (indutivo e não-indutivo) estes apresentaram algumas diferenças morfológicas, como a espessura do colmo, que, de maneira geral, apresentavam-se mais finos no regime indutivo ao florescimento. Além

disso, estavam estiolados, com os entrenós espaçados neste tratamento. O número de entrenós dos cultivares expostos ao fotoperíodo indutivo foi menor que os do não indutivo, ou seja, sessaram o crescimento (não houve o surgimento de novas folhas e entrenós). Quando o meristema do ápice começa a diferenciação para gema floral (estádio vegetativo para reprodutivo) a planta para de formar folhas e entrenós e passa a se modificar em estruturas florais. Desta forma, houve evidências de que as plantas estavam em processo de indução floral mesmo antes da emissão da folha bandeira. Estes sinais ocorreram após 60 dias de exposição aos tratamentos.

Havia desconfiança que a retirada da folha+1 dos cultivares pudessem causar atraso, ou ainda, a não ocorrência da indução ou que houvesse diferença em dias na emissão da folha bandeira entre réplicas nos diferentes tempos de coleta (retirada da folha em dias diferentes). Porém, não foi constatada essa diferença em pelo menos três das cinco réplicas, ou seja, a emissão da folha bandeira ocorreu no mesmo dia para qualquer tempo de coleta da folha+1 dentro de cada cultivar (Tabela 2). Todas as testemunhas apresentaram sinal de indução, folha bandeira para IACSP96-7569, IACSP95-5094, IACSP96-3060 e IACSP94-2101 e inflorescência para IACSP94-2101 nos mesmos dias das réplicas de cada uma delas. Shanmugavadivu e Rao (2010) estudaram a remoção de diferentes folhas de cinco variedades de cana-de-açúcar no período indutivo natural ao florescimento. Estes autores, diferentemente do que ocorreu neste experimento, constataram grande relação das folhas com a indução, isso porque, quando retirou-se a folha+1 houve atraso na emissão da inflorescência em relação às testemunhas. Julien (1966) (citado por SHANMUGAVADIVU; RAO, 2010) sugeriu que folhas maduras possuem inibidores do florescimento, assim, a retirada de folha jovem e metabolicamente ativa pode fazer com que os materiais não induzam. Para este experimento, a folha +1 foi retirada uma vez para cada réplica e o desenvolvimento de novas folhas durante todo este período (154 dias) podem ter feito com que as réplicas de cada cultivar fossem induzidas todas ao mesmo tempo.

Ainda, a muito sabe-se que o pigmento responsável pela percepção do fotoperíodo indutivo ao florescimento é o Fitocromo, e este é abundante em toda planta (TAIZ; ZAIGER, 2013). Isto também pode ter contribuído para o comportamento similar dos cultivares em relação ao dia de emissão da folha bandeira entre as réplicas cultivares para os diferentes dias de coleta (retirada das folhas).

A Câmara de Fotoperíodo foi eficiente na indução ao florescimento dos cultivares que estavam sob regime fotoperiódico decrescente. Muitos são os trabalhos que demonstram a eficiência de Câmaras como esta na indução artificial do florescimento em cana-de-açúcar (BERDING et al., 2004, BERDING et al., 2007; BERDING et al., 2010; MELLONI et al., 2015).

A emissão da folha bandeira entre as réplicas dos cultivares no mesmo dia demonstra que a Câmara de fotoperíodo foi eficiente na indução do florescimento não importando a posição da réplica no vagão. Essa uniformidade também pode ser relacionada com a idade cronológica e fisiológica entre as réplicas que eram semelhantes para cada cultivar. Além disso, essa uniformidade foi garantida pela manutenção e manutenção de um perfilho por vaso, bem como os tratos culturais, que foram realizados igualmente em todos os tratamentos e réplicas.

5.2 Técnica de cDNA-AFLP

A técnica de cDNA-AFLP utilizando as enzimas de restrição *TaqI* e *MseI* e a combinação de primers com duas bases seletivas proporcionou um grande número de fragmentos diferencialmente expressos (Figura 10).

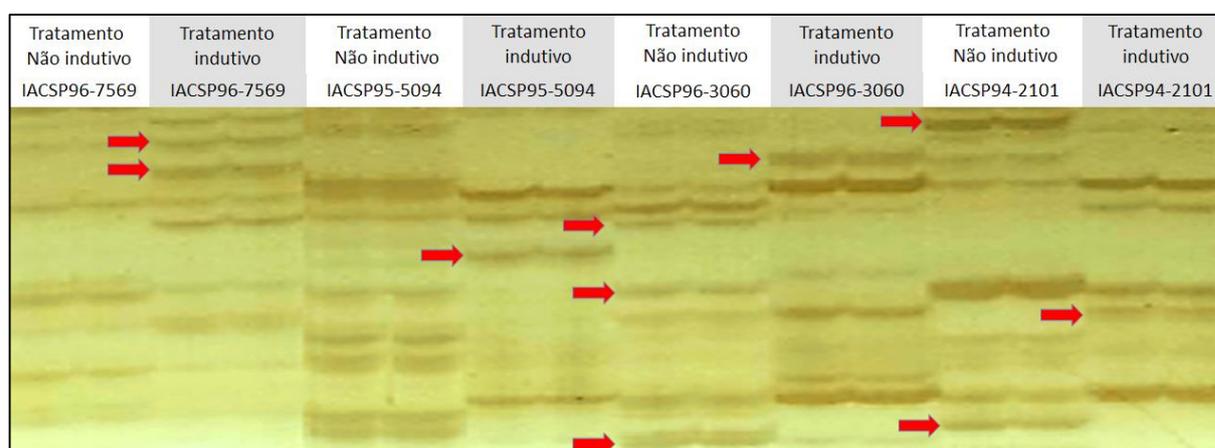


Figura 10. Fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) para a combinação seletiva TaqAG/MseGT obtidos por meio da técnica de cDNA-AFLP entre as cultivares IACSP96-7569, IACSP95-5094, IACSP96-3060, IACSP94-2101 nos diferentes tratamentos fotoperiódicos revelados em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% e corado com nitrato de prata.

De acordo com a análise dos géis de poliacrilamida, 162 fragmentos diferencialmente expressos (FDE) foram retirados e eluídos. Destes 162 FDEs, 63 fragmentos foram reamplificados e clonados.

5.3 Análise das sequências

O tamanho das sequências variaram de 77 a 377 bases. Destas, após a análise nos bancos, o número que apresentou similaridade com o SUCEST foi de 23, com Proteínas do genoma de sorgo, 16, com BAC de cana-de-açúcar, apenas 1, com Proteínas do genoma de arroz, 16, com Proteínas presentes no Phytozome, também 16, e finalmente, com o NCBI, 23.

Vinte e três sequências apresentaram identidade com genes em diferentes espécies (Tabela 3). As outras 40, que não apresentaram similaridade (no hits) com nenhuma outra sequência, provavelmente não foram depositadas nestes bancos (não conhecidas), ou o tamanho dos fragmentos foi um fator limitante para encontrar similaridade com alguma sequência.

Destas 23 sequências, oito mostraram similaridade com *Sorghum bicolor* (sorgo) (LM-29, LM-07, LM-03, LM-19, LM-20, LM-44, LM-52, LM-49). As sequências LM-49, LM-52, LM-44, LM-07, LM-19 e LM-29 apresentam similaridade com proteínas hipotéticas e as LM-03 e LM-20 com proteínas ainda não caracterizadas em sorgo. Ainda, com base nas análises das sequências, das 23, duas apresentaram similaridade com banco de *Oryza sativa* (arroz) (LM-30, LM-55). A LM-30, apresentou similaridade com gene que codifica uma endonuclease em arroz, e a LM-55, a uma proteína hipotética também em arroz.

As sequências LM-02 e LM-01 apresentaram similaridade com uma proteína putativa puroindoline b, que são proteínas de defesa das plantas contra bactérias (CHARNET et al, 2003). Provavelmente, estas sequencias (LM-01 e LM-02) podem não estar relacionadas ao estudo do florescimento, podendo ser uma defesa da planta à alguma bactéria instalada em uma das réplicas.

A LM-22 apresentou similaridade com o gene TNP2 em *Glycine max* (Soja) que codifica uma transposase-like. É evidente a importância das transposases nos metabolismos dos seres vivos. Os mecanismos epigenéticos como os transposons

Tabela 3. Resultados das análises dos fragmentos diferencialmente expressos (FDEs) nas cultivares de cana-de-açúcar IACSP96-7569, IACSP95-5094, IACSP96-3060, IACSP94-2101 submetidas aos tratamentos fotoperiódicos de indução e não indução ao florescimento.

FDE	Tecido	Coleta (dias)	Combinação (Taq/MseI)	Tamanho (bases)	Identificação	Descrição do banco de dados	E-value	Identidade (%)
LM-01	Folha	5	AG/CT	377	CAQ43070.2	Putative puroindoline b protein	6,00E-13	97,14
LM-02	Folha	10	AG/CT	100	CAQ43070.2	Putative puroindoline b protein	2,00E-11	100,00
LM-03	Folha	5	AG/CT	167	XP_002448940.1	Putative uncharacterized protein Sb05g002035	5,00E-20	72,72
LM-07	Folha	10	AG/CT	243	XP_002445353.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g011900 [Sorghum bicolor]	3,00E-27	79,74
LM-11	Bainha	5	AG/CT	242	XP_002331606.1	Predicted protein [Populus trichocarpa]	5,00E-12	44,59
LM-17	Folha	10	AG/CT	104	AAL75983.1 AF466203_12	Putative gag-pol precursor -orf2 [Zea mays]	5,00E-09	79,41
LM-19	Folha	20	AG/CT	285	XP_002443330.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g017590 [Sorghum bicolor]	3,00E-40	92,30
LM-20	Folha	20	AG/CT	258	XP_002442592.1	Putative uncharacterized protein Sb08g022600	9,00E-24	67,50
LM-21	Folha	20	AG/CT	249	ZP_03932026.1	fimbrial associated sortase family protein [Corynebacterium accolens ATCC 49725]	2,00E-39	98,76
LM-22	Folha	20	AG/CT	227	ACT98135.1	TNP2 transition protein 2 [Glycine max (L.) Merr.]	2,00E-17	61,11
LM-27	Folha	20	AG/CT	170	BAJ86690.1	Predicted protein in Hordeum vulgare var. distichum (Domesticated barley)	2,00E-22	85,71
LM-29	Bainha	5	AG/CT	141	XP_002445353.1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_07g011900 [Sorghum bicolor]	4,00E-10	64,44
LM-30	Folha	5	AG/GT	142	AAK13589.1	*rRNA intron-encoded homing endonuclease, partial [Oryza sativa].	4,00E-18	100,00
LM-39	Bainha	20	AG/CT	277	ZP_06064002.1	UDP-N-acetylmuramyl pentapeptide synthase [Acinetobacter johnsonii SH046]	1,00E-43	98,47
LM-40	Bainha	20	AG/CT	251	XP_546346.2	Similar to S-phase kinase-associated protein 2 isoform 1 [Canis familiaris]	3,00E-08	75,00
LM-41	Bainha	20	AG/CT	242	XP_002331606.1	Predicted protein [Populus trichocarpa]	5,00E-12	44,59
LM-44	Bainha	20	AG/CT	196	XP_002447406.1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g000520 [Sorghum bicolor]	4,00E-22	95,65
LM-49	Folha	5	AG/CT	194	XP_002447406.1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g000520 [Sorghum bicolor]	1,00E-26	93,75
LM-52	Folha	5	AG/CT	202	XP_002441639.1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_09g030760 [Sorghum bicolor]	6,00E-10	100,00
LM-53	Folha	10	AG/GT	247	XP_002455443.1	Unknown [Trifolium repens]	6,00E-31	77,89
LM-55	Folha	10	AG/GT	164	EEE59342.1	Hypothetical protein OsJ_11425 [Oryza sativa]	1,00E-09	53,70
LM-58	Folha	20	AG/GT	157	ZP_06726878.1	Ribonucleoside-diphosphate reductase	2,00E-24	100,00
LM-59	Folha	20	AG/GT	211	XP_001731432.1	Hypothetical protein MGL_1615 [Malassezia globosa CBS 7966]	3,00E-28	81,42

ainda não foram associados aos metabolismos da indução do florescimento, porém é provável que possa existir alguma relação entre os elementos transponíveis e o processo de indução do florescimento. Tamaki et al. (2015) em estudos com arroz sugeriram uma ligação entre a indução floral e a regulação dos elementos transponíveis.

Ainda, as sequências LM-11, LM-27 e LM-41 possuem similaridades com proteínas preditas de diferentes espécies. LM-11 e LM-41 possuem similaridade com essas em *Populus trichocarpa* (Árvore Choupos) e LM-27 em *Hordeum vulgare* (Cevada).

As LM-59, LM-21 e LM-39 provavelmente são sequências que não estão relacionadas com o metabolismo do florescimento, já que apresentaram similaridade com fungo (LM-59) e bactéria (LM-21 e LM-39). Estas podem ter sido proveniente de alguma contaminação durante a execução do experimento. A LM-40, apresentou similaridade com S-phase kinase-associada proteína 2 isoforma 1 em *Canis familiaris* (Cão), porém, esta sequência pode não ter sido oriunda de contaminação, já que proteínas codificadas por este gene são similares as encontrada em plantas. LM-53 apresentou similaridade com uma proteína não conhecida em *Trifolium repens* (Trevo branco) e LM-21 com a família de proteínas sortase em *Corynebacterium accolens* (bactéria). LM-58 com ribonucleoside-diphosphate reductase em *Escherinchia coli*, uma proteína componente da replicação nesta bactéria, provavelmente outra contaminação. Por fim, a LM-17 apresentou similaridade com um precursor putativo de gag-pol-orf2 em *Zea mays* (milho).

Como a maioria das sequências mostraram similaridade com genes que codificam proteínas preditas, hipotéticas e desconhecidas, as sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes foram confrontadas com o banco de domínio de proteína (Pfam) (Tabela 4).

A análise mais detalhada destas sequências no banco de domínio de proteínas mostrou que 26% apresentaram características que podem ser relacionadas à indução ao florescimento. Dentre as que se destacaram, as sequências LM-29 e LM-07 (proteínas hipotéticas em Sorgo) possuem três domínios (Tabela 4). Estas duas sequências possuem similaridade com o mesmo gene (XP_002445353.1) (Tabela 4). Dentre os domínios a qual pertence a proteína codificada por este gene, o domínio

Zinc knuckle destaca-se por estar envolvido nos processos de indução floral. De fato, a proteína Indeterminada 1 (ID1) que desempenha papel fundamental na regulação do florescimento em milho também é membro de uma família de Zinc-finger (KOZAKI et al. 2004). Da mesma forma, a proteína Cys-2/His-2 zinc-finger, codificada pelo gene *RDI1* está estreitamente relacionado a passagem do estágio vegetativo para o reprodutivo em plantas de arroz, sendo que, plantas mutantes e homozigóticas para o *RDI1* não florescem (WU et al.; 2008).

Grande parte dos Zinc-finger (função biológica) funcionam como módulo de interação que se ligam ao DNA, RNA, proteínas ou outras moléculas que são importantes no metabolismo. É importante ressaltar que as variações que ocorrem na estrutura destas moléculas servem principalmente para alterar a especificidade de ligação de uma proteína particular. Hoje, os estudos realizados na exploração deste domínio de proteínas nas plantas tem investigado as nucleases e fatores de transcrição de Zinc-finger (NOGUERO et al., 2013; PAUL; KUMAR, 2015; SUN et al., 2015; VENKATESH; PARK, 2015)

Chen e Ni (2006) por meio de um mutante de *Arabidopsis thaliana* chamado *RFI2*, que é insensível à percepção de vermelho e vermelho-extremo, perceberam que essa mutação afetou a expressão dos genes *CO* e *FT*, tanto em dia longos (16h de luz) quanto mais curtos (8 horas de luz). A região do DNA, em que houve a mutação, codifica uma proteína nuclear Zinc-finger tipo C3H2C3 ou de domínio RING que pode mediar as interações proteína-proteína. Estas sequencias que possuem similaridade com genes que codificam proteínas com o domínio Zinc knuckle podem estar diretamente relacionadas a indução do florescimento.

A sequência LM-40 se destaca por ter similaridade com um gene que codifica a proteína S-phase kinase-associated protein 2 isoform 1. Ainda, o domínio desta proteína (F-BOX) sugere forte relação aos processos de indução ao florescimento. Em *Arabidopsis thaliana*, planta facultativa de dia longo, as proteínas FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) são ativadas pela luz azul e promovem a floração através da regulação transcricional e pós-transcricional que regulam o gene *CO* em condições indutivas de florescimento, ou seja, fotoperíodo acima do crítico, dia longo (IMAZUMI et al., 2005). Han et al. (2015) estudaram os efeitos do F-BOX 1 (FKF1) em arroz, já que, diferente de *Arabidopsis thaliana* responde facultativamente ao

Tabela 4. Domínio e Família das proteínas transcritas dos genes que apresentam similaridade com as sequências.

Tratamento	Coleta (tempo)	Tecido	FDT Sequência	Pfam	Domínio	Descrição	Família	e-value
Indutivo (Situações 1, 3 e 5)	5 DIAS	B	LM-29	Retrotrans gag			Retrotransposon gag protein	1,30E-08
				RVT1			Reverse transcriptase	2,20E-27
				RVP2	Retroviral aspartyl protease			1,10E-29
				Rve	Integrase core domain			8,60E-12
				zf-CCHC	Zinc knuckle			2,00E-06
	20 DIAS	B	LM-39	Mur ligase	Mur ligase family, catalytic domain			1,7e-07
				F-box-like	F-box-like			1,7e-14
	20 DIAS	B	LM-41	DUF4283	Domínio de função desconhecida			1,2e-36
	10 DIAS	F	LM-02	Tryp alpha amyl			Protease inhibitor/seed storage/LTP family	1,3e-12
				Retrotrans gag			Retrotransposon gag protein	1,30E-08
	10 DIAS	F	LM-07	RVT1			Reverse transcriptase	2,20E-27
				RVP2	Retroviral aspartyl protease			1,10E-29
				Rve	Integrase core domain			8,60E-12
	20 DIAS	F	LM-19	zf-CCHC	Zinc knuckle			2,00E-06
				Dnaj	DnaJ domain			0,0029
20 DIAS	F	LM-22	Pinin SDK mesma			pinin/SDK/memA/ protein conserved region	0,0016	
			Transportase			Transposase family tnp2	1,1e-100	
20 DIAS	F	LM-22	DUF4218	Domínio de função desconhecida			4,0e-55	
			DUF4216	Domínio de função desconhecida			2,6e-28	
5 DIAS	F	LM-30	Transpos assoc	Transposase-associated domain			1,1e-21	
			não encontrado	não encontrado		não encontrado	----	
10 DIAS	F	LM-53	MULE	MULE transposase domain			1,4e-20	
			FAR1	FAR1 DNA-binding domain			3,8e-17	
20 DIAS	F	LM-59	SWIM	SWIM zinc finger			3,5e-05	
			PEPCK ATP			Phosphoenolpyruvate carboxykinase	4,8e-216	
Não indutivo (Situações 2, 4 e 6)	5 DIAS	F	LM-03	RVT1			Reverse transcriptase	9,5e-08
				RVT1			Reverse transcriptase	3,2e-40
	20 DIAS	F	LM-21	EXO endo phos	Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family			0,00018
				Sortase			Sortase Family	3,9e-26
	20 DIAS	F	LM-27	zf-BED	BED zinc finger			6,1e-06
				Sugar tr			Sugar (and other) transporter	4,3e-90
	5 DIAS	F	LM-52	não encontrado	não encontrado			----
				DDE Tnp 4	DDE superfamily endonuclease			4,9e-31
10 DIAS	F	LM-55	Myb DNA-bind 3	Myb/SANT-like DNA-binding domain			2,5e-29	
			Tryp alpha amyl			Protease inhibitor/seed storage/LTP family	1,3e-12	
Ind./Não ind. (Situações 7 e 8)	5 DIAS	B	LM-11	DUF4283	Domínio de função desconhecida			1,2e-36
				RVT1			Reverse transcriptase	1,2e-24
	10 DIAS	F	LM-17	RVT3	Reverse transcriptase-like			1,1e-22
				Sugar tr			Sugar (and other) transporter	4,3e-90
10 DIAS	F	LM-58	não encontrado	não encontrado			----	
						não encontrado	----	

fotoperíodo de dias curtos. A proteína OsFKF1 (FKF1 em arroz) induz o ativador floral *Ehd2* e regula negativamente a expressão do repressor floral *Ghd7*, estes expressam e suprimem o *Ehd1* (CO-like) em arroz, respectivamente (HAN et al. 2015). Ainda, estes mesmos autores perceberam que a OsFKF1 independe do fotoperíodo para induzir o florescimento em plantas de arroz, o que não ocorre em *A. thaliana* (ativadas pela luz azul) (HAN et al., 2015).

A sequência LM-53 apresenta similaridade com gene que codifica proteína que possui 3 domínios: MULE transposase, FAR1 DNA-binding e SWIM zinc finger. Reyes et al. 2004 relataram que a proteína transcrita pela região GATA, (proteína de domínio DNA-binding, classe IV de zinc finger na forma de CX2CX17–20CX2C seguida de uma região básica) é dependente da luz e nitrato. Estes domínios, quando confrontados com os bancos de sequências de plantas apresentaram similaridade com regiões de controle do florescimento (REYES et al., 2004).

Como resultado, estes autores encontraram que a região de domínio de GATA zinc finger, (polipeptídeos de diferentes subfamílias) são caracterizados pela presença de mais domínios: domínio acidic, domínio CCT (*CONSTANS*, *CO-like*, e *TOC1*), ou um domínio transposase-like, como encontrado em FAR1 e FHY3. A sequência LM-53 apresenta domínios de Zinc finger, MULE transposase e FAR1 DNA-binding, o que pode indicar relação com a indução ao florescimento. Mutantes para FAR1 e FHY3 apresentam redução na inibição do alongamento do hipocótilo quando exposto a luz de vermelho extremo sugerindo envolvimento destas proteínas com o fitocromo (REYES et al., 2004).

LM-19 (proteína hipotética em Sorgo) pertence à família de proteínas pinin/SDK/memA/ protein conserved region, e domínio DnaJ quando confrontada no Pfam. Em 2011, Shen et al. apontaram o J-domain como sendo um mediador da integração dos sinais do florescimento em *Arabidopsis thaliana*. Estes autores sugerem que ele medeia a regulação da transcrição dos genes *FLOWERING LOCUS T* e o *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*. Segundo estes autores, vários estímulos florais, como vernalização, fotoperíodo e GA (fitoregulador Giberelina) regulam a expressão de J3, que pertence ao mesmo domínio da proteína expressa pela sequência do gene que apresenta similaridade com a sequência LM-

19. Isto mostra a possível relação desta sequência com o metabolismo da indução do florescimento.

As sequências anteriormente apresentadas correspondem aos fragmentos retirados das situações (1,3 e 5) exclusivas do tratamento indutivo ao florescimento.

Dentre os FDEs que apareceram no tratamento não indutivo (situações 2, 4 e 6), a LM-27 (proteína predita em cevada) se destaca. Esta sequência tem similaridade com o gene que codifica a proteína de domínio BED zinc finger. Proteínas deste domínio se ligam ao DNA, o que pode sugerir que são fatores de transcrição. O resultado sugere que este fator de transcrição está presente somente quando a planta não está induzida ao florescimento, já que aparece somente quando em tratamento não indutivo. Provavelmente este fator de transcrição é reprimido durante a indução do florescimento.

Em gramíneas, muitos dos genes e proteínas envolvidos no processo de indução do florescimento ainda não foram caracterizados. Isto explicaria proteínas hipotéticas ou preditas. Além disso, é evidente que muitos dos FDEs identificados nos diferentes tratamentos fotoperiódicos não foram descritos neste trabalho, também devido aos poucos estudos realizados em cana-de-açúcar, o que dificulta o entendimento das proteínas diferencialmente codificadas nas situações aqui estudadas. Para algumas sequências, não foram encontrados domínios no Pfam (LM-30, LM-52 e LM-58), e outras, apresentaram domínios de função desconhecida (LM-41, LM-22 e LM-11).

As sequências aqui apresentadas possuem grandes chances de estarem envolvidas na indução do florescimento em cana-de-açúcar, principalmente, pelo fato de terem sido identificadas a partir de um experimento conduzido em condições controladas de indução de fotoperíodo, até então não realizado para cana-de-açúcar. Dentre os FDEs identificados, 63% não apresentaram similaridade com sequências depositadas nos bancos acessados, e provavelmente podem representar transcritos que codifiquem proteínas ainda não identificadas em cana-de-açúcar, não representados no Banco do SUCEST e demais bancos atualmente disponíveis. Ou ainda, podem ser RNAs reguladores, os quais não seriam traduzidos em proteína.

É evidente que, a maioria dos fragmentos que não apresentaram similaridade com nenhuma sequência foi proveniente de tecido da bainha foliar, mesmo explorando

quantidades semelhantes de fragmentos diferencialmente expressos nos dois tecidos. O tecido da bainha foliar, em cana, ainda não foi explorado em trabalhos desta natureza e possivelmente não há bibliotecas que possuam detalhes das expressões gênicas que ocorrem neste tecido. O maior banco de transcritos em cana-de-açúcar é o SUCEST (VETTTORE et al. 2003), neste banco, não há bibliotecas do tecido da bainha. Desta forma, este trabalho pode contribuir para incremento de bibliotecas e auxiliar em estudos posteriores.

Os estudos realizados neste trabalho são considerados iniciais, e posteriormente algumas sequências serão melhor analisadas por meio de PCR quantitativa. Esta análise mais profunda contribuirá para o conhecimento das vias que regulam a fase inicial do florescimento. Dentre as sequências, as LM-40, LM-19 e LM-53 são candidatas a validação por RT-PCR.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos foi possível concluir que:

- ✓ Cultivares que são considerados de difícil indução natural, induzem e chegam a florescer em regime artificial (controle artificial dos fatores ambientais) de indução ao florescimento.
- ✓ A técnica do cDNA-AFLP é eficiente, visto que encontrou muitos fragmentos diferencialmente expressos.
- ✓ Três sequencias, LM-40, LM19, LM-53 possuem grande potencial de representar alguma participação no repertório gênico do metabolismo da indução em florescimento em cana-de-açúcar.
- ✓ É provável que alguns dos FDEs obtidos possam estar envolvidos nos metabolismos da indução do florescimento, porém ainda não foram identificados na literatura.

7. REFERÊNCIAS

ABE, M.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, S.; DAIMON, Y.; YAMAGUCHI, A.; IKEDA, Y.; ICHINOKI, H.; NOTAGUCHI, M.; GOTO, K.; ARAKI, T. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science**, Washington, v. 309, n. 5737, p. 1052-1056, 2005.

ALEXANDER, A. G. **Sugar Cane Physiology**. 1973. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Scientific Publishing Company, 752p.

AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P. Identification of genes expressed during early somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. **Plant Physiology Biochemistry**, v.46, p. 559–568, 2008.

ARALDI, R.; SILVA, F. M. L.; ONO, E. O.; RODRIGUES J. D. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 694-702, 2010.

BACHEM, C. W. B.; HOEVEN VAN DER, R. S.; DE BRUIJN, S. M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, v. 9, n. 5, p. 745-753, 1996.

BACHEM, M. G.; SCHNEIDER, E.; GROß, H.; WEIDENBACH, H.; SCHMID, R. M.; MENKE, A.; SIECH, M.; BEGER, H.; GRUNERT, A.; ADLER, G. Identification, Culture, and Characterization of Pancreatic Stellate Cells in Rats and Humans. **Gastroenterology**, v.115, p. 421–432, 1998.

BERDING N, DUNNE V, SWAIN RS, OWENS WG. Tropical, managed initiation of sugarcane flowering: optimization of nonphotoperiodic variables. In: AUSTRALIAN SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGY, 26., 2004, Meringa. **Resumos...** Meringa: ASSCT, 2004. p.1-13.

BERDING N, PENDRIGH RS, DUNNE V. Can flowering in sugarcane be optimized by use of differential declinations for the initiation and developmental phases?. In: CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 26., 2007, Durban. **Resumos...** Durban: ISSCT, 2007. p. 699-711.

BERDING N, PENDRIGH RS, DUNNE V. Pursuing higher efficacy for managed photoperiodic initiation of sugarcane flowering in the tropics. In: AUSTRALIAN SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGY, 32., 2010, Gordonvale. **Resumos...** Gordonvale: ASSCT, 2010. p. 234-250.

BERDING, N. Improved flowering and pollen fertility in sugarcane under increased night temperature. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 863-867, 1981

BÖHLENIUS, H.; HUANG, T.; CHARBONNEL-CAMPAA, L.; BRUNNER, A. M.; JANSSON, S.; STRAUSS, S. H.; NILSSON, O. *CO/FT* Regulatory Module Controls

Timing of Flowering and Seasonal Growth Cessation in Trees. **Science**, Washington, v.312, n. 5776 ,p. 1040-1043, 2006.

BRADLEY,D.; RATCLIFFE,O.; VINCENT,C.; CARPENTER, R.; ANDCOEN, E. Inflorescence commitment and architecture in Arabidopsis. **Science**, v. 275, p.80–83. 1997.

BRETT, P. G. C., HARDING, R. L. Artificial induction of flowering in Natal. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 15., 1974, Mauritius. **Resumos...** Mauritius: ISSCT, 1974. p. 55-66.

BREYNE, P.; DREESEN, R.; CANNOOT, B.; ROMBAUT, D.; VANDEPOELE, K.; ROMBAUTS, S.; VANDERHAEGHEN, R.; INZE´, D.; ZABEAU M. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. **Molecular Genetics Genomics**, v.269, n. 2, p.173–179, 2003.

ČECHOVÁ, M.; BARÁNEK, B.; PIDRA, K. M. Screening of differentially expressed genes during the end of endogenous dormancy of flower buds in *Prunus armeniaca* L. **Plant Growth Regulation**, v. 67, n. 2, p. 141-150, 2012.

CHARNET, P., MOLLE, G., MARION, D., ROUSSET, M., LULLIEN-PELLERIN, V. Puroindolines form ion channels in biological membranes. **Biophysical Journal**, v. 84, p. 2416-2426, 2003.

CHEN, M.; NI, M. RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates *CONSTANS* expression and photoperiodic flowering. **The Plant Journal**, London, v. 46, n. 5, p. 823–833, 2006.

CLEMENTS, H. F.; AWADA, M. Experiments on the artificial induction of flowering in sugarcane. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 12., 1965, Quatre-Bornes. **Resumos...** Quatre-Bornes: ISSCT, 1965. p.795-812.

CLEMENTS, H.F. **Flowering of sugarcane: mechanics and control.** Honolulu: University of Hawaii, 1975, p. 92.

CLEMENTS, H.F. Lengthening versus shortening dark periods and blossoming in sugarcane as affected by temperature. **Plant Physiology**, v. 43, n. 1, p. 57-60, 1968.

COELHO, C. P.; COSTA NETTO, A. P.; COLASANTI, J.; CHALFUN-JUNIOR, A. A proposed model for the flowering signaling pathway of sugarcane under photoperiodic control. **Genetic Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1347-1359, 2013.

COELHO, P. C.; MINOW, M. A. A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; COLASANTI, J. Putative Sugarcane *FT/TFL1* genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne Switzerland, v. 5, n. 221, p. 1-12, 2014.

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

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Safra**. Disponível em : <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 11 nov, 2015.

CORBESIER, L.; COUPLAND, G. Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. **Plant, Cell & Environment**, Malden MA, v. 28, n. 1, p. 54-66, 2005.

COUPLAND, G. Genetic and environmental control of flowering time in Arabidopsis. **Trends in Genetics**, Cambridge, p. 11, n. 10, p. 393-397, 1995.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Quebec, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DORNELAS, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M. A genomic approach to elucidating grass flower development. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto SP, v. 24, n.1-4, p. 69-76, 2001.

ECKEY, C.; KORELL, M.; LEIB, K.; BIEDENKOPF, D.; JANSEN, C.; LANGEN, G.; KOGEL, K. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. **Plant Molecular Biology**, v.55, p. 1–15, 2004.

FAURE, S.; HIGGINS, J.; TURNER, A.; LAURIE, D. A. The *FLOWERING LOCUS T*-like gene family in barley (*Hordeum vulgare* L). **Genetics**, Bethesda, v. 176, n. 1, p. 599-609, 2007.

FERRARI, F. **Caracterização Cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*, Poaceae)**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia vegetal) – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo.

FIGUEIREDO, R. C.; BRITO, M. S.; FIGUEIREDO, L. H. M.; QUIAPIN, A. C.; VITORELLI, P. M.; SILVA, L. R.; SANTOS, R. V.; MOLFETTA, J. B., GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S. Dissecting the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database: unraveling flower-specific genes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto SP, v. 24, n. 1-4, p. 77-84, 2001.

FORNARA, F.; PANIGRAHI, K. C.; GISSOT, L.; SAUERBRUNN, N.; RUHL, M.; JARILLO, J. A.; COUPLAND, G. " Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. **Developmental Cell**, v.17, p. 75–86, 2009.

FORNARA, F.; DE MONTAIGU, A.; COUPLAND, G. SnapShot: Control of flowering in Arabidopsis. **Cell**, Tehran, v. 141, n. 3, p. 550–550, 2010.

FU, J.; WANG, L.; WANG, Y.; YANG, L.; YANG, Y.; DAI, S. Photoperiodic control of *FT*-like gene *C1FT* initiates flowering in *Chrysanthemum lavandulifolium*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 230-238, 2014.

GENDRON, J. M.; PRUNEDA-PAZ, J. L.; DOHERTY, C. J.; GROSS, A. M.; KANG, S. E.; KAY, S. A. Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 3167–3172, 2012.

GLASSOP, D.; RAE, A. L.; BONNETT, G. D. Sugarcane Flowering Genes and Pathways in Relation to Vegetative Regression. **Sugar Tech**, Delhi, v. 16, n. 3, p. 235-240, 2014.

GUIMARÃES, E. R. **Cigarrinha-Das-Raízes** Em Cana-De-Açúcar: Resistência Genotípica E Interação Planta-Praga. 2007.53f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, UNESP, São Paulo.

HAJIZADEH, H.; RAZAVI, K.; MOSTOFI, Y.; MOUSAVI, A.; CACCO, G.; ZAMANI, Z.; STEVANATO, P. Identification and characterization of genes differentially displayed in *Rosa hybrida* petals during flower senescence. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 320–324, 2011.

HAN, S.H.; YOO, S. C.; LEE, B. D.; AN, G.; PAEK, N. C. *Rice FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (OsFKF1)* promotes flowering independent of photoperiod. **Plant Cell Environment**, p. 1-14, 2015.

HANANO, S.; GOTO, K. Arabidopsis *TERMINAL FLOWER 1* is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. **PlantCell**, v. 23, p. 3172–3184, 2011.

HANZAWA, Y.; MONEY, T.; ANDBRADLEY, D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 7748–7753, 2005.

HUMBERT, R. P. **El cultivo de la caña de azúcar**. Cidade do México: Compañía Editorial Continental, 1974, p. 719.

IMAIZUMI, T., TRAN, H. G., SWARTZ, T. E., BRIGGS, W. R., & KAY, S. A. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in Arabidopsis. **Nature**, Londres, v. 426, n. 6964, p. 302–306, 2004.

IMAIZUMI, T.; SCHULTZ, T. F.; HARMON, F. G.; HO, L. A.; KAY, S. A. *FKF1 F-box* protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 309, n. 5732, p. 293-297, 2005.

JACKSON, S. D. Plant responses to photoperiod. **New Phytologist**, Lancaster LA, v. 181, n. 3, p. 517-531, 2009.

KOJIMA, S.; TAKAHASHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; MONNA, L.; SASAKI, T.; ARAKI, T.; YANO, M. *Hd3a*, a Rice Ortholog of the Arabidopsis *FT* Gene, Promotes Transition to Flowering Downstream of *Hd1* under Short-Day Conditions. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 1096–1105, 2002.

KOMIYA, R.; IKEGAMI, A.; TAMAKI, S.; YOKOI, S.; SHIMAMOTO, K. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. **Development**, v. 135, n. 4, p. 767-774, 2008.

KOORNNEEF, M.; ALONSO-BLANCO, C.; PEETERS, A. J. M.; SOPPE, W. Genetic Control of Flowering Time in *Arabidopsis*. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 345–70, 1998.

KOZAKI, A.; HAKE, S.; COLASANTI, J. The maize ID1 flowering time regulator is a zinc finger protein with novel DNA binding properties. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.32, n. 5, p. 1710–1720, 2004.

LIFSCHITZ, L.; EVIATAR, T.; ROZMAN, A.; SHALIT, A.; GOLDSHMIDT, A.; AMSELLEM, Z.; ALVAREZ, J. P.; ESHED, Y. The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.18, p. 6398-6403., 2006.

MACCOLL, D. Some aspects of the flowering of sugarcane in Barbados and its control in a breeding programme. **Annals of Botany**, Oxford, v. 41, n. 171, p. 191-201, 1977.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em : 24 set. 2015.

MATHIEU, J., WARTHMAN, N., KU'TTNER, F., & SCHMID, M. Export of FT Protein from Phloem Companion Cells is Sufficient for Floral Induction in *Arabidopsis*. **Current Biology**, Maryland Heights, v. 17, n. 12, p. 1055-1060, 2007.

MATÍAS-HERNÁNDEZ, L.; AGUILAR-JARAMILLO, A. E.; MARÍN-GONZÁLEZ, E.; SUÁREZ-LÓPEZ, P.; PELAZ, S. *RAV* genes: regulation of floral induction and beyond. **Annals of Botany**, Oxford, v. 114, n. 7, p. 1459–1470, 2014.

MATSUBARA, K.; HORI, K.; OGISO-TANAKA, E., YANO, M. Cloning of quantitative trait genes from rice reveals conservation and divergence of photoperiod flowering pathways in *Arabidopsis* and rice. **Frontiers in Plant science**, v. 5, n. 193, p. 1-7.

MELLONI, M. L. G.; MELLONI, M. N. G., SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; LANDELL, M. G. A.; PINTO, L. R. Flowering of Sugarcane Genotypes under Different Artificial Photoperiod Conditions. **American Journal of Plant Sciences**, v.6, n. 3, p. 456-463, 2015.

MIDMOORE, D. J. Effects of photoperiod on flowering and fertility of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Field Crops Research**, 3, 65-81, 1980.

MOORE, P. H. Physiology and control of flowering. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1., 1987, São Paulo. **Resumo...**São Paulo: CISBW. 1987. p. 101-127.

MOORE, P. H.; NUSS, K. J. Flowering and flower synchronization. In: HEINZ, D. J (Ed.), **Sugarcane Improvement through Breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 273-311.

NOGUERO, M.; ATIF, R. M.; OCHATT, R.; THOMPSON, R. D. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. **Plant Science**, v. 209, n. 2013, p. 32– 45, 2013.

NUSS, K. J. Synchronization of flowering to implement a proven cross breeding system in sugarcane. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 16., 1978, Mauritius. **Resumos...** Mauritius: ISSCT. 1978. p. 111-119.

NUSS, K. J., BERDING, N. Planned recombination in sugarcane breeding: artificial initiation of flowering in sugarcane in subtropical and tropical conditions. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 23., 1999, India,. **Resumos...** India: ISSCT. 1999. p. 504-508.

PATHAN, A. A. K.; DEVI, K. U.; VOGEL, H.; REINEKE, A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 12., p. 1231-41, 2007.

PAUL, A.; KUMAR, S. An A20/AN1-zinc-finger domain containing protein gene in tea is differentially expressed during winter dormancy and in response to abiotic stress and plant growth regulators. **Plant Gene**, v. 1, p. 1–7, 2015.

PEREIRA, A.R. . Previsão do florescimento em cana-de-açúcar. **Comunicação da Pesquisa Agropecuária**, São Paulo, v.3, n.6, p.15-16, 1985.

PUTTERILL, J.; LAURIE, R.; MACKNIGHT, R. It's time to flower: the genetic control of flowering time. **Bioessays**, v. 26, n. 4, p. 363-373, 2004.

PUTTERILL, J.; ROBSON, F.; LEE, K.; SIMON, R.; COUPLAND, G. The *CONSTANS* Gene of Arabidopsis Promotes Flowering and Encodes a Protein Showing Similarities to Zinc Finger Transcription Factors. **Cell**, v. 80, p. 847-857, 1995.

REYES JC, MURO-PASTOR MI, FLORENCIO FJ. The GATA Family of Transcription Factors in Arabidopsis and Rice. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p.1718-1732, 2004.
SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSEL, D. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Nova York: Cold Springs Harbour Press, 2001. p. 2344.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceeding of the National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCARPARI, M.S.; de BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e Botânica. IN: DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. . **Cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008, cap. 2, p.47-56.

SCHAFFER R, RAMSAY N, SAMACH A, CORDEN S, PUTTERILL J, CARRÉ, I. A.; COUPLAND, G. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. **Cell**, v. 93, p.1219–1229, 1998.

SETTA, N. DE; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; METCALFE, C. J.; CRUZ1, G. M. Q.; DEL BEM, L. E.; VICENTINI, R.; NOGUEIRA, F. T. S.; CAMPOS, R. A.; NUNES6, S. L.; TURRINI, P. C. G.; VIEIRA, A. P.; CRUZ, E. A. O.; CORRÊA, T. C. S.; HOTTA, C. T.; VARANI, SONIA VAUTRIN, A. M.; TRINDADE, A. S.; VILELA, M. M.; LEMBKE, C. G.; SATO, P. M.; ANDRADE, R. F.; NISHIYAMA JR, M. Y.; CARDOSO-SILVA, C. B.; SCORTECCI, K. C.; GARCIA, A. A. F.; CARNEIRO, M. S.; KIM, C.; PATERSON, A. H.; BERGÈS, H.; D'HONT, A.; SOUZA, G. M.; VINCENTZ, M.; KITAJIMA, J. P.; SLUYS, M. V. Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. **BMC Genomics**, v. 15, n. 540, p. 1-17, 2014.

SHANMUGAVADIVU, R.; RAO, P. N. G. Effect of Different Leaf Removal Treatments on Flowering in Certain Early Flowering Sugarcane Varieties. **Sugar Tech**, v. 12, n. 3–4, p. 329–332, 2010.

SHEN, L.; KANG, Y. G.; LIU, L.; YU, H. The j-domain protein j3 mediates the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 23, n. 2, p. 499–514, 2011.

SONG, Y. H.; SHIM, J. S.; KINMONTH-SCHULTZ, H. A.; IMAIZUMI, T. Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 66, p. 441-464, 2015.

STRAYER, C.; OYAMA, T.; SCHULTZ, T. F.; RAMAN, R.; SOMERS DE, M. P.; PANDA, S.; KREPS, J. A.; SA, K. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. **Science**, v. 289, p. 768–771, 2000.

SUAREZ-LÓPEZ, P.; WHEATLEY, K., ROBSON, F.; ONOUCHI, H.; VALVERDE, F.; COUPLAND, G. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 410, p.1116–20, 2001.

SUN, Z. H.; DING, C. H.; LI, X. J.; XIAO, K. Molecular Characterization and Expression Analysis of *TaZFP15*, a C2H2-Type Zinc Finger Transcription Factor Gene in Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 31-42, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 918.

TAMAKI, S.; TSUJI, H.; MATSUMOTOB, A.; FUJITAB, A.; SHIMATANIB, Z.; TERADAC, R.; SAKAMOTOA, T.; KURATAA, T.; SHIMAMOTO, K. *FT*-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 9, p. 901–910, 2015.

TAOKA, K.; OHKI, I.; TSUJI, H.; KOJIMA, C.; SHIMAMOTO, K. Structure and function of florigen and the receptor complex. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 287-294, 2013.

TORTI, S.; FORNARA, F.; ANDRÉS, V. C. F.; NORDSTROM, K.; GOBEL, U.; KNOLL, D.; SCHOOF, H.; COUPLAND, G. Analysis of the Arabidopsis Shoot Meristem Transcriptome during Floral Transition Identifies Distinct Regulatory Patterns and a LEUCINE-RICH REPEAT protein that Promotes Flowering. **The Plant Cell**, São Paulo, v. 24, p. 444–462, 2012.

TSUJI, H.; TAOKA, K.; SHIMAMOTO, K. Florigen in rice: complex gene network for florigen transcription, florigen activation complex, and multiple functions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 228–235, 2013.

UNICA, União da Indústria de Cana De Açúcar. **Safra 2015**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em 25 de out. de 2015.

VENKATESH, J.; PARK, S. W. Genome-wide analysis and expression profiling of DNA-binding with one zinc finger (DOF) transcription factor family in potato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94 , p. 73-85, 2015.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; SILVA, A. M.; FERRO, M. I. T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E. A.; LEMOS, M. V. F.; COUTINHO, L. L.; NOBREGA, M. P.; CARRER, H.; FRANÇA, S. C.; BACCI JR., M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S. L.; NUNES, L. R.; CAMARGO, L. E. A.; SIQUEIRA, W. J.; SLUYS, M.V., THIEMANN, O. H.; KURAMAE, E. E.; SANTELLI, R. V.; MARINO, C. L.; TARGON, M. L. P. N.; FERRO, J. A.; SILVEIRA, H. C. S.; MARINI, D. C.; LEMOS, E. G. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; TAMBOR, J. H. M.; CARRARO, D. M.; ROBERTO, P. G.; MARTINS, V. G.; GOLDMAN, G. H.; OLIVEIRA, R. C., TRUFFI, D.; COLOMBO, C. A.; ROSSI, M.; ARAUJO, P. G.; SCULACCIO, S. A.; ANGELLA, A.; LIMA, M. M. A.; ROSA JR., V. E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V. E.; MACHADO, M. A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S. M. Z.; NOBREGA, F. G.; MENCK, C. F. M.; BRAGA, M. D. V.; TELLES, G. P.; CARA, F. A. A; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and Functional Annotation of an Expressed Sequence Tag Collection for Tropical Crop Sugarcane. **Genome Research**, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VIVEIROS, V. C. A.; CASSALETT, D. C.; LÓPEZ, F. Y. Efecto de la edad de la planta y de diferentes tratamientos fotoinductivos en la floración de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.). **Acta Agronomica**, Bogotá, v. 41, p. 37-45, 1991.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J.D.; VAN EIJK, M.J. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. **Nature Protocols**, v.2, p. 1399–1413, 2007.

WU, C.; YOU, C.; LI, C.; LONG, T.; CHEN, G.; BYRNE, M. E.; ZHANG, Q. RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 35, p. 12915–12920, 2008.

XIAO, X.; LEI, J.; CAO, B.; CHEN, G.; CHEN, C. cDNA-AFLP analysis on bolting or flowering of flowering Chinese cabbage and molecular characteristics of BrcuDFR-like/BrcuAXS gene. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 7, p. 7525-7531, 2012.

XING, L.; LIU, X. M. Characterization of *Betula platyphylla* gene transcripts associated with early development of male inflorescence. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 2, p. 929-935, 2012.

XU, F.; RONG, X.; HUANG, X.; CHENG, S. Recent Advances of *Flowering Locus T* Gene in Higher Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 3773-3781, 2012.

XUE W., XING Y., WENG X., ZHAO Y., TANG W., WANG L., ZHOU, H.; YU, S., XU, C.; LI, X., ZHANG, Q. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. **Nature Genetics**, v. 40, p. 761–767, 2008.

YU, G.; DUAN, J.; YAN, H.; SONG, B.; HE, Z. cDNA-AFLP analysis of gene expression differences between the flower bud and sprout-shoot apical meristem of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 2, p. 274-279, 2011.

**T
E
S
E
/
M
E
L
L
O
N
I**

**M.
L.
G.**

**2
0
1
5**