Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

A difusão e assimilação de CO₂ em folhas C4 (*Saccharum spp.* e *Sorghum bicolor*) e suas relações com o nitrogênio foliar e o deficit hídrico

Naiara Célida dos Santos de Souza

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2016

Naiara Célida dos Santos de Souza
Engenheira Agrônoma

A difusão e assimilação de CO₂ em folhas C4 (*Saccharum spp.* e *Sorghum bicolor*) e suas relações com o nitrogênio foliar e o deficit hídrico

Orientador:
Prof. Dr. **VICTOR ALEXANDRE VITORELLO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Souza, Naiara Célida dos Santos de

A difusão e assimilação de CO₂ em folhas C4 (*Saccharum spp.* e *Sorghum bicolor*) e suas relações com o nitrogênio foliar e o deficit hídrico / Naiara Célida dos Santos de Souza. - - Piracicaba, 2016.

95 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fotossíntese 2. Condutância do mesofilo 3. PNUE 4. Limitação metabólica. I. Título

DEDICO

Aos meus pais Josué e Juvanilda,
Pelos ensinamentos e valores da vida

Meu esposo Yuri Ramos,
pelo amor, paciência e companheirismo

Meus irmãos Oniram e Mayane
por todo apoio, amor e carinho

Aos sobrinhos Maria Guadalupe, Lorenzo e João
Sementes da nossa família

Aos meus avôs Francisco e Adália, João e Valdete (*in memoriam*)
Raízes da nossa família

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, ESALQ/CENA, por todo suporte acadêmico e estrutural necessários para o desenvolvimento desta Tese.

À Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo que proporcionou o desenvolvimento deste trabalho, financiando-o (processo 2013/07665-8).

Ao curso de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, seus professores, servidores e alunos por todo aprendizado, suporte e amizade.

Ao professor Dr. Victor Alexandre Vitorello por compartilhar seu conhecimento e pelos momentos de aprendizado.

Ao professor Dr. Joaquim Albenísido Gomes da Silveira pelos conselhos e ensinamentos que me incentivaram para a realização deste doutorado.

Ao professor Dr. Rafael Ribeiro Vasconcelos por suas contribuições ao longo deste trajeto.

Ao Dr. Paulo E. R. Marchiori pelo auxílio no cálculo de parâmetros bioquímicos apresentados no III capítulo.

À Australia National University pelo aceite de estágio e por proporcionar toda estrutura necessária para o desenvolvimento de parte desta Tese.

À professora Dr. Susanne von Caemmerer, e todo seu grupo de pesquisa, por me receber tão bem em seu laboratório, pela confiança e por toda contribuição na minha formação.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa) pelo fornecimento das gemas para propagação dos materiais de cana-de-açúcar.

Ao Mestre Rafael Tassinari pela amizade, sugestões e suporte estatístico.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular e Celular: Jamille, Jonathas, Mariana, Sabrina e Rodrigo. Aos amigos do CENA que sempre foram tão atenciosos, em especial: Cleusa, Becão, Ana e Renata.

Aos meus grandes amigos Leandro Dias, Karine Cedraz, Mariana Bittencourt, Simara Melo e toda minha família que além do apoio, sempre entenderam meus momentos de ausência nestes últimos 6 anos, e ainda assim sempre me aguardavam de braços abertos.

“O sucesso nasce do querer da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

Papa Francisco

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. DIFUSÃO DE CO₂ EM FOLHAS DE SORGO: ALTERAÇÕES DA CONDUTÂNCIA DO MESOFILO COM A IDADE DA FOLHA E COM A NUTRIÇÃO NITROGENADA	11
RESUMO.....	11
ABSTRACT	11
2.1. INTRODUÇÃO	13
2.2. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	15
2.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
2.4. RESULTADOS	23
2.5. DISCUSSÃO	30
2.6. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS.....	34
3. VARIAÇÃO GENOTÍPICA EM PARÂMETROS ASSOCIADOS COM A FOTOSSÍNTESE E O NITROGÊNIO FOLIAR EM CANA-DE-AÇÚCAR	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT	41
3.1. INTRODUÇÃO	42
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.3. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	43
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
3.5. RESULTADOS	46
3.6. DISCUSSÃO	56
3.7. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61
4. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTAS AO DÉFICIT HÍDRICO E SUA RELAÇÃO COM A ASSIMILAÇÃO DE CO₂.....	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT	65
4.1. INTRODUÇÃO	66
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	67
4.3. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	67
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	74
4.5. RESULTADOS	74
4.6. DISCUSSÃO	85
4.7. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICES	95

A difusão e assimilação de CO₂ em folhas C4 (*Saccharum spp.* e *Sorghum bicolor*) e suas relações com o nitrogênio foliar e o deficit hídrico

RESUMO

O aumento para demanda na produção de alimentos associado a possíveis alterações climáticas globais tem promovido um interesse renovado em pesquisas envolvendo o metabolismo fotossintético. Acredita-se que com o melhoramento fotossintético a produtividade das culturas aumente. Para se alcançar este objetivo, além do uso de práticas biotecnológicas, ainda são necessários estudos abordando as limitações intrínsecas do processo fotossintético que possam contribuir com a identificação de alvos para a engenharia genética. Neste contexto, esta tese aborda perguntas específicas sobre a regulação da fotossíntese C4 pela nutrição nitrogenada, o deficit hídrico e a interação destes dois fatores. No primeiro capítulo experimental foi desenvolvido um estudo envolvendo os efeitos da nutrição nitrogenada na difusão interna de CO₂. Foi observado que o conteúdo de nitrogênio (N) foliar é determinante para a condutância interna de CO₂ ($\Delta^{18}O\text{-}gm$). Um menor conteúdo de N induz reduções iniciais em $\Delta^{18}O\text{-}gm$ devido menor atividade das enzimas carboxilativas. Conforme o conteúdo de N reduz em folhas mais velhas alterações na antomia passaram a contribuir com a regulação de $\Delta^{18}O\text{-}gm$. No segundo capítulo, foi explorada a variação genotípica de cana-de-açúcar quanto a parâmetros relacionados a fotossíntese e o nitrogênio foliar, envolvendo a eficiência de uso de nitrogênio fotossintética (PNUE) e índices de herdabilidade. A variabilidade dos materiais genéticos foi explicada principalmente pelos parâmetros de trocas gasosas que contribuíram com o agrupamento dos materiais em três grupos. A partir deste agrupamento é possível verificar as diferenças entre os materiais em resposta a nutrição nitrogenada. Além disto, parâmetros de trocas gasosas como a taxa de assimilação de CO₂ e condutância estomática junto com PNUE apresentaram altos índices de herdabilidade no sentido restrito. Por fim, o terceiro capítulo investigou a regulação do metabolismo de assimilação de CO₂ em resposta ao deficit hídrico em folhas de cana-de-açúcar e como o metabolismo de nitrogênio está envolvido neste processo. Diferentes fatores envolvidos na regulação negativa da fotossíntese foram identificados. Interessantemente, alterações nos componentes nitrogenados só contribuíram com a inibição metabólica na fase de estresse severo. Adicionalmente foi observado que a superação da inibição metabólica durante a reidratação é mais rápida quando a cultivar apresenta decréscimos mais lentos no metabolismo de N no período de seca, associado a menores danos na capacidade fotossintética.

Palavras-chave: Fotossíntese; Condutância do mesófilo; PNUE; Limitação metabólica

Diffusion and assimilation of the CO₂ in C4 plants (*Saccharum spp. e Sorghum bicolor*) its relationship with leaf nitrogen and water deficit

ABSTRACT

Increased demand for food production and the possibility of global climate change has promoted renewed interest in photosynthesis research. It is expected that with the photosynthetic improving the crop productivity increase. For this, besides of the use of biotechnological practices, further studies are needed about intrinsic limitations of the photosynthetic process that can contribute to the identification of targets for genetic engineering. In this context, this thesis discusses specific questions about photosynthesis regulation C4 by nitrogen nutrition, water deficit and the interaction of these two factors. In the chapter I, it was developed a study of the effects of nitrogen nutrition in the internal diffusion of CO₂. It was observed that the leaf nitrogen (N) is essential for the internal CO₂ conductance ($\Delta^{18}O\text{-}gm$). A lower leaf N induces initial reductions in $\Delta^{18}O\text{-}gm$ by lower activity of the carboxylation enzymes. With N leaf reduction in older leaves anatomy changes began to contribute to the regulation of $\Delta^{18}O\text{-}gm$. In the chapter II, the genotypic variation of sugarcane to photosynthetic parameters and leaf nitrogen was explored, involving the photosynthetic nitrogen use efficiency (PNUE) and heritability analysis. The variability of the genetic material is explained mainly by gas exchange parameters that contributed to the grouping of materials into three groups. From this, it is possible examine the differences between the materials in response to nitrogen nutrition. Furthermore, gas exchange parameters such as CO₂ assimilation rate and stomatal conductance along with PNUE showed high heritability in the narrow sense. Finally, the chapter III investigated the regulation of CO₂ assimilation metabolism in response to water deficit sugarcane leaves and how nitrogen metabolism is involved in this process. Different factors involved in the negative regulation of photosynthesis were identified. Interestingly, changes in nitrogen components only contributed to metabolic inhibition in severe stress. Additionally it noted that overcoming metabolic inhibition during rehydration is faster when the cultivar presents slower decreases in N metabolism during water deficit, associated with less damage to the photosynthetic capacity.

Keywords: Photosynthesis; Mesophyll conductance; PNUE; Metabolic limitation

1.1. Introdução geral

Ao longo dos últimos 50 anos, a "Revolução verde" aumentou a produtividade das culturas através da utilização de variedades modernas de alto rendimento associadas à adequadas práticas agrícolas. Em média, a produtividade aumentou 2.3% ao ano, sempre abaixo das taxas de crescimento da população mundial, que é 1.7% ao ano (1). No entanto, as previsões do aumento populacional e as possíveis mudanças climáticas sugerem que a oferta mundial de alimentos será um problema enfrentado pela humanidade. Serão necessários esforços para garantir o aumento da produtividade de forma sustentável.

O aumento da produtividade das culturas foi obtido pela introdução de características de nanismo nas plantas (2), melhoramento genético clássico e plantas geneticamente modificadas para resistência a pragas e doenças associados as práticas agrícolas adequadas. Porém, não houve aumentos significativos na capacidade de assimilação fotossintética destas plantas. Até então, não haviam sido criados programas de melhoramento destinados a seleção e criação de novas variedades para melhorar a capacidade fotossintética.

O processo fotossintético tem baixa eficiência de conversão de energia durante a formação de biomassa vegetal, estimada em 3-6% (3). As principais razões são as perdas de energia durante a absorção de luz e reações fotoquímicas, a presença da fotorrespiração C3 e a arquitetura das plantas. Assim, para melhorar a capacidade fotossintética discute-se: (i) aumentar a eficiência da absorção de luz e de conversão de energia; (ii) melhorar a eficiência da captação de CO₂ pelas folhas e (iii) reduzir as perdas de energia durante a formação da biomassa.

Estas possibilidades podem ser alcançadas por manipular proteínas e clorofilas envolvidas na absorção/conversão da luz e as vias de difusão e concentração de CO₂, seja pela variação natural das plantas ou inserção de genes de algas e cianobactérias (4). No entanto, além da tecnologia molecular, o conhecimento sobre os fatores limitantes durante a assimilação de CO₂ é necessário para o desenvolvimento de estratégias capazes de minimizar as limitações encontradas no ambiente assim como para identificar alvos de interesse para a engenharia genética.

Os fatores ambientais externos que co-ocorrem em processos internos do metabolismo vegetal influenciam fortemente a fotossíntese. Dentre eles, a disponibilidade de nitrogênio e água merecem atenção porque são os principais responsáveis pelas perdas de produção de

agrícola. Em condições deficientes de nitrogênio e água são observadas reduções na eficiência de captação de luz, difusão e assimilação de CO₂ entre as espécies. Curiosamente, muitos destes efeitos ocorrem de forma similar porque, frequentemente a deficiência nitrogenada induz reduções no transporte de água, assim como o deficit hídrico altera o metabolismo de nitrogênio.

Como grande parte dos estudos que abordam os efeitos da deficiência nitrogenada ou hídrica no metabolismo fotossintético tem sido realizado em plantas C3, ainda há uma carência de informações para espécies C4. Algumas das repostas podem ser comuns aos dois tipos fotossintéticos, C3 e C4, mas a via fotossintética C4 é mais complexa apresentando certas particularidades.

Desta forma, esta tese aborda perguntas específicas sobre a regulação da fotossíntese C4 pela nutrição nitrogenada, o deficit hídrico e a interação destes dois fatores. No primeiro capítulo experimental foi desenvolvido um estudo envolvendo os efeitos da nutrição nitrogenada na difusão interna de CO₂. No segundo capítulo, foi explorada a variação genotípica de cana-de-açúcar quanto a parâmetros relacionados a fotossíntese e o nitrogênio foliar, envolvendo a eficiência de uso de nitrogênio fotossintética (PNUE). Por fim, o terceiro capítulo investiga a regulação do metabolismo de assimilação de CO₂ ocasionada pelo deficit hídrico em cana-de-açúcar e como o metabolismo de nitrogênio está envolvido neste processo.

- ¹ Wik M, Pingali P, Broca S (2008) Background Paper for the World Development Report 2008: Global Agricultural Performance: Past Trends and Future Prospects (World Bank, Washington, DC
- ² Hedden P (2003) The genes of the green revolution. *Trends Genet* 19:5-9
- ³ Zhu X-G, Long SP, Ort DR (2010). Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annual Review of Plant Biology* 61:235-261.
- ⁴ Long, S P, Marshall-Colon, A. Zhu, X-Z. (2015). Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential *Cell*, 161: 56–66.

2. DIFUSÃO DE CO₂ EM FOLHAS DE SORGO: ALTERAÇÕES DA CONDUTÂNCIA DO MESOFILO COM A IDADE DA FOLHA E COM A NUTRIÇÃO NITROGENADA

Souza, N.C.¹; Vitorello, V.A.¹; von Caemmerer, S.²

¹Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA- USP ² ARC Centre of Excellence for Translational Photosynthesis, Australia National University

RESUMO

A taxa de assimilação fotossintética de CO₂ é limitada pela difusão de CO₂ dentro das folhas. Entender e quantificar estas limitações, auxiliam na identificação de novas estratégias para manipular e aumentar a taxa de fotossíntese através da engenharia genética. No entanto, a mensuração da condutância interna de folhas C4 só se tornou possível recentemente a partir de informações de isótopos estáveis no CO₂ e no vapor de água. Um sistema tradicional de trocas gasosas foi acoplado com espectrômetros de absorção a laser capazes de mensurar a composição isotópica do oxigênio no CO₂ e a composição isotópica do oxigênio no vapor de água transpirado. Estas medidas foram utilizadas para quantificar a condutância do mesofilo ($\Delta^{18}O\text{-}g_m$, condutância para a difusão de CO₂ entre os espaços intercelulares e o citosol do mesofilo). Os resultados apresentados aqui, corroboram a teoria assumida, demonstrando que alterações em $\Delta^{18}O\text{-}g_m$ foram proporcionais a atividade da anidrase carbônica, responsável por ocasionar o equilíbrio isotópico entre o oxigênio da água e o oxigênio do CO₂, o que permitiu a estimativa da concentração de CO₂ no citosol do mesofilo. Além disto, em folhas de *Sorghum bicolor*, $\Delta^{18}O\text{-}g_m$ decresceu com a idade da folha sendo fortemente correlacionado com a capacidade fotossintética e o conteúdo de N foliar. A redução na atividade da anidrase carbônica e alterações na composição de paredes celulares e membranas plasmáticas por efeitos do nitrogênio possivelmente estão envolvidos na regulação de $\Delta^{18}O\text{-}g_m$, precedendo as modificações na anatomia. Adicionalmente, as medidas de $\Delta^{18}O\text{-}g_m$ devem ser incorporadas na resolução de modelos bioquímicos C4 para uma estimativa mais confiável da capacidade máxima de carboxilação do fosfoenolpiruvato (V_{pmax}).

Palavras-chave: Fotossíntese C4; Anatomia 3; Anidrase carbônica

ABSTRACT

The CO₂ assimilation rate is limited by the diffusion of CO₂ into the leaves. By understand and quantify these limitations, novel strategies to manipulate and enhance photosynthesis rate through genetic engineering can be identified. However, the measurement of internal conductance C4 leaves only became possible recently from information about stable isotopes in CO₂ and water vapor. A traditional gas exchange was coupled with laser absorption spectrometers capable of measuring the oxygen isotope composition in CO₂ and stable oxygen isotope composition of transpired water vapour. These measurements were used to estimate the mesophyll conductance ($\Delta^{18}O\text{-}g_m$, conductance to CO₂ diffusion from intercellular spaces to the mesophyll cytosol). The results support the assumed theory, demonstrating that changes in $\Delta^{18}O\text{-}g_m$ were related with carbonic anhydrase activity (CA), responsible for the isotopic equilibrium between oxygen of the water and the oxygen of the CO₂. It is allowed the estimation of the CO₂ concentration in the mesophyll cytosol. In addition, in leaves of *Sorghum bicolor*, $\Delta^{18}O\text{-}g_m$ decreased with leaf age and is strongly correlated with the photosynthetic capacity and leaf nitrogen. Reduction in the CA activity and changes in the cell wall and/or membrane properties by nitrogen effects are probably involved in the regulation of $\Delta^{18}O\text{-}g_m$, before changes in the anatomy. Additionally, $\Delta^{18}O\text{-}g_m$ should be incorporated in the C4

biochemical models resolution, for a reliable estimation of the maximum carboxylation of the phosphoenolpyruvate (V_{pmax}).

Keywords: C4 Photosynthesis, anatomy, carbonic anhydrase

2.1. Introdução

Os processos que permitem a captura do CO₂ atmosférico com sua subsequente conversão em açúcares dentro dos cloroplastos tem limitações significativamente intrínsecas, apresentando especialmente resistências para a difusão de CO₂ dentro da folha e limitações bioquímicas da Rubisco (Evans *et al.*, 2009; Adachi *et al.*, 2013).

Parte das limitações impostas pela Rubisco foram minimizadas durante a evolução com o surgimento da fotossíntese C4. Em plantas superiores, a fotossíntese C4 é conhecida pelo seu mecanismo de concentração de CO₂ abrangendo a separação espacial da aquisição e redução do carbono inorgânico entre dois tipos de células: as células do mesófilo e da bainha vascular. A carboxilação inicial de CO₂ ocorre no citosol do mesófilo. O CO₂ é inicialmente convertido a bicarbonato por ação da anidrase carbônica (CA) e fixado dentro de ácidos C4 pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) (Hatch *et al.*, 1967). Os ácidos C4 difundem-se até as células da bainha onde serão descarboxilados liberando CO₂ que será carboxilado pela Rubisco (Hatch e Osmond, 1976).

Mesmo com este avanço, as resistências para a difusão de CO₂ dentro da folha ainda estão presentes em folhas C4. Estas ocorrem individualmente em várias etapas, mas são caracterizadas comumente pela condutância estomática (g_s) e condutância do mesófilo (g_m), ambas influenciadas por características anatômicas e bioquímicas (Evans, 1996). Enquanto, a condutância estomática é facilmente avaliada por medidas de trocas gasosas as medidas da condutância do mesófilo não tem sido comumente avaliada. Os métodos disponíveis para estimativa de g_m não são aplicáveis para o especializado mecanismo de carboxilação C4.

Ao contrário das plantas C3, a condutância do CO₂ entre os espaços intercelulares e os sítios de carboxilação não se relaciona a discriminação isotópica do carbono (von Caemmerer, 2014). Comparativamente, a resistência ao CO₂ imposta pelas paredes celulares e membranas então é menor nas espécies C4, induzindo baixos valores para $\Delta^{13}\text{C}$ (Farquhar, 1983; von Caemmerer, 2014). As células do mesófilo adjacentes aos espaços intercelulares apresentam paredes mais finas e como a fixação inicial do CO₂ ocorre no citosol, a fase líquida de difusão é consideravelmente mais curta, porque o CO₂ não precisa atravessar a membrana do cloroplasto (Evans, 1996; von Caemmerer, 2014). Ao mesmo tempo em 25°C, a hidratação inicial do CO₂ para bicarbonato e carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP) tem um fracionamento combinado de -5.7%, bastante inferior ao fracionamento imposto pela Rubisco, -27% (Farquhar, 1983; Henderson, 1992). Quando há uma estreita coordenação entre os ciclos

C4 e C3, praticamente todo CO₂ é fixado pela Rubisco, reduzindo ainda mais ainda seu efeito no fracionamento isotópico do carbono (Cousins *et al.*, 2006).

Enquanto a discriminação de ¹³C não contribui com o conhecimento sobre a difusão de CO₂ em folhas C4, a troca de isótopos estáveis de oxigênio na folha pode fornecer informações relevantes para mensurar a condutância interna de CO₂ (Barbour *et al.*, 2016). A hidratação de CO₂ pela CA permite o equilíbrio isotópico entre o oxigênio na água no citosol e o oxigênio na molécula de CO₂ (Gillon and Yakir, 2000). Como a água no citosol pode ser isotopicamente a mesma nos sítios de evaporação, os dados de discriminação isotópica para trocas de vapor de água permitem a estimação da concentração de CO₂ no mesófilo do citosol (Barbour *et al.*, 2016).

Esta técnica requer um sistema capaz de mensurar ¹⁸O/¹⁶O do vapor de água transpirado e ¹⁸O/¹⁶O e ¹³C/¹²C durante as medidas de trocas gasosas pelo acoplamento do analisador de fotossíntese LI-4000 com dois espectrômetros de absorção a laser (TDL) e um espectrômetro de cavidade ressonante do tipo ring-down (L1102-i; Picarro Inc.). A utilização deste sistema para mensurar g_m em plantas C4 só se tornou possível recentemente (Barbour *et al.*, 2016).

As estimativas de g_m são importantes para a interpretação de estudos sobre o fluxo do CO₂ entre a vegetação e a atmosfera, estudos evolutivos e na identificação de novas estratégias de manipulação fotossintética e eficiência do uso da água que podem ser explorados pela engenharia genética (Evans e von Caemmerer, 2013). Sobretudo é de extrema importância em espécies C4, onde não se conhece em ordem de grandeza quais os fatores envolvidos na regulação da taxa de difusão de CO₂ interna e com que extensão limitam seu potencial fotossintético (von Caemmerer e Furbank, 2015).

As alterações na nutrição nitrogenada podem se tornar uma interessante abordagem para investigar os mecanismos relacionados com g_m devido a sua forte e positiva correlação com a assimilação de CO₂. Além de ser uma das mais importantes limitações para a produtividade das culturas, a deficiência nitrogenada, especificamente, decresce a condutância estomática (Zhao *et al.*, 2005), reduz a eficiência das enzimas envolvidas na assimilação de CO₂ (Markelz *et al.*, 2011; Meinzer e Zhu (1998) podendo também induzir alterações anatômicas. Provavelmente, a disponibilidade de CO₂ nos sítios carboxilativos das folhas C4 seja comprometida nestas folhas. Além disto, a intensidade destas respostas pode ser afetada pela taxa de remobilização de nitrogênio dependente da idade da folha permitindo traçar relações entre g_m e diferentes concentrações de N na mesma planta.

Diante deste contexto, a condutância interna ao CO_2 foi estimada pelo método da discriminação fotossintética do oxigênio em folhas de sorgo com idades diferentes cultivadas sob condições contrastante de nitrogênio. Avaliações quanto a anatomia, atividades de enzimas envolvidas na assimilação de CO_2 e a capacidade fotossintética destas folhas foram realizadas na tentativa de entender a regulação de g_m em folhas C4.

2.2 Material e Métodos

2.2. Material vegetal e condições experimentais

As sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* sv.) foram semeadas em potes com capacidade de 8 litros em substrato comercial (Debco, Melbourne, Australia) contendo fertilizante industrial de lenta liberação (Osmocote, Scootts, Austrália). O substrato com adequado fornecimento de nitrogênio (N) foi fertilizado com 5 g L^{-1} (+N), enquanto o substrato com baixo fornecimento de N recebeu $0,5\text{ g L}^{-1}$ (-N).

As plantas foram cultivadas por 4 semanas em casa de vegetação sob condições não controladas de luz solar, temperatura e umidade, com hidratação constante. As medidas de trocas gasosas e análises bioquímicas foram realizadas em três folhas completamente expandidas como exemplificado abaixo.

Figura 1. Desenvolvimento de plantas de sorgo com 4 semanas.

Medidas de trocas gasosas acopladas ao fluxo de isótopos

As medidas simultâneas de trocas do CO_2 , H_2O , $^{13}\text{CO}_2$, $\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ e H_2^{18}O foram realizados por dois espectrômetros de absorção a laser (TDL) (modelos TGA 100 e TGA 200- Campbell Scientific Inc) e por um espectrômetro de cavidade ressonante do tipo ring-down (L1102-i; Picarro Inc.) o primeiro para isótopos do CO_2 e o segundo para isótopos da H_2O ,

acoplados a dois aparelhos de medidas de trocas gasosas (Li-Cor, LI-6400XT) (Fig.2) sob uma taxa de fluxo de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A temperatura da folha foi controlada pelos LI-6400XT para se manter próximo a 28°C . A diferença média da pressão de vapor entre o ar e a folha foi 1.24 kPa, com a concentração de CO_2 ambiental mantida em $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos em $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas permaneceram na câmara de medidas aproximadamente 3 horas, onde as trocas gasosas e fluxo de isótopos em cada folha foi mensurado por 1 hora. Este tempo foi necessário para que a folha se adaptasse as condições da câmara e para que fosse obtido 10 repetições destas medidas por folha. As trocas gasosas, assim como fluxo de isótopos foram mensurados a cada 4 minutos. Durante este tempo, o sistema para discriminação isotópica do CO_2 completa um ciclo de leituras entre dois cilindros de calibração, mensurando a discriminação isotópica em concentrações crescentes de CO_2 por dois minutos (Fig. 2). Os dois minutos restantes são utilizados para medir a composição isotópica do ar ao redor da folha (um minuto para a folha da planta acoplada no primeiro LI-6400XT, outro minuto para a folha da planta no segundo LI-6400XT). O momento das análises da discriminação no vapor de água não coincidiu com as mensurações do CO_2 . Enquanto ocorreu a mensuração do ciclo de calibração pelo TGA 200, o Picarro mensurou o fluxo dos isótopos do vapor de água. Assim como para o CO_2 , foram mensuradas $\delta^{18}\text{O}$ como padrão numa amostra de água. Os dados foram registrados num talogger e ao final do dia transferidos para o computador.

Figura 2. Visão geral da sala para medidas de trocas gasosas. Espectrômetro de absorção laser de diodo sintonizável (TDL 100, utilizado apenas para ^{13}C); Espectrômetro de absorção laser de diodo sintonizável (TDL 200, utilizado para C, H e O); Câmara com condições controladas, onde as plantas permanecem durante as medidas; Picarro, para medidas do fluxo isotópico do vapor de água; Sistemas portáteis de fotossíntese (LI-6400XT).

Figura 3. Programas de operação para o TGA 200. Os seis primeiros incrementos no gráfico são referentes a discriminação isotópica do CO_2 presente em cilindros de calibração. Posteriormente é realizada a discriminação isotópica presente na câmara de dois Licor, onde as trocas gasosas de CO_2 e vapor de água pelas folhas estão sendo analisadas. A janela à direita mostra a sincronia dos três lasers para detecção do CO_2 , ^{13}C e ^{18}O respectivamente.

Condutância do mesófilo ao CO₂ a partir da discriminação contra ¹⁸O ($\Delta^{18}O\text{-}g_m$)

A $\Delta^{18}O\text{-}g_m$ foi estimado a partir da pressão parcial do CO₂ dentro das células do mesófilo (C_m) assumindo que há um equilíbrio isotópico do oxigênio entre o CO₂ e a água no citosol (Equação. 1):

$$\Delta^{18}O\text{-}g_m = \frac{A}{C_i - C_m} \quad (1)$$

$$C_m = C_i \left[\frac{\delta^{18}O_i - a_{18w} - \delta^{18}O_A(1+a_{18w})}{\delta^{18}O_c - a_{18w} - \delta^{18}O_A(1+a_{18w})} \right] \quad (2)$$

Onde $\delta^{18}O_c$ representa a composição isotópica do oxigênio do CO₂ no citosol, em completo equilíbrio isotópico com a água, $\delta^{18}O_i$ é a composição isotópica do oxigênio nos espaços intercelulares e $\delta^{18}O_A$ é a composição isotópica do oxigênio no CO₂ assimilado.

Para estimar $\delta^{18}O_c$ assumiu-se que há um equilíbrio isotópico entre os sítios evaporativos e o citosol, que é em parte estimado pela equação Craig Gordon (Craig e Gordon, 1965) dependente da $\delta^{18}O$ da água transpirada:

$$\delta^{18}O_c = \delta^{18}O_e + \varepsilon_w \quad (3)$$

$\delta^{18}O_e$ é a composição isotópica da água nos sítios evaporativos (Eq. 10) e ε_w é o equilíbrio isotópico entre o CO₂ e a água, descrito por Brenninkmeijer *et al.* (1983).

A composição isotópica de CO₂ nos espaços intercelulares, ignorando correções ternárias, foi dada por (Farquhar e Cernusak, 2012):

$$\delta^{18}O_{io} = \delta^{18}O_A \left(1 - \frac{C_a}{C_i} \right) (1 + a'_{18}) + \frac{C_a}{C_i} (\delta^{18}O_{out} - a'_{18}) + a'_{18} \quad (4)$$

Incluindo correções ternárias (efeito de colisão entre as moléculas de H₂O e CO₂), a composição isotópica de CO₂ nos espaços intercelulares foi estimada por:

$$\delta^{18}O_i = \frac{\delta^{18}O_{io} + t \left[\delta^{18}O_A \left(\frac{C_a}{C_i} + 1 \right) - \delta^{18}O_a \frac{C_a}{C_i} \right]}{1+t} \quad (5)$$

A partir das medidas do TDL para $\delta^{18}O$ do CO₂, foi estimado a composição isotópica do CO₂ assimilado:

$$\delta^{18}O_A = \frac{\delta^{18}O_o - \Delta^{18}O_{obs}}{1 + \Delta^{18}O_{obs}} \quad (6)$$

A discriminação contra ¹⁸O foi calculado a partir dos mensuramentos do $\delta^{18}O$ (TGA 200) utilizando o modelo descrito por Evans *et al.*, (1996):

$$\Delta_{obs} = \frac{\xi(\delta_o - \delta_e)}{1 + \delta_o - \xi(\delta_o - \delta_e)} \quad (7)$$

Onde:

$$\xi = \frac{C_e}{C_e - C_o} \quad (8)$$

C_e e δ_e são as concentrações e composições isotópica do $C^{18}O^{16}O$ entrando na câmara da folha, respectivamente, e C_o e δ_o são as concentrações e composições isotópicas de $C^{18}O^{16}O$ deixando a câmara da folha, respectivamente.

Estimativa da composição isotópica da água transpirada e sítios evaporativos

O enriquecimento local da água nos sítios de evaporação ocorre porque $H_2^{16}O$ difunde mais rápido que $H_2^{18}O$. Num estado estável a água transpirada tem a mesma composição isotópica da água no interior da planta.

A composição da água transpirada, foi estimada a partir do balanço de massa entre o vapor de água na corrente do ar entrando ($\delta^{18}O_{win}$) e deixando a câmara da folha ($\delta^{18}O_{wout}$), fornecidos pelo Picarro. As concentrações de vapor de água utilizadas (w_{in} e w_{out}) foram fornecidas pelo LI6400.

$$\delta^{18}O_{trans} = \left[\delta^{18}O_{wout}(1 - w_{in}) - \delta^{18}O_{win} \frac{w_{in}}{w_{out}}(1 - w_{out}) \right] \frac{w_{out}}{w_{out} - w_{in}} \quad (9)$$

A composição isotópica do oxigênio nos sítios de evaporação foi estimada considerando $\delta^{18}O_{trans}$ (Craig e Gordon, 1965; Flanagan *et al.*, 1991): Assim, $\delta^{18}O_e$:

$$\delta^{18}O_e = \delta^{18}O_{trans} + \varepsilon^* + \varepsilon_k + h^* \left(\delta^{18}O_{wout} - \varepsilon_k - \delta^{18}O_{trans} \right) \quad (10)$$

Onde ε^* é o fracionamento de equilíbrio durante a evaporação do líquido para o vapor, ε_k é o fracionamento cinético durante a difusão do vapor da folha para a atmosfera e h é a taxa da pressão do vapor ambiente para intercelular, ε^* é dependente da temperatura e dado por Bottinga e Craig (1969). ε_k é dependente da condutância estomatal e da camada limite e associado a fatores de fracionamento (mais detalhes sobre as equações podem ser vistas em Barbour *et al.*, 2016).

Discriminação fotossintética de $^{13}CO_2$

Da mesma forma que calculado para $\Delta^{18}O_{obs}$ A discriminação contra $^{13}CO_2$ foi calculado a partir dos mensuramentos do δ^{13} (TGA 200) utilizando o modelo descrito por Evans *et al.*, (1986):

$$\Delta_{obs} = \frac{\xi(\delta_o - \delta_e)}{1 + \delta_o - \xi(\delta_o - \delta_e)} \quad (11)$$

Onde:

$$\xi = \frac{C_e}{C_e - C_o} \quad (12)$$

C_e e δ_e são as concentrações e composições isotópica do CO_2 entrando na câmara da folha, e C_o e δ_o são as concentrações dos isótopos de CO_2 deixando a câmara da folha.

Curvas de assimilação do CO_2 em resposta a concentração intercelular de CO_2

As curvas de assimilação de CO_2 em resposta a concentração intercelular de CO_2 (curvas A/C_i) foram realizadas sob densidade de fluxo de fótons constante em $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ alterando a $p\text{CO}_2$ em 400, 0, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1400, 1600, 1800 e 400 ppm. A temperatura foliar foi monitorada e mantida próximo a 25°C . Os parâmetros bioquímicos das curvas foram calculados segundo von Caemmerer e Furbank (1999).

A taxa de carboxilação do PEP é o primeiro passo limitante no modelo fotossintético C4, sendo estimado pela equação Michaelis-Meten:

$$V_{p=} = \frac{C_m V_{pmax}}{C_m + K_p} \quad (13)$$

Onde V_{pmax} é a máxima taxa de carboxilação do PEP, K_p é o K_m para CO_2 e C_m é a concentração de CO_2 no citosol do mesofilo. C_m foi estimado por:

$$C_m = \frac{C_i - (A + R_d)}{g_m} \quad (14)$$

Sob elevada irradiação a taxa de carboxilação da Rubisco pôde ser calculada pela equação:

$$V_c = \frac{(C_s V_{cmax})}{C_s + K_c (1 + \frac{O_s}{K_o})} \quad (15)$$

C_s é a concentração de CO_2 nas células da bainha, O_s é a concentração de oxigênio nas células da bainha e K_c é a constante Michaelis da Rubisco para o CO_2 , enquanto K_o é a constante para o oxigênio.

Programas de computadores como a função solver (Excel) completam o processo interativo necessário para ajustar as equações acima dentro de uma equação quadrática capaz de estimar enzimática limitações para a taxa de assimilação de CO_2 . Assim, os dados foram ajustados para encontrar os valores máximos de carboxilação da PEPC e Rubisco. A expressão quadrática é aproximada por:

$$Ac = \min\{(V_p - R_m + g_s' C_m), (V_{cmax} - R_d)\} \quad (16)$$

Tabela 1. Resumo dos parâmetros necessários para $\Delta C^{18}O^{16}O$ fotossintética e para modelagem da fotossíntese C4 a 25°C

Parâmetros	Valores	Definição	Fonte
$\Delta C^{18}O^{16}O$			
a_{18w}	0.8‰	Soma das discriminações durante a fase líquida e dissolução	1
a₁₈ (mol m⁻²s⁻¹)	8.8‰	Discriminação durante a difusão através dos estômatos	1
a_{18b}	5.8‰	Discriminação durante a difusão através da camada limite	1
a'₁₈	--	Soma da discriminação durante a difusão através dos estômatos e da camada limite	1
Modelo fotossintético			
K_c	650 µbar	Constante Michaelis_Menten da Rubisco para o CO ₂	2
K_o	450 000 mbar	Constante Michaelis_Menten constant da Rubisco para o O ₂	2
K_p	80 µbar	Constante Michaelis_Menten da PEPC para o CO ₂	2
R_d	1	Respiração mitocondrial foliar	2
R_m	0.5	Respiração mitocondrial nas células da bainha	2
A	0.1	Fração da atividade do PSII nas células da bainha	2
γ*	0.0001930 5	0.5 (S _c /S _o)	2
g_s*	0.003 mol m ⁻² s ⁻¹	Condutância das células da bainha para o CO ₂	2

¹ Farquhar and Cernusak (2012); ² Von Caemmer and Furbank (1999)

Análises anatômicas

As seções foliares foram preparadas para mensurar a área da superfície do mesofilo exposta aos espaços intercelulares (S_{mes}), espessura da folha, distância interneival e área de superfície das células da bainha por unidade de área foliar (S_b). As amostras foram fixadas sob vácuo, em 2 ml de tampão contendo 2.5% glutaraldeído, 3% formaldeído, 0.01% triton X e 50 mM fosfato, pH 7.2 por 40 min. Posteriormente foram lavadas duas vezes em tampão fosfato e então pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio. As amostras fixadas foram desidratadas em series de soluções crescentes de etanol diluído em água por 20 minutos (10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100%). Ao final, foram embebidas em soluções de resina LR diluída em etanol, alterando a concentração da resina LR a cada 24 horas (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 100, 100%) até serem emolduradas em moldes plásticos com resina LR a 60°C por uma noite. As seções das folhas foram cortadas com uma lâmina de vidro em um ultra micrometro, coradas com azul de tolúeno e colocadas em lâminas. As lâminas foram observadas usando microscópio

de luz Zeiss Axioskop com 400 x de magnificação. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image J (NIH, USA). As características anatômicas foram calculadas segundo Pengelly *et al.*, 2010, assumindo como fator de curvatura de 1.34, estimado segundo Evans *et al.*, 1994.

Conteúdo de nitrogênio e atividades *in vitro* da CA, PEPC e Rubisco

Disco foliares (0.28 ou 5 cm²) foram coletados da mesma área foliar utilizada nas medidas de trocas gasosas e discriminação isotópica. Os discos utilizados para as atividades enzimáticas foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido enquanto que os discos utilizados para determinação de N foram secos em estufa a 60°C. O conteúdo de nitrogênio foliar foi determinado pelo analisador C-H-N (model 1106; Carlo Erba, Milan, Italy). Para os ensaios das atividades da PEPC e Rubisco o conteúdo de proteínas solúveis foi determinado pelo método de Bradford. O extrato enzimático foi obtido em tampão HEPES 50mM, 1mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 10 mM DTT, 1% (w/v) PVPP, 1% (v) de coquetel inibidor de proteases (Sigma) com pH 7.8. Os ensaios espectrométricos da PEPC e Rubisco foram realizados segundo Pengelly *et al.*, 2010. A atividade da anidrase carbônica foi determinada usando espectrometria de massa por mensurar as trocas entre ¹⁸O₂ a partir do ¹³C¹⁸O₂ e da H₂¹⁶O à 25°C com uma concentração sub-saturante de CO₂, 1mM (Cousins *et al.*, 2006).

2.3. Análises estatísticas

Os efeitos da adubação nitrogenada e da idade da folha foram analisados por análises de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2 × 3, sendo 2 níveis de nitrogênio (+N e -N) e 3 folhas em idades diferentes (N e F, respectivamente). As correlações entre os caracteres avaliados foram obtidas por meio de correlações de Pearson.

2.4. Resultados

Efeitos pela idade da folha

A idade das folhas foi definida pela posição na planta, variando quanto ao período de emissão. Não foram observadas alterações no conteúdo de N foliar e nos dados de LMA pela idade das folhas em plantas cultivadas sob condições de +N. Folhas de sorgo com 4 semanas de crescimento apresentaram diferenças apenas nas taxas de assimilação de CO₂.

Quando as plantas foram cultivadas sob adequada disponibilidade de N apresentaram conteúdo foliar médio de 105.9 mmol N m⁻², com LMA em 30.83 ± 0.38 g m⁻². Enquanto quando cultivadas com -N o conteúdo de N foliar decresceu conforme aumentou a idade da folha para 41.89, 48.55 e 56.07 mmol N m⁻² em folhas velhas, intermediárias e novas, respectivamente. A LMA sofreu reduções de 33% em ambas as folhas.

Figura 4. (A) Taxa de assimilação de CO₂, (B) massa foliar por área (LMA) e (C) conteúdo de N foliar em folhas de sorgo diferindo quanto a idade (velha, intermediária e nova) em plantas cultivadas sob condições de baixo N (-N) ou adequado N (+N). Valores são médias seguidas do erro-padrão. A significância estatística dos efeitos de nitrogênio (N), idade da folha (F) e a interação dos fatores (N x F) são mostrados, *P < 0.05, **P < 0.1.

Relações entre a taxa difusão de CO₂ com a taxa de assimilação de CO₂ e a nutrição nitrogenada

A condutância do mesofilo, *i.e.* condutância entre os espaços intercelulares e os sítios de troca de oxigênio entre CO₂ e H₂O ($\Delta^{18}O-g_m$), junto com a condutância estomática, foram linearmente relacionadas com a taxa de assimilação de CO₂ e o conteúdo de N foliar (Figura 5). Os resultados mostraram que $\Delta^{18}O-g_m$ não foi afetado significativamente com a idade das folhas nas plantas cultivadas sob condições adequadas de N, apresentando-se entre 0.48 ± 0.03 e $0.58 \pm 0.05 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$. O conteúdo de N similar entre estas folhas foi um indicativo da ausência de senescência.

Quando as plantas foram cultivadas sob baixa disponibilidade de N, o conteúdo do nitrogênio foliar foi alterado conforme a idade da folha. Quanto mais velha a folha, menor o conteúdo de N foliar e, conseqüentemente, menores valores de A , $\Delta^{18}O-g_m$ e g_s .

As reduções na difusão interna de CO₂ foram mais sensíveis que a condutância estomática. Interessantemente, em plantas sob condições adequadas de N, o conteúdo do N foliar foi em média foi $105.9 \pm 4 \text{ mmol m}^{-2}$ reduzindo quase 60% nas folhas novas e intermediárias sob baixo N. Da mesma forma $\Delta^{18}O-g_m$ reduziu em média 55% nestas folhas enquanto g_s reduziu em média apenas 21%.

Embora plantas C4 apresentam uma baixa discriminação fotossintética contra o ¹³C, incrementos em $\Delta^{13}C$ foram observados por efeitos da nutrição nitrogenada. A $\Delta^{18}O$ foi menos sensível as reduções na condutância dos estômatos e do mesofilo, no entanto aumentou em 22% em folhas velhas com baixo $\Delta^{18}O-g_m$.

Figura 5. (A) Relações entre a condutância do mesofilo e a taxa de assimilação do CO_2 ; (B) condutância estomática e a taxa de assimilação de CO_2 ; (C) condutância do mesofilo e conteúdo de nitrogênio foliar; (D) condutância estomática e conteúdo de nitrogênio foliar em plantas de sorgo cultivadas em condições adequadas de N (verde escuro) e em condições de baixo N (verde claro) em três folhas com diferentes idades (velha, intermediária e nova).

Tabela 2. Características foliares de trocas gasosas, composições isotópicas e relação CA/A . Valores são médias seguido de erro-padrão. A , Taxa de assimilação de CO_2 ; g_s condutância estomática; C_i/C_a , pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares/ pressão parcial de CO_2 no ambiente; $C_m(\Delta^{18}O)$, pressão parcial de CO_2 nos sítios de equilíbrio isotópico entre CO_2-H_2O ; $g_m^{18}O$, condutância do mesofilo estimada a partir da discriminação de oxigênio; VDP, deficit de pressão de vapor; $\delta^{18}O_{trans}$, composição isotópica do oxigênio da água transpirada; $\delta^{18}O_e$, composição isotópica dos sítios de evaporação da água dentro das folhas; $\Delta^{18}O_{obs}$, discriminação isotópica fotossintética do $C^{18}O^{16}O$; $\delta^{18}O_c$, composição do oxigênio do CO_2 no cloroplasto $\Delta^{13}C_{obs}$, discriminação isotópica contra o ^{13}C durante a fotossíntese; $\Delta^{13}C_{dry\ mass}$, discriminação isotópica contra o ^{13}C na massa seca das folhas; CA/A relação entre a atividade da enzima anidrase carbônica com a taxa de assimilação de CO_2 .

Parametro	Folha velha		Folha intermediária		Folha nova	
	+N	-N	+N	-N	+N	-N
Trocas gasosas						
A ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$)	23.9 ± 1.3	7.8 ± 1.1	29.9 ± 5.1	19.9 ± 3.1	29 ± 3.9	22.7 ± 0.5
g_s ($mol\ m^{-2}s^{-1}$)	0.16 ± 0.0	0.06 ± 0.01	0.26 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.19 ± 0.02
C_i/C_a	0.26 ± 0.01	0.51 ± 0.04	0.34 ± 0.01	0.42 ± 0.03	0.24 ± 0.007	0.28 ± 0.05
$C_m(\Delta^{18}O)$ ($\mu mol\ mol^{-1}$)	57.99 ± 6.99	105.6 ± 9.1	64.5 ± 9.4	72.5 ± 14.9	41.3 ± 9.3	96.9 ± 23
$g_m^{18}O$ ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}\ bar^{-1}$)	0.57 ± 0.04	0.071 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.25 ± 0.021	0.58 ± 0.05	0.23 ± 0.045
VPD	1.63 ± 0.23	1.34 ± 0.07	1.37 ± 0.045	1.12 ± 0.1	1.40 ± 0.05	1.13 ± 0.09
Isotópicos						
$\delta^{18}O_{trans}$ (H_2O) (‰)	5.9 ± 0.6	-1.9 ± 1.9	3.9 ± 0.2	-2.8 ± 1.3	3.2 ± 0.6	-3.6 ± 1.9
$\delta^{18}O_e$ (H_2O) (‰)	28.9 ± 0.9	22.1 ± 1.2	25.0 ± 0.3	19.8 ± 0.7	24.4 ± 0.7	19.2 ± 0.5
$\Delta^{18}O_{obs}(CO_2)$ (‰)	18.0 ± 0.9	23.0 ± 1.1	17.0 ± 1.5	17.2 ± 1.7	13.8 ± 1.5	13.6 ± 0.8
$\delta^{18}O_c(CO_2)$ (‰)	70.9 ± 0.9	64.1 ± 1.3	66.4 ± 0.8	61.8 ± 0.1	66.8 ± 0.5	61.1 ± 0.5
$\Delta^{13}C_{obs}$ (‰)	4.2 ± 0.6	8.15 ± 1.1	3.8 ± 0.2	5.58 ± 0.5	3.0 ± 0.4	4.85 ± 0.2
$\Delta^{13}C_{massa\ seca}$ (‰)	13.4 ± 0.006	13.3 ± 0.1	13.1 ± 0.03	13.3 ± 0.04	12.8 ± 0.09	14 ± 1.3
CA/A	43.9 ± 10	34.0 ± 9.5	44.7 ± 9.5	17.2 ± 5.2	44.8 ± 8.3	23.3 ± 7.5

Reduções na condutância do mesofilo associadas a características anatômicas

As alterações em $\Delta^{18}O-g_m$ podem ser explicadas em parte por decréscimos na área de superfície do mesofilo exposta aos espaços intercelulares (S_{mes}) (Tab. 2). Em folhas velhas sob -N o forte declínio de $\Delta^{18}O-g_m$ foi acompanhado por menores valores de S_{mes} . No entanto esta resposta não está bem definida nas outras folhas. Apesar destas folhas apresentarem uma tendência de redução em 12% para S_{mes} , esta resposta não é tão expressiva quanto as reduções em $\Delta^{18}O-g_m$, evidenciando que outros fatores estão envolvidos na regulação da $\Delta^{18}O-g_m$.

A espessura e a distância interneival também só foram reduzidas significativamente em folhas velhas com baixo conteúdo de N foliar. Enquanto isto S_b não sofreram alterações significativas pela idade da folha ou pela nutrição nitrogenada.

Tabela 3. Espessura foliar (EF), distância interneival (DI), área de superfície do mesofilo exposto aos espaços intercelulares (S_{mes}) e superfície das células da bainha por unidade de área foliar (S_b) em plantas cultivadas em condições de adequado de N (+N) e em condições de baixo N (-N) em três folhas com diferentes idades (velha, intermediária e nova). ** indicam um efeito significativo para o nitrogênio, $p < 0.1$; * $p < 0.5$.

Parametro	Folha velha		Folha Intermediária		Folha nova	
	+N	-N	+N	-N	+N	-N
EF	138 ± 14	83.4±5.3**	110 ± 2.7	114.4±8.6	120.7 ±5.9	112.7±5.9
DI	169± 14	123±11	145.9±10	170.6±20	143.3±5.5	126.7±7.7
S_{mes} ($m\ m^{-2}$)	17.9±2.4	8.08±1.6*	15.61±2.3	13.52±1.5	15.1±1.4	13.58±3.6
S_b ($m\ m^{-2}$)	2.3±0.06	2.99±0.5	2.59±0.09	2.67±0.17	2.45±0.05	2.99±0.21

Figura 6. Relação entre a condutância do mesofilo ($\Delta^{18}O-g_m$) expressa na base da superfície da área do mesofilo exposta aos espaços intercelulares (S_{mes}) com o conteúdo de nitrogênio foliar em plantas cultivadas em condições adequadas de N (verde escuro) e em condições de baixo N (verde claro) em três folhas com diferentes idades (velha, intermediária e nova).

Atividades das enzimas CA, PEPC e Rubisco

As folhas de sorgo sob adequada nutrição nitrogenada apresentaram elevada e similar atividade da CA (1091.77 , 1098.01 e $1407.78 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em folhas velhas, intermediárias e novas, respectivamente) assim como altas taxas relativas entre a PEPC e Rubisco. A atividade da PEPC chegou a ser 11 vezes superior à atividade da Rubisco, mantendo a relação PEPC:Rubisco constante ao longo do experimento.

O conteúdo de N foliar foi determinante para as atividades *in vitro* das enzimas CA, PEPC e Rubisco. Quando o conteúdo de N reduziu com a idade da folha, foram observados decréscimos entre 62-88% na atividade destas enzimas.

Figura 7. Atividades da anidrase carbônica (CA), fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), e Rubisco; Relação entre a atividade da PEPC e Rubisco em folhas de plantas cultivadas em condições adequadas de N (+N) e em baixas condições de N (-N) em três folhas com diferentes idades (velha, intermediária e nova).

Modelando a taxa de assimilação de CO₂ com a condutância do mesófilo

Devido à falta de ferramentas adequadas para mensurar g_m , na resolução de modelos bioquímicos C4 comumente se assume um valor constante e elevado de g_m (von Caemmerer e Furbank, 1999; Massad *et al.*, 2007). No entanto, os valores obtidos aqui mostraram que mesmo em condições adequadas de luz, água e nutrientes, folhas de sorgo apresentam valores de g_m inferiores a $1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ (Fig. 3).

Ao ajustarmos as curvas A/C_i com os valores de g_m encontrados neste estudo, não observamos modificações no comportamento das curvas comparado às curvas ajustadas assumindo com g_m em $5 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$, mas nossas análises revelaram que os dados para V_{pmax} estavam sub-estimados (Tab. 3).

Figura 8. Curvas da taxa de assimilação do CO₂ em reposta a concentração intercelular de CO₂ em folhas de plantas cultivadas em condições adequadas de N (+N) e em baixas condições de N (-N) em três folhas com idades diferentes (FV=folha velha, FI= folha intermediária e FN= folha nova). Aplicou-se o modelo fotossintético (von Caemmerer e Furbank, 1999) assumindo g_m constante e igual a $5 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ (linhas completas) e utilizando os valores de g_m encontrados neste estudo (linhas pontilhadas).

Tabela 4. Comparação entre a taxa máxima de carboxilação pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e Rubisco a partir do modelo fotossintético para plantas C4 (von Caemmerer e Furbank, 1999), assumindo g_m constante e igual a $5 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ e utilizando os valores de g_m encontrados neste estudo.

Idade da Folha	$g_m=5$		g_m determinado	
	V_{pmax}	V_{cmax}	V_{pmax}	V_{cmax}
+N				
Nova	63.6 ± 6.89	48.97 ± 3.81	109.56 ± 42.48	42.48 ± 3.45
Intem.	54.97 ± 7.14	37.89 ± 2.77	69.43 ± 5.79	34.97 ± 0.74
Velha	38.77 ± 2.76	38.81 ± 5.35	52.02 ± 7.26	32.5 ± 3.14
-N				
Nova	33.27 ± 1.81	32.34 ± 3.64	82.46 ± 23.56	23.56 ± 1.81
Interm.	37.94 ± 4.33	29.46 ± 2.99	73.08 ± 2.1	24.9 ± 2.51
Velha	26.48 ± 1.76	16.15 ± 1.65	26.86 ± 2.02	16.37 ± 1.47

2.5. Discussão

Efeitos da $\Delta^{18}O-g_m$ nas trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas junto com as curvas de assimilação de CO_2 revelaram diferenças na capacidade fotossintética entre as folhas nutridas adequadamente com N, mesmo estas folhas apresentando similares conteúdos de N foliar e constante condutância do mesofilo. Isto evidencia que embora sejam plantas jovens, as folhas já apresentavam diferenças na capacidade fotossintética devido a idade, sendo que as taxas fotossintéticas máximas foram limitadas por propriedades bioquímicas e não por limitações na taxa de difusão de CO_2 . As limitações na difusão de CO_2 pela idade da folha só foram observadas quando o conteúdo de N foliar decresceu.

As reduções na condutância do mesofilo foram acompanhadas por reduções nas taxas fotossintéticas e na condutância estomática (Fig. 5). Barbour *et al.* (2016) encontraram forte declínio na g_m em folhas de *Flaveria* e *Setaria* entre folhas maduras e senescentes que também se relacionou as propriedades das trocas gasosas. Em geral, folhas senescentes apresentam reduzido conteúdo de N por serviram de fonte de N para as folhas mais novas (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Assim o conteúdo de N foliar provavelmente é um fator determinante para as alterações em $\Delta^{18}O-g_m$ durante a fase de desenvolvimento foliar.

A menor condutância foliar aumentou a discriminação fotossintética contra o ^{13}C em todas as folhas (velhas, intermediárias e novas), enquanto que $\Delta^{18}O$ (CO_2) aumentou somente em folhas velhas sob baixas condições nitrogenadas, revelando que o oxigênio na molécula de CO_2 é menos sensível a menor condutância foliar que o carbono.

Mesmo com reduzido $\Delta^{18}O-g_m$, a relação C_i/C_a foi superior nas folhas em -N, demonstrando que incrementos em C_i não refletem necessariamente na maior disponibilidade de CO_2 para os sítios carboxilativos.

$\Delta^{18}O-g_m$ descrece através da superfície do mesofilo com o N foliar

A regulação de g_m pode ser explicada em parte por alterações estruturais. Em teoria, g_m é regulado pela taxa de carboxilação assim como por diferenças na concentração de CO_2 dos espaços intercelulares para o citosol ($g_m = A / (C_i - C_c)$). Nós encontramos altos valores $C_i - C_c$ nas folhas com menos nitrogênio, que suportam a influência do controle estrutural para a condutância do mesofilo (Niinemets *et al.*, 2009).

Embora não sejam estabelecidas quais alterações estruturais se relacionam a condutância interna de CO₂ em folhas C4 (Barbour *et al.*, 2016) relações positivas entre a área de exposição do cloroplasto com a área do mesófilo em plantas C3 (Tomás *et al.*, 2013), sugerem que possa existir uma relação semelhante para plantas C4. No entanto, em espécies C4, a condutância interna do CO₂ possivelmente se relaciona a área do mesófilo exposta aos espaços intercelulares, uma vez que a fase inicial de carboxilação ocorre no citosol e não no cloroplasto.

As seções foliares observadas por microscopia eletrônica forneceram claras evidências desta relação. Quanto menor o conteúdo de N foliar, maior foi a contribuição das modificações anatômicas em $\Delta^{18}O-g_m$, especialmente por reduções em S_{mes} . Reduções em S_{mes} foram reflexo de uma área menor entre os tecidos da bainha, pela redução da espessura foliar assim como pela distância entre tecidos da bainha adjacentes (distância interneival). O declínio em S_{mes} implica numa área menor exposta para o fluxo de CO₂ ao citosol destas células (Evan and von Caemmerer, 1996; von Caemmerer *et al.*, 2007).

Foi conseguido demonstrar que $\Delta^{18}O-g_m$ na base de S_{mes} escala positivamente com o conteúdo de N foliar, entretanto o fato de S_{mes} reduzir apenas em folhas velhas, revela que em folhas intermediárias e novas outros fatores além desta característica estão atuando, inclusive, precedentes a estas alterações anatômicas.

Apesar de poucos estudos terem avaliado propriedades estruturais em folhas C4 relacionas a nutrição nitrogenada (Tazoe *et al.*, 2004; Ghannoum *et al.*, 2005; Retta *et al.*, 2016) as reduções em LMA com o conteúdo de N foliar tem sido um indicativo de alterações na anatomia foliar. Como LMA também reduziu em folhas intermediárias e novas, além dos efeitos induzidos por alterações em S_{mes} (evidente em folhas velhas), outra alteração possivelmente relacionada ao declínio em $\Delta^{18}O-g_m$ é o aumento da espessura da parede celular das células do mesófilo, recentemente observada em plantas de milho cultivadas em baixo N (Retta *et al.*, 2016).

É esperado que as perturbações ambientais também influenciam as propriedades da bainha facilitando a retro difusão de CO₂ para o mesófilo (Kromdijk *et al.*, 2014). No entanto aqui, não foram encontradas alterações físicas em S_b que possam contribuir com alterações na taxa de vazamento de CO₂ pela células bainha.

A taxa de assimilação e atividades da CA, PEPC e Rubisco co-variam com o conteúdo de N foliar

A relação positiva entre A e o conteúdo de N foliar é bem documentada na literatura (revisado por Ghannoum *et al.*, 2009; Sage *et al.*, 2013). O conteúdo proteico da Rubisco e PEPC decresce com a baixa nutrição nitrogenada em folhas de milho (Mu *et al.*, 2016) e suas atividades mostram uma relação linear com o N foliar em cana-de-açúcar (Meinzer e Zhu, 1998). Sobre as alterações na atividade/contéudo da CA não foram encontrados relatos. Neste estudo, as atividades destas enzimas foram fortemente sensíveis ao decréscimo de N foliar, o que contribuiu com menores taxas de assimilação de CO_2 .

As alterações na atividade da CA proporcional ao N foliar e $\Delta^{18}\text{O}-g_m$, em particular, suportam a teoria assumida. A redução do equilíbrio isotópico entre as moléculas de oxigênio da água e do CO_2 no citosol permitiram estimar diferenças em $\Delta^{18}\text{O}-g_m$ que foram consistentes com o N foliar e, vistas em parte, por alterações estruturais. Assim, estes resultados estabelecem fortes relações entre a atividade da CA e $\Delta^{18}\text{O}-g_m$. No entanto, ainda não eliminam dúvidas quanto ao completo equilíbrio isotópico do oxigênio por ação de CA. Assim como mencionado por Barbour *et al.*, (2016) CA mostra um fator de fracionamento próximo a 40% (CA/A), o que é aceito para se assumir o completo equilíbrio isotópico do oxigênio entre o CO_2 e H_2O . No entanto, esta relação decresce nas folhas com menos N, principalmente em folhas intermediárias e novas (Tabela 2). Como ressaltado por Barbour *et al.* (2016) cuidados devem ser considerados quanto aos valores brutos de $\Delta^{18}\text{O}-g_m$ estimados por este método, pois quando não há o completo equilíbrio isotópico valores de $\Delta^{18}\text{O}-g_m$ podem estar subestimados.

Modelando a taxa de assimilação de CO_2 com a condutância do mesofilo

Modelos bioquímicos de fotossíntese não são frequentemente usados em plantas C_4 , devido a complexidade da sua via de carboxilação, tornando a parametrização das cinéticas da PEPC e Rubisco mais complexa (Boyd *et al.*, 2015; von Caemmerer, 2013). Para a estimação das atividades máximas da PEPC e Rubisco é necessário conhecer a concentração de CO_2 nos seus sítios de carboxilação. Com a ausência de g_m , medidas para a condutância das células da bainha foram incorporadas para se alcançar C_m (von Caemmerer e Furbank, 1999) ou foram assumidos altos valores para a condutância do mesofilo (Massad *et al.*, 2007; von Caemmerer, 2013).

Yin *et al.* (2011) realizaram o ajuste de curvas A/C_i alterando g_m de 0.1 até $50 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e observaram que dentre os parâmetros estimados somente V_{pmax} foi sensível as alterações em g_m . De forma similar, o ajuste das curvas A/C_i com os valores de g_m encontrados neste estudo não alteram o comportamento das curvas A/C_i , mas demonstrou que os dados de V_{pmax} podem ficar subestimados quando se assume valores muito elevados para g_m .

Considerando que as medidas das curvas foram realizadas em folhas com temperaturas médias de 25.18⁰ C, constantes e valores cinéticos para PEPC e Rubisco puderam ser assumidos a partir de von Cammerer e Furbank (1999). Assim, a resolução matemática do modelo nos forneceu estimativas muito próximas da atividade *in vitro* da Rubisco, enquanto que os valores de V_{pmax} foram similares apenas quando houve alterações no conteúdo de N foliar. As condições do ensaio *in vitro* pode ter maximizado a atividade da PEPC quando a enzima estava abundante em folhas com altos níveis de N.

2.6. Conclusões

Em conclusão, a condutância do mesofilo se correlaciona com a taxa de assimilação de CO₂ em folhas de sorgo de idades diferentes por efeitos do conteúdo de nitrogênio foliar. As alterações na condutância do mesofilo são explicadas em parte pela variação da area de superfície do mesofilo exposta aos espaços intercelulares. Isto sugere que a variação na permeabilidade da parede celular e/ou nas propriedades da membrana plasmática ou possivelmente reduções na atividade de CA estão envolvidas na regulação de g_m , antes das alterações anatômicas em S_{mes} .

REFERÊNCIAS

- Adachi, S.; Nakae, T.; Uchida, M.; Soda, K.; Takai, T.; Oi, T. , Yamamoto, T.; Ookawa, T. Miyake, H.; Yano, M. et al.** The mesophyll anatomy enhancing CO₂ diffusion is a key trait for improving rice photosynthesis. *Journal Experimental Botany Oxford*, v. 64: 1061–1072.
- Barbour MM, Evans JR, Simonin KA, von Caemmerer S.** 2016. Online CO₂ and H₂O oxygen isotope fractionations allows estimation of mesophyll conductance in C₄ plants, and reveals that mesophyll conductance decreases as leaves age in both C₄ and C₃ plants. *New Phytologist*. DOI:[10.1111/nph.13830](https://doi.org/10.1111/nph.13830).
- Boyd, R.A, Gandin,A, Cousins, A.B.** 2015. Temperature responses of C₄ photosynthesis: biochemical analysis of rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase, and carbonic anhydrase in *Setaria viridis* *Plant Physiol*, 169:1850–1861.
- Brenninkmeijer C, Kraft P, Mook W.** 1983. Oxygen isotope fractionation between CO₂ and H₂O. *Isotope Geoscience* 1: 181–190.
- Bottinga Y, Craig H.** 1969. Oxygen isotope fractionation between CO₂ and water, and the isotopic composition of marine atmospheric CO₂. *Earth and Planetary Science Letters* 5: 285–295.
- von Caemmerer S, Evans JR.** 2015. Temperature responses of mesophyll conductance differ greatly between species. *Plant Cell Environ* 38: 629–637.
- von Caemmerer S.; Evans J.R.; Cousins A.B.; Badger M.R.; Furbank R.T.** 2007. C₄ photosynthesis and CO₂ diffusion. In: *Charting new pathways to C₄ Rice*. Edited: Sheehy J.E.; Mitchell P.L.; Hardy, B. . World Scientific Publishing; 422 p.
- von Caemmerer S, Ghannoum O, Pengelly J.J.L, Cousins AB.** 2014. Carbon isotope discrimination as a tool to explore C₄ photosynthesis. *J Exp Bot* 65: 3459–3470.
- von Caemmerer S.** 2013. Steady-state models of photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 36, 1617–1630.
- von Caemmerer S Furbank RT .** 2016. Strategies for improving C₄ photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 31:125–134.
- von Caemmerer S. & Furbank R.T.** 1999. Modeling of C₄ photosynthesis. In *The Biology of C₄ Photosynthesis* (ed. R.F. Sage), pp. 169–207. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- von Caemmerer S, Evans JR, Cousins AB, Badger MR, Furbank RT** 2007. C₄ photosynthesis and CO₂ diffusion. In: Sheehy JE, Mitchell PL, Hardy B , eds. *Charting New Pathways to C₄ Rice* . Philippines: IRRI, 95–115.

- Cousins AB, Badger MR, von Caemmerer S.** 2006. A Transgenic Approach to Understanding the Influence of Carbonic Anhydrase on C18OO Discrimination during C4 Photosynthesis. *Plant Physiol* **142**: 662–672.
- Craig H, Gordon LI.** 1965. Deuterium and oxygen-18 variations in the ocean and the marine atmosphere. In: Tongiorgi E, ed, *Proceedings of a Conference on stable isotopes in oceanographic studies and paleotemperatures*. Pisa, Italy: Consiglio Nazionale delle Ricerche, Laboratorie Geologia Nuclear, 9–130.
- Ethier GJ, Livingston NJ.** 2004. On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar–von Caemmerer–Berry leaf photosynthesis model. *Plant Cell Environ* **27**: 137–153.
- Evans R, von Caemmerer S.** 1996. Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology* **110**: 339–346.
- Evans, R J; von Caemmerer, S. 2013. Temperature response of carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in tobacco. *Plant, Cell and Environment* **36**: 745–756.
- Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I.** 2009. Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *J Exp Bot* **60**: 2235–2248.
- Evans J, Sharkey T, Berry J, Farquhar G.** 1986. Carbon Isotope Discrimination Measured Concurrently with Gas-Exchange to Investigate CO₂ Diffusion in Leaves of Higher-Plants. *Aust J Plant Physiol* **13**: 281–292.
- Evans JR, von Caemmerer S, Setchell BA, Hudson G.** 1994. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**: 475–495.
- Farquhar GD.** 1983. On the nature of carbon isotope discrimination in C₄ species. *Aust J Plant Physiol* **10**: 205–226.
- Farquhar GD, Cernusak LA.** 2012. Ternary effects on the gas exchange of isotopologues of carbon dioxide. *Plant, Cell & Environment* **35**: 1221–1231.
- Flanagan LB, Comstock JP, Ehleringer JR.** 1991. Comparison of modeled and observed environmental-influences on the stable oxygen and hydrogen isotope composition of leaf water in *Phaseolus-vulgaris* l. *Plant Physiology* **96**: 588–596.
- Ghannoum O, Evans J, von Caemmerer S.** 2009. Nitrogen and Water Use Efficiency of C₄ Plants. In: Agepati S. Raghavendra and Rowan F. Sage (ed.), *C4 Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms*, Springer, Netherlands, p. 129–146.

- Ghannoum O, Evans JR, Chow WS, Conroy JP, von Caemmerer S.** 2005. Faster Rubisco is the key to superior nitrogen-use efficiency in NADP-malic enzyme relative to NAD-malic enzyme C4 grasses. *Plant Physiol* v. **137**, p. 638–650.
- Gillon JS, Yakir D.** 2000. Internal Conductance to CO₂ Diffusion and C₁₈O₂ Discrimination in C₃ Leaves. *Plant Physiol* **123**: 201–214.
- Hatch MD, Slack CR, Johnson HS.** 1967. Further studies on a new pathway of photosynthetic CO₂ fixation in sugar cane and its occurrence in other plant species. *Biochemical Journal* **102**, 417–422.
- Hatch, M. D., Osmond, C. B., 1976.** Compartmentation and Transport in C₄ Photosynthesis. In: C. R. Stocking, U. Heber, Eds.), *Transport in Plants III*, 3: 144-184.
- Henderson S, von Caemmerer S, Farquhar GD.** 1992. Short-term measurements of carbon isotope discrimination in several C₄ species. *Australian Journal of Plant Physiology* **19**, 263–285.
- Kromdijk J, Ubierna N, Cousins AB, Griffiths H.** 2014. Bundle-sheath leakiness in C₄ photosynthesis: a careful balancing act between CO₂ concentration and assimilation. *J Exp Bot* **65**: 3443–3457
- Markelz RJ, Strellner RS, Leahey A.** 2011. Impairment of C₄ photosynthesis by drought is exacerbated by limiting nitrogen and ameliorated by elevated CO₂ in maize. *Journal of Experimental Botany*. **62**: 3235-3246.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*. **105**: 1141-1158.
- Massad RS, Tuzet A, Bethenod O.** 2007. The effect of temperature on C₄-type leaf photosynthesis parameters. *Plant Cell Environ* **30**: 1191–1204
- Meinzer, FC, Zhu, J,** 1998. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C₄CO₂ concentration system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. *J. Exp. Bot.* **49**, 1227–1234.
- Niinemets U, Wright, IJ, Evans, JR.** 2009. Leaf mesophyll diffusion conductance in 35 Australian sclerophylls covering a broad range of foliage structural and physiological variation. *Journal of Experimental Botany*. **60**: 2433-2449
- Mu X, Chen K, Chen F, Yuan L., Mi, G.** 2016. Within-Leaf Nitrogen Allocation in Adaptation to Low Nitrogen Supply in Maize during Grain-Filling Stage. *Frontiers in Plant Science*: **7**, ARTICLE 669.

- Pengelly JJL, Sirault XRR, Tazoe Y, Evans JR, Furbank RT, Caemmerer S von .2010.** Growth of the C₄ dicot *Flaveria bidentis*: photosynthetic acclimation to low light through shifts in leaf anatomy and biochemistry. *J Exp Bot* **61**: 4109–4122
- Sage, R.; Peixoto, MM.; Sage, T.** 2014. Photosynthesis in surcane. In: Sugarcane: Physiology, biochemistry an functional biology, First Edition. Moore, P.H.; Botha, F.C.; John Willey e Sons, 716 p.
- Retta, M. Yin X, van der Putten, PL, Cantre D, Berghu HNC, Tri Ho Q, Verboven P, Struik PC, Nicolai, B M.** Impact of anatomical traits of maize (*Zea mays* L.) leaf as affected by nitrogen supply and leaf age on bundle sheath conductance. *Plant Science* (in press)
- Tazoe Y, Von Caemmerer S, Estavillo GM, Evans JR.** 2011. Using tunable diode laser spectroscopy to measure carbon isotope discrimination and mesophyll conductance to CO₂ diffusion dynamically at different CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ* **34**: 580–591
- Tazoe, Y.; Noguchi, K.; Terashima, I.** 2006. Effects of growth light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in leaves of a C₄ plant, *Amaranthus cruentus*. *Plant, Cell and Environment* **29**: 691-700.
- Tómas M, Flexas J, Copolovici L, Galmés J, Haliki L, Medrano H, Ribas-Carbó M, Tosens T, Vislap V, Niinemts U.** 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* **64**: 2269–2281.
- Yin X.Y., Sun Z.P., Struik P.C., Van der Putten P.E.L., Van Ieperen W. & Harbinson J.** 2011. Using a biochemical C₄ photosynthesis model and combined gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements to estimate bundle-sheath conductance of maize leaves differing in age and nitrogen content. *Plant, Cell & Environment* **34**, 2183–2199
- Zhao D, Reddy KR, Kakani, VG, Reddy VR.** 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* **22**:391-403.
- Henderson S, von Caemmerer S, Farquhar GD.** 1992. Short-term measurements of carbon isotope discrimination in several C₄ species. *Australian Journal of Plant Physiology* **19**, 263–285.
- Kromdijk J, Ubierna N, Cousins AB, Griffiths H.** 2014. Bundle-sheath leakiness in C₄ photosynthesis: a careful balancing act between CO₂ concentration and assimilation. *J Exp Bot* **65**: 3443–3457

- Markelz RJ, Strellner RS, Leakey A.** 2011. Impairment of C₄ photosynthesis by drought is exacerbated by limiting nitrogen and ameliorated by elevated CO₂ in maize. *Journal of Experimental Botany*. **62**:3235-3246.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*. **105**: 1141-1158.
- Massad RS, Tuzet A, Bethenod O.** 2007. The effect of temperature on C₄-type leaf photosynthesis parameters. *Plant Cell Environ* **30**: 1191–1204
- Meinzer, FC, Zhu, J,** 1998. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C₄CO₂ concentration system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. *J. Exp. Bot.* **49**, 1227–1234.
- Niinemets U, Wright, IJ, Evans, JR.** 2009. Leaf mesophyll diffusion conductance in 35 Australian sclerophylls covering a broad range of foliage structural and physiological variation. *Journal of Experimental Botany*. **60**: 2433-2449
- Mu X, Chen K, Chen F, Yuan L., Mi, G.** 2016. Within-Leaf Nitrogen Allocation in Adaptation to Low Nitrogen Supply in Maize during Grain-Filling Stage. *Frontiers in Plant Science*: **7**, ARTICLE 669.
- Pengelly JJL, Sirault XRR, Tazoe Y, Evans JR, Furbank RT, Caemmerer S von** .2010. Growth of the C₄ dicot *Flaveria bidentis*: photosynthetic acclimation to low light through shifts in leaf anatomy and biochemistry. *J Exp Bot* **61**: 4109–4122
- Sage, R.; Peixoto, MM.; Sage, T.** 2014. Photosynthesis in sugarcane. In: *Sugarcane: Physiology, biochemistry and functional biology*, First Edition. Moore, P.H.; Botha, F.C.; John Wiley & Sons, 716 p.
- Retta, M. Yin X, van der Putten, PL, Cantre D, Berghu HNC, Tri Ho Q, Verboven P, Struik PC, Nicolaï, B M.** Impact of anatomical traits of maize (*Zea mays* L.) leaf as affected by nitrogen supply and leaf age on bundle sheath conductance. *Plant Science* (in press)
- Tazoe Y, Von Caemmerer S, Estavillo GM, Evans JR.** 2011. Using tunable diode laser spectroscopy to measure carbon isotope discrimination and mesophyll conductance to CO₂ diffusion dynamically at different CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ* **34**: 580–591
- Tazoe, Y.; Noguchi, K.; Terashima, I.** 2006. Effects of growth light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in leaves of a C₄ plant, *Amaranthus cruentus*. *Plant, Cell and Environment* **29**: 691-700.
- Tómas M, Flexas J, Copolovici L, Galmés J, Haliki L, Medrano H, Ribas-Carbó M, Tosens T, Vislap V, Niinemets U.** 2013. Importance of leaf anatomy in determining

mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* **64**: 2269–2281.

- Yin X.Y., Sun Z.P., Struik P.C., Van der Putten P.E.L., Van Ieperen W. & Harbinson J.** 2011. Using a biochemical C₄ photosynthesis model and combined gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements to estimate bundle-sheath conductance of maize leaves differing in age and nitrogen content. *Plant, Cell & Environment* **34**, 2183–2199
- Zhao D, Reddy KR, Kakani, VG, Reddy VR.** 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* **22**:391-403.

3. VARIAÇÃO GENOTÍPICA EM PARÂMETROS ASSOCIADOS COM A FOTOSSÍNTESE E O NITROGÊNIO FOLIAR EM CANA-DE-AÇÚCAR

Souza, N.C.S¹; Vitorello, V.A¹.; Resende, R. T.²

¹Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA- USP ² Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil

RESUMO

A taxa de assimilação de CO₂ e o nitrogênio foliar são importantes características para a definição do crescimento e produção de biomassa vegetal. Em cana-de-açúcar, é desejável que haja um aumento na eficiência do uso de nitrogênio que possa proporcionar ganhos na capacidade fotossintética e produção. Neste estudo, nove materiais genéticos de cana-de-açúcar foram avaliados em condições de casa-de-vegetação quanto a variabilidade dos parâmetros de trocas gasosas, nitrogênio foliar, eficiência do uso de nitrogênio na fotossíntese (PNUE) e conteúdos foliares de nitrato e amônio. As análises foram realizadas em folhas do dossel superior (folhas +1) e inferior (folhas +5) de plantas cultivadas sob o fornecimento contínuo de nitrogênio e após um período de suspensão da fertilização nitrogenada. Os dados mostraram que entre os nove materiais de cana-de-açúcar há diferenças quanto à PNUE, principalmente no acúmulo de nitrogênio foliar, podendo este estar investido e utilizado diferencialmente entre os materiais. No entanto, as análises por componentes principais revelaram que os parâmetros de trocas gasosas explicam a maior parte da variabilidade destes materiais. Os parâmetros de trocas gasosas como a taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática junto com PNUE apresentaram altos índices de herdabilidade no sentido restrito que merecem ser explorados em estudos futuros avaliando-os em outras condições ambientais, diferentes estágios de crescimento e condições de campo.

Palavras-chave: Trocas gasosas; PNUE; Herdabilidade

ABSTRACT

The CO₂ assimilation rate and leaf nitrogen are important traits to define the plant growth and biomass production. In sugarcane, it is desirable to increase nitrogen use efficiency to enhance photosynthetic capacity and production. In this study, nine genetic materials of sugarcane were evaluated in green-house by variability of gas exchange parameters, leaf nitrogen, photosynthesis nitrogen use efficiency (PNUE) and foliar nitrate and ammonium. Analyses were performed in the upper canopy leaves (leaves +1) and bottom (leaves +5) in plants growth under continuous supply of nitrogen and after a period of suspension of the nitrogen fertilization. The data revealed that among sugarcane materials there are differences to PNUE, especially in leaf nitrogen accumulation, which may be invested and used differentially between the materials. However, in the Principal Component analysis the gas exchange parameters explain most of these variability. Gas exchange parameters such as the CO₂ assimilation rate, stomatal conductance along with PNUE showed high heritability in the narrow sense. It is worth exploring in further studies evaluating them in other environmental conditions, different growth stages and field conditions.

Keywords: Gas Exchange, PNUE, heritability

3.1. Introdução

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do mundo. Nos últimos anos, seu interesse econômico tem aumentado significativamente devido ao aumento da demanda mundial para produção de energia sustentável (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011). Somente no Brasil, o uso da biomassa de cana-de-açúcar representou 16% da oferta interna de energia (BEN, 2014).

A alta produção de sacarose e biomassa são reflexos de: (i) uma densa área foliar– que contribui com a absorção da energia solar e sua conversão em energia química (Irvine, 1983; Botha and Moore *et al.*, 2014); (ii) relações dependentes de açúcar entre tecidos fonte e dreno, ainda pouco entendidas (McCormick *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2014) e (ii) alta adaptabilidade a várias condições edafoclimáticas (Zambrosi *et al.*, 2015).

O seu melhoramento genético tem se baseado principalmente na seleção e clonagem de genótipos superiores para aumento de resistência à pragas e doenças e no alto acúmulo de açúcares (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011; Botha and Moore *et al.*, 2014; Burnquist *et al.*, 2010). Como consequência, a produtividade da cultura aumentou 66% em toneladas por hectare com ganhos de 34% no acúmulo de açúcar. Entretanto nos últimos anos, o aumento no conteúdo de açúcar tem sido menos pronunciado (Dal-Bianco *et al.*, 2012, Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011; Burnquist *et al.*, 2010).

Em uma interessante revisão, Sage *et al.* (2013) discutem considerações relevantes que ainda podem ser exploradas em cana-de-açúcar focando na capacidade fotossintética como um potencial alvo para o melhoramento. Afinal, embora a produção de biomassa seja um produto direto da eficiência fotossintética (Evans, 2013), o processo fotossintético não foi um alvo dos programas de melhoramento das últimas décadas.

Dentre os fatores limitantes para a maior eficiência fotossintética, discute-se a inserção de mecanismos de concentração de CO₂ em plantas, aumento na eficiência da captação e conversão de luz, e na eficiência de enzimas envolvidas na carboxilação de CO₂ (Long *et al.*, 2015). No caso da cana-de-açúcar, além destas possibilidades, sua eficiência no uso do nitrogênio na fotossíntese é relativamente baixa. Comparada a outras culturas C₄, esta espécie apresenta um alto conteúdo de nitrogênio foliar que não proporciona maiores taxas fotossintéticas. Aumentos em PNUE poderiam possibilitar um incremento em *A* de 25 % (Sage *et al.*, 2013).

Assim, um desafio subsequente será então avançar nas relações entre a capacidade fotossintética e o uso eficiente de recursos, em especial o nitrogênio, que reflita em ganhos de produtividade. Neste estudo foram realizadas observações iniciais sobre a variação genotípica de materiais brasileiros em parâmetros fotossintéticos, envolvendo o status do N, dois potenciais alvos para os programas de melhoramento em cana-de-açúcar. Os resultados demonstraram que as condições ambientais estudadas foram suficientes para identificar a variabilidade entre os genótipos e que parte das variáveis relacionadas aos parâmetros fotossintéticos apresentam moderados e altos índices de herdabilidade podendo se tornarem útil para a escolha de cultivares.

3.2. Material e Métodos

3.3. Material vegetal e condições experimentais

Nove materiais genéticos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foram cultivados e avaliados em condições de casa-de-vegetação. Os materiais foram provenientes dos programas de melhoramento do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e do RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético). Estes materiais são recomendados pela maturidade precoce (IACSP95-3028), alta produção de biomassa (IACSP95-5094), desempenho sob déficit hídrico (IACP95-5000, IACSP94-2094, RB867515, RB72454) e rusticidade (IAC87-3396). Os materiais IACSP97-7065 e IACSP03-8189 são clones que não foram lançados. Os anos de liberação dos demais materiais foram: 2007, 2010, 2007, 2005, 1998, 1982, 1997 respectivamente.

As gemas reprodutivas de cada material foram plantadas em vasos com capacidade de 12L contendo vermiculita e areia (3:1). As plantas foram irrigadas todos os dias, sendo que a cada dois dias receberam solução nutritiva Hoagland e Arnon (1950) modificada (2mM NH_4NO_3 , 1mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 0.25 mM K_2SO_4 , 0.25 CaCl_2 , 0.1 mM Na-Fe-EDTA e micronutrientes: 50 μM KCl, 30 μM H_3BO_3 , 5 μM ZnSO_4 , 1 μM CuSO_4 and 1 μM NaMoO_4). A condutividade elétrica da solução foi 2.0- 2.5 dS m^{-1} , e o pH 5.8.

Noventa dias após o plantio, as plantas foram divididas em dois grupos: metade das plantas continuaram recebendo a solução nutritiva com sua composição completa (+N) e a outra metade recebeu a mesma solução sem nitrogênio (-N). Antes da suspensão do suprimento de N, o substrato de todos os vasos foi continuamente lavado com água de torneira até a água percolada alcançar valores de condutividade elétrica próximos à água pura (0.3-0.35 dS m^{-1}).

As plantas foram coletadas 22 dias após o início dos tratamentos. A média da temperatura do ar foi 30-35°C e a máxima densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativa dentro da casa de vegetação (PPFD) foi 1800 mol m⁻²s⁻¹.

Medidas de trocas gasosas

As medidas foliares de trovas gasosas foram realizadas com um analisador de gases por infravermelho (Li-6400XT, Licor, USA. As taxas de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) e transpiração (*E*) foram avaliadas em folhas +1 e +5, completamente expandidas e com a lígula aparente (Kuijper, 1915). As medidas foram realizadas sob PPFD de 2000 mol m⁻² s⁻¹, temperatura foliar de 31±0.8 °C, VPD (déficit de pressão de vapor) de 1.86 ± 0.24 kPa com pressão parcial de CO₂ em 38Pa. A partir destas avaliações foram estimadas a eficiência aparente de carboxilação da Rubisco (*A/C_i*) e a eficiência intrínseca do uso da água (*A/g_s*). Após as medidas, a parte aérea foi coletada, seca em estufa a 60° por 72h e subsequentemente pesada para determinar o acúmulo de massa seca.

Conteúdo foliar de nitrogênio e PNUE

O conteúdo de N total foi determinado por quantificação colorimétrica (Baethgen e alley, 1989) após digestão Kjeldahl. A eficiência do uso do nitrogênio na fotossíntese (PNUE) foi calculada com base na relação entre *A* e o conteúdo de N foliar (Pons and Westbeek, 2004).

Conteúdo foliar de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺)

A extração dos íons NO₃⁻ e NH₄⁺ livres foi realizada à 100°C em banho-maria por 1 h, determinando seus conteúdos pelos métodos descritos por Cataldo (1975) e Weatherburn (1967), respectivamente.

3.4. Análises estatísticas

Os modelos de avaliação das variáveis fisiológicas e massa seca foram ajustados utilizando o pacote *asreml* do R (Butler *et al.* 2009) e analisados pelo teste de Scott-knott. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial 9 × 2, sendo 9 genótipos (clones) de cana-de-açúcar e 2 tratamentos (suprimento contínuo e ausência de N, -N e +N, respectivamente).

As medições das parcelas foram subdivididas de acordo com a posição das folhas nas plantas (folhas inferiores +5, e folhas superiores +1). Em termos de análise multi-experimentos (MET) e considerando g genótipos em 11 CT's, o modelo linear misto utilizado pode ser representado pela forma reduzida matricial abaixo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zg} + \mathbf{Wp} + \mathbf{e}, \quad [1]$$

em que $\mathbf{y}$ é o vetor de observações em todos experimentos; $\mathbf{b}$ é o vetor de efeitos fixos (intercepto e posição das folhas e tratamentos); $\mathbf{g}$ é o vetor aleatório de genótipos dentro de experimentos; $\mathbf{p}$ é o vetor aleatório de parcela permanente (ou planta); e $\mathbf{e}$ representa o vetor de resíduos dentro de experimentos. $\mathbf{X}$, $\mathbf{W}$ e $\mathbf{Z}$ são as matrizes de incidência relacionando as observações com os efeitos fixos e aleatórios, respectivamente. Vetores contendo os efeitos aleatórios assumem distribuição normal multivariada, centradas em zero com as seguintes estruturas de covariância: $Cov(g, g') = \mathbf{G}_0 \otimes \mathbf{A}$, $Cov(\varepsilon, \varepsilon') = \mathbf{I}_g \otimes \mathbf{R}_0$ e $Cov(g, \varepsilon') = 0$. Sendo $\mathbf{I}_g$ uma matriz identidade de tamanho g ; $\mathbf{G}_0$ uma matriz de covariância do efeito genético dos clones em cada experimento; $\otimes$ denota o produto de *Kronecker* entre matrizes; e $\mathbf{A}$ (matriz formada pelo denominador dos coeficientes aditivos de parentesco de ordem $g \times g$, obtidos por meio da informação de *pedigree* (Hayes, Visscher e Goddard, 2009)). A $Cov(g, g') = \mathbf{G}_0 \otimes \mathbf{A}$ é representada pela Eq. [4], sendo $\sigma_{g_j}^2$ a variância genética aditiva nas quatro condições experimentais avaliadas (i.e., -N e +N versus +5 e +1), logo $j = \{1, 2, 3, 4\}$.

$$\mathbf{G}_0 \otimes \mathbf{K} = \begin{bmatrix} \sigma_{g_1}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{g_2}^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{g_4}^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sigma_{g_4}^2 \end{bmatrix} \otimes \mathbf{K} \quad [4]$$

Os resíduos são independentes e normalmente distribuídos (NID) com matriz bloco diagonal entre as condições experimentais, fazendo-se $\mathbf{R} = \sigma_{e_1}^2 \mathbf{I}_{n_1} \otimes \sigma_{e_2}^2 \mathbf{I}_{n_2} \otimes \sigma_{e_3}^2 \mathbf{I}_{n_3} \otimes \sigma_{e_4}^2 \mathbf{I}_{n_4}$ (sendo $\sigma_{e_1}^2 \neq \sigma_{e_2}^2 \neq \sigma_{e_3}^2 \neq \sigma_{e_4}^2$). As herdabilidades no sentido restrito, em cada condição experimental, foram calculadas com base na Eq. [2] a partir dos componentes de variância obtidos via procedimento REML- *Average Information* (Gilmour, Thompson e Cullis, 1995) sob o modelo da equação 1, em que $\sigma_{g_j}^2$ e $\sigma_{\varepsilon_j}^2$ são as variâncias genéticas aditivas e as variâncias residuais na j -ésima condição experimental, respectivamente, e σ_p^2 é a variância da parcela permanente. Os *estimated breeding values* (EBV) foram obtidos por meio do procedimento BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) e os erros padrões da média para verificar diferenças entre os parâmetros foram obtidos de acordo com Lynch and Walsh (1998). As correlações genéticas entre caracteres fisiológicos e massa seca

foram, bem como as correlações genéticas entre as condições -N e +N foram obtidas por meio de correlações de Pearson entre os EBV (Resende 2007).

$$h_j^2 = \frac{\sigma_{g_j}^2}{\sigma_{g_j}^2 + \sigma_p^2 + \sigma_{\varepsilon_j}^2} \quad [2]$$

As médias fenotípicas dos clones foram também avaliadas utilizando o método k-means (Jain, 2010). Para isso, utilizou-se as nove variáveis nas condições contínuas de N (+N) e sob restrição de N (-N). A inferência sobre o número ótimo de grupos foi feita avaliando-se a razão da soma de quadrados entre grupos e soma de quadrados total dos dados (SQ_{bet}/SQ_{tot}). Ademais, para avaliar a importância de cada variável (TI) sobre a formação dos grupos, removeu-se uma-a-uma do conjunto de dados, e confroutou-se a razão SQ_{bet}/SQ_{tot} do conjunto reduzido (D1) com a o conjunto total (D0), fazendo-se:

$$TI(\%) = \left[1 - \left(\frac{D1}{D0} \right) \right] \times 100 \quad [3]$$

3.5. Resultados

Acúmulo de massa seca da parte aérea

As diferenças genotípicas para o acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA) foram observadas apenas para o genótipo IACSP95-7065, que independente da condição nitrogenada, apresentou um acúmulo de MSPA inferior em 40% aos demais genótipos (Fig.1).

Em resposta à disponibilidade de N, a MSPA total não alterou na maioria dos genótipos (Fig. 1). A suspensão do fornecimento de N induziu reduções no acúmulo de MSPA no genótipo IACSP95-5000 e aumentos no genótipo IACSP03-8189. Entretanto, quando observamos a MSPA subdivida em folhas e colmos, os genótipos IAC87-3396, IACSP03-8189, IACSP95-5094, RB867515, IACSP94-2094 e RB72454 apresentaram incrementos de 20 até 28% no peso seco dos colmos, ao mesmo tempo que o peso seco das folhas reduziu de 4 até 16%, exceto para o IACSP03- 8189 que não sofreu reduções no peso seco foliar.

O efeito da interação entre os materiais genéticos e a disponibilidade de N no acúmulo de massa seca das folhas e dos colmos não foi significativo ($p > 0.1$). No entanto, o efeito dos materiais genéticos sobre a MS das folhas e colmos foi significativo (** $p < 0.1$) enquanto que, o efeito da disponibilidade de N foi significativo apenas para o acúmulo de MS dos colmos (** $p < 0.1$).

Figura 1. Acúmulo de massa seca da parte área (MSPA) (g) em nove materiais genéticos de cana-de-açúcar cultivados continuamente na presença de N (+N) e na ausência de nutrição nitrogenada (-N). Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa pelo teste de Scott-Knot ao nível de 5% por efeitos da nutrição nitrogenada. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% devido a variabilidade genotípica.

Parâmetros associados com o nitrogênio foliar (N total, NH_4^+ e NO_3^-)

Por causa das interações entre os metabolismos do C e N, o conteúdo de N foliar tem sido um componente importante que se relaciona a capacidade fotossintética das folhas. Aqui, quando observamos o conteúdo de N foliar entre as folhas +1 e +5, o conteúdo de N decresce pela posição da folha, sendo menor em folhas +5 (Fig.2), enquanto A não reduz nestas folhas (Fig. 5). Em condições de -N, esta resposta não é observada para os genótipos IACSP95-7065, IACSP95-5094 e IACSP95-5000 que apresentaram nas folhas +5, um acúmulo de N 35% superior aos demais genótipos.

Numa média geral, os genótipos cultivados na presença contínua de N apresentaram valores entre 1.7-2.5 g N m^{-2} foliar, condizente ao reportado na literatura para cana-de-açúcar 1.7-2.0 g N m^{-2} e superior ao observado para sorgo e milho ~1.0-1.5 g N m^{-2} (Robinson *et al.*, 2013), mesmo com ambas espécies alcançando A_{max} entre 45-50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

O conteúdo de NH_4^+ foi superior em folhas +5 (Tab. 2), reduzindo em condições de -N enquanto o conteúdo de NO_3^- foi menos sensível as alterações da nutrição nitrogenada.

Figura 2. (A) Conteúdo de N foliar (mmol m⁻²) em folhas +1 e (B) em folhas +5 de nove materiais genéticos de cana-de-açúcar cultivados continuamente na presença de N (+N) e na ausência de nutrição nitrogenada (-N). Valores são médias seguidos de erros-padrão. *, *p* < 0.05.

Tabela 2. Conteúdo de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) em nove materiais genéticos de cana-de-açúcar cultivados continuamente na presença de N (+N) e na ausência de nutrição nitrogenada (-N). Valores são médias seguidos de erros-padrão, $p^{**}<0.1$.

Clones		NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-
		Folha +1		Folha +5	
IACSP94- 2094	-N	3.83 ± 0.27	26.76 ± 3.25	8.25 ± 0.08	41.80 ± 1.30
IACSP94- 2094	+N	11.70 ± 1.26	26.76 ± 0.20	25.69 ± 0.58	41.80 ± 0.89
RB72 454	-N	6.51 ± 0.90	19.14 ± 0.69	11.25 ± 0.42	39.08 ± 0.88
RB72 454	+N	22.82 ± 1.78	36.94 ± 1.00	19.94 ± 0.25	40.72 ± 3.59
IACSP95-3028	-N	10.70 ± 0.88	75.09 ± 2.76	21.22 ± 0.04	40.19 ± 4.67
IACSP95-3028	+N	14.41 ± 1.08	34.08 ± 0.69	25.16 ± 2.71	25.13 ± 1.38
IAC87-3396	-N	4.06 ± 0.19	24.64 ± 1.31	16.13 ± 0.69	37.64 ± 1.44
IAC87-3396	+N	7.75 ± 0.09	39.18 ± 4.15	15.36 ± 0.39	29.72 ± 1.12
IACSP95-5000	-N	9.92 ± 0.18	31.02 ± 0.28	18.73 ± 0.81	26.19 ± 0.79
IACSP95-5000	+N	18.40 ± 0.12	26.68 ± 3.46	17.55 ± 1.36	33.46 ± 1.28
IACSP95-5094	-N	6.00 ± 0.16	60.79 ± 0.19	16.16 ± 0.16	35.27 ± 1.47
IACSP95-5094	+N	21.15 ± 1.79	42.99 ± 4.79	18.18 ± 1.24	33.12 ± 0.38
IACSP95-7065	-N	2.54 ± 0.34	37.35 ± 0.20	9.27 ± 1.60	56.10 ± 0.19
IACSP95-7065	+N	5.95 ± 0.14	41.30 ± 3.25	9.26 ± 0.45	52.60 ± 6.25
RB86 7515	-N	6.81 ± 0.59	44.88 ± 0.02	21.22 ± 0.04	41.34 ± 2.25
RB86 7515	+N	3.65 ± 1.37	44.05 ± 3.44	25.16 ± 2.71	33.80 ± 0.60
IACSP03-8189	-N	5.15 ± 0.80	48.07 ± 1.13	5.72 ± 0.60	37.42 ± 2.32
IACSP03- 8189	+N	3.83 ± 0.27	49.59 ± 0.62	10.09 ± 0.10	58.14 ± 8.10

Os efeitos da nutrição nitrogenada em parâmetros associados com a fotossíntese foram avaliados em folhas +1 e +5. Em condições controle, apenas o genótipo IACSP94-2094 apresentou reduções significativas nas taxas de assimilação de CO_2 pela posição da folha, suas folhas +5 apresentaram A inferior em 47%. Para os demais genótipos foram observadas reduções em A somente quando houve a suspensão do fornecimento de N. Curiosamente nesta condição, o genótipo IACSP94-2094 foi o único que não apresentou reduções em A nas folhas +5.

Embora a suspensão do fornecimento de N tenha induzido reduções em A e g_s na maioria dos genótipos, a intensidade dos seus efeitos foi variável. De forma geral, reduções em g_s foram mais expressivas e contribuíram para elevada eficiência no uso intrínseco da água em condições desfavoráveis de N, evitando perdas de seu conteúdo hídrico. Enquanto, menores A

contribuíram com menores taxas na eficiência de carboxilação uma vez que C_i não apresentou alterações significativas (Fig. 3).

A A/C_i dos genótipos IAC03-8189, IACSP94-2094, IACSP95-3028 e RB72454 se destacou positivamente em folhas +5 sob condições de -N e para os genótipos IACSP94-2094, IACSP95-3028 e RB72454, esta resposta pode estar relacionada a maior PNUE. Dentre eles, os genótipos IACSP95-3028 e RB72454 estão sempre entre os mais eficientes no uso do nitrogênio na fotossíntese em todos os ambientes.

Figura 3. (A) Taxa de assimilação de CO_2 em folhas +1, (B) taxa de assimilação de CO_2 em folhas +5, (C) condutância estomática em folhas +1, (D) condutância estomática em folhas +5, (E) concentração intercelular de CO_2 em folhas +1, (F) concentração intercelular de folhas +5 de nove materiais genéticos de cana-de-açúcar cultivados continuamente na presença de N (+N) e na ausência de nutrição nitrogenada (-N). Valores são médias seguidos de erros-padrão. **, $p < 0.01$, ns = não significativo.

Figura 4. (A) Eficiência intrínseca da água em folhas +1, (B) Eficiência intrínseca da água em folhas +5, (C) Eficiência instantânea de carboxilação em folhas +1, (D) Eficiência instantânea de carboxilação em folhas +5, (E) Eficiência do uso de nitrogênio na fotossíntese em folhas +1, (F) Eficiência do uso de nitrogênio na fotossíntese em folhas +5 de nove materiais genéticos de cana-de-açúcar cultivados continuamente na presença de N (+N) e na ausência de nutrição nitrogenada (-N). Valores são médias seguidos de erros-padrão. **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, F1, significativo apenas por efeito genotípico, ns= não significativo.

Variabilidade genotípica, coeficientes de herdabilidade e correlações genéticas

A PCA foi realizada com o objetivo de identificar quais variáveis melhor distinguem os genótipos e a partir delas verificar como os genótipos se agrupam em condições de +N e -N. Em ordem decrescente os genótipos se distinguiram principalmente pelas g_s , A , E , A/C_i em folhas +5 e +1 seguidos pela PNUE nas folhas +5 (Tabela 3). O que resume o conjunto de observações apresentadas nos gráficos anteriores.

O primeiro (PC1) e o segundo componente principal (PC2) explicaram 41.4% e 12.3%, respectivamente, totalizando uma explicação de 53.7% da variação dos dados.

A disposição dos genótipos ao longo do primeiro componente principal (PC1) foi significativa, mostrando relações inversamente proporcionais entre os genótipos. Os genótipos IACSP95-3028, IAC97-3396, IACSP95-5094 e RB72454 se destacam em condições de +N, enquanto o genótipo IACSP03-8189 é inferior. Quando observados em condições de -N o genótipo RB72454 se mantém superior aos demais e os genótipos IACSP95-7065 e IACSP03-8189 se apresentam inferiores. Quando o fornecimento de N do genótipo RB72454 foi suspenso, este ainda conseguiu manter características favoráveis que tornaram seu desempenho similar aos genótipos IACSP95-3028, IAC97-3396, IACSP95-5094 e RB72454 em condições continuas de N.

Posteriormente, foi avaliado a variabilidade genética quanto à herdabilidade das características estudadas. Independente da posição da folha e da condição nitrogenada, o coeficiente de herdabilidade no sentido restrito foi elevado ($h^2 > 0.7$) para A, g_s (exceto na folha +5 com -N), PNUE, NO_3^- e NH_4^+ foliar, com baixos erros padrão. A alta herdabilidade destas características indica que a variabilidade fenotípica observada anteriormente foi de natureza genética. Para os demais parâmetros o grau de herdabilidade variou pela nutrição nitrogenada ou pela posição da folha, podendo haver genes diferencialmente expressos apenas em determinada condição. Altos coeficientes de herdabilidade em parâmetros relacionados a fotossíntese podem se tornar alvos interessantes para programas de melhoramento em cana-de-açúcar, ainda mais abrangendo a PNUE (Tab. 3).

Quanto ao acúmulo de MSPA apenas a massa seca dos colmos apresetaram coeficientes moderados e significativos de herdabilidade, evidenciando que o acúmulo de massa seca das folhas foi uma característica totalmente influenciada pelo ambiente.

Como esperado, A apresentou uma alta correlação genética positiva com g_s , ao mesmo tempo que revelou uma correlação significativa com PNUE. Apesar de PNUE tender a se correlacionar negativamente com o conteúdo de N foliar, esta resposta não é apresentada em folhas +5 com -N (Tabela S1 e S2, Apêndice A). Mostrando que A apresenta um padrão mais estável de correlação com PNUE do que o conteúdo de N foliar.

As análises de correlação genética (r_g) para os parâmetros avaliados entre os dois ambientes (-N e +N) reforçaram ao observado pela PCA, indicando que existiram genótipos que se destacaram nos dois ambientes (Fig. 6).

Figura 5. Análise de componentes principais. Observa-se a formação de três grupos por meio do método *k-means*, representados pelas cores verde, azul e vermelha. Os componentes principais PC1 e PC2 explicaram, respectivamente, 41.4 e 13.2% da variação de todas variáveis, totalizando 53.7%.

Tabela 3. Médias de cada variável em cada um dos três grupos formados pelo k-means. A primeira coluna representa a ordem de importância de cada variável na formação dos grupos.

Variável	I (%)	Grupo 1 (verde)	Grupo 2 (azul)	Grupo 3 (vermelho)
g_s F+5	9.20	0.33	0.19	0.13
A F+1	7.81	35.25	32.64	21.54
E F+5	6.46	4.76	3.69	2.67
A/ g_s F+1	3.41	108.78	134.21	167.15
g_s F+1	3.28	0.34	0.25	0.12
A F+5	2.37	35.60	27.20	19.58
A/ g_s F+5	1.89	103.74	145.46	148.68
PNUE+5	1.81	0.39	0.23	0.20
E F+1	0.14	4.30	4.51	3.16
NH_4^+ F+1	-0.71	14.70	14.74	4.69
N F+1	-0.84	147.79	132.93	105.43
MSC	-0.95	23.85	20.42	19.41
MSF	-1.12	34.46	26.35	36.55
A/ C_i F+1	-2.41	0.31	0.41	0.33
N F+5	-2.44	91.41	118.99	102.14
PNUE				
F+1	-2.59	0.27	0.26	0.21
A/ C_i F+5	-2.73	0.32	0.41	0.27
nitrato+5	-2.77	32.75	37.76	43.15
amonio+5	-3.27	17.62	17.43	12.41
nitrato+1	-4.23	33.90	41.86	42.94

I (%): importância da variável em porcentagem

Tabela 4. Coeficientes de herdabilidades no sentido restrito para 9 materiais de cana-de-açúcar cultivados continuamente na presença de N (+N) e na ausência de nutrição nitrogenada (-N).

Variável	Folha +5		Folha +1	
	-N	+N	+N	-N
$A(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})$	0.84±0.06	0.86±0.06	0.87±0.05	0.81±0.07
$g_s (\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})$	0.50±0.16	0.83±0.07	0.78±0.09	0.83±0.07
$E (\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})$	0.32±0.20	0.54±0.15	0.54±0.15	0.08±0.20
A/g_s	0.33±0.19	0.70±0.11	0.62±0.14	0.64±0.13
A/C_i	0.56±0.14	0.46±0.17	0.00±0.00	0.34±0.19
N foliar (mmol m^{-2})	0.45±0.06	0.50±0.15	0.24±0.21	0.35±0.18
PNUE	0.84±0.06	0.87±0.05	0.65±0.12	0.66±0.12
NO_3^- foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$)	0.74±0.10	0.84±0.06	0.94±0.02	0.71±0.11
NH_4^+ foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$)	0.92±0.03	0.93±0.03	0.71±0.11	0.96±0.02
MSPA (g)	Colmos		Folhas	
	-N	+N	+N	-N
MSPA (g)	0.68±0.12	0.36±0.18	0.00±0.00	0.14±0.20

Figura 6. Herdabilidades no sentido restrito (h^2) de parâmetros fotossintéticos, conteúdo de nitrogênio, nitrato, amônio e massa seca (barras cinzas) e correlações genéticas (r_g) (barras azuis). Os valores de h^2 podem ser vistos tanto para as folhas +5 quanto para as folhas +1 e, também para cultivados continuamente na presença de N (+N) e na ausência de nutrição nitrogenada (-N). Os intervalos das barras de h^2 representam o erro padrão da h^2 . As correlações genéticas referem-se à alteração dos ranks dos genótipos nas condições de -N e +N.

3.6. Discussão

Características fisiológicas expressas pelos fenótipos

Após a suspensão do suprimento de N, os parâmetros fotossintéticos e o conteúdo do N foliar foram mais responsivos a ausência de N do que alterações no acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA). Por esse motivo, não foram observadas relações entre os parâmetros

fotossintéticos e o acúmulo de MSPA. Relações positivas entre a taxa de assimilação do CO₂ e o acúmulo de MSPA foram observadas apenas em folhas de plantas supridas continuamente com N, onde os genótipos IACSP03-8189 e IACSP97-7065 são menos produtivos no acúmulo de MSPA. Em geral, o crescimento é afetado apenas em longos períodos experimentais, pois reduções no crescimento são mais lentas do que alterações na taxa de assimilação de CO₂.

Interessantemente, para alguns materiais como o IACSP87-3396, IACSP03-8189, IACSP95-5094, RB677515, IACSP94-2094 e RB72454 a suspensão do suprimento de N, proporcionou aumento no peso dos colmos (Fig. 5). Esta é uma resposta característica para plantas em fase de maturação, onde em condições de estresse, um menor conteúdo de carboidratos é utilizado na formação de novos tecidos e um maior conteúdo de sacarose é estocado (Cardozo e Sentelhas, 2013; van Heerden *et al.*, 2013). Em nosso caso, não seria uma resposta esperada, uma vez que as plantas avaliadas apresentavam aproximadamente 4 meses de crescimento, fase típica de colmos imaturos, onde prevalece o acúmulo de fibras e proteínas (Bidon e Botha, 2002). No entanto, pode ser também um indicativo de precocidade destes materiais, que embora jovens já apresentam uma considerável formação do colmo e ao expostos à uma condição limitante, a incorporação de C excedeu sua utilização sendo o C estocado.

A taxa de assimilação de CO₂ assim como a mobilização do N foram avaliados em folhas +1 e +5 por sofrerem significantes efeitos pela posição da folha (Masclaus-Daubresse *et al.*, 2010). Aqui, com exceção do genótipo IACSP94-2094, não foram observadas significantes alterações na taxa de assimilação de CO₂ pela posição da folha. Contudo, o conteúdo de N foliar em folhas +5 foi menor do que em folhas +1, quando cultivadas em +N, uma resposta típica de remobilização de N para folhas mais novas (Robinson *et al.*, 2013). As folhas +5 seriam então mais sensíveis à suspensão do fornecimento de N. No entanto, após a suspensão de N, o conteúdo de N nestas folhas se manteve em todos os genótipos, reduzindo apenas em folhas +1 (Fig. 5). Mesmo mantendo os níveis de N foliar, somente os materiais IACSP95-3028, RB72454 mantiveram similares taxa de assimilação de CO₂ nas folhas +5, com maior PNUE. O que para estes genótipos pode estar associado a alta eficiência instântanea de carboxilação nestas folhas (Fig 4D). No estudo desenvolvido por Marchiori *et al.* (2014), a cultivar IACSP95-3028 também apresentou elevado PNUE associado a maior capacidade fotossintética, por apresentar maior conteúdo de clorofilas e altas atividades *in vivo* da PEPC e Rubisco.

Em cana-de-açúcar, PNUE pode se correlacionar negativamente com o N foliar (Ranjith and Meinzer, 1997; Meinzer and Zhu, 1998) ou mesmo apresentar uma correlação positiva (Allison *et al.* 1997; Sage *et al.*, 2013). Não há então uma resposta padrão definida entre A e o

N foliar, se mostrando ser uma característica bastante dependente da cultivar, assim como observado nos nossos dados.

Além da remobilização de N entre as folhas, curtos período de escassez nitrogenada induzem a mobilização de N para componentes do aparato fotossintético que podem contribuir com a manutenção da fotossíntese (Ranjith *et al.*, 1995). Sugere-se que os materiais IACSP95-7065, IACSP95-5094 e IACSP95-5000 não foram capazes de converter/direcionar o N foliar das folhas +5 para melhores taxas de assimilação de CO₂. Afinal, estes genótipos apresentam maiores acúmulos de N foliar associado a reduzido A (Fig. 2 e 3).

Reduções em A pareceram estar mais associadas as alterações na eficiência de carboxilação do que pelo conteúdo de N. Substancialmente, o curto período de estresse confirmou a eficácia da fotossíntese C₄ contra flutuações na disponibilidade de CO₂ mantendo C_i constante (Fig. 3) (Ghannoum *et al.*, 2009). A inalteração em C_i revelou que as reduções em A/C_i possivelmente ocorreram por reduções em propriedades carboxilativas, onde o melhor investimento de N em Rubisco, sua especificidade, e a coordenação das vias C₃:C₄ podem ser mais limitantes à fotossíntese C₄ (Ghannoum *et al.*, 2005; Ranjith *et al.*, 2005; Saliendra, 1996).

Do ponto de vista fisiológico, não existiu uma clara relação entre os parâmetros fotossintéticos e o conteúdo foliar de NO₃⁻ ou NH₄⁺, mas nossos dados podem tornar-se interessantes para a capacidade de mobilização e estocagem destes íons pelos genótipos.

Associações da variabilidade fenotípica com coeficientes genéticos

Avaliações fisiológicas realizadas a partir de trocas gasosas não são usuais para a seleção de plantas e na maioria das vezes os índices de herdabilidade sequer são testados. Discute-se o quanto medidas pontuais nas folhas podem contribuir para identificação de caracteres herdáveis e a complexidade dos eventos envolvidos por traz destas respostas (Long, 2005). No entanto em cana-de-açúcar, Basnayake *et al.* (2015) e Jackson *et al.* (2016) demonstraram que informações a partir destas avaliações tem potencial para caracterizar a variação genotípica para maiores índices de colheita e melhor eficiência em condições de estresse.

Aqui, as análises de herdabilidade inicialmente mostraram que as condições ambientais estudadas foram suficientes para identificar a variabilidade entre os genótipos, uma vez que os valores diferiram significativamente de zero e entre as condições experimentais avaliadas (Figura 7).

O coeficiente de herdabilidade no sentido restrito para a taxa de assimilação de CO₂ foi elevado (>0.7). A magnitude desta herdabilidade não diferiu pelo suprimento de N, nem pela

posição da folha, indicando que foi pouco influenciada pelo ambiente. Resultados semelhantes sobre a herdabilidade de parâmetros associados as trocas gasosas foram encontrados por Jackson *et al.* (2016) e Basnayake *et al.* (2015). Estes autores conseguiram identificar altos valores de herdabilidade para a condutância estomática ao nível da planta e para a concentração interna de CO₂ foliar, que se correlacionam geneticamente com a eficiência de transpiração ao nível da planta. Um passo importante para seleção de genótipos em ambientes sob deficiência hídrica.

Também foi observado alta herdabilidade para g_s e PNUE com altos índices de correlação genética para os ambientes com +N e -N. Isto pode estar contribuindo com as diferenças na taxa de assimilação de CO₂ entre os genótipos e revela que existem genótipos que se sobressaem nas duas condições nitrogenadas. Além disto, observações sobre correlações genéticas positivas entre PNUE e A podem ser interessantes para seleção de plantas com dados de trocas gasosas, sendo capaz de se identificar materiais promissores quanto à disponibilidade de N.

Quanto aos dados de massa seca, é interessante notar que seu acúmulo nas folhas se mostrou uma característica de baixa herdabilidade, enquanto seu acúmulo nos colmos apresenta moderada herdabilidade em condições de +N sendo mais expressiva em -N. Esta resposta reforça nossa discussão inicial sobre a maturação e capacidade de estoque de C de alguns materiais frente à curtas flutuações ambientais mostrando ser uma característica herdável.

A variabilidade genotípica em resposta a disponibilidade de N, pode ser observada pelos resultados fornecidos pelas análises de componentes principais. Os genótipos variaram principalmente por g_s e A em folhas +5, g_s e A em folhas +1 seguidas pelas A/C_i em folhas +1 e PNUE nas folhas +5. As variações na condutância estomática podem aumentar a capacidade fotossintética e potencialmente as A/C_i e PNUE nestas folhas (revisado por Nunes-Nesi *et al.*, 2016; Warren e Adams, 2006).

Ao longo do primeiro componente principal (PC1) foi apresentado uma disposição gradual entre os genótipos de acordo a disponibilidade de N, onde o genótipo RB72454 é superior nos dois ambientes, +N e -N, revelando que este genótipo é mais responsivo ao N e tem maior tolerância à deficiência nitrogenada (Guedes *et al.*, 2014). As respostas dos genótipos não foram relacionadas ao ano de liberação das cultivares nem aos programas Ridesa ou IAC (ver material e métodos). Entretanto, os materiais que não foram lançados, IACSP03-8189 e IACSP95-7065 mostraram características próximas, em geral inferiores.

A identificação da variabilidade genética em cana-de-acúcar sob condições contrastantes de N deve continuar. Os resultados encontrados precisam ser reproduzidos ao

nível do ciclo da cultura e em condições de campo para que se atinjam índices de colheita. Além disto, futuramente são necessários avanços na detecção de regiões do genoma associado a características de interesse (QTL). Apesar da detecção de QTLs em cana-de-açúcar, sobretudo relacionadas a EUN e parâmetros fotossintéticos ainda configurem um desafio (Zhang *et al.*, 2013; Whan *et al.*, 2010; Singels *et al.*, 2010), estes resultados subsidiam a existência de genes diferencialmente expressos responsáveis pela variabilidade observada. O uso das análises de trocas gasosas, desde que realizadas com acurácia, também se apresentou como uma ferramenta potencial na seleção das cultivares.

3.7. Conclusões

Os resultados demonstraram que as condições ambientais estudadas foram suficientes para identificar a variabilidade entre os genótipos e que parte das variáveis relacionadas aos parâmetros fotossintéticos apresentam moderados e altos índices de herdabilidade podendo se tornarem útil para a escolha de cultivares.

REFERÊNCIAS

- BEN**, Balanço Energético Nacional 2014. Relatório Síntese. Ministério de Minas e Energia, disponível em <https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioFinal.aspx?anoColeta=2014&anoFimColeta=2013>. Acesso em 11/07/2016.
- Baethgen, W.E.; Alley, M.M.** 1989. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. *Community Soil Science and Plant Annalysis*, 20:961-969.
- Basnayake, P.A; Jackson, N.G; Inman-Bamber, P. Lakshmanan.** 2015. Sugarcane for water-limited environments. Variation in stomatal conductance and its genetic correlation with crop productivity. *Jounal Exerimental Botany*, 66 : 3945–3958, 2015.
- Bindon K. A., Botha FC.** 2002. Carbon allocation to the insoluble fraction, respiration and triose-phosphate cycling in the sugarcane culm. *Physiologia Plantarum*, 116 :12–19.
- Burnquist, W. L., Redshaw, K., Gilmour, R. F.** Evaluating sugarcane R&D performance: evaluation of three breeding programs. In: ISSCT CONGRESS, 27., 2010, Vera Cruz. Proceedings... Vera Cruz: ISSCT, 2010. p. 1-15.
- Cataldo, J.M.; Haroom, M.; Schrader, L.E.; Youngs, V.L.** 1975. .Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- Cheavegatti-Gianotto, A.; Abreu, H.M.C.; Arruda, P. et al.** 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology*, 4: 62-89.
- Dal-Bianco M., Carneiro M. S., Hotta C. T., Chapola R. G., Hoffmann H. P., Garcia A. A. F., et al.** 2012. Sugarcane improvement: how far can we go? *Curr. Opin. Biotechnol.*23, 265–270.
- Evans, R. J.** 2013. Improving photosynthesis. *Plant Physiology*, 162: 1780-1793.
- Guedes, F.L.; Diniz, R.P.; Balestre, M. Ribeiro, C. B.; Camargos, R.B.; Souza, J. C.** 2014. Inheritance of Nitrogen Use Efficiency in Inbred Progenies of Tropical Maize Based on Multivariate Diallel Analysis. *The Scientific World Journal* Article ID 894710, 7 p.
- Haegle J.W., Cook K.A., Nichols D.M.; Below F.E.** 2013. Changes in nitrogen use traits associated with genetic improvement for grain yield of maize hybrids released in different decades. *Crop Sci.* 53: 1256–1268.

- Hayes, B. J.; Visscher, P. M.; Goddard, M. E.** 2009. Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. *Genetics Research*, 91: 47-60.
- Hoagland, d.r.; Arnon, D. I.** 1950. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.
- Ghannoum, O.; Evans, J. R.; Chow, W.S.; Conroy, J.P.; von Carenmerer, S.** 2005. Faster Rubisco is the key to superior nitrogen-use efficiency in NADP-malic enzyme relative to NAD-malic enzyme C4 grasses. *Plant Physiology*, 137: 638–650.
- Gilmour, A. R.; Thompson, R.; Cullis, B. R.** 1995. Average information REML: an efficient algorithm for variance parameter estimation in linear mixed models. *Biometrics*, p. 1440-1450.
- Irvine, J.E. Sugarcane.** 1983. Pphysiological characteristics, yield potential and climatic and environment factors] .InSymposium on Potential Productivity of Field Crops Under Different Environments, (Smith, W. H. and Banta, S. J., eds), pp. 361–281. Los Baños, Laguna (Philippines): Intl. Rice Res. Inst.
- Jackson P Basnayake J InmaBamber G Lakshmanan P Natarajan S Stokes C.** 2016. Genetic variation in transpiration efficiency and relationships between whole plant and leaf gas exchange measurements in *Saccharum* spp. and related germplasm. *Journal of Experimental Botany*, 67: 861–871.
- Jain, A. K.** 2010. Data clustering: 50 years beyond K-means. *Pattern recognition letters*, v.31 651-666.
- Kuijper, J.** 1915. Degroei van bladschijf, bladscheede en stengel van het suikerriet. *Archief Suikerind. Nederland. –Indie*, 23, 528–556.
- Lynch, M.; Walsh, B.** 1998. Genetics and analysis of quantitative traits (Vol. 1). Sunderland, MA: Sinauer.
- Long S.P., Zhu X.-G., Naidu S.L. & Ort D.R.** 2006. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant, Cell & Environment* **29**, 315–330, 2006.
- Long, S P, Marshall-Colon,A. Zhu, X-Z.** 2015. Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential *Cell*, 161: 56–66.
- Marchiori, P.R.; Machado, E.C.; Ribeiro, R. V.** 2014. Photosynthetic limitations imposed by self-shading in field-grown sugarcane varieties. *Field Crops Research*, v. 155: 30-37.
- Mariano E., Leite J. M., Megda M. X. V., Ciampitti I. A., Vitti A. C., Faroni C. E., et al..** 2016. Biomass and nutrient content by sugarcane as affected by fertilizer nitrogen sources. *Crop Sci.*10.2135/cropsci2015.06.0349.

- McCormick, A.J., Cramer, A.J., Watt, D.A.,** 2008 Culm sucrose accumulation promotes physiological decline of mature leaves in ripening sugarcane. *Field Crops Res*, 108, 250–258.
- Meinzer, F.C., Zhu, J.,** 1998. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C₄ CO₂ concentration system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. *J. Exp. Bot.* v. 49, 1227–1234.
- Nunes-Nesi, A.; Nascimento, V.L.; de Oliveira Silva, F. M.; ; ZSÖGÖN, A. ; Araújo, Wagner L. ; Sulpice, R.** 2016. Natural genetic variation for morphological and molecular determinants of plant growth and yield. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2989–3001.
- Pons, T.L., Westbeek, M.H.M.,** 2004. Analysis of differences in photosynthetic nitrogen use efficiency between four contrasting species. *Physiol. Plantarum*, 122, 68–78.
- Ranjith, S.A., Meinzer, F.C.,** 1997. Physiological correlates of variation in nitrogen-use efficiency in two contrasting sugarcane cultivars. *Crop Science*, 37: 818–825.
- Ranjith, S.A., Meinzer, F.C., Perry, M.H., et al.** 1995. Partitioning of carboxylase activity in nitrogen-stressed sugarcane and its relationship to bundle sheath leakiness to CO₂, photosynthesis and carbon isotope discrimination. *Plant Physiology*, 22: 903–911.
- Resende, M. D. V.** 2007. *Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético*. Embrapa Florestas, Colombo, 561 p.
- Robinson, N.; Vogt, J.; Lakshmanan, P. ; Schmidt, S.** Nitrogen Physiology of Sugarcane. 2014 In: *Sugarcane: Physiology, biochemistry and functional biology*, First Edition. Moore, P.H.; Botha, F.C.; John Wiley e Sons, 716 p.
- Sage, R.; Peixoto, M.M.; Sage, T.** 2014. Photosynthesis in sugarcane. In: *Sugarcane: Physiology, biochemistry and functional biology*, First Edition. Moore, P.H.; Botha, F.C.; John Wiley e Sons, 716 p.
- Saliendra, N.Z., Meinzer, F.C., Perry, F.C., Thom, M.,** 1996. Association between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO₂, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. *J. Exp. Bot.* 47, 907–914.
- Singels, A., Smit, M.A., Butterfield, M.K., et al.** 2010. Identifying quantitative trait alleles for physiological traits in sugarcane: an exploratory study. *Sugar Cane International*, 28(2), 53–55.
- Souza, A.P.; Grandis, A.; Leite, D. C. C; Buckeridge, M.S.** 2014. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. *Bioenerg. Research*, 7:24–35.
- Warren, C.R.; M.A. Adams.** 2006. Internal conductance does not scale with photosynthetic

capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and nitrogen use in photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 29: 192–201.

Weatherburn M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39 : 971-974.

Whan, A., Robinson, N., Lakshmanan, P., et al. 2010. A quantitative genetics approach to nitrogen use efficiency in sugarcane. *Functional Plant Biology*, 37: 448–454.

Zhang, J.; Zhou, M.; Walsh, J.; Zhu, L.; Chen, Y.; Ming, R. 2014. Sugarcane Genetics and Genomics. In: *Sugarcane: Physiology, biochemistry and functional biology*, First Edition. Moore, P.H.; Botha, F.C.; John Wiley & Sons, 716 p.

Zambrosi, F.; Ribeiro, R.V.; Machado, E.C.; Garcia, J.C. 2005. Phosphorus deficiency impairs shoot regrowth of sugarcane varieties. *Experimental Agriculture* 1: 1-11.

4. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTAS AO DÉFICIT HÍDRICO E SUA RELAÇÃO COM A ASSIMILAÇÃO DE CO₂

Souza, N.C.S¹; Vitorello, V.A¹.

¹Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA- USP

RESUMO

Ainda existem poucas informações sobre a inibição metabólica da taxa de assimilação de CO₂ (A) em plantas C4 expostas ao deficit hídrico, principalmente com relação ao metabolismo e o status nutricional de N da folha. Assim, neste estudo, foram avaliadas relações temporais entre os metabolismos fotossintético e de N, de forma a investigar os fatores atuantes na limitação metabólica de cana-de-açúcar por efeitos do deficit hídrico. Dois cultivares de cana-de-açúcar, IACSP95-3028 e IACSP95-5000, avaliados anteriormente quanto a relações entre A e o nitrogênio foliar (capítulo II) foram cultivados em um período de deficit hídrico sendo posteriormente reidratados. Durante a fase inicial de deficiência hídrica, as reduções na taxa de assimilação de nitrato foram mais expressivas do que reduções em A. No entanto, o metabolismo de N só contribuiu com a inibição metabólica na fase de estresse severo. O início da regulação negativa da fotossíntese foi associado a menor atividade de Rubisco e com a progressão do estresse diferentes processos passaram a contribuir com as reduções em A. A atividade de Rubisco também foi relevante para a manutenção da capacidade fotossintética da cultivar mais tolerante, o IACSP95-3028. Junto com as menores reduções na atividade de Rubisco, este cultivar apresentou decréscimos mais lentos no metabolismo de N, associado a menores danos na capacidade fotossintética, possibilitando a superação da limitação metabólica de forma mais rápida do que a cultivar IACSP95-5000.

Palavras-chave: Fotossíntese C4; Limitação metabólica; Reidratação

ABSTRACT

There are still little information about metabolic inhibition of the CO₂ assimilation rate (A) in C4 plants exposed to water deficit, particularly with respect to N metabolism and nutritional status. In this study, temporal relations were evaluated between the photosynthetic and N metabolisms in order to investigate factors involved in the metabolic limitation of sugarcane by water deficit effects. Two cultivars of sugarcane, IACSP95-3028 and IACSP95-5000 evaluated previously (Chapter II) were growth in a period of water deficit, subsequently rehydrated. During the initial phase of water stress, reductions in nitrate assimilation rate was most expressive than reductions in A. However, the N metabolism only contributed to the metabolic limitation in severe stress. The beginning of the negative regulation of photosynthesis was associated with decreased in Rubisco activity. With the stress progression different processes began to contribute to reductions in A. Rubisco activity was also important for the maintenance of photosynthetic capacity in the tolerant cultivar, IACSP95-3028. Along with smaller decreases in Rubisco activity, this cultivar showed slower decrease in N metabolism associated with smaller damage in the photosynthetic capacity, enabling to overcome the metabolic limitation faster than the IACSP95-5000

Keywords: C4 Photosynthesis, Metabolic limitation, Rehydration

4.1. Introdução

A cana-de-açúcar apresenta o metabolismo fotossintético C4 (Hatch e Slack, 1966), o que torna a cultura altamente eficiente na produção de biomassa e no uso de recursos, como o nitrogênio e a água (Smit e Singels, 2006; Sage *et al.*, 2013). O mecanismo de concentração de CO₂ ao redor da enzima Rubisco possibilita que sejam alcançadas altas taxas de assimilação de CO₂ sem aumento no requerimento de N para os componentes fotossintéticos e, sem que haja também um expressivo aumento em g_s evitando a perda de água (Ghannoum *et al.*, 2011).

Esta eficiência no uso de água e de nitrogênio é desejável para enfrentar períodos de estiagem e ambientes quentes e áridos, onde a escassez de recursos é um importante fator limitante na produtividade das culturas. No entanto não tem sido suficiente para superar a alta sensibilidade da fotossíntese C4 quando a disponibilidade hídrica é reduzida (Ripley *et al.*, 2007; Ghannoum, 2009).

A deficiência hídrica induz um baixo estado hídrico nos tecidos, perda de turgidez celular, desbalanço energético e perdas na capacidade fotossintética, além de interferir com a absorção de N e estresse osmótico (Chaves *et al.*, 2009). As reduções na taxa fotossintética são causadas em resposta ao fechamento estomático, que ao evitar perdas excessivas de água reduz a difusão de CO₂, e/ou por efeitos não estomáticos, caracterizados por limitações metabólicas (Lawlor e Cornic, 2002).

Em cana-de-açúcar, tem se observado reduções na fotossíntese associadas a limitação metabólica, principalmente por menores atividades da Rubisco (Saliendra *et al.*, 1996; Vu e Allen, 2009), maior retro-difusão de CO₂ das células da bainha (Saliendra *et al.*, 1996), estresse oxidativo (Sales *et al.*, 2015) e fotoinibição (Silva *et al.*, 2007). Parte destas respostas são moduladas por acúmulo de metabólitos como os carboidratos solúveis, alterações no transporte de elétrons e na síntese de ATP, redução do conteúdo de clorofilas, inibição enzimática, expressão de genes e turnover de proteínas (Lawlor e Tezara, 2009; Chaves *et al.* 2009), onde alterações no metabolismo de N é um fator agravante para a regulação da fotossíntese (Foyer *et al.*, 1998).

Estudos sobre os efeitos do déficit hídrico mostram que a assimilação de N, principalmente a redução do nitrato, é acentuadamente reduzida. Com isto são observados diminuição nos níveis de proteínas, resultante tanto de reduções na sua síntese como incrementos na sua degradação. Também são observadas reduções no conteúdo de clorofilas, ao mesmo tempo que são observados aumentos nos níveis de aminoácidos livres e de NH₄⁺ por

reações de catabolismo (Foyer *et al.*, 1998; Chaves *et al.*, 2009; Betti *et al.*, 2012). Quando há um menor conteúdo de N foliar, o desbalanço entre a taxa C/N induz a expressão de genes marcadores de senescência (Chen *et al.*, 2016).

Estas alterações no metabolismo de N são relatadas na literatura (Foyer *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2001; Dugo *et al.*, 2009) com certa frequência e provavelmente são concomitantes com o desenvolvimento da inibição metabólica da fotossíntese. Apesar disto, as relações causais e possíveis funções destas alterações não são conhecidas. Ainda existem informações bastante fragmentadas, sendo que a maioria destes estudos foi realizada com plantas do tipo C3.

Numa visão geral, também não está claramente definido quando o metabolismo de N se torna limitante para a capacidade fotossintética por efeitos do deficit hídrico. Discute-se que a limitação do crescimento das culturas nos estágios iniciais do deficit hídrico pode ocorrer principalmente devido a deficiência nitrogenada (Liu *et al.*, 2005) assim como a nutrição nitrogenada pode ser mais limitante para a fase de recuperação do estresse (Roth *et al.* 2013).

Neste contexto, objetivou-se avaliar relações temporais entre os metabolismos fotossintético e de N que possam estar envolvidas na limitação metabólica da cana-de-açúcar por efeitos do deficit hídrico. Para isto, processos envolvidos na limitação metabólica de dois cultivares de cana-de-açúcar com resposta diferencial à nutrição nitrogenada (cap. II) foram investigados durante o período de deficit hídrico e reidratação.

4.2. Material e Métodos

4.3. Material vegetal e condições experimentais

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação, com temperatura média de 30-35°C e a máxima densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativa (PPFD) de 1800 mol m⁻²s⁻¹. Foram utilizados dois cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) IACSP95-3028 e IACSP95-5000 provenientes do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e escolhidos a partir dos resultados apresentados no capítulo II desta tese.

As gemas reprodutivas de cada material foram plantadas em potes com capacidade de 12L contendo substrato Carolina Soil padrão 07 (Carolina Soil do Brasil), apresentando em sua composição vermiculita, turfa de *sphagno* e casca de arroz. Durante a fase de crescimento vegetal, as plantas foram irrigadas todos os dias, sendo que a cada dois dias receberam solução nutritiva Hoagland e Arnon (1950) modificada (2mM NH₄NO₃, 1mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄,

0.25 mM K_2SO_4 , 0.25 $CaCl_2$, 0.1 mM Na-Fe-EDTA e micronutrientes: 50 μM KCl, 30 μM H_3BO_3 , 5 μM $ZnSO_4$, 1 μM $CuSO_4$ and 1 μM $NaMoO_4$) com condutividade elétrica de 2.0- 2.5 $dS\ m^{-1}$, e o pH 5.8.

Noventa dias após o plantio, as plantas foram divididas em três grupos: plantas controles continuamente irrigadas, plantas que foram expostas ao progressivo deficit hídrico e plantas que após o período de estresse foram reidratadas. O conteúdo volumétrico de água no solo foi monitorado diariamente com um sensor de umidade, modelo GS3 (Decagon Devices). O deficit hídrico foi imposto pela suspensão da irrigação e durante o período de reidratação as plantas foram irrigadas diariamente até a saturação do solo. O início das coletas em resposta a deficiência hídrica ocorreu quando as plantas apresentaram reduções significativas na condutância estomática, 5 dias após a suspensão da rega (Fig. 1).

Figura 1. Relação entre a condutância estomática em folhas +1 das cultivares de cana-de-açúcar IACSP95-3028 e IACSP95-5000, com o conteúdo volumétrico de água no substrato ao longo de 14 dias após a suspensão da irrigação. A taxa de assimilação de CO_2 em 38Pa é mostrada para os dois cultivares até 5 dias sem irrigação quando se iniciou as coletas.

Medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

As medidas foliares de trocas gasosas foram realizadas em folhas +1 com um analisador de gases por infravermelho (Li-6400XT, Licor, USA). Para avaliação da capacidade fotossintética destas folhas foram analisadas a resposta de A em relação a pressão parcial de CO_2 , perfazendo curvas A/C_i e estimando a A_{pot} . Antes das medidas, o tecido foliar foi brevemente aclimatado sob PPFD de 1000 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ por 5 min. Posteriormente, a PPFD foi aumentada até 2300 $\mu mol\ m^{-2}$ por mais 5 min. A pressão parcial de CO_2 (C_a) dentro da câmara

foliar do Li-6400 foi modificada entre 5 e 200 Pa em 13 etapas: 38, 30, 20, 10, 7.5, 5, 38, 60, 90, 110, 150, 170 e 200 Pa (Marchiori *et al.*, 2014). A temperatura foliar foi monitorada para se manter próximo a 30°C. Os parâmetros bioquímicos das curvas foram calculados segundo Collatz *et al.* (1992).

A assimilação potencial foi determinada quando A atingiu valores constantes sob saturação de CO_2 (Lawlor, 2002). A limitação metabólica (L_m) da fotossíntese foi estimada a partir da equação:

$$[(A_{\text{potC}} - A_{\text{potD}}) / A_{\text{potC}}] * 100 \quad (1)$$

Sendo que A_{potC} é a assimilação potencial de CO_2 expressa em folhas +1 das plantas controle e A_{potD} é a assimilação potencial de CO_2 na folhas +1 da plantas sob deficit hídrico (Lawlor *et al.*, 2002). A partir dos dados de trocas gasosas também foi calculado a eficiência do uso da água A/E .

A resposta de A para a PPFD (curva A/Q) foi avaliada após um breve procedimento de aclimação como descrito para a realização das curvas A/C_i . O valor de Ca foi mantido em 38 Pa e os níveis de PPFD utilizados foram: 2300, 1900, 1500, 1100, 700, 400, 300, 200, 250, 100, 50 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As respostas das curvas de luz foram analisadas por equações propostas por Lieth e Reynolds (1987).

Com um fluorômetro acoplado (modelo LI-6400-40, Licor, USA), foram avaliados os seguintes parâmetros de fluorescência da clorofila a : eficiência quântica potencial do fotossistema II [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$], coeficiente de extinção fotoquímico [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$], coeficiente de extinção não fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] e o transporte aparente de elétrons [$ETR = (F_q'/F_m' \times Q \times 0.4 \times 0.85)$] (Baker, 2008). F_m e F_o significam, respectivamente, fluorescência máxima e mínima de folhas adaptadas ao escuro e, F_m' e F_s , são respectivamente, fluorescência máxima e em equilíbrio dinâmico e F_o' é a fluorescência mínima após iluminação com vermelho-distante de folhas expostas a luz (GENTY *et al.*, 1989; SCHREIBER *et al.*, 1994). Os dados foram obtidos através do método de pulso de saturação nas folhas iluminadas, previamente adaptadas ao escuro por 30 min. Para isto, a intensidade e a duração do pulso de saturação de luz foram de 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 0,7 s, respectivamente.

Análise das Curvas de CO_2 e de luz

Para a estimação dos parâmetros bioquímicos através das curvas A/C_i foi utilizado o modelo proposto por Collatz *et al.* (1992):

$$\theta M^2 - M(V_T + \alpha Q) + V_T \alpha Q = 0 \quad (2)$$

$$\beta A_g^2 - A_g \left(M + \frac{K_T}{P} \right) + MK_T C_i / P = 0 \quad (3)$$

Onde Θ significa a convexidade da curva de luz, M é taxa fotossintética máxima na curva A/C_i , V_T é a capacidade da Rubisco saturada pelo substrato dependente da temperatura, α significa a eficiência quântica aparente da curva A/Q , β é a convexidade da curva A/C_i , A_g representa a taxa de assimilação somada a taxa de respiração (R_d), K_T é a eficiência da atividade de PEPC dependente da temperatura e relacionada a C_i e a pressão atmosférica (P). (Marchiori *et al* 2014).

A capacidade máxima da Rubisco (V_{max}) e a eficiência de carboxilação da PEPC (K) foram estimadas com a solução das equações abaixo assim como houve a correção dos parâmetros bioquímicos foram para 25°C:

$$V_T = \frac{[V_{max} Q_{10}^{\frac{T_L-25}{10}}]}{\{[1+e^{0.3(13-T_L)}][1+e^{0.3(T_L-36)}]\}} \quad (4)$$

$$V_T = K Q_{10}^{(T_L-25)/10} \quad (5)$$

$$R_T = \frac{[R_d Q_{10}^{(T_L-25)/10}]}{[1+e^{1.3(T_L-55)}]} \quad (6)$$

Para estimar a convexidade da curva (β) foi utilizada a equação proposta por Lieth e Reynolds (1987) na curva A/C_i . A_{max} significa a assimilação de CO_2 sob condições saturadas de luz (PPFD=2300 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$).

$$A = \frac{((\alpha Q + A_{max} + R_d) - (\alpha Q + A_{max} + R_d)^2 - (4\alpha Q \Theta (A_{max} + R_d)))^{0.5}}{(2\Theta)} - R_d \quad (7)$$

Os parâmetros provenientes da curva de luz também foram analisados pelo modelo proposto por Lieth e Reynolds (1987).

Atividade *in vivo* de redutase de nitrato

A atividade da enzima redutase de nitrato foi feita depois das medidas de trocas gasosas, através do método *in vivo* de acordo com Coombs e Hall (1987) e Snell e Snell (1949) que estima a quantidade de nitrito (NO_2^-) produzido. O método para medir o nitrito é baseado na formação de um sal de diazônio durante a reação em meio ácido com a sulfanilamida. Este complexo reage com o NNEDA, formando um complexo colorido rósea e possui absorbância em 540 nm. Para a atividade enzimática, foram utilizados 10 discos foliares ($\phi = 0,5$ cm) com

aproximadamente 200 mg de massa fresca. Os discos foram colocados em tubos de ensaio envolvidos com papel alumínio (para impedir a entrada de luz) e foram adicionados 5 mL do meio de incubação (tampão fosfato 0.1 M em pH 7.5, KNO₃ 50 mM e isopropanol 1%). O meio de reação foi exposto ao vácuo por 4 minutos.

A reação ocorreu durante um período de 30 min em banho-maria a 30°C e foi paralisada a 100°C. Ao atingirem a temperatura ambiente, foi mensurada a concentração de nitrito nos extratos de incubação. Foram pipetados 2 mL dos extratos de incubação em tubos de ensaio contendo 1 mL do meio de incubação, 1 mL de sulfanilamida (sulfanilamida 1% diluída em HCl 2,4 N) e 1 mL de NNEDA (N-1-naftil etilenodiamina bicloridrato 0,02%) que em seguida foram agitados em vórtex. Os tubos ficaram em repouso por 15 minutos e, em seguida, os extratos foram lidos em espectrofotômetro visível em 540 nm.

Determinação do conteúdo de N e clorofila

Amostras de folhas secas, em tubos de digestão, foram digeridas com 1,1 g de catalisador (K₂SO₄, CuSO₄ e Se) e 1.5 mL de H₂SO₄ concentrado. Estes tubos foram acondicionados em bloco digestor com aumento gradativo da temperatura (de 100 °C a 400 °C), até a digestão completa do material. O material mineralizado foi diluído em água destilada e o volume completado para 10 mL. Para quantificar o nitrogênio foram adicionados em tubos de ensaio: 0.1 mL do mineralizado, 0.9 mL do diluente (catalisador e H₂SO₄), 5.5 mL do tampão I (Na₂HPO₄, KNaC₄H₄O₆·4H₂O e NaOH), 4 mL do tampão II (C₇H₅NaO₃ e Na₂[Fe(CN)₅NO]·2H₂O) e 2 mL da solução III (NaClO 5,25%), seguido de agitação. Os tubos ficaram em banho - maria a 37° por 15 minutos, depois foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro em 650 nm. Foi utilizado a solução de (NH₄)₂SO₄ como padrão (BAETHGEN e ALLEY, 1989). As determinações dos níveis das clorofilas foram realizadas pelo método descrito por Lichtenthaler (1987).

Sintetase de glutamina

Amostras foliares foram maceradas com tampão fosfato 0.1 M (pH 8.0) + EDTA 5 mM + β-mercaptoetanol 10 mM + DTT 10 mM + PVP 1%. Após extração, foi realizada uma centrifugação em 14.000 rpm/ 30min em 4°C. A reação foi preparada em eppendorfs com adição de: Tampão TRIS-HCL 0.25 M pH 7.0 + glutamato de sódio 0.3 M + ATP 30 mM + MgSO₄ 0.5 M + extrato enzimático + solução hidroxilamina (1:1). Posteriormente os

eppendorfs foram agitados em vortex e incubados a 30°C. A reação foi paralisada com reagente férrico e as leituras realizadas em 540 nm (Elliott, 1953).

Atividade GDH

A determinação enzimática da desidrogenase de glutamato aminante (GDH) foi conduzida de acordo com Coombs e Hall, (1982). Neste método, a enzima catalisa de forma irreversível a aminação do α -cetoglutarato produzindo glutamato envolvendo a oxidação do NADPH. Para mensurar a atividade da enzima, foram pipetados diretamente na cubeta 1.8 mL de tampão Tris-HCl (tampão Tris-HCl 50 mM em pH 7.4, NH_4Cl 10 mM, α -cetoglutarato 7 mM e CaCl_2 2 mM), 0.2 mL do extrato e 0.2 mL de NADPH 2.5 mM. A oxidação do NADPH a 25 °C foi monitorado por meio da redução da absorbância em 340 nm durante 3 min.

Determinação de nitrato

Amostras secas de tecido foliar e raízes foram maceradas e colocadas em tubos de ensaio com 15 mL de água deionizada, transferindo-os para banho-maria por 1 h a 100 ° C. Logo após o resfriamento, os extratos foram filtrados e centrifugados a 3000 g por 10 min. Para a análise do conteúdo de NO_3^- no xilema não foi necessário o procedimento de extração.

Foram pipetados em tubos de ensaio 0.1 mL do extrato, 0.2 mL da solução de ácido salicílico (5% $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ diluído em H_2SO_4 concentrado) e 4.7 mL de NaOH 2N, seguido de agitação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 410 nm e o conteúdo de nitrato foi calculado com base na curva padrão de nitrato em $\mu\text{mol NO}_3^-\text{L}^{-1}$ (Cataldo *et al.*, 1975).

Determinação de amônio

Foram pipetados em tubos de ensaio 0.4 mL do mesmo extrato utilizado na determinação do nitrato, 2.5 mL da solução A (solução de fenol 1% (p/v) e nitroprussiato de sódio 0.005% (p/v) e 2.5 mL da solução B (solução de hidróxido de sódio 0.5% (p/v) e hipoclorito de sódio 2.52% (v/v), agitando a cada adição. Os tubos permaneceram a 37 ° C por 20 minutos em banho-maria e, após esse período, os extratos foram lidos em espectrofotômetro em 625 nm (Weatherburn, 1967).

Conteúdo de aminoácidos livres totais

O extrato para determinação de aminoácidos livres totais foi obtido a partir da extração de 50 mg MS em 5 mL de água deionizada a 100°C por 30 min. 100µL do sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de ensaio, onde se adicionou 250 µL de tampão Citrato 0.2 M, pH 5.0 e 250 µL de reagente Ninhidrina. A solução foi misturada em vortex e colocada em banho - maria em 100°C. A reação foi parada em banho de gelo e as leituras foram realizadas em 570 nm (Peoples *et al.*, 1989; Yemm e Cocking, 1955).

Extração e ensaio de atividade de enzimas carboxilativas

A extração de proteínas foi realizada com amostras de folhas maceradas com tampão fosfato de potássio, a 4 °C, 100 mM pH 7.4 + EDTA 1 mM e determinadas pelo método de Bradford.

Para atividade de PEP carboxilase, o meio de extração diferiu apenas no pH do tampão fosfato de potássio que foi 7, baseado em Degli'nnocentiet *al.* (2002). A atividade foi mensurada em um meio de reação contendo NaHCO₃ 10 mM, NADH 0.3 mM, MgCl₂ 5 mM e MDH (Malato desidrogenase) 33nkat dissolvidos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.8 junto com o extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de fosfoenolpiruvato (PEP) 20 mM e a atividade enzimática foi determinada observando a oxidação de NADH, pela diminuição da absorbância em 340 nm.

Para atividade de Rubisco, foi utilizado o mesmo tampão de extração para proteínas solúveis. A atividade também foi medida espectofotometricamente pela taxa de oxidação de NADH em 340 nm (Sage *et al.*, 1988; Reid *et al.*, 1997). O ensaio foi realizado em cubetas de 1 ml contendo tampão de reação composto por: bicina 100 mM pH 8.0, KHCO₃ 25 mM, MgCl₂ 20 mM, ATP 3.5 mM, fosfocreatina 5 mM, 80 nkat de desidrogenase G-3-P, 80 nkat de 3-fosfoglicerato fosfoquinase, 80 nkat de creatina fosfoquinase e NADH 0.25 mM.

Peroxidação lípica (TBARS)

Para determinação da peroxidação lipídica, amostras foliares foram maceradas com ácido tricloroacético (TCA) a 5% (p/v). O material obtido foi filtrado e centrifugado por 20 minutos em 12.000 rpm, a 4°C. Alíquotas dos sobrenadantes foram adicionadas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos de ensaio foram imediatamente incubados em banho-maria por 60 minutos a 95°C, sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para o banho de gelo, até alcançar a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 9000 rpm por 10 minutos sob temperatura

ambiente, sendo as absorbâncias dos sobrenadantes lidas em 532 e 660 nm (Heath e Pacher, 1968; Sudhakar *et al.*, 2001).

4.4. Análises estatísticas

Os efeitos da cultivar e o deficit hídrico foram analisados por análises de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2×5 , sendo 2 cultivares de cana-de-açúcar e 5 períodos de exposição ao deficit hídrico (C e DH, respectivamente). Para a análise de algumas variáveis foram acrescentadas as respostas no período de reidratação, utilizando então o esquema fatorial 2×6 , sendo 2 cultivares de cana-de-açúcar e 6 períodos de exposição ao deficit hídrico.

4.5. Resultados

Parâmetros de crescimento e relações hídricas

O crescimento das cultivares foi avaliado durante a progressão do deficit hídrico quanto ao acúmulo de massa seca na parte aérea e raízes. Nestes 14 dias, os dois cultivares, IACSP95-3028 e IACSP95-5000, não apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto o acúmulo de massa foliar (Fig. 2A). No entanto, o sistema radicular de ambas cultivares aumentou significativamente durante a progressão do deficit hídrico. A cultivar IACSP95-5000 que apresentou um sistema radicular maior no controle, apresentou um incremento de 30.18% no peso seco das raízes enquanto que para a cultivar IACSP95-3028 este incremento foi de 26%. O maior sistema radicular da cultivar IACSP95-5000 induziu uma relação raiz/parte aérea superior (Figura 2).

Figura 2. (A) Massa seca das folhas, (B) massa seca das raízes, (C) matéria seca da parte aérea e (D) relação raiz: parte aérea de plantas de cana-de-açúcar durante a progressão do deficit hídrico. Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde C x DH significa a diferença estatística pela interação dos fatores (cultivares e o deficit hídrico), C, significância em resposta as cultivares e DH pelo deficit hídrico, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Foram escolhidos como indicadores para as relações hídricas o conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) e o uso eficiente da água (A_{380}/E). As folhas +1 de cana-de-açúcar apresentaram reduções significativas em CRA somente aos 14 dias após a suspensão da rega. Na cultivar IACSP95-5000 esta redução foi mais expressiva do que na cultivar IACSP95-3028, embora seja significativa em ambas cultivares. Por outro lado, as diferenças em A_{380}/E não foram significativas durante o período experimental.

Figura 3. (A) conteúdo relativo de água (CRA), (B) eficiência do uso da água (A_{380}/E), em folhas +1 de cana-de-açúcar durante a progressão do deficit hídrico. Os valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde C x DH significa a diferença estatística pela interação dos fatores (cultivares e o deficit hídrico), C, significância em resposta aas cultivares e DH pelo deficit hídrico, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Trocas gasosas e parâmetros fotoquímicos

A cultivar IACSP95-5000 apresentou valores de condutância estomática inferiores a cultivar IACSP95-3028, inclusive em condições controle, sendo uma característica própria da cultivar neste experimento. Ao final do experimento, as reduções em g_s na cultivar IACSP95-5000 foram em média 93.3%, enquanto que g_s reduziu 89.6% na cultivar IACSP95-3028.

As taxas de assimilação de CO_2 (A_{380}) acompanharam o mesmo padrão da condutância estomática, apresentando decréscimos lineares a partir do primeiro ponto de coleta em ambas cultivares (Fig. 4A). Embora tenha apresentado menor g_s , a cultivar IACSP95-5000 apresentou a mesma taxa de assimilação que a cultivar IACSP95-3028 em condições controle, não sendo g_s um fator limitante para A . As diferenças em A_{380} entre as cultivares foram mais evidentes durante as duas primeiras coletas sob deficit hídrico, onde a cultivar IACSP95-3028 foi claramente menos sensível à suspensão da rega.

Embora foram observadas reduções em g_s e A_{380} desde a primeira coleta sob deficit hídrico, a concentração intercelular de CO_2 (C_i) não apresentou alterações significativas durante o período experimental. As reduções em A_{380} aos 5 dias de deficit hídrico não ocorreram em resposta a C_i , assim como nas últimas coletas de seca, onde C_i atinge valores mais elevados, sugerindo a presença de limitações metabólicas. A taxa de transpiração reduziu linearmente com a progressão do deficit hídrico em ambas cultivares (Fig. 4)

Figura 4. (A) Taxa de assimilação do CO₂ (A_{380}), (B) condutância estomática (g_s), (C) concentração intercelular de CO₂ (C_i) e (D) transpiração em folhas +1 de plantas de cana-de-açúcar durante a progressão do déficit hídrico. Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde a interação dos fatores (cultivares e o déficit hídrico), assim como seus efeitos isolados apresentaram o mesmo comportamento, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Quanto a capacidade de transporte de elétrons, dissipação fotoquímica e NPQ não foram observadas diferenças entre as cultivares. Para estes parâmetros, o fator determinante foi o déficit hídrico que induziu pequenas alterações aos cinco dias de estresse, com efeitos expressivos a partir do 8º dia sem irrigação (Fig. 5). Neste momento ETR reduziu até 60% nas cultivares, direcionando menos elétrons por dissipação fotoquímica, o que passou a contribuir com as menores taxas de assimilação de CO₂ observadas anteriormente. Indicativos de danos ao fotossistema II, observados pela sua eficiência quântica máxima (F_v/F_m) foram encontrados apenas no ponto de estresse mais severo (14 dias) quando a cultivar IACSP95-5000 foi mais sensível.

Figura 5. (A) Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), (B) dissipação fotoquímica (qp), (C) dissipação não fotoquímica (NPQ) e (D) eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) em folhas +1 de plantas de cana-de-açúcar durante a progressão do deficit hídrico. Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde C x DH significa a diferença estatística pela interação dos fatores (cultivares e o deficit hídrico) C, significância em resposta as cultivares e DH pelo deficit hídrico, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Limitações estomáticas e metabólicas

A ocorrência de limitações estomáticas e bioquímicas foram avaliadas através do método proposto por Lawlor (2000) considerando as taxas de assimilação de CO_2 em função de C_i (A/C_i) (Fig. 6).

Os dados obtidos a partir das curvas (A/C_i) evidenciaram que a cultivar IACSP95-5000 apresentou valores de C_i mais baixos que a cultivar IACSP95-3028 em todas concentrações ambientais de CO_2 . Isto pode ser atribuído a propriedades difusivas de CO_2 , citado anteriormente, quando mesmo em condições controle este cultivar já apresentava menor g_s .

Diante da curva de resposta de L_m ao tempo de exposição à deficiência hídrica foi possível caracterizar quatro fases distintas de estresse em cana-de-açúcar: leve, moderado,

		IACSP5 5000					IACSP95 3028						
α	Curva	0	5	8	11	14	P	0	5	8	11	14	p
	<i>Luz</i>	0,045	0,05	0,034	0,0014	-----		0,048	0,044	0,035	0,019	0,010

Figura 7. Taxa de limitação metabólica (L_m) em folhas +1 de cultivares de cana-de-açúcar caracterizada em quatro fases do déficit hídrico: leve, moderado, severo e recuperação. Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde a interação dos fatores (cultivares e o déficit hídrico), assim como seus efeitos isolados apresentaram o mesmo comportamento, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Tabela 2. Porcentagem da limitação estomática (L_s), limitação metabólica (L_m) e assimilação potencial (A_{pot}) em folhas de cana-de-açúcar durante a progressão do estresse hídrico. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas e maiúsculas indicam diferenças estatísticas (5% de probabilidade) entre cultivares e por efeitos do déficit hídrico, respectivamente.

	IACSP95-5000					IACSP95-3028					
	Dias sem irrigação					Dias sem irrigação					
	0	5	8	11	14	0	5	8	11	14	Valor-p
Ls (%)	19aB	27aB	23aB	21bB	67aA	20aB	35aAB	35aB	43aAB	63aA	0.11
Lm (%)	0aD	40aC	67aB	80aA	90aA	0aD	15bC	44bB	67bA	75bA	0.11
Apot	43aA	25bB	10bC	8bD	5aD	48aA	41aA	26aB	15aC	10acD	0.814

Atividades de Rubisco e Pepc

Os efeitos do déficit hídrico em K_T foram similares nos dois cultivares, decrescendo gradativamente com a progressão do estresse. No entanto, foi observada uma diferença genotípica quanto a V_{max} . Durante a fase de estresse leve, a suspensão da irrigação induziu decréscimos em V_{max} , significativos para a cultivar IACSP95-5000. Ao progredir com a suspensão da irrigação a cultivar IACSP95-3028 apresentou sempre as reduções mais brandas em V_{max} .

As atividades de Rubisco e PEPC *in vitro* diferiram quanto a cultivar e a intensidade da seca (Fig. 8A e 8B). Em condições controle e com 5 dias sem irrigação, não houve diferenças significativas quanto a atividade de PEPC. No entanto com a progressão dos dias a cultivar IACSP95-3028 apresentou incrementos de até 62% nesta atividade enzimática, enquanto que na cultivar IACSP95-5000 a atividade reduziu até 11% ao final do estresse. Quando reidratados, a atividade de PEPC em ambas cultivares se reestabeleceram próximo ao controle.

A atividade de Rubisco decresceu linearmente com a progressão do deficit hídrico. Assim como as estimativas *in vivo* desta enzima, não houve diferença significativa por efeitos da seca na cultivar IACSP95-3028 aos cinco dias sem irrigação. Numa visão geral, a atividade de Rubisco reduziu de forma mais acentuada na cultivar IACSP95-5000. Aos 14 dias sem irrigação as cultivares apresentam atividades de Rubisco similar, mas durante o período de reidratação a cultivar IACSP95-5000 se sobressaiu.

Figura 8. (A) Eficiência de carboxilação da PEPC (K), (B) e atividade máxima da Rubisco (V_{max}) em folhas +1 de cana-de-açúcar durante a progressão do deficit hídrico. Valores apresentados com letras minúsculas ou maiúsculas indicam diferenças estatísticas significativas (5% probabilidade pelo teste de Tukey) entre cultivares e por efeitos do deficit hídrico, respectivamente.

Figura 9. Atividade das enzimas PEPC (A) e Rubisco (V_{cmax}) (B) em folhas +1 de cana-de-açúcar durante a progressão do deficit hídrico e após três dias de reidratação (indicado pela seta). Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde C x DH significa a diferença estatística pela interação dos fatores (cultivares e o deficit hídrico, C, significância em resposta às cultivares e DH pelo deficit hídrico, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$).

Parâmetros associados ao metabolismo do Nitrogênio junto com o conteúdo de carboidratos solúveis

Considerando que relações entre os metabolismos do C e N podem estar envolvidas durante a L_m de cana-de-açúcar sob deficit hídrico, parâmetros associados ao metabolismo de N foram avaliados durante a progressão do estresse.

A atividade da redutase do nitrato (RN) decresceu significativamente e com alta sensibilidade a ausência da irrigação. Aos cinco dias sem irrigação a cultivar IACSP95-3028 apresentou reduções na RN em 60%, enquanto na cultivar IACSP95-5000 estas reduções foram de 93%. No último ponto de deficit hídrico as atividades da RN foram similares em ambas cultivares, diferindo novamente em condições de recuperação (Fig. 9A). O comportamento da atividade total de GS foi condizente com a RN. Embora não houve uma redução tão expressiva em GS na primeira coleta sob seca, sua atividade total reduziu com a progressão do estresse até 39.6% na cultivar IACSP95-3028 e 66% na cultivar IACSP95-5000. Por outro lado, a atividade de GDH em folhas do IACSP95-5000 foi sempre superior (Fig. 9C).

Apesar da menor atividade de RN, o conteúdo de nitrato nas folhas +1 manteve-se constante, com exceção de dois pontos específicos para cada cultivar. Houve um incremento no teor de nitrato aos oito dias de seca nas folhas +1 da cultivar IACSP95-3028 e aos 11 dias para a cultivar IACSP95-5000 (Fig 10B). O conteúdo de nitrato no xilema também não alterou no período de deficiência hídrica. Reduções no teor de nitrato só foram observados ao nível radicular onde o deficit hídrico induziu reduções próximas a 50% em ambas cultivares.

Para o conteúdo de amônio foliar, sua disponibilidade aumentou progressivamente até o último ponto de deficit hídrico. Os incrementos na cultivar IACS95-3028 foram da ordem de 50% enquanto que na cultivar IACSP95-5000 alcançaram valores 64.5% superiores. O período de reidratação contribuiu com o reestabelecimento do conteúdo de amônio foliar na cultivar IACSP95-3028, mas não foi suficiente para seu reestabelecimento na cultivar IACSP95-5000.

As clorofilas e proteínas foram significamente afetadas apenas pelos efeitos do deficit hídrico ($p < 0.05$) e fortemente associadas ao conteúdo de nitrogênio foliar neste período. Interessantemente durante a reidratação, mesmo que as cultivares tenham apresentado similar conteúdo de N foliar, apenas a cultivar IACSP95-3028 alcançou o teor de clorofila próximo ao das folhas em condições controle.

Refletindo as maiores taxas de assimilação de CO_2 observadas, a PNUE foi superior em folhas do IACSP95-3028, inclusive em condições de recuperação ao estresse, se revelando

uma característica interessante assim como ao observado para clorofilas. O conteúdo de carboidratos solúveis aumentou significativamente a partir do oitavo dia sem irrigação, alcançando incrementos de até 52%. No entanto aos 14 dias de deficit hídrico foi reduzido consideravelmente, se reestabelecendo próximo ao controle após o período de reidratação.

Figura 10. (A) Atividade das enzimas redutase do nitrato (RN), (B) glutamina sintetase (GS) e (C) glutamato desidrogenase (GDH) em folhas de cana-de-açúcar durante a progressão do deficit hídrico e após três dias de reidratação (indicado pela seta). Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde C x DH significa a diferença estatística pela interação dos fatores (cultivares e o deficit hídrico), C, significância em resposta às cultivares e DH pelo deficit hídrico, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Figura 11. (A) Conteúdos de clorofilas, (B) aminoácidos, (C) proteínas solúveis, (D) PNUE, (E) e nitrogênio total e (F) carboidratos solúveis em folhas +1 de duas cultivares de cana-de-açúcar durante a progressão do deficit hídrico e após três dias de reidratação (indicado pela seta). Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde C x DH significa a diferença estatística pela interação dos fatores (cultivares e o deficit hídrico) C significância em resposta às cultivares e DH pelo deficit hídrico, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Tabela 3. Conteúdo de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) em folhas +1 e o conteúdo de nitrato no xilema de dois cultivares de cana-de-açúcar durante a progressão do déficit hídrico e após três dias de reidratação. Valores são médias seguidos de erros-padrão.

Cultivar	Parâmetro	C	5DS	8DS	11DS	14DS	R
IACSP95							
-3028							
	NO_3^- Foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	56,47 $\pm$ 4.1	50,5 $\pm$ 3.38	116,2 $\pm$ 6.13	60,8 $\pm$ 3.5	41,99 $\pm$ 2.8	56 $\pm$ 10.7
	NH_4^+ foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	15,89 $\pm$ 0.76	13,11 $\pm$ 0.24	26,82 $\pm$ 2.08	28,23 $\pm$ 3	30,64 $\pm$ 3.01	14,1 $\pm$ 1.19
	NO_3^- Radicular ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	72 $\pm$ 1.86	54.4 $\pm$ 3.8	47.2 $\pm$ 3.3	41.4 $\pm$ 3.0	36.9 $\pm$ 0.4	----
	NH_4^+ radicular ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	17.8 $\pm$ 4.86	9.27 $\pm$ 0.32	7.86 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 1.2	6.87 $\pm$ 0.00	----
	NO_3^- xilema ($\mu\text{mol g}^{-1}$ ml)	24.33 $\pm$ 3.73	21.1 $\pm$ 2.72	19.22 $\pm$ 1.45	19.4 $\pm$ 0.3	21.86 $\pm$ 0.67	----
IACSP95							
5000							
	NO_3^- foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	33,38 $\pm$ 0.98	56,4 $\pm$ 2.65	63,39 $\pm$ 3.7	118 $\pm$ 2.95	23,19 $\pm$ 3.46	86 $\pm$ 13.9
	NH_4^+ foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	11,23 $\pm$ 1.6	14,75 $\pm$ 1.31	16 $\pm$ 0.16	24 $\pm$ 2.33	31,13 $\pm$ 3.18	24,87 $\pm$ 3.27
	NO_3^- Radicular ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	63.73 $\pm$ 3.7	39.12 $\pm$ 0.7	41.7 $\pm$ 1.7	40.5 $\pm$ 2.0	28.19 $\pm$ 1.35	----
	NH_4^+ Radicular ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	12.7 $\pm$ 3.49	7.32 $\pm$ 1.3	7.08 $\pm$ 0.0	6.68 $\pm$ 0.5	6.75 $\pm$ 0.79	----
	NO_3^- xilema ($\mu\text{mol g}^{-1}$ ml)	20.89 $\pm$ 2.26	23.79 $\pm$ 5.3	27.12 $\pm$ 2.66	26.8 $\pm$ 1.7	21.86 $\pm$ 0.67	----

Tabela 4. Análise estatística para o conteúdo de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) em folhas, raízes e xilema. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

Parâmetro	Interação	Cultivar	Deficit hídrico
NO_3^- Foliar	**	ns	**
NH_4^+ foliar	**	ns	**
NO_3^- Radicular	*	**	**
NH_4^+ radicular	ns	**	**
NO_3^- xilema	ns	ns	*

Estresse oxidativo

Quanto a peroxidação lipídica de membranas, indicativo de estresse oxidativo, esta iniciou-se lentamente a partir do oitavo dia sem irrigação aumentando expressivamente até o 14º dia, retornando a valores basais no período de recuperação, em ambas cultivares (Fig. 12).

Figura 12. Nível de peroxidação lipídica (TBARS) em folhas +1 de dois cultivares de cana-de-açúcar durante a progressão do déficit hídrico e após três de reidratação (indicado pela seta). Valores são médias seguidos de erros-padrão. Os níveis de significância foram avaliados pelo teste de Tukey, onde C x DH significa a diferença estatística pela interação dos fatores (cultivares e o déficit hídrico), C, significância em resposta aas cultivares e DH pelo déficit hídrico, ns quando não significativo ($p > 0.5$); *, $p < 0.5$ e **, $p < 0.1$.

4.6. Discussão

Tipicamente, a taxa fotossintética decresce conforme o déficit hídrico aumenta (Chaves, Flexas e Pinheiro, 2009; Lawlor e Cornic, 2002; Flexas *et al.*, 2004). Em plantas de cana-de-açúcar não foi diferente. A taxa de assimilação de CO_2 em folhas +1 decresceu linearmente após cinco dias sem irrigação até alcançar valores bastante reduzidos com 14 dias de estresse. Nos dois cultivares, as limitações metabólicas foram determinantes para o

desempenho fotossintético, principalmente no período de reidratação, quando a cultivar IACSP95-3028 reestabeleceu sua capacidade fotossintética mais rápido ao apresentar taxas mínimas de L_m .

Os dados de massa seca indicaram que estes cultivares apresentam alterações morfológicas interessantes em condições de seca com incrementos no tamanho das raízes (Figura 1). Isto, aumenta sua área de exploração hídrica no solo em condições de campo. Dentre eles, a cultivar IACSP95-5000 apresentou maior incremento na relação raiz: parte aérea como observado anteriormente por Marchiori (2014). As cultivares também conseguem manter o CRA em folhas +1 inalterado até 11 dias sem irrigação, indicando provavelmente um ajustamento osmótico eficiente nestas folhas (Fig. 2A)

Diferentes processos no metabolismo fotossintético são afetados a medida que o deficit hídrico se intensifica

Tem se discutido na literatura que os efeitos do deficit hídrico na fotossíntese ocorrem em resposta ao estabelecimento de uma fase de limitação estomática, reversível pela exposição a altas concentrações de CO_2 , e uma fase posterior, com alterações no metabolismo, onde C_i não seria apenas o fator limitante (Lawlor e Cornic, 2002). Aqui, o início da L_m ocorreu concomitante a L_s (Tabela 2). A ausência de uma fase com a L_s ocorrendo isoladamente pode ser atribuída ao mecanismo de concentração de CO_2 presente nesta espécie. Afinal a caracterização de duas fases de resposta ao deficit hídrico tem se evidenciado em plantas C3.

O início da limitação metabólica, durante o estresse leve, foi acompanhado por reduções na taxa de assimilação de CO_2 , independente de C_i , com leves reduções na atividade de Rubisco (Fig. 7). Diferenças na capacidade máxima desta enzima também podem ser observadas pelo platô das curvas A/C_i , indicando que as menores taxa de assimilação de CO_2 foram dependentes da atividade de Rubisco (Sage, 1994). Condizente ao reportado na literatura a atividade da via C3 é mais sensível ao deficit hídrico do que o ciclo C4 (Ghannoum *et al* 2011; Saliendra, 1996)

No entanto, não foi possível identificar qual fator estava envolvido na regulação negativa da atividade de Rubisco durante esta fase do estresse. Provavelmente não ocorreu uma regulação negativa por acúmulo de carboidratos (Fig. 11F), nem por decréscimos na regeneração do RuBP, uma vez que a atividade fotoquímica ainda estava em plena operação (Fig. 5; Tabela 1). Além disto, a falta de alterações na atividade de PEPC sugerem que as reações de carboxilação de CO_2 no mesofilo não foram limitantes, mantendo a capacidade do mecanismo C4 em concentrar CO_2 nas células da bainha (von Caemmerer, 2000).

Conforme o déficit hídrico progrediu atingiu-se uma fase de resposta ao estresse moderado ao oitavo dias sem irrigação. Neste estágio, as reduções em V_{pmax} e V_{cmax} foram associadas as reduções na atividade fotoquímica das folhas, sem alterações na captação energética (Figuras 5, 11A; Tabela 1). ETR, qP e o Fq'/Fm' reduziram expressivamente, NPQ apresentou incrementos na mesma proporção, enquanto que o teor de clorofilas, α e F_v/F_m não foram significativamente alterados. A restrição no direcionamento energético para as reações de carboxilação possivelmente foi regulado pela sua taxa de utilização pelas enzimas carboxilativas (Foyer *et al.*, 2012). Consequentemente devido ao menor consumo energético, NPQ pode ter sido estimulado pela acidificação do lúmen (Baker, 2008).

Ainda neste período, as reduções iniciais na atividade de PEPC por efeitos do déficit hídrico pode ter ocorrido por efeitos inibitórios. Em plantas de sorgo, os decréscimos na inclinação inicial de curvas A/C_i ocasionados pela seca ocorreram em resposta ao efeito inibitório do acúmulo de malato sobre a PEPC (Beyel e Bruggemann, 2005). O déficit hídrico induziu aumento nos níveis de malato nas células do mesófilo, possivelmente por efeitos de acidificação do citoplasma (Beyel e Bruggemann, 2005, citando Berkovitz *et al.* 1983, Yin *et al.* 1993). Adicionalmente, os efeitos inibitórios da atividade de PEPC podem estar contribuindo com suas menores atividades em todo período de déficit hídrico, uma vez que a atividade *in vitro* desta enzima não reduz tão acentuadamente como a atividade *in vivo*, apresentando inclusive incrementos na cultivar IACSP95-3028.

Além de efeitos inibitórios na atividade das enzimas, decréscimos em V_{pmax} também podem estar relacionados a menor taxa de condutância de CO_2 para o citosol do mesófilo. Como observado no próximo capítulo desta tese (cap. IV), mesmo apresentando alto C_i o fechamento estomático é positivamente relacionado a condutância interna de CO_2 e, os dados de C_i podem não se relacionar necessariamente a disponibilidade de CO_2 para a PEPC no citosol.

Apesar da redução no direcionamento eletrônico para a fase de carboxilação, a produção potencial de ATP e NADPH provavelmente não foi danificada, uma vez que os valores de α ainda foram mantidos próximos ao reportado na literatura (Marchiori *et al.*, 2014; Sage *et al.*, 2014).

Indicativos significantes de peroxidação lipídica às membranas começaram a surgir somente após 11 dias sem irrigação (Fig. 13). Associadamente, fatores envolvidos no funcionamento do complexo proteico fotossintético também sofreram reduções. Os efeitos das espécies reativas de oxigênio nos cloroplastos possivelmente iniciaram o processo de senescência foliar com reduções significativas no teor de clorofilas. Embora não significativas, as reduções em F_v/F_m começam a ser observadas.

Tem se observado em sorgo que genes marcadores de senescência são expressos paralelo a reduções em F_v/F_m e clorofilas por efeitos do deficit hídrico (Chen *et al.*, 2016). Assim, estas observações configuraram um estágio de seca severa, onde a proporção de fatores envolvidos na limitação metabólica abrange processos biofísicos, foto-inibitórios e reduções na capacidade bioquímica (Ripley *et al.*, 2007).

No último ponto de coleta, aos 14 dias sem irrigação, estas respostas se agravaram impossibilitando que a taxa de assimilação na concentração ambiental de CO_2 alcançasse valores superiores a $5 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Neste ponto, F_v/F_m reduziu ainda mais em folhas da cultivar IACSP95-5000, o que contribuiu com as maiores taxas de L_m apresentadas por este cultivar. A baixa capacidade fotossintética das plantas as tornaram vulneráveis à fotoinibição (Bernