



**VIVIANNY NAYSE BELO SILVA**

**EXPRESSÃO DE GENES DA ROTA DO  
FLORESCIMENTO DE CANA DE AÇÚCAR SOB  
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE  
PIRACLOSTROBINA NA CULTIVAR RB867515**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**VIVIANNY NAYSE BELO SILVA**

**EXPRESSÃO DE GENES DA ROTA DO FLORESCIMENTO DE CANA  
DE AÇÚCAR SOB INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE  
PIRACLOSTROBINA NA CULTIVAR RB867515**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Antonio Chalfun Júnior, PhD

Coorientador

Dr. Antônio Paulino da Costa Netto

**LAVRAS – MG**

**2015**

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

Silva, Vivianny Nayse Belo.

Expressão de genes da rota do florescimento de cana de açúcar  
sob influência da aplicação de Piraclostrobina na cultivar RB867515  
/ Vivianny Nayse Belo Silva. – Lavras : UFLA, 2016.

69 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmica)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Antonio Chalfun Júnior.

Bibliografia.

1. Estrobilurinas. 2. Expressão gênica. 3. *Saccharum* spp.. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**VIVIANNY NAYSE BELO SILVA**

**EXPRESSÃO DE GENES DA ROTA DO FLORESCIMENTO DE CANA  
DE AÇÚCAR SOB INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE  
PIRACLOSTROBINA NA CULTIVAR RB867515**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de Julho de 2015.

Dr. Antônio Paulino da Costa Netto

UFG

Dr. Adriano Teodoro Bruzi

UFLA

Antonio Chalfun Júnior, PhD  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Dedico aos meus pais Umberto Belo Batista e Chirle de Maria da Silva Belo, por serem a grande fonte de incentivo a minha carreira.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha eterna gratidão, por ser fonte inesgotável de amor. Senhor, toda honra e glória sejam dadas a ti, pois, tudo que tenho é porque Vós me destes.

Aos meus pais, Umberto Belo Batista e Chirle de Maria da Silva Belo, por todo o amor, carinho, apoio e compreensão oferecidos. Vocês são o meu exemplo.

Aos meus irmãos, Daniella Taíse Belo Silva e Dannillo Belo Silva, pelo imenso carinho e companheirismo.

Ao meu namorado, Elias Alves da Silva, por todo o amor, carinho, apoio e paciência, bem como por toda a sua ajuda, em todos os momentos. Você é muito especial para mim.

À Universidade Federal de Lavras por toda a estrutura oferecida a minha formação.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Antonio Chalfun Júnior, pelos ensinamentos, compreensão e confiança, os quais foram essenciais para a minha formação profissional.

Ao Professor Antônio Paulino da Costa Netto por todo o seu apoio, diálogo a respeito do presente trabalho e estímulo.

Aos meus queridos amigos que construí durante o mestrado, a saber, Daynara, Roniel, Fernando, Cleide e Iasminy. Obrigado pela vossa amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas. Em especial ao Cassio, Iasminy, Amanda e Christiane.

Aos funcionários da UFLA que sempre me auxiliaram durante o curso de mestrado. Meus sinceros agradecimentos à Daniele, Lena (*in memorium*), Barrinha, Joel, Odorêncio e Tanham.

Agradeço imenso a todos aqueles que contribuíram direta e/ou indiretamente para o desenvolvimento do presente estudo e, especialmente, para a minha formação profissional.

*“Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se eu não tivesse o amor, eu não seria nada”. Coríntios 13:2*



## RESUMO

O efeito verdejante com conseqüente ganho de produtividade após a aplicação de fungicidas com ingrediente ativo Piraclostrobina tem sido alvo de estudos em várias culturas. Entretanto, não se conhece o efeito deste ingrediente ativo em genes envolvidos com a rota do florescimento em cana de açúcar. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de Piraclostrobina nos genes *ScID1*, *ScFT1* e *ScFT2* obtidos na cultivar RB867515 de cana de açúcar. O experimento foi realizado em condições de campo na Fazenda Muquém pertencente à Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Estabeleceu-se em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições. O arranjo dos tratamentos foi em esquema fatorial 2 x 3, sendo dois níveis ou doses de fungicida e três períodos (dias) após a aplicação do fungicida. As coletas dos materiais vegetais foram realizadas aos 35, 65 e 85 dias após a aplicação (DAA) do fungicida Opera®. A análise dos dados foi realizada por meio do programa Rotor-Gene Series Pure Detection (Versão 2.0.2). Para o cálculo da expressão relativa de um gene alvo, foi calculada a sua eficiência de transcrição e o desvio Cq de uma amostra desconhecida em comparação com um controle, e expresso em relação a um gene de referência. Observou-se que o ingrediente ativo Piraclostrobina teve efeito na expressão dos genes *ScID1*, *ScFT1* e *ScFT2* obtidos na cultivar em estudo. Existe mudança no padrão de expressão do gene *ScID1* aos 35 DAA. Há mudança no padrão de expressão do *ScFT1* e ocorre inibição floral aos 65 DAA. Para o gene *ScFT2*, a mudança ocorreu no padrão de expressão aos 35 DAA para o grupo tratamento e controle, e aos 65 DAA para tratamento; ocorrendo inibição floral aos 65 DAA.

Palavras-chave: Estrobilurinas. Expressão gênica. *Saccharum* spp.

## ABSTRACT

The green effect with consequent productivity gains after application of Pyraclostrobin, a fungicide active ingredient, has been studied in various crops. However, the effect of this active ingredient toward genes involved in the flowering pathway in sugarcane is unknown so far. In this study, we aimed to evaluate the effect of Pyraclostrobin on *ScID1*, *ScFT1* and *ScFT2* genes found in sugarcane, RB867515 cultivar. This cultivar was grown at Muquém farm belonging to the Federal University Lavras, State of Minas Gerais. The experiment was established in randomized block design with three replications. Treatments were arranged in  $2 \times 3$  factorial scheme consisting of two levels or doses of fungicide, and three periods (days) after fungicide application. Collections of plant material were carried out at 35, 65 and 85 days after Opera® fungicide application. Data analyses were performed by using the Rotor-Gene Series Pure Detection Software (version 2.0.2). The relative expression of a target gene was obtained by estimating the transcription efficiency and Cq deviation of an unknown sample, compared to a control, and expressed in relation to a reference gene. We found that the application of Pyraclostrobin affects the expression pattern of *ScID1*, *ScFT1* and *ScFT2* genes in the cultivar under study. For *ScID1* gene, changes in terms of expression pattern occurred about 35 days after fungicide application. For *ScFT1* gene, changes in terms of its expression pattern and floral inhibition occurred about 65 days after fungicide application. For *ScFT2* gene, changes in terms of expression pattern occurred about 35 days after fungicide application for the treatment and control, and about 65 days after fungicide application only for the treatment. The floral inhibition for this gene occurred 65 days after fungicide application.

Key-words: Strobilurin. Gene expression. *Saccharum* spp.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cana de açúcar, Cultivar RB867515.....	18
Figura 2	Porcentagem de produção de cana de açúcar nos Estados do Brasil .....	19
Figura 3	Produção de açúcar por região.....	20
Figura 4	Estrutura molecular da sacarose (A) e do amido (B) .....	23
Figura 5	Fases do desenvolvimento da cana de açúcar .....	25
Figura 6	Estrutura química da Piraclostrobina .....	34
Figura 7	Composição do fungicida Opera®.....	35
Figura 8	Curva de eficiência do <i>primer ScGAPDH</i> (A) e <i>ScID1</i> (B) .....	53
Figura 9	Curva de eficiência do <i>primer ScFT1</i> (C) e <i>ScFT2</i> (D).....	53
Figura 10	Expressão relativa do gene <i>ScID1</i> no grupo controle (sem aplicação de Piraclostrobina) e no grupo tratamento (com aplicação de Piraclostrobina) aos 35; 65 e 85 dias após a aplicação (DAA). A barra ilustra o erro padrão e a seta em vermelho indica a amostra calibradora .....	56
Figura 11	Expressão relativa do gene <i>ScFT1</i> no grupo controle (sem aplicação de Piraclostrobina) e no grupo tratamento (com aplicação de Piraclostrobina) aos 35; 65 e 85 dias após a aplicação (DAA). A barra ilustra o erro padrão e a seta em vermelho indica a amostra calibradora .....	58
Figura 12	Expressão relativa do gene <i>ScFT2</i> no grupo controle (sem aplicação de Piraclostrobina) e no grupo tratamento (com aplicação de Piraclostrobina) aos 35; 65 e 85 dias após a aplicação (DAA). A barra ilustra erro padrão e a seta em vermelho indica a amostra calibradora .....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para extração de RNA de folha completamente expandida (FCE). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente.....	44
Tabela 2	Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para extração de RNA de folha imatura (FI). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente .....	45
Tabela 3	Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para tratamento com DNase de folha completamente expandida (FCE). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente .....	47
Tabela 4	Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para tratamento com DNase de folha imatura (FI). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente .....	48
Tabela 5	Componentes do mix para PCR convencional .....	49
Tabela 6	Condições do Termociclador .....	50
Tabela 7	Composição do RT master mix .....	50
Tabela 8	Condições do Termociclador .....	51
Tabela 9	Sequências dos <i>primers</i> utilizados .....	52

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1	Descrição botânica .....	17
2.2	Importância e cenário atual da cana de açúcar .....	18
2.3	Fisiologia da cana de açúcar .....	21
2.3.1	Fotossíntese .....	22
2.3.2	Fisiologia do desenvolvimento .....	23
2.3.3	Fases de cultivo .....	24
2.3.4	Florescimento em cana de açúcar .....	25
2.3.4.1	<i>IDI</i> .....	29
2.3.4.2	<i>FT</i> , <i>FT1</i> e <i>FT2</i> .....	30
2.3.5	Aspectos da maturação .....	31
2.4	Tipos de cultivares desenvolvidas .....	32
2.4.1	Cultivar RB867515 .....	33
2.5	Fungicida Piraclostrobina .....	34
2.5.1	Composição química .....	34
2.5.2	Modo de ação .....	35
2.5.3	Efeito fisiológico positivo da aplicação de Piraclostrobina .....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3.1	Local do experimento .....	39
3.2	Material vegetal .....	39
3.3	Tratamento e delineamento experimental .....	39
3.4	Aplicação do fungicida .....	40
3.5	Avaliações .....	40
3.6	Extração de RNA .....	40
3.6.1	Folha completamente expandida .....	41
3.6.2	Folha imatura .....	42
3.7	Tratamento com DNase .....	46
3.8	PCR e Gel de agarose .....	49
3.9	Síntese de cDNA .....	50
3.10	Expressão por PCR em tempo real .....	51
3.11	Elaboração dos gráficos .....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4.1	Expressão dos genes <i>ScIDI</i> , <i>ScFT1</i> e <i>ScFT2</i> .....	55
5	CONCLUSÕES .....	62
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63
	REFERÊNCIAS .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

A cana de açúcar (*Saccharum spp.*), pertence à família Poaceae e à classe das monocotiledôneas. É a principal fonte de matéria prima para a fabricação de produtos como açúcar, álcool (etanol) e aguardente; o que a torna uma importante fonte de renda e consequente desenvolvimento. Seu componente mais valioso é a sacarose, pois dela se obtém o açúcar e o álcool etílico, os dois produtos de maior exploração econômica (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2012). Ainda que esses produtos possam ser gerados a partir de outras plantas, atualmente a cana de açúcar destaca-se como a matéria prima mais utilizada, contribuindo com 89.527.366 toneladas de Açúcar Total Recuperável (ATR) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015).

Brasil ocupa uma posição de destaque na produção de açúcar e etanol, sendo considerado o primeiro País no mundo em relação ao abastecimento desses produtos (CONAB, 2015). Projeções positivas são esperadas para os próximos anos devido, principalmente, ao consumo interno do etanol e exportação do açúcar. O país possui disponibilidade de áreas cultiváveis, não afetando a produção de outros alimentos, além de tecnologia de produção e estrutura de distribuição (BRASIL, 2014).

No que se refere à área destinada para a atividade sucroalcooleira, estima-se que na safra de 2015/2016 serão cultivados cerca de 9.070,4 mil hectares. O estado de São Paulo continua como o maior produtor com 51,7% (4.687,6 mil hectares) de área total plantada, seguido por Goiás com 9,8% (891,6 mil hectares), Minas Gerais com 8,9% (808 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,5% (682,3 mil hectares), Paraná com 6,8% (620,1 mil hectares), Alagoas com 4,3% (386 mil hectares) e Pernambuco com 3% (276,3 mil hectares). Estima-se que a produção de açúcar cresça 5%, chegando a 37,35 milhões de toneladas; e, em relação à produção do etanol, estima-se que alcance

cerca de 29,2 bilhões de litros, incremento equivalente a 539,2 milhões de litros em relação à safra de 2014/15 (CONAB, 2015).

No entanto, essa alta produtividade pode ser influenciada negativamente pelo florescimento, em que as reservas de sacarose são reduzidas e revertidas em energia, levando à isoporização (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2012). Em função da isoporização, ocorrem mudanças na distribuição de água, redistribuição de nutrientes orgânicos e inorgânicos e diminuição nas reservas de carboidratos. Mesmo ocorrendo diferenças entre as cultivares, a isoporização resulta na diminuição na porcentagem de caldo de cana, com consequente aumento no teor de fibras; elevando a produção de bagaço (RODRIGUES, 1995).

A transição para o florescimento é caracterizada por alterações no padrão de morfogênese e diferenciação celular, sendo estimulado por fatores endógenos e/ou externos (TAIZ; ZEIGER, 2013). O florescimento paralisa o crescimento vegetativo do colmo, promovendo a perda em acúmulo de açúcar, e induzindo a planta a translocação de assimilados para formação da folha bandeira, a qual protege a inflorescência. Após o florescimento, a cultura entra em senescência; permitindo novas brotações e impactando negativamente na quantidade de açúcar acumulado; uma vez que a planta transloca assimilados para novos brotos (CONAB, 2015). Apesar desse processo ser considerado vantajoso sob ponto de vista evolutivo, estudos vem sendo desenvolvidos com o objetivo de evitar o florescimento em cana de açúcar, tanto por melhoramento genético como pelo uso de reguladores vegetais, objetivando o aumento da produtividade.

Entre as técnicas empregadas para a promoção da produtividade de culturas de interesse comercial, a utilização de fungicidas que tenham como ingrediente ativo a Piraclostrobina tem sido cogitada. Esta substância promoveu efeito fisiológico positivo quanto ao incremento na produtividade (VENANCIO

et al., 2003; TROJAN, 2009) observadas em culturas como milho (BARBOSA et al., 2011), trigo (TROJAN, 2009) e soja (RODRIGUES, 2009; SOARES et al., 2011). Em relação à cana de açúcar, os efeitos da aplicação de fungicidas com ingrediente ativo Piraclostrobina ainda são pouco conhecidos, o que tem estimulado as investigações fisiológica e molecular dessa substância em relação ao florescimento nesta cultura.

O gene INDETERMINATE1 (*IDI*), que é expresso em folha imaturas de milho (CONEVA; ZHU; COLASANTI, 2007), codifica um fator de transcrição que desempenha um importante papel na regulação da transição para floração, em que plantas mutantes *idl* apresentam uma fase de crescimento vegetativo prolongado e não formam flores normais (WONG; COLASANTI, 2007). Foi identificado um padrão de semelhança entre genes *IDI* em outras gramíneas, o que sugere uma possível semelhança dessa função (COLASANTI et al., 2006). Em cana de açúcar, foi isolada uma sequência parcial de *ScIDI*, sugerindo um possível papel no processo do florescimento da espécie (COELHO, 2010).

O gene FLOWERING LOCUS T (*FT*) afeta principalmente a indução da floração, sendo que esse gene é conservado entre espécies diferentes. O resultado do estudo com transgênicos demonstra que o *FT* pode promover a floração em plantas superiores (XU et al., 2012). Em cana, o *ScFT1* atua como repressor floral e a sua expressão varia sob condições indutiva e não indutiva (COELHO et al., 2014). Em beterraba (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*), o gene *BvFT1* atua reprimindo também a floração, sendo fundamental para respostas de vernalização, enquanto que o gene *BvFT2* é necessário para a floração (PIN et al., 2010). O *ScFT2* em cana está intimamente relacionado ao candidato *FT* em milho *ZCN8* e *ScFT1* (COELHO et al., 2014).

Dessa forma, buscou-se compreender se esse maior vigor vegetativo observado nas culturas frente à aplicação de fungicida com ingrediente ativo



Piraclostrobina seria responsável por postergar o florescimento em cana de açúcar. Com base nisso, o presente estudo foi elaborado com a finalidade de avaliar o efeito de Piraclostrobina nos genes *ScID1*, *ScFT1* e *ScFT2* obtidos na cultivar RB867515 de cana de açúcar, visando compreender a ação desta molécula sobre a expressão destes genes; contribuindo para o entendimento do controle do florescimento na espécie.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O florescimento em cana de açúcar é um processo fisiológico indesejável, apesar de ser inato no seu desenvolvimento, pois, afeta diretamente a produtividade da cultura. Dessa forma, torna-se fundamental a realização de estudos que visem promover maior produtividade, desvendando os aspectos moleculares envolvidos.

### 2.1 Descrição botânica

A cana de açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae e a classe monocotiledônea. As principais características desta família são a inflorescência na forma de espiga, crescimento do caule em colmo, folhas com lâminas de sílica nas bordas e bainha aberta (SANTOS et al., 2012). A descrição botânica mais detalhada é a seguinte:

Planta herbácea de raiz geniculada e em parte fibrosa; colmo arqueado na base, cilíndrico, simples, articulado e um pouco mais grosso nos internós, carnoso e com epiderme lenhosa de cor amarelada, verde ou violácea; folhas amplexicantes, 1 dísticas, planas, lineares, ápice agudo, ásperas, nervura central saliente e bainha espinescente; espiguetas com flores pequenas, hermafroditas; fruto do tipo cariopse ovóide, pequeno. (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002, p. 45).

Na forma nativa, trata-se de uma planta perene com hábito de crescimento ereto e levemente decumbente na fase inicial do seu desenvolvimento; sofrendo seleção por auto-sombreamento nas fases seguintes. Quanto ao crescimento em altura, este pode ser limitado devido a disponibilidade hídrica, baixas temperaturas e/ou florescimento (SANTOS et al., 2012) (Figura 1).



Figura 1 Cana de açúcar, Cultivar RB867515

Fonte: Canaufv

## 2.2 Importância e cenário atual da cana de açúcar

O cultivo da cana de açúcar é considerada uma das atividades agrícolas mais importantes do mundo na região tropical, criando milhares de empregos diretos e indiretos. A cana apresenta-se como importante fonte de renda e desenvolvimento, pois é a principal fonte de matéria prima para a fabricação de produtos tais como o açúcar, álcool (etanol) e aguardente, além de ser utilizada como forrageira. A sacarose é o seu componente mais valioso, pois, dela se obtêm os dois produtos de maior exploração, a saber, o açúcar e o álcool etílico (SANTOS et al., 2012).

O valor econômico dessa cultura é baseado em três atributos: ser altamente produtiva, utilizar eficientemente os insumos agrícolas e poder ser processada em produtos como açúcar, melaço e etanol (MOORE; BOTHA, 2014). Dessa forma, essa atividade apresenta um importante papel na economia

nacional, sendo Brasil considerado o primeiro país no mundo em relação ao abastecimento do açúcar e do etanol. O país possui disponibilidade de áreas cultiváveis, o que não afeta a produção de outros alimentos (BRASIL, 2014).

Dados evidenciam que a área destinada para a atividade sucroalcooleira na safra 2015/2016 é estimada em cerca de 9.070,4 mil hectares, na qual, o estado de São Paulo continua como o maior produtor nacional, com 51,7% (4.687,6 mil hectares) de área total plantada, seguido por Goiás com 9,8% (891,6 mil hectares), Minas Gerais com 8,9% (808 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,5% (682,3 mil hectares), Paraná com 6,8% (620,1 mil hectares), Alagoas com 4,3% (386 mil hectares) e Pernambuco com 3% (276,3 mil hectares) (CONAB, 2015) (Figura 2).

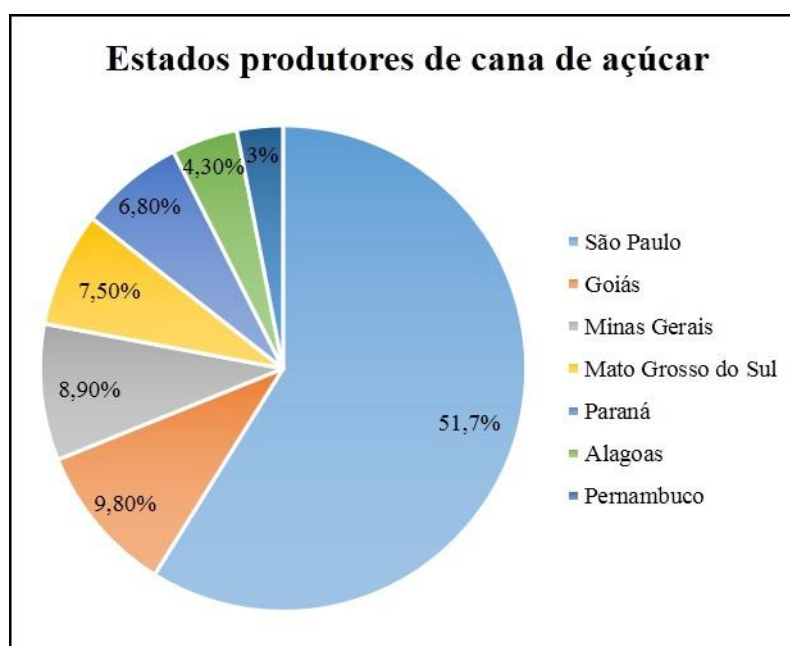


Figura 2 Porcentagem de produção de cana de açúcar nos Estados do Brasil  
Fonte: CONAB (2015).

Em relação a produção de açúcar na safra 2014/15, atingiu-se 35,36 milhões de toneladas. Para a safra 2015/16 estima-se um aumento de 5%, podendo atingir 37,35 milhões de toneladas. A região sudeste destaca-se dentre as regiões produtoras de açúcar, sendo responsável por cerca de 71,5% do açúcar produzido no país seguida da região Centro-Oeste (10,5%), Nordeste (9,6%), Sul (8,3%) e Norte (0,1%) (Figura 3). A produção de etanol total na safra 2014/15 foi de 28,66 bilhões de litros, sendo estimado para a safra 2015/16 um incremento de 539,2 milhões de litros (1,9%), totalizando 29,2 bilhões de litros.

Para o etanol anidro, a estimativa é que aumente de 11,73 bilhões de litros para 12,73 bilhões de litros, diferente do observado para o etanol hidratado, em que se estima uma redução de 2,8%, equivalendo a menos 467,4 milhões de litros (CONAB, 2015).

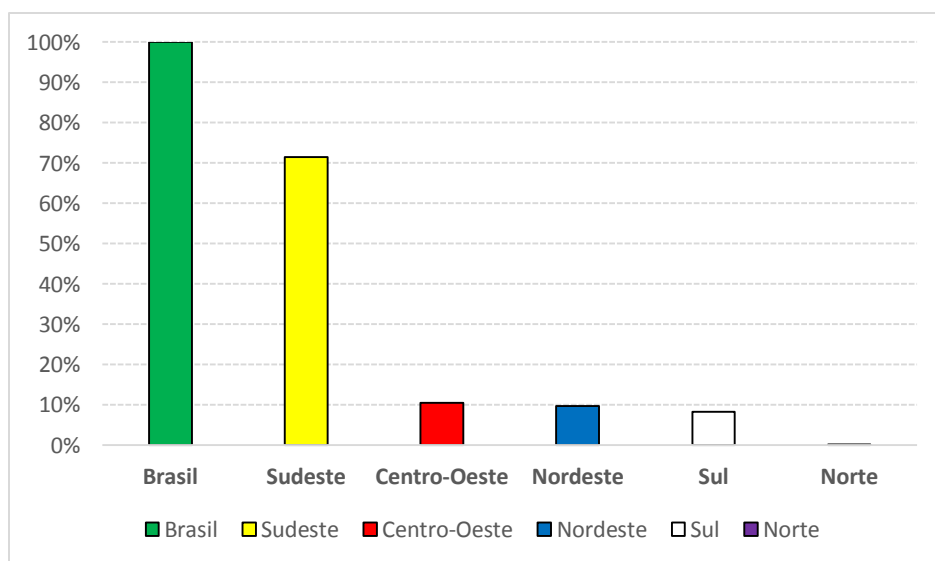


Figura 3 Produção de açúcar por região

Fonte: Adaptado de CONAB (2015).

Num estudo realizado no nordeste de Minas Gerais avaliou-se a produtividade e qualidade de três variedades de cana. O resultado mostrou que o efeito varietal foi significativo para a produção de açúcar, no qual as variedades RB867515 e RB92579 apresentaram valores de 17,51 e 19,00 t ha<sup>-1</sup> respectivamente, enquanto que a variedade SP791011 produziu 15,06 t ha<sup>-1</sup>, sendo 20% menos produtiva (OLIVEIRA et al., 2014).

Entre as plantas ricas em açúcares ou amido como milho (*Zea mays*), beterraba (*Beta vulgaris*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), a cana destaca-se por ser a mais simples e produtiva (NOVACANA, 2015). Este destaque justifica-se por sua anatomia e morfologia, que são capazes de sustentar habilidade especial em acumular grande quantidade de sacarose. A cana é considerada como um componente significativo da economia de vários países em regiões tropicais e subtropicais, servindo como alimento e matéria prima para a produção de bioenergia (MOORE; BOTHA, 2014). Brasil, além de ser considerado o maior produtor da cultura, seguido por países como Índia e China, destaca-se também como maior produtor de açúcar e etanol, chegando a produzir mais de 50% do açúcar comercializado no mundo e apresentando um importante papel ambiental pelo uso do etanol (CONAB, 2015).

### **2.3 Fisiologia da cana de açúcar**

O florescimento é um estágio fisiológico que interfere diretamente na produtividade de cana de açúcar. Dessa forma, é importante conhecer o comportamento fisiológico da espécie em questão.

### 2.3.1 Fotossíntese

A planta de cana apresenta um aparato fotossintético  $C_4$  (MAGRO et al., 2011), que é caracterizado pela produção de ácidos de quatro carbonos como produtos iniciais da fixação de  $CO_2$ , e destacando-se em ambientes de alta irradiação e temperaturas elevadas (SALISBURY; ROSS, 2012). É altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química, com taxa fotossintética calculada em até 100 mg de  $CO_2$  fixado por  $dm^2$  de área foliar por hora. Assim, a sua alta taxa de acumulação de biomassa ocorre devido a sua alta taxa fotossintética ao longo do período vegetativo e ao alto índice de área foliar (SANTOS et al., 2012).

As características das cultivares e as variações climáticas ocorridas durante o desenvolvimento da cultura influenciam nessa eficiência fotossintética, podendo a fotossíntese ser correlacionada negativamente e positivamente com a largura e a espessura da folha, respectivamente (RODRIGUES, 1995). Os resultados obtidos em estudo com as cultivares RB de cana de açúcar irrigadas por gotejamento demonstraram tendência crescente das correlações entre produtividade e radiação fotossinteticamente ativa e com a fotossíntese bruta acumulada durante o ciclo (FERREIRA JUNIOR et al., 2012).

Avaliando o efeito da temperatura do ar sobre a fotossíntese e o desenvolvimento inicial de cana, observou-se que, em baixas temperaturas, a eficiência fotossintética foi reduzida. Em altas temperaturas, a eficiência fotossintética não foi afetada, porém, nessa condição foi verificada a diminuição do diâmetro do colmo (GUERRA et al., 2013).

Os produtos finais da assimilação fotossintética para a maioria das plantas são a sacarose (Figura 4 A) no citosol e o amido (Figura 4 B) no cloroplasto (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim como nas demais plantas, em cana de açúcar, a sacarose e o amido são sintetizados a partir da triose fosfato gerados

pelo ciclo de Calvin. A sacarose é principal forma de carboidrato acumulado, a qual é translocada pelo floema. O amido é uma reserva estável e insolúvel de carboidrato, sendo uma forma compactada de conservação de energia (SANTOS et al., 2012).

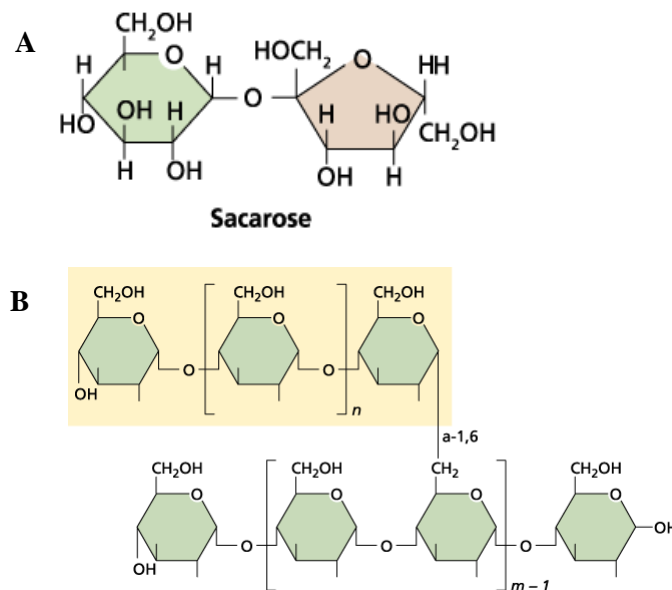


Figura 4 Estrutura molecular da sacarose (A) e do amido (B)

Fonte: Taiz; Zeiger (2013).

### 2.3.2 Fisiologia do desenvolvimento

O desenvolvimento refere-se ao conjunto de mudanças que um organismo experimenta ao longo do seu ciclo, desde a germinação até a senescência. Esse termo é qualitativo e engloba o crescimento e a diferenciação de células e/ou tecidos (LACERDA; ENÉAS FILHO; PINHEIRO, 2007).

Para a cana de açúcar, as raízes podem ser classificadas em dois tipos. As raízes *sett* são finas e com muitas ramificações, sendo responsáveis por



sustentar as plantas nas primeiras semanas após a brotação; e as raízes *shoot*, que são mais grossas e vigorosas que as raízes *sett*, e são responsáveis pelo suprimento de água e nutrientes. O caule é o órgão de reserva, também conhecido como colmo, podendo ser ereto ou decumbente. Suas folhas são divididas em duas partes, bainha e limbo, sendo separadas por uma junta no limbo. A inflorescência é uma panícula aberta denominada de “bandeira” ou “flecha” sendo constituída por milhares de flores. Cada flor é capaz de produzir uma semente (SANTOS et al., 2012), de modo que o tamanho, a cor e a formação é variável, sendo dependente da espécie ou cultivar (RODRIGUES, 2009; SANTOS et al, 2012). No cultivo comercial, emprega-se a propagação assexuada realizada através de uma porção do colmo (SANTOS et al., 2012).

### **2.3.3 Fases de cultivo**

A cultura apresenta os seguintes estádios de desenvolvimento: brotação de emergência, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação dos colmos. As características varietais irão definir o número de colmos por planta, comprimento e largura das folhas e arquitetura da parte aérea, sendo isso influenciado também pelo clima, manejo e práticas culturais (MAGRO et al., 2011) (Figura 5).

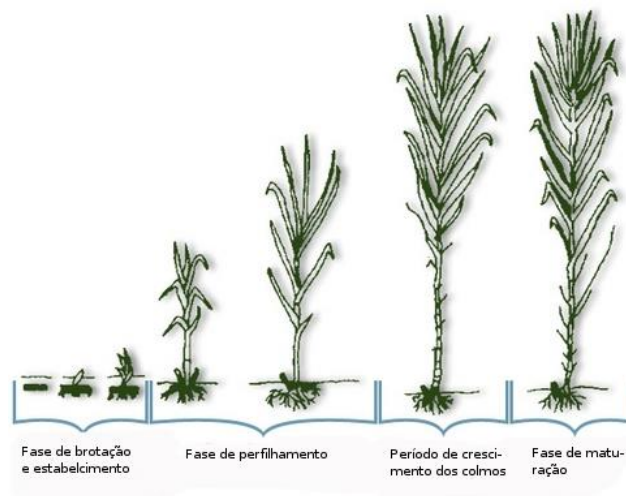


Figura 5 Fases do desenvolvimento da cana de açúcar

Fonte: Gascho e Shih (1993).

### 2.3.4 Florescimento em cana de açúcar

Como as outras plantas pertencente à família Poaceae a cana de açúcar floresce, frutifica e morre. Entretanto, esse processo normal é indesejável ao produtor (RODRIGUES, 1995), por afetar a produtividade final da cultura. O florescimento em cana é considerado um processo fisiológico complexo, o qual é formado por vários estádios de desenvolvimento, tendo cada estágio uma necessidade ambiental e fisiológica própria (ARALDI et al., 2010).

O florescimento pode ser dividido em quatro fases: (i) a transformação do meristema apical em gema floral; (ii) a transformação da gema floral em inflorescência; (iii) o desenvolvimento da inflorescência e da folha bandeira; e (iv) a emissão da inflorescência. Após a indução, inicia-se o desenvolvimento do eixo principal com as ramificações seguidas pelos ramos secundários. A partir disso forma-se a folha-bandeira responsável por proteger a inflorescência (SANTOS et al., 2012).

A terceira fase caracteriza-se pelo alongamento da bainha da folha bandeira e desenvolvimento da inflorescência. Esse alongamento é para fornecer espaço para a inflorescência, evitando a sua quebra. Concomitantemente, as espiguetas desenvolvem-se até a formação da estrutura completa, com o máximo desenvolvimento da bainha da folha-bandeira. A emissão da inflorescência seguida pela abertura das flores e polinização dura de quatro a cinco semanas; já a abertura das flores, formação de frutos e maturação não passa de duas a três semanas (SANTOS et al., 2012).

A indução floral em cana depende do comprimento/duração do dia. Quando for induzida pode durar até 14 semanas para a emergência da panícula e 2 a 3 semanas para maturação (GLASSOP; RAE; BONNETT, 2014).

No entanto, esse processo fisiológico é controlado por diversos fatores, os quais podem ser externos ou internos. Os fatores externos são caracterizados por fotoperíodo, temperatura, umidade, radiação solar e fertilidade do solo/nutrientes (ARALDI et al., 2010; GLASSOP; RAE; BONNETT, 2014); e os internos são caracterizados pelo fitocromo, hormônios, florígeno e ácidos nucleicos. Vale ressaltar ainda que a intensidade do processo e as consequências na qualidade de cana variam de acordo com a cultivar utilizada e o clima (ARALDI et al., 2010).

A cana é considerada uma planta sensível a luminosidade para desencadear o processo do florescimento. Ela irá somente florescer quando for submetida a dias com comprimentos inferiores a um fotoperíodo crítico, sendo portanto considerada uma planta de dias curtos. As melhores condições para a ocorrência do florescimento são fotoperíodos com 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com pequenas variações de temperatura (TOPPA et al., 2011). É importante mencionar que o fotoperíodo afeta também o comprimento do colmo, uma vez que foi constatado que em fotoperíodos de 10 a 14 horas houve um

aumento do colmo, mas em fotoperíodos longos, de 16 e 18 horas, houve redução no colmo (RODRIGUES, 1995).

A temperatura exerce maior influência no florescimento em localizações mais afastadas da linha do Equador. Temperaturas noturnas inferiores a 18°C por períodos maiores que dez dias, apresentam maior importância no processo de floração (RODRIGUES, 1995). Noites frias e temperaturas elevadas durante o dia seguida pela falta de umidade interferem no desenvolvimento inicial da flor (AUSTRALIA, 2004). Além da temperatura, destaca-se a radiação solar, principalmente, nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura, em que o prolongamento da fase juvenil, normal sob baixas temperaturas, ocorre devido à expansão da razão de área foliar mediante a alta radiação solar (RODRIGUES, 1995).

A distribuição irregular de chuvas, seguida de variação na umidade, afetam a fisiologia da produção e resulta em floração em cana de açúcar (MALI; SHRIVASTAVA; THAKARE, 2014). Quanto ao balanço de nutrientes, estes autores relatam que muitos fatores estão envolvidos com a floração em cana. Assim, esse balanço no interior da planta pode desempenhar papel importante no acúmulo de um estímulo para a floração no meristema apical (BRUNKHORST, 2001). Dentre os nutrientes, o nitrogênio encontra-se diretamente envolvido como o florescimento, de modo que altas doses são responsáveis por alterar a relação carbono/nitrogênio, resultando na diminuição do florescimento (SANTOS et al., 2012).

O fitocromo encontra-se diretamente envolvido com respostas fotoperiódicas. Existem normalmente duas formas de fitocromo: (i) a FVE (fitocromo vermelho extremo), que é instável mas fisiologicamente ativa; e (ii) a forma estável, mas fisiologicamente inativa, a FV (fitocromo vermelho). Assim, para a indução do florescimento em cana, há necessidade de baixas concentrações de FVE noturnas, até atingir a quantidade de horas mínima de

escuro, caso não haja iluminação por luz vermelha ou branca no período noturno. Ocorrendo qualquer iluminação, a concentração de FVE eleva-se, quebrando o estímulo (RODRIGUES, 1995).

Durante o florescimento, ocorre a diminuição do nível de auxinas, ocorrendo a translocação de outros hormônios para o meristema apical, sendo esse modificado e transformado em gema floral. O período de escuro nesse momento é importante para a síntese de substâncias ligadas à formação da flor, como o florígeno, e para a diminuição da concentração de fitocromo vermelho extremo (RODRIGUES, 1995). Um estudo recente sugere que o *ScFTI* atua como um repressor floral em cana, podendo estar associado a um sinal antiflorígeno originado em folhas maduras sob condições indutivas florais para contrabalancear o sinal do florígeno (COELHO et al., 2014).

Dessa forma, ao atingir a maturação e diante do estímulo ambiental adequado, ocorre a alteração do meristema apical de vegetativo para reprodutivo. Assim, o meristema não mais irá formar a folha primordia e passará a produzir a inflorescência. Esta, como já exposto anteriormente, é uma panícula aberta denominada de “bandeira” ou “flecha” sendo constituída por milhares de flores, cada capaz de produzir uma semente. O tempo estimado para que o meristema se modifique em gema floral será dependente da cultivar, podendo variar de 18 a 21 dias (SANTOS et al., 2012).

Apesar de este processo ser considerado vantajoso do ponto de vista evolutivo, estudos vem sendo desenvolvidos com objetivo de evitar o florescimento em cana, tendo em vista um aumento de produtividade. Os principais prejuízos relatados por este processo são descritos na literatura como a paralização do crescimento vegetativo do colmo; formação de novas brotações, em virtude da planta ter iniciado a fase de senescência; redução do tempo de armazenamento no campo e as reservas de sacarose são reduzidas e revertidas culminando na isoporização (SANTOS et al., 2012; CONAB, 2015).

#### 2.3.4.1 *IDI*

A proteína INDETERMINATE1 (*ID1*) apresenta um papel fundamental na regulação da transição para o florescimento em milho, sendo conhecida como uma proteína dedo-de-zinco com características únicas. O *ID1* é o membro fundador dessa família de genes, específica em plantas, definida por conter uma sequência de aminoácidos altamente conservada, denominada domínio ID (KOZAKI; HAKE; COLASANTI, 2004).

O domínio ID parece ser encontrado em todos os genomas de plantas superiores. A presença desse domínio mostra que o *ID1* se liga ao DNA sugerindo que os membros desta família de genes estejam envolvidos com a regulação da transcrição. Por meio de análise genômica comparativa, esse estudo demonstrou que a família dedo-de-zinco (IDD) é altamente conservada entre as monocotiledôneas e dicotiledôneas, no qual o padrão de expressão *ID1* específico de folha distingue-se dos outros genes *IDD* de milho analisados. Foi identificado um padrão de semelhança entre genes *ID1* em outras gramíneas, sugerindo possível semelhança na sua função (COLASANTI et al., 2006).

Em milho, o gene INDETERMINATE1 (*ID1*) é expresso em folhas imaturas (CONEVA; ZHU; COLASANTI, 2007), sendo a proteína ID1 detectada no núcleo de todos os tipos de células em folhas imaturas (WONG; COLASANTI, 2007). Ela codifica um regulador de transcrição que opera em folhas para mediar a transcrição para floração. O estudo sugere ainda que o *ID1* opera através de uma indução floral autônoma e distinta da via do fotoperíodo (CONEVA; ZHU; COLASANTI, 2007). Foi verificado também que plantas mutantes *idl* apresentam uma fase de crescimento vegetativo prolongado e não formaram flores normais (WONG; COLASANTI, 2007).

Em cana de açúcar foi realizado o isolamento da sequência parcial de *ScID1*, sugerindo que esse gene possivelmente age no processo de florescimento

nesta espécie. Assim como em milho, esse gene é expresso somente em folhas imaturas. Podendo a proteína ScID1 agir como um fator de transcrição, controlando o processo de florescimento na espécie (COELHO, 2010).

#### **2.3.4.2 *FT*, *FT1* e *FT2***

A percepção do sinal de duração do dia é notada pela folha, mas o mecanismo pelo qual esse sinal chega a parte aérea e onde ocorre a iniciação floral, ainda é desconhecido. Em *Arabidopsis thaliana*, essa resposta depende da indução floral do FLOWERING LOCUS T (*FT*). O mRNA do *FT* é considerado parte do estímulo floral móvel, no entanto, não se exclui a possibilidade de a proteína FT estar também em movimento e possivelmente ser responsável pela indução floral. Do mesmo modo, o *FT* pode induzir outros genes ou compostos da folha que se movem junto para induzir a floração. Resumidamente, a forma mRNA do *FT* constitui uma parte importante do estímulo floral que se move da folha ao ápice (HUANG et al., 2005).

O desenvolvimento da flor em plantas superiores é regulado por uma variedade de genes de floração. O gene FLOWERING LOCUS T (*FT*) afeta principalmente a indução da floração, sendo conservado entre espécies diferentes, podendo promover a floração pela via do fotoperíodo e facilitar a via da vernalização. No estudo usou-se o gene *FT-Like*, no qual o resultado com transgênicos demonstrou que o *FT* pode promover a floração em plantas superiores (XU et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado por meio de análise de expressão que *ScFT1* transcrito é expresso em folhas maduras de plantas em fase vegetativa e, curiosamente, foi detectado em folhas maduras de plantas com flores, sugerindo um possível papel de transição pós-florais. Foram também identificadas quatro outras sequências incompletas denominadas *ScFT2*, *ScFT3*, *ScFT4* e *ScFT5*.

Dentre estas, apenas o *ScFT2* está intimamente relacionado com candidato *FT* em milho *ZCN8* e *ScFT1*. Foi observada floração tardia em plantas de *Arabidopsis* com “overexpressing” do *ScFT1*, indicando que este gene atua ampliando a duração das fases de crescimento e manutenção do meristema da inflorescência em cana. Desse modo, foi proposto que o *ScFT1* atua como um repressor floral em cana e a expressão deste varia sob condições não indutiva e indutivas (COELHO et al., 2014).

### **2.3.5 Aspectos da maturação**

O processo de maturação em cana de açúcar pode ser definido como um processo fisiológico em que ocorre a formação de açúcares nas folhas e o seu deslocamento e armazenamento no colmo. Esse processo pode ainda ser definido sob três aspectos: (i) o botânico, no qual a cana só é considerada madura após a emissão de flores e formação de sementes. No caso de reprodução por toletes, a maturação ocorre quando as gemas apresentam condições de dar origem a novas plantas; (ii) o fisiológico, onde a maturação é observada no momento em que o colmo atinge o seu máximo armazenamento de sacarose; e (iii) o econômico que ocorre quando a cana atinge teor mínimo de sacarose de 13% do peso do colmo, tornando-a viável industrialmente (ROSSETTO, 2014).

Assim, este acontecimento é fisiologicamente determinado pelos processos que envolvem o engrossamento e alongamento das células da parede, aumento sensível da matéria seca, desidratação gradual, aumento e retenção da sacarose acumulada, diminuição do alongamento das folhas do colmo e seu desprendimento. Isto acontece continuamente devido a produção de trioses e hexoses, desde a produção da primeira folha até a folha-bandeira. Nesse período,



a acumulação destes produtos é proporcional ao processo fotossintético e inverso ao consumo das reservas (SANTOS et al., 2012).

Esse acúmulo de reserva é observado da base ao ápice do colmo, podendo ser intensificado pela redução de nutriente ou deficiência hídrica (SANTOS et al., 2012). Apenas os entrenós imaturos das folhas verdes e os entrenós superamadurecidos da base não retém quantidades de açúcar apreciável. Cada entrenó acumula o seu próprio açúcar mas os valores mais elevados são encontrados na direção do centro do colmo, diminuindo no sentido das pontas, sendo esta diferença mais acentuada nos entrenós mais jovens (RODRIGUES, 1995). Isto provavelmente remete a uma distribuição diferente de invertases, conteúdo mais invertase no meristema intercalar do que nos tecidos centrais do entrenó (SANTOS et al., 2012).

Dentre os fatores que interferem na maturação podem ser destacados os seguintes: disponibilidade de água, nitrogênio, potássio, fotoperíodo, reguladores vegetais, substância inibidora de crescimento e herbicidas (RODRIGUES, 1995).

#### **2.4 Tipos de cultivares desenvolvidas**

Visando assegurar rentabilidade ao setor sucroalcooleiro, é fundamental obter uma produtividade elevada de cana de açúcar. Diante disto, o melhoramento genético é um dos principais fatores agronômicos que podem contribuir para o aumento de produtividade, desenvolvendo cultivares mais adaptadas às condições adversas de clima, solo, pragas, doenças e ao sistema de colheita. Assim, a existência de muitas cultivares é considerada uma vantagem para o produtor (MARIN, 2014).

As cultivares de cana são classificadas em precoce, média e tardia para representar uma graduação relativa entre cultivares, para efeito de comparação

baseado na maturidade. Isto facilita o cultivo da cultivar no tempo apropriado para aumentar a recuperação e, como consequência, a produção de açúcar (NETAFIM, 2014).

#### **2.4.1 Cultivar RB867515**

A cultivar RB867515 apresenta como características morfológicas, o hábito de crescimento ereto com fácil despalha. O perfilhamento é médio e os seus colmos tem diâmetro médio e alta uniformidade. Apresentam entrenó cilíndricos com coloração verde arroxeadado sob a palha, sendo roxo intenso quando exposto ao sol. É observado pouca rachadura e suave ziguezague, tem aspecto liso e com pouca cera. O anel de crescimento apresenta largura média com coloração verde amarelada sob a palha e verde arroxeadado quando exposto ao sol. A zona radicular apresenta largura média sem enraizamento aéreo. O tipo pentagonal é observado em suas gemas, tendo tamanho médio, pouco proeminente ultrapassando o anel de crescimento e com poro germinativo apical. Além disso, apresenta almofada de largura estreita e deprimida (CATÁLOGO..., 2010).

Suas folhas apresentam largura média, são arqueadas, curvas e bordos com serrilhamento pouco agressivo. A bainha tem comprimento longo com quantidade regular de cera, sendo pouco joçal. Exibe duas aurículas, sendo uma lanceolada de tamanho médio e outra curta com forma transitória. Apresenta ainda lígula de forma crescente, com dewlap triangular. O seu palmito é médio, de coloração verde arroxeadado com pouca cera (CATÁLOGO..., 2010).

Em relação as características agroindustriais, esta cultivar apresenta boa capacidade de brotação mesmo em plantio tardio e sob baixas temperaturas. O florescimento pode ocorrer apresentando chocamento, o que não compromete a produção, devido seu crescimento expressivo. Esta cultivar apresenta boa

capacidade de brotação mesmo em plantio tardio sob baixas temperaturas. Em cana planta, no plantio de ano e meio, pode ocorrer tombamento ao final do ciclo devido a crescimento vigoroso. O corte recomendado é de junho a agosto, devido ao seu ciclo médio-tardio, sendo uma ótima opção a aplicação de maturadores. O seu teor de fibras é relativamente alto, podendo alcançar 13% (CATÁLOGO..., 2010).

## 2.5 Fungicida Piraclostrobina

O efeito verdejante com consequente ganho de produtividade observado em culturas após a aplicação de fungicidas que pertencem ao grupo químico das estrobilurina (Piraclostrobina) tem remetido à atenção de estudos que visem compreender como ocorre esse efeito fisiológico positivo.

### 2.5.1 Composição química

O produto comercial Opera® é um fungicida que apresenta em sua composição os ingredientes ativos, a Piraclostrobina (Figura 6) e o Epoxiconazol; e ingredientes inertes; como representado na Figura 7. Este fungicida apresenta ação sistêmica dos grupos químicos estrobilurina (Piraclostrobina) e triazol (EPOXICONAZOL) (BASF, 2014).

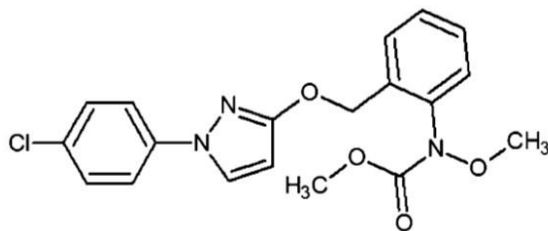


Figura 6 Estrutura química da Piraclostrobina

Fonte: Fulcher et al. (2014).

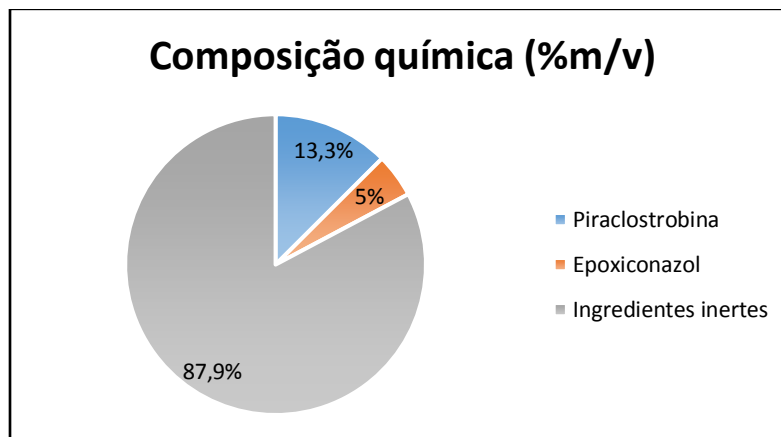


Figura 7 Composição do fungicida Opera®

Fonte: Basf (2014).

### 2.5.2 Modo de ação

O fungicida Opera® apresenta modo de ação duplo, atuando através dos ingredientes ativos PIRACLOSTROBINA e EPOXICONAZOL. Para a Piraclostrobina foi constatada a inibição no transporte de elétrons da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial dos fungos, inibindo a formação de ATP. Para o Epoxiconazol foi evidenciado a inibição na síntese do ergosterol, grupo de lipídios que constituem a membrana plasmática desses organismos (BASF, 2014). Em ambos os casos foi observada resposta positiva da ação deste fungicida, uma vez que os ingredientes ativos reduzem os processos metabólicos e afetam a composição estrutural dos fungos, respectivamente.

### 2.5.3 Efeito fisiológico positivo da aplicação de Piraclostrobina

Os grupos de compostos químicos extraídos do fungo *Strobilurus tenacellus* é denominado de estrobilurina. Estes compostos são inibidores de quinona oxidase (QoI), e sua toxicidade incide na inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo III, impedindo a transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, o que interfere na respiração do patógeno. Exemplos da estrobilurina mais comuns são azoxistrobina, metil-cresoxima, picoxistrobina, fluoxastrobina, orizastrobina, dimoxiystrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina (PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009).

Após o lançamento e evolução do grupo das estrobilurinas, o controle de doenças por meio de fungicidas adquiriu novas perspectivas, principalmente no que se refere ao efeito fisiológico positivo observado em diversas culturas (VENANCIO et al., 2003). Em trigo, o tratamento com Piraclostrobina, na dose de 250 g i.a.ha<sup>-1</sup>, aplicado ao final do perfilhamento não foi suficiente para o controle da doença, porém proporcionou resposta positiva quanto ao rendimento da cultura, atribuindo ao ingrediente ativo Piraclostrobina esse efeito fisiológico positivo (TROJAN, 2009).

Para a cultura da soja, foi realizado estudo com objetivo de avaliar o efeito fisiológico da aplicação da estrobilurina Piraclostrobina em diferentes cultivares. Constatou-se que a aplicação conjunta de Piraclostrobina e Epoxiconazol promoveram efeitos fisiológicos que maximizaram a produtividade de grãos, melhorando a qualidade do produto final. Os autores justificaram os resultados obtidos em função do aumento da fotossíntese líquida; aumento da atividade da enzima redutase do nitrato; diminuição da produção de etileno, com conseqüente redução da senescência e queda das folhas; aumento da fitomassa seca total; aumento da área foliar; aumento do teor de clorofila; diminuição da atividade da enzima polifenoloxidase; aumento dos teores de

citocininas; aumento do teor de giberelinas e do ácido indolbutírico; aumento da atividade das enzimas antioxidantes; diminuição da incidência de patógenos e tendência de aumento do teor de óleo na semente (RODRIGUES, 2009).

Tratando ainda da cultura da soja, este efeito fisiológico foi também observado por outros pesquisadores, onde a aplicação de Piraclostrobina afetou a taxa de assimilação de carbono e de nitrogênio; sendo isto refletido na produtividade dos grãos (FAGAN et al., 2010). Avaliando-se a produtividade de dezoito genótipos de sorgo frente à aplicação do fungicida epoxiconazol em conjunto com a Piraclostrobina, foi observada resposta variada entre alguns genótipos, porém, o genótipo 1G 282 obteve maior produtividade (ANSELMO et al., 2010).

A aplicação de Piraclostrobina em milho, no início do ciclo de desenvolvimento do dossel vegetativo, apresentou resultados benéficos para a cultura, sendo observado maior desenvolvimento do dossel vegetativo e incremento na produtividade de grãos. O tratamento da semente que apresentou melhores resultados para o índice de área foliar e a massa seca foi Piraclostrobina com o Metil Tiofanto na dose de  $0.1 \text{ L ha}^{-1}$  e Comet® (Piraclostrobina) na dose de  $0,3 \text{ L ha}^{-1}$ ; pulverizados 12 após a emergência (LIMA et al., 2009). Avaliando-se o efeito fisiológico e bromatológico em milho após a aplicação da estrobilurina Piraclostrobina, associada a diferentes doses de nitrogênio, constatou-se que essa aplicação na variedade híbrido DKB-330 aumentou a atividade da enzima nitrato redutase e a produtividade de grãos. Entretanto, não alterou os teores de proteína bruta e extrato etéreo (BARBOSA et al., 2011).

Além disso, foi caracterizado o efeito da Piraclostrobina em trigo sob condições de estresse e senescência, verificando-se a inibição na atividade da enzima sintase do ACC em 63%, bem como na síntese do etileno e nos níveis hormonais do ácido indol acético e ácido abscísico (KÖEHLE et al., 2002). Num outro estudo constatou-se que, em trigo, a aplicação de fungicida do grupo das

estrobilurinas promoveu a inibição da biossíntese de etileno, e que os níveis de auxina regulam a síntese de sintase do ACC (GROSSMANN; RETZLAFF, 1997).

Em cana de açúcar, num trabalho desenvolvido objetivando avaliar o controle da podridão de abacaxi usando fungicidas de rebolos no sulco de plantio, constatou-se que a aplicação de piraclostrobina e epoxiconazol; propiconazol; e piraclostrobina é eficaz para o controle desta doença. Neste trabalho, a aplicação apenas de Piraclostrobina, em casa de vegetação, não proporcionou ganhos significativos no que se refere à produtividade de colmos e rendimento em açúcar, porém, controlou de modo eficiente a doença, aumentou a brotação e foram observadas plantas mais vigorosas (CHAPOLA et al., 2014).

Avaliando características tecnológicas, produtividade e brotação de cana de açúcar (SP813250) referente a aplicação dos fungicidas Piraclostrobina e Piraclostrobina mais Epoxiconazol, e comparando os resultados com os obtidos por aplicação de maturadores comerciais, observou-se que os fungicidas Piraclostrobina mais Epoxiconazol e Piraclostrobina não obtiveram bons resultados nos ganhos de açúcar total recuperável e sacarose. Porém, a atuação em conjunto com o maturador fluazifop-butil apresentou maior brotação da soca e melhores ganhos em produtividade de colmo que resultou em maior quantidade de açúcar por hectare (FERNÁNDES; SEGATO; ROCHA, 2013).

A aplicação de fungicida com ingrediente ativo Piraclostrobina tem sido alvo de estudos em várias culturas de interesse comercial devido ao efeito fisiológico positivo, principalmente no que se refere ao aumento de produtividade. No entanto, pouco se sabe sobre a influência da Piraclostrobina no florescimento da cana de açúcar.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do experimento**

O experimento foi conduzido no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária da UFLA - Fazenda Muquém localizada no município de Lavras-MG, latitude 21.198551° sul e longitude 44.982641 a 940 metros de altitude. Outra parte foi realizada no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (<http://www.dbi.ufla.br/lfmp/>), no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Brasil, no período compreendido entre 2013/2014.

#### **3.2 Material vegetal**

O experimento foi constituído por uma cultivar de cana de açúcar (*Saccharum* spp.), a RB867515, com ciclo de maturação médio-tardio.

#### **3.3 Tratamento e delineamento experimental**

O experimento foi dividido em um grupo controle, sem a aplicação do fungicida; e um grupo tratado, o qual recebeu a aplicação do fungicida Piraclostrobina na dose de 1,0 L ha<sup>-1</sup>. O delineamento foi em blocos ao acaso com três repetições de plantas distintas, sendo que o arranjo dos tratamentos foi fatorial 2 x 3, sendo dois níveis ou doses de fungicida e três períodos (dias) após a aplicação do fungicidas.



### 3.4 Aplicação do fungicida

A aplicação do fungicida Opera® foi realizada nove meses após o plantio, utilizando um pulverizador costal de barra pressurizada com CO<sub>2</sub> munido de ponta modelo teejet-AIRX11002, com espaço entre os bicos de 0,5 metros a pressão de 2 bar. O volume de calda utilizado foi proporcional à 150 litros por hectare, sendo usado 1 litro de fungicida (BASF, 2014).

### 3.5 Avaliações

As avaliações foram realizadas aos 35, 65, 85 dias após a aplicação (DAA) do fungicida; referentes aos meses de abril (35 DAA) e maio (65 e 85 DAA). Para a análise foram utilizadas a primeira folha completamente expandida (folha 3+) para os genes *ScFT1* e *ScFT2* e a folha imatura para o gene *ScID1*. O material vegetal coletado em campo foi obtido de três folhas independentes (plantas distintas) sendo acondicionado em nitrogênio líquido até ser transferido para o ultrafreezer -80°C, onde permaneceu até as análises subsequentes.

### 3.6 Extração de RNA

As folhas foram maceradas utilizando nitrogênio líquido (-196°C). Para as folhas completamente expandidas utilizou-se o Protocolo de extração de RNA com QIAzol (Qiagen), e para folhas imaturas foi utilizado o Protocolo de extração de RNA com TRIzol (Lifetechnologies, 2012). Todos os materiais utilizados para a extração foram autoclavados por 20 minutos, exceto a água pois foi utilizada água comercial livre de RNase. A quantificação do RNA extraído foi realizada em espectrofotômetro (Nanovue®) a A260. Mediante a

quantificação e absorvância adequadas, em seguida, as amostras foram estocadas em ultrafreezer -80°C.

### **3.6.1 Folha completamente expandida**

O RNA total do tecido vegetal de cana de açúcar foi extraído usando o QIAzol® Lysis Reagent da Qiagen seguindo as instruções do fabricante, com pequenas alterações. Foram usadas três repetições biológicas de cada amostra e 100 mg de massa. Foi inicialmente adicionado 1mL de QIAzol para cada 100 mg de tecido macerado e agitado em vórtex para que o tecido descongelasse na presença do reagente. Em seguida, o material foi levado ao vórtex novamente por 30 segundos por amostra. Posto isto, o material foi colocado em temperatura ambiente por 5 minutos, em que os tubos foram mantidos na posição horizontal para aumentar a superfície de contato com o tecido macerado. Após este período, foram adicionados 300 µL de clorofórmio para cada 1 mL de QIAzol e homogeneizado no vórtex por 15 segundos. O material foi novamente deixado a temperatura ambiente, por 3 minutos, e os tubos mantidos deitados. Então, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 g a 4°C. Após isto, foram observadas três fases. Depois destas etapas o material foi sempre mantido em gelo. Em seguida, foram coletados 300 µL e transferidos para novos tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, e adicionados 500 µL de isopropanol para cada mL de Qiazol e vórtex de exatos por 30 segundos por amostra. Foi novamente deixado em temperatura ambiente, por 10 minutos. Após este período, foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 75% para cada mL de QIAzol e centrifugado por 10 minutos a 7500 g a 4°C. Em seguida, removeu-se completamente o sobrenadante, deixado as amostras secar por 10 a 15 minutos ou até o pellet estar seco. Por fim foi ressuspensando em 20 µL de água livre de RNase. Após isso

foram repetidos os seguintes passos: adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol e vórtex por 30 segundos por amostra, estas foram deixadas a temperatura ambiente por 10 minutos, e então centrifugadas a 12000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 75% por amostra e centrifugadas a 7500 g por 10 minutos a 4°C e, por fim, removido o sobrenadante deixando-as secar por 10 a 15 minutos ou até o pellet estar seco. Depois disso, ressuspendeu-se o pellet em 20  $\mu$ L de água livre de RNase. Os valores de quantificação e absorbância para folha completamente expandida foram adequados ao procedimento, como ilustrado na Tabela 1.

### **3.6.2 Folha imatura**

O RNA total do tecido vegetal de cana de açúcar foi extraído usando o TRIzol® Reagent da Life Technologies, seguindo as instruções do fabricante, com pequenas alterações. Foram usadas três repetições biológicas de cada amostra e 200 mg de massa. Foi inicialmente adicionado 1 mL de TRIzol por amostra, sendo homogeneizado em vórtex para que o tecido descongelasse na presença do reagente. Em seguida, o material foi levado ao vórtex novamente por 30 segundos. Posto isto, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, tendo os tubos sido mantidos na posição horizontal para aumentar a superfície de contato com o tecido macerado. Para cada 1 mL de TRIzol foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio e agitados com a mão por 15 segundos. Em seguida foram incubados a temperatura ambiente por 2 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 2°C. Após a centrifugação foram observadas 3 fases. Em seguida, o RNA total foi precipitado com a transferência da fase aquosa para o novo tubo adicionando 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de TRIzol, e misturando lentamente. Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente

por 10 minutos. Após este tempo, foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 2°C. Em seguida, iniciou-se a lavagem do RNA no qual o sobrenadante foi removido e o pellet lavado utilizando-se 1 mL de etanol 75% para cada mL de TRIzol. As amostras foram levadas ao vórtex por 15 segundos e depois centrifugadas a 7500 g por 5 minutos a 2°C. Em seguida, o RNA foi ressuspenso, o pellet foi seco a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e, depois, ressuspenso em 20 µL de água livre de RNase. As etapas de lavagem do RNA e a de ressuspenso foram repetidas. Os valores de quantificação e absorvância para folha imatura foram adequados ao procedimento como ilustrado na Tabela 2.

Tabela 1 Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para extração de RNA de folha completamente expandida (FCE). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente

EXTRAÇÃO DE RNA									
AMOSTRA	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	FOLHA	BLOCO	COLETA	Concentração (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	
19	C	1	FCE	1	1	499,60	1,998	2,044	
20	T	1	FCE	1	1	360,80	1,857	1,826	
21	C	2	FCE	2	1	749,20	2,010	2,217	
21	T	2	FCE	2	1	700,00	2,000	2,185	
23	C	3	FCE	3	1	555,60	1,987	2,187	
24	T	3	FCE	3	1	1011,00	2,026	2,135	
25	C	1	FCE	1	2	576,40	1,958	1,681	
26	T	1	FCE	1	2	622,00	2,022	1,994	
27	C	2	FCE	2	2	753,60	1,994	2,143	
28	T	2	FCE	2	2	2160,00	2,074	2,217	
29	C	3	FCE	3	2	744,80	2,006	1,964	
30	T	3	FCE	3	2	745,60	2,000	2,042	
31	C	1	FCE	1	3	556,00	1,955	1,839	
32	T	1	FCE	1	3	2423,00	2,018	1,976	
33	C	2	FCE	2	3	733,60	2,029	2,082	
34	T	2	FCE	2	3	860,80	1,987	1,928	
35	C	3	FCE	3	3	350,40	1,969	1,991	
36	T	3	FCE	3	3	672,40	2,018	2,050	

Tabela 2 Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para extração de RNA de folha imatura (FI). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente

EXTRAÇÃO DE RNA								
AMOSTRA	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	FOLHA	BLOCO	COLETA	Concentração (ng/µl)	A260/A280	A260/A230
1	C	1	FI	1	1	1326,00	1,966	2,436
2	T	1	FI	1	1	758,00	2,117	2,122
3	C	2	FI	2	1	401,20	1,963	2,382
4	T	2	FI	2	1	898,00	1,992	2,391
5	C	3	FI	3	1	631,60	1,991	2,367
6	T	3	FI	3	1	537,20	2,057	2,442
7	C	1	FI	1	2	1170,00	1,993	2,434
8	T	1	FI	1	2	698,80	2,024	1,742
9	C	2	FI	2	2	3662,00	1,972	2,446
10	T	2	FI	2	2	1069,00	2,005	2,437
11	C	3	FI	3	2	2590,00	2,004	2,483
12	T	3	FI	3	2	4798,00	1,857	2,199
13	C	1	FI	1	3	2149,00	2,004	2,573
14	T	1	FI	1	3	4990,00	1,806	2,118
15	C	2	FI	2	3	1288,00	2,037	2,190
16	T	2	FI	2	3	2230,00	2,015	2,524
17	C	3	FI	3	3	471,60	2,136	2,358
18	T	3	FI	3	3	2317,00	2,192	2,245

### 3.7 Tratamento com DNase

As amostras foram tratadas utilizando-se o kit Turbo DNA-free (Ambion), para a eliminação da contaminação de DNA residual. Foi inicialmente realizado o cálculo para definir a concentração necessária das amostras para prosseguir com a técnica. De acordo com os cálculos, foi primeiramente alíquotada a água comercial livre de RNase nos tubos, e posteriormente alíquotou-se o RNA. Em seguida, foi feito um *mix* contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de 10xTurbo DNase Buffer e 0,5  $\mu\text{L}$  de Turbo DNase por amostra, sendo adicionado em cada tubo 3,0  $\mu\text{L}$  do *mix*. Feito isto, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de DNase Inactivation Reagent, homogeneizando bem a solução antes de usar. As amostras foram então incubadas por 5 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos e, por fim, transferidos 15  $\mu\text{L}$  para novos tubos e estocado em ultrafreezer -80°C. Os dados de absorbância do tratamento com DNase também se mostraram pertinentes para folha completamente expandida (Tabela 3) e folha imatura (Tabela 4).

Tabela 3 Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para tratamento com DNase de folha completamente expandida (FCE). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente

TRATAMENTO COM DNase								
AMOSTRA	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	FOLHA	BLOCO	COLETA	Concentração (ng/µl)	A260/A280	A260/A230
19	C	1	FCE	1	1	141,60	1,844	1,727
20	T	1	FCE	1	1	108,00	1,862	1,636
21	C	2	FCE	2	1	168,00	1,963	2,039
21	T	2	FCE	2	1	118,80	1,880	1,632
23	C	3	FCE	3	1	130,80	1,935	1,858
24	T	3	FCE	3	1	126,80	1,832	1,843
25	C	1	FCE	1	2	113,60	1,856	1,881
26	T	1	FCE	1	2	148,80	1,869	1,842
27	C	2	FCE	2	2	134,80	1,852	1,812
28	T	2	FCE	2	2	103,20	1,940	1,955
29	C	3	FCE	3	2	132,80	1,855	1,876
30	T	3	FCE	3	2	144,40	1,890	1,910
31	C	1	FCE	1	3	201,60	1,946	1,853
32	T	1	FCE	1	3	118,00	1,941	1,941
33	C	2	FCE	2	3	141,20	1,858	1,829
34	T	2	FCE	2	3	132,80	1,886	1,757
35	C	3	FCE	3	3	139,20	1,944	2,148
36	T	3	FCE	3	3	153,60	1,959	2,259



Tabela 4 Valores das quantificações em espectrofotômetro (Nanovue®) para tratamento com DNase de folha imatura (FI). A coleta 1 ocorreu no mês de abril (aos 35 DAA) e as coletas 2 e 3 ocorreram em maio (aos 65 e 85 DAA), respectivamente

TRATAMENTO COM DNase									
AMOSTRA	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	FOLHA	BLOCO	COLETA	Concentração (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	
1	C	1	FI	1	1	166,40	1,908	2,000	
2	T	1	FI	1	1	202,40	1,931	1,969	
3	C	2	FI	2	1	155,60	1,861	1,995	
4	T	2	FI	2	1	135,20	1,867	1,910	
5	C	3	FI	3	1	174,00	1,867	1,883	
6	T	3	FI	3	1	103,90	1,799	1,704	
7	C	1	FI	1	2	164,00	1,847	2,040	
8	T	1	FI	1	2	184,00	1,917	1,974	
9	C	2	FI	2	2	148,80	1,888	1,927	
10	T	2	FI	2	2	156,40	1,898	1,844	
11	C	3	FI	3	2	142,40	1,914	1,914	
12	T	3	FI	3	2	185,20	1,945	1,996	
13	C	1	FI	1	3	136,80	1,911	1,829	
14	T	1	FI	1	3	160,40	1,928	1,831	
15	C	2	FI	2	3	149,20	1,893	1,884	
16	T	2	FI	2	3	150,40	1,899	2,077	
17	C	3	FI	3	3	158,00	1,899	1,965	
18	T	3	FI	3	3	156,00	1,902	2,021	

### 3.8 PCR e Gel de agarose

Foi realizada uma PCR convencional para verificar a presença de DNA genômico nas amostras tratadas com DNase, e para verificar a eficiência do tratamento. Para o efeito, foi preparado um *mix* contendo os componentes ilustrados na Tabela 5, partindo do maior para o menor volume. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 9  $\mu\text{L}$  do *mix* em cada tubo e 1  $\mu\text{L}$  do RNA tratado com DNase. O material foi, então, levado ao Termociclador (Tabela 6). Posteriormente, foi realizado um gel de agarose a 1,5% para verificar a sua integridade. Foram usados 70 mL de TAE 1 x, 1,05 g de agarose e 6  $\mu\text{L}$  de gel red. A corrida foi de 100 v por 30 minutos. O controle positivo foi sempre composto pelo *mix* e cDNA de cana, e o controle negativo pelo *mix* e água.

Tabela 5 Componentes do mix para PCR convencional

<b>Componente</b>	<b>1 Reação</b>
Buffer green	2 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu\text{L}$
dNTP	0,8 $\mu\text{L}$
Primer 1 - <i>ScCO</i> F: 5'GAGGAGGTCGCTCGAAGA3'	0,8 $\mu\text{L}$
Primer 2 - <i>ScCO</i> R: 5'GTCGGCGTGGCAGTACAC3'	0,8 $\mu\text{L}$
Gotaq	0,1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	3,5 $\mu\text{L}$

Tabela 6 Condições do Termociclador

Componente	Passo 1		Passo 2 (35x)		Passo 3	
Temperatura (°C)	94	94	58	72	72	4
Tempo	2	0,20s	0,50s	1min	10min	∞

### 3.9 Síntese de cDNA

As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram usadas para a síntese de cDNA, com o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Inicialmente, foi realizado o cálculo para a síntese de cDNA, mantendo a concentração por reação de 1  $\mu\text{L}$  e volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Em seguida, foi preparado o RT master *mix* no gelo Tabela 7. Deste, foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  em cada tubo. Foram também pipetados 10  $\mu\text{L}$  da amostra e misturado com a pipeta. Em seguida, os tubos foram brevemente centrifugados para eliminar bolhas de ar. Os tubos foram, então, levados ao Termociclador para a corrida de transcrição reversa, de acordo com as condições do Termociclador ilustradas na Tabela 8. Após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas no ultrafreezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Tabela 7 Composição do RT master mix

Componente	Volume da reação
10x RT buffer	2,0 $\mu\text{L}$
25x dNTP <i>mix</i> (100nM)	0,8 $\mu\text{L}$
10x random <i>primers</i>	2,0 $\mu\text{L}$
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 $\mu\text{L}$
Água nuclease-free	4,2 $\mu\text{L}$
Total por reação	10 $\mu\text{L}$

Tabela 8 Condições do Termociclador

Componente	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo (min)	10	120	5	∞

### 3.10 Expressão por PCR em tempo real

Para a análise da expressão gênica quantitativa dos genes *ScID1*, *ScFT1e* e *ScFT2*, foi utilizado o aparelho Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Qiagen) pelo sistema de detecção por SYBR Green. Foi realizado ensaio de quantificação absoluta para a determinação da curva padrão e eficiência dos *primers*. Em seguida, foi realizado o ensaio de expressão relativa, pelo método do Pfaffl. As amostras foram analisadas em triplicata. Para a avaliação de gene de referência, foi utilizado o gliceraldehide-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Os dados foram analisados por meio do programa Rotor-Gene Series Pure Detection (Versão 2.0.2). Para o cálculo da expressão relativa (R) de um gene alvo, foi calculado com base em E e o desvio CP de uma amostra desconhecida, em comparação com um controle, e expresso em relação a um gene de referência. Para o cálculo da expressão relativa foi utilizada a seguinte fórmula (PFAFFL, 2001):

#### a) Cálculo da expressão relativa

$$ratio = \frac{E_{alvo}^{\Delta CP_{alvo}^{(controle-amostra)}}}{E_{referência}^{\Delta CP_{referência}^{(controle-amostra)}}} \quad (1)$$

Onde,  $E_{alvo}$  é a eficiência de transcrição do gene alvo;  $E_{referência}$  é a eficiência de transcrição do gene de referência;  $\Delta CP_{alvo}$  é o desvio CP do

controle - amostra do transcrito do gene alvo;  $\Delta CP_{\text{referência}}$  é o desvio CP do controle - amostra do transcrito do gene de referência (PFAFFL, 2001).

Os *primers* usados estão descritos na Tabela 9 e a sua eficiência foi confirmada pela curva de eficiência para cada gene (Figuras 8 e 9)

Tabela 9 Sequências dos *primers* utilizados

<b>Sequência dos <i>primers</i></b>	
<i>ScID1</i> F	5'CCCTAACAATACCCTCTTCTTCC3'
<i>ScID1</i> R	5'GGTGGTGGTGGTGATGCT3'
<i>ScFT1</i> F	5'GGCTAATGACTCCCTGACGA3'
<i>ScFT1</i> R	5'CCATCCCTTCAAACACTGGT3'
<i>ScFT2</i> F	5'GACGCTGAGGGAGTATTTGC3'
<i>ScFT2</i> R	5'GCTGGAAGAGCACGAACAC3'
<i>ScGAPDH</i> F	5'CACGGCCACTGGAAGCA3'
<i>ScGAPDH</i> R	5'TCCTCAGGGTTCCTGATGCC3'

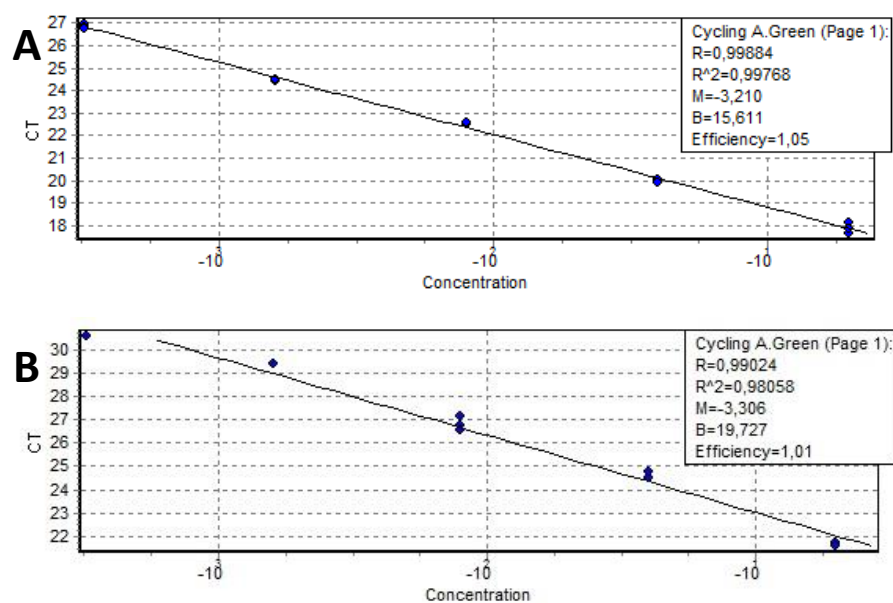


Figura 8 Curva de eficiência do *primer ScGAPDH* (A) e *ScIDI* (B)

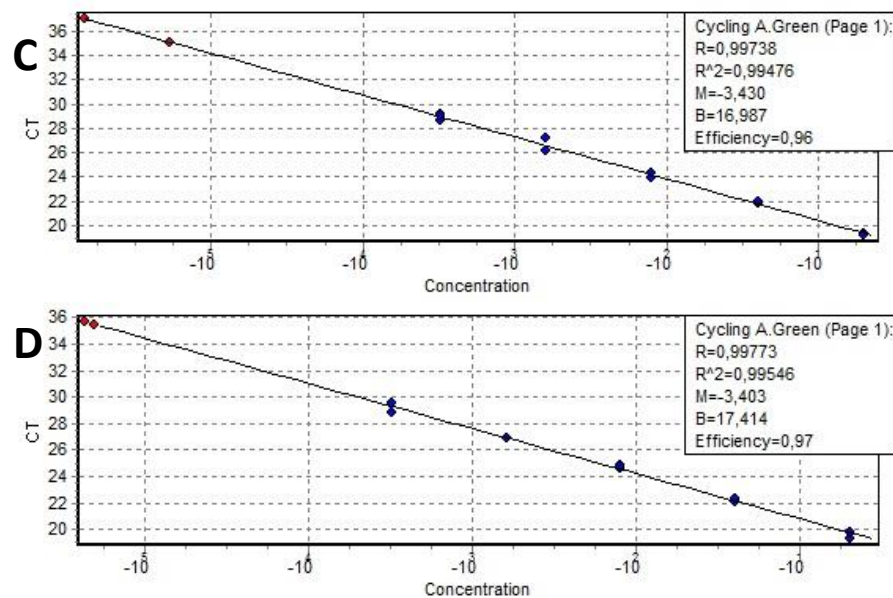


Figura 9 Curva de eficiência do *primer ScFT1* (C) e *ScFT2* (D)

### 3.11 Elaboração dos gráficos

Durante a elaboração dos gráficos referente à expressão gênica foi escolhida uma amostra calibradora que melhor representasse o resultado, para permitir uma comparação com as demais amostras. Esta escolha baseou-se no maior valor observado pela diferença entre o Cq do gene alvo e o Cq do gene de referência (Equação 2). Em seguida, foi efetuado o cálculo da expressão relativa e, posto isto, calculou-se o erro padrão e inseriu-se no gráfico.

#### b) Cálculo para a escolha da amostra calibradora

$$\text{Amostra calibradora} = Cq_{\text{gene alvo}} - Cq_{\text{gene de referência}} \quad (2)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Expressão dos genes *ScIDI*, *ScFT1* e *ScFT2*

A Figura 10 ilustra a expressão relativa do gene *ScIDI*. Ao comparar a amostra calibradora (grupo tratamento dos 65 DAA) com as demais, observou-se que aos 35 DAA o grupo controle e o tratamento apresentaram 1,22 e 2,94, respectivamente. Aos 65 DAA o controle foi de 1,59. Aos 85 DAA o grupo controle e tratamento apresentaram 1,92 e 1,20, respectivamente. Os resultados indicam que apenas o grupo tratamento dos 35 DAA apresentou mudança na expressão do gene. Comparando o controle com o tratamento, observou-se que aos 35 e 65 DAA os valores foram 2,4; 1,0 vez mais expressos, respectivamente. Aos 85 DAA obteve-se valores 1,5 vezes menos expressos. Isto sugere uma influência da Piraclostrobina no aumento da expressão do gene *ScIDI* até os 35 DAA. Estudo realizado com cana de açúcar demonstrou que a proteína ScID1 pode ser responsável por controlar o processo do florescimento, agindo como fator de transcrição (COELHO, 2010).

Em milho, o gene *ID1* apresenta papel fundamental na regulação da transição para o florescimento (MCSTEEN; LAUDENCIA-CHINGCUANCO; COLASANTI, 2000; KOZAKI; HAKE; COLASANTI, 2004; WONG; COLASANTI, 2007). Dessa forma, plantas com perda de função *idl* apresentam fenótipo característico como flor atrasada ou desenvolvimento anormal da flor (WONG; COLASANTI, 2007).

Avaliando a produtividade da cultivar RB867515 mediante a aplicação de Piraclostrobina, em estudo complementar, os resultados obtidos em campo indicam que a produtividade dos colmos (61,84 t ha<sup>-1</sup> e 48,80t ha<sup>-1</sup>, tratamento e controle, respectivamente) e a massa verde (67,69t ha<sup>-1</sup> e 55,08t ha<sup>-1</sup>, tratamento e controle, respectivamente) apresentaram maiores valores para o grupo que



recebeu a aplicação da Piraclostrobia. Dessa forma, além do efeito na expressão do gene ainda foi observado um incremento na produtividade da cultivar (LOPES, 2015)<sup>1</sup>.

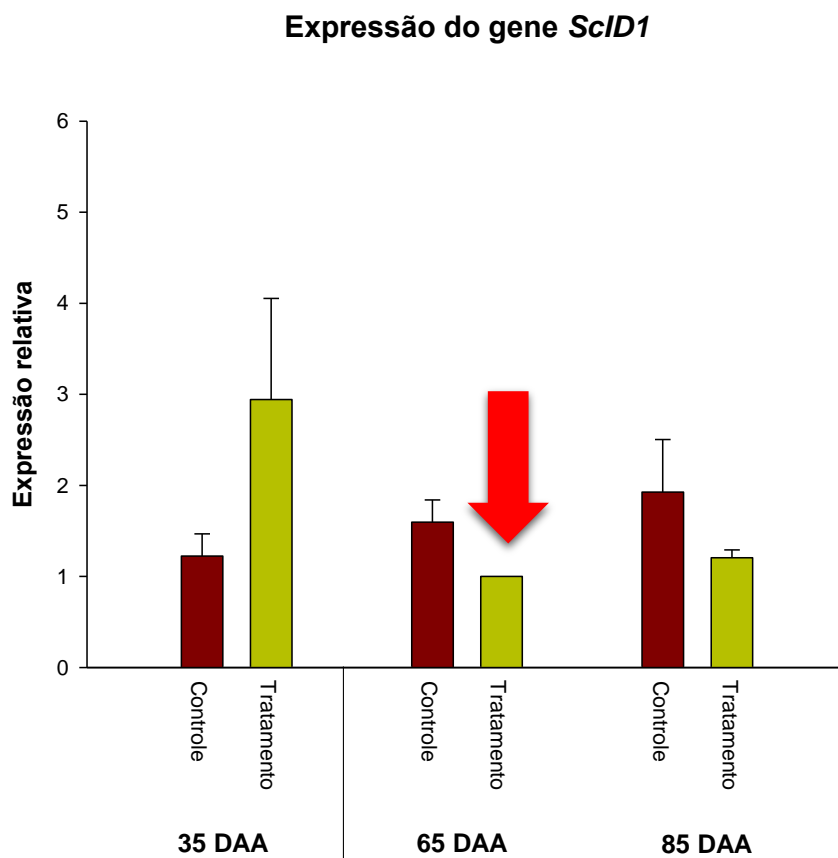


Figura 10 Expressão relativa do gene *ScID1* no grupo controle (sem aplicação de Piraclostrobina) e no grupo tratamento (com aplicação de Piraclostrobina) aos 35; 65 e 85 dias após a aplicação (DAA). A barra ilustra o erro padrão e a seta em vermelho indica a amostra calibradora

<sup>1</sup> LOPES, A. M. **Dados não publicados**. 2015. Esses dados serão publicados na tese de doutorado da pesquisadora Amanda Moreira Lopes a ser defendida no Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras no ano de 2016.

A Figura 11 ilustra a expressão relativa do gene *ScFTI*. Comparado à amostra calibradora (grupo tratamento dos 85 DAA), aos 35 DAA obteve-se 10,50 e 10,78 respectivamente para o grupo controle e o tratamento. Aos 65 DAA obteve-se 5,40 (controle) e 6,01 (tratado). Aos 85 DAA o controle foi 7,61 vezes mais expresso. Os resultados indicaram que houve mudança no padrão de expressão em todos os tempos de coleta quando comparados com a amostra calibradora. Comparando-se o controle com o tratamento, observou-se que aos 35 e 65 DAA os valores do tratamento foram 1,02 e 1,12 vezes mais expresso do que o controle, o que não ocorreu aos 85 DAA. Dessa forma, o período de inibição floral aos 65 DAA pode ser constatado pela diferença existente no padrão de expressão do *ScFTI*.

### Expressão do gene ScFT1

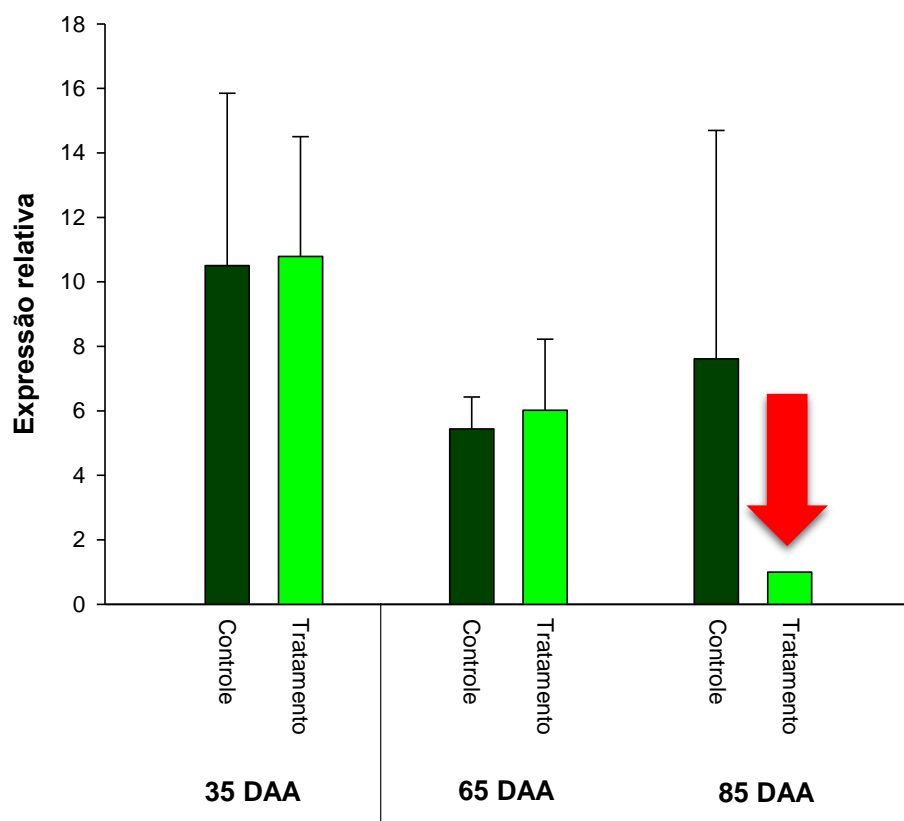


Figura 11 Expressão relativa do gene *ScFT1* no grupo controle (sem aplicação de Piraclostrobina) e no grupo tratamento (com aplicação de Piraclostrobina) aos 35; 65 e 85 dias após a aplicação (DAA). A barra ilustra o erro padrão e a seta em vermelho indica a amostra calibradora

Para o gene *ScFT2*, a amostra calibradora foi o grupo controle aos 85 DAA. Assim, observou-se que aos 35 DAA o grupo controle foi 4,93 vezes mais expresso, e o grupo tratamento foi 3,31 vezes mais expresso. Aos 65 DAA, esse nível de expressão foi de 1,69 para o controle e 2,77 para o tratamento. Aos 85 DAA, o nível de expressão do grupo tratamento foi de 1,87 (Figura 12). Os resultados indicam que os níveis de expressão mudaram apenas aos 35 DAA (controle e tratado) e aos 65 para o tratamento. Comparando o controle com o tratamento, este mostrou-se com valores mais elevados de expressão apenas aos 65 e 85 DAA, sendo 1,75 e 1,87, respectivamente. Dessa forma, os valores indicam que o período de inibição floral foi novamente constatado aos 65 DAA e que o nível de expressão o nível de expressão decresce com o tempo, tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado. Porém, o grupo que recebeu a aplicação do fungicida (tratado) aos 65 DAA e 85 DAA mostrou-se com níveis de expressão mais elevados que o grupo que não recebeu a aplicação de Piraclostrobina.

Com relação ao gene *FT*, o estudo destaca que este afeta a indução floral, promovendo a floração em plantas superiores (XU et al., 2012). Porém, em cana foi constatado que o *ScFT1* e o *ScFT2* atuam como repressores florais, podendo o *ScFT1* estar envolvido em atividades meristemáticas que controlam o tempo de floração e órgãos férteis (COELHO et al., 2014). Em beterraba (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*), esta evidencia foi também obtida. Com base nesse estudo afirma-se que o gene *BvFT1* atua reprimindo a floração (PIN et al., 2010) assim como as proteínas NtFT1, NtFT2 e NtFT3 que são também inibidores florais atípicos para proteínas FT-like em tabaco (HARIG et al., 2012). Desse modo, o exposto suporta a inferência de que o processo do florescimento foi inibido aos 65 DAA, tanto para o *ScFT1* quanto para o *ScFT2*, já que o grupo tratado (com aplicação do fungicida) apresentou valores de expressão superiores ao grupo controle (sem aplicação do fungicida). Estes fatos levam à afirmação de que a

aplicação do fungicida Opera® constituiu em uma alternativa viável para o produtor quanto ao controle do florescimento que foi observado aos 65 DAA, não ocorrendo o florescimento em campo das plantas utilizadas neste trabalho e constatando-se uma maior produtividade.

### Expressão do gene ScFT2

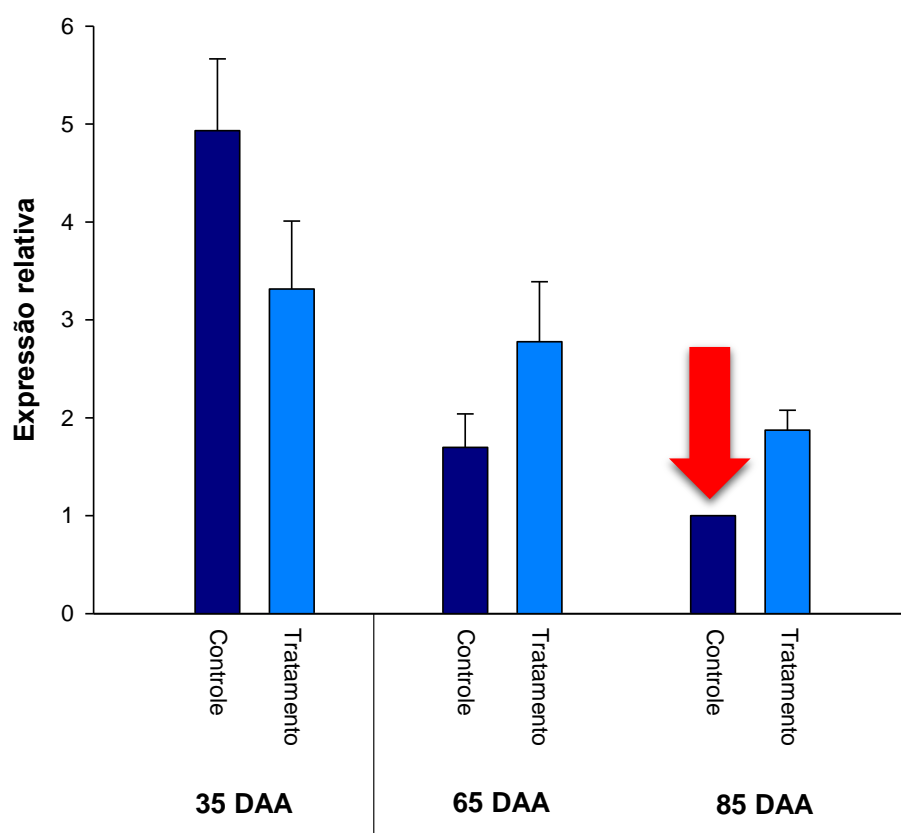


Figura 12 Expressão relativa do gene *ScFT2* no grupo controle (sem aplicação de Piraclostrobina) e no grupo tratamento (com aplicação de Piraclostrobina) aos 35; 65 e 85 dias após a aplicação (DAA). A barra ilustra erro padrão e a seta em vermelho indica a amostra calibradora

Na região centro-sul, o ano de 2015 apresentou uma tendência de maior favorecimento à ocorrência do florescimento do que no ano de 2014, sendo evidenciado esta condição em regiões que em anos anteriores não costumava ser tão frequente; afetando negativamente a produtividade dos canaviais. Outra questão relevante, referente as perdas, é o tempo que a cultivar florescida permanece no campo até ser colhida. Quanto maior for o tempo e as temperaturas e quanto menor for a disponibilidade de água, maior será o comprometimento da produtividade (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIERA, 2015). Assim sendo, a utilização de Piraclostrobina na cultivar RB867515 é uma alternativa viável ao produtor, visando maior ganho em produtividade, mediante a alterações no padrão de expressão dos genes *ScID1*, *ScFT1* e *ScFT2*.

## 5 CONCLUSÕES

A aplicação do fungicida com ingrediente ativo Piraclostrobina tem efeito na expressão dos genes *ScID1*, *ScFT1* e *ScFT2* na cultivar RB867515.

Existe mudança na expressão do gene *ScID1* no grupo tratamento aos 35 dias após a aplicação (DAA).

Para o gene *ScFT1*, há mudança no padrão de expressão quando comparado com a amostra calibradora em todos os tempos de coleta, e ocorre inibição floral aos 65 DAA.

Há mudança no padrão de expressão do *ScFT2* aos 35 dias após a aplicação (DAA) para o grupo tratamento e controle e aos 65 DAA para o tratamento. Aos 65 DAA existe inibição floral.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste estudo, pode-se verificar que a aplicação da Piraclostrobina na dose recomendada pelo fabricante na cultivar RB867515 promove resposta na mudança do padrão de genes relacionados com a rota do florescimento em cana de açúcar em alguns tempos de coleta, o que provavelmente afeta a produtividade final da cultura.

Assim, os resultados indicaram que a utilização da molécula do grupo das estrobilurinas, pode ser promissor para garantia da produtividade em cana, consistindo em estratégia inovadora que pode vir a garantir melhorias na cadeia produtiva da cultura. É importante que outros estudos sejam realizados para complementar o entendimento do efeito desta molécula no florescimento de cana de açúcar.



## REFERÊNCIAS

- ANSELMO, J. L. et al. Efeito de fungicida na produtividade em cultivares de sorgo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. 1 CD-ROM.
- ARALDI, R. et al. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 694-702, mar. 2010.
- AUSTRALIA. Department of Health and Ageing. Office of the Gene Technology Regulator. **The biology and ecology of sugarcane (*Saccharum spp. hybrids*) in Australia**. 2004. Disponível em: <[http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/\\$FILE/biologysugarcane.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/$FILE/biologysugarcane.pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2015.
- BARBOSA, K. A. et al. Aplicação de estrobilurina na cultura do milho: alterações fisiológicas e bromatológicas. **Revista do Centro Universitário de Patos de Minas**, Patos de Minas, v. 2178, n. 2, p. 7662, set. 2011.
- BASF. **Fungicidas**: opera fungicida. 2014. Disponível em: <[http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt\\_BR/content/APBrazil/solutions/fungicides/fungicides\\_product/OPERA](http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt_BR/content/APBrazil/solutions/fungicides/fungicides_product/OPERA)>. Acesso em: 01 jul. 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Cana-de-açúcar**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 16 maio 2015.
- BRUNKHORST, M. A preliminary investigation into the effect of plant nutrient levels on sugarcane flowering. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Mount Edgecombe, 2001. p. 143-150.
- CATÁLOGO nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, 2010. Disponível em: <<http://canaufv.com.br/catalogo/catalogo-2010.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2015.
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Boletim técnico**: florescimento. 2015. Disponível em: <[http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/ct\\_025\\_15\\_boletim\\_tecnico.pdf](http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/ct_025_15_boletim_tecnico.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2015.

CHAPOLA, R. G. et al. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em rebolos no sulco de plantio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 197-202, fev. 2014.

COELHO, C. P. **Identification and partial characterization of the flowering time gene ID1 in sugarcane**. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

COELHO, C. P. et al. Putative sugarcane FT/TFL1 genes delay flowering time and alter reproductive architecture in Arabidopsis. **Frontiers in plant science**, [S. l.], v. 5, May 2014.

COLASANTI, J. et al. The maize INDETERMINATE1 flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. **Bmc Genomics**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 158, June 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar**. Brasília, v. 2 (Safra 2015/16), n. 1 (Primeiro Levantamento), abr. 2015. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_04\\_13\\_09\\_39\\_02\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_1o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_09_39_02_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 16 maio 2015.

CONEVA, V.; ZHU, T.; COLASANTI, J. Expression differences between normal and indeterminate1 maize suggest downstream targets of ID1, a floral transition regulator in maize. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 58, n. 13, p. 3679-3693, Oct. 2007.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Unesp, 2002.

FAGAN, E. B. et al. Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 771-777, mar. 2010.

FERNÁNDES, M. D. S.; SEGATO, S. V.; ROCHA, D. R. D. Produtividade, açúcar e brotação de cana-de-açúcar submetida a fungicidas e maturadores. **Revista Científica da Fundação Educacional de Ituverava**, Ituverava, v. 10, n. 2, p. 323-338, out. 2013.

FERREIRA JUNIOR, R. A. et al. Crescimento e fotossíntese de cana-de-açúcar em função de variáveis biométricas e meteorológicas. **Revista Brasileira de**

**Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 11, p. 1229-1236, ago. 2012.

FULCHER, J. M. et al. Pyraclostrobin wash-off from sugarcane leaves and aerobic dissipation in agricultural soil. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S.l.], v. 62, n. 10, p. 2141-2146, Mar. 2014.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I. D.; PEET, M. M. (Ed.). **Crop-water relations**. New York: Wiley-Interscience, 1993. p. 445-479.

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

GROSSMANN, K.; RETZLAFF, G. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). **Pesticide Science**, [S.l.], v. 50, n. 1, p. 11-20, Jan. 1997.

GUERRA, A. et al. Efeitos da temperatura do ar na fotossíntese da cana-de-açúcar na fase inicial do desenvolvimento. **Agrarian**, Dourados, v. 7, n. 24, p. 211-217, dez. 2013.

HARIG, L. et al. Proteins from the FLOWERING LOCUS T-like subclade of the PEBP family act antagonistically to regulate floral initiation in tobacco. **The Plant Journal**, [S.l.], v. 72, n. 6, p. 908-921, Dec. 2012.

HUANG, T. et al. The mRNA of the Arabidopsis gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. **Science**, [S.l.], v. 309, n. 5741, p. 1694-1696, Oct. 2005.

KÖEHLER, H. et al. **Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants**. 2002. Disponível em: <[https://www.seedquest.com/id/b/basf/vitality/articles/Physiological\\_effects\\_of\\_the\\_strobilurin\\_fungicide.pdf](https://www.seedquest.com/id/b/basf/vitality/articles/Physiological_effects_of_the_strobilurin_fungicide.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2015.

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**, [S.l.], v. 32, n. 5, p. 1710-1720, Mar. 2004.

LACERDA, C. F. D.; ENÉAS FILHO, J.; PINHEIRO, C. B. **Desenvolvimento: crescimento, diferenciação e morfogênese (Unidade VIII)**. Apostila de Fisiologia Vegetal da UFC. 2007. Disponível em:

<[http://www.fisiologiavegetal.ufc.br/APOSTILA/CRESCIMENTO\\_DIFERENCIACAO.pdf](http://www.fisiologiavegetal.ufc.br/APOSTILA/CRESCIMENTO_DIFERENCIACAO.pdf)>. Acesso em: 01 jul. 2015.

LIFETECHNOLOGIES. **TRIZOL® Reagent** 2012. Disponível em: <[https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2015.

LIMA, A. D. S. et al. Efeito fisiológico de fungicida Pyraclostrobin e tratamento de sementes na cultura do milho. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, [S.l.], v. 2, p. 113-120, dez. 2009.

MAGRO, F. J. et al. **Biometria em cana-de-açúcar**. 2011. Disponível em: <<http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv0684/Biometria%20em%20cana-de-acucar%20exemplo%20de%20texto%20aluno.pdf>>. Acesso em: 16 dez 2015.

MALI, S.; SHRIVASTAVA, P.; THAKARE, H. **Impact of weather changes on sugarcane production**. 2014. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/267395358\\_Impact\\_of\\_weather\\_changes\\_on\\_sugarcane\\_production](https://www.researchgate.net/publication/267395358_Impact_of_weather_changes_on_sugarcane_production)>. Acesso em: 16 dez 2015.

MARIN, F. R. **Varietades**. 2014. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_42\\_1110200717570.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html)>. Acesso em: 01 jul. 2015.

MCSTEEN, P.; LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D.; COLASANTI, J. A floret by any other name: control of meristem identity in maize. **Trends in plant science**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 61-66, Feb. 2000.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: physiology, biochemistry and functional biology**. New Delhi: J. Wiley, 2014.

NETAFIM. 2014. Disponível em: <[http://www.sugarcane crops.com/p/agronomic\\_practices/improved\\_varieties/](http://www.sugarcane crops.com/p/agronomic_practices/improved_varieties/)>. Acesso em: 01 jul.2015.

NOVACANA. **Sobre o Etanol**. 2015. Disponível em: <<http://www.novacana.com/etanol/sobre-etanol/>>. Acesso em: 09 jun. 2015.

OLIVEIRA, M. W. de et al. Produção e qualidade de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas no nordeste de Minas Gerais. **Revista Ciência Agrícola**, Rio Largo, v. 12, n. 1, p. 17-20, 2014.

PARREIRA, D.; NEVES, W.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, [S.l.], v. 29, n. 9, p. e45-e45, Mar. 2001.

PIN, P. A. et al. An antagonistic pair of FT homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. **Science**, [S.l.], v. 330, n. 6009, p. 1397-1400, Nov. 2010.

QIAGEN. **QIAzol Lysis Reagent**. 2015. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/br/shop/sample-technologies/rna-sample-technologies/total-rna/qiazol-lysis-reagent/>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Unesp, 1995.

RODRIGUES, M. A. T. **Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura de soja**. 2009. 197 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11136/tde-24022010-165137/>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

ROSSETTO, R. **Maturação**. 2014. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_90\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_90_22122006154841.html)>. Acesso em: 01 jul. 2015.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia da plantas**. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol-tecnologias e perspectivas**. Viçosa, MG: UFV, 2012.

SOARES, L. H. et al. APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESTROBILURINAS NA CULTURA DA SOJA. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 18, n. 1, p.78-97, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmede, 2013.

TOPPA, E. V. B. et al. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 215-221, dez. 2011.

TROJAN, D. **Avaliação do efeito de piraclostrobina aplicada ao final do perfilhamento sobre a produtividade da cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 2009. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

VENANCIO, W. S. et al. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p. 59-68, Dec. 2003.

WONG, A. Y.; COLASANTI, J. Maize floral regulator protein INDETERMINATE1 is localized to developing leaves and is not altered by light or the sink/source transition. **Journal of experimental botany**, [S.l.], v. 58, n. 3, p. 403-414, Sept. 2007.

XU, F. et al. Recent advances of FLOWERING LOCUS T gene in higher plants. **International journal of molecular sciences**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 3773-3781, Mar. 2012.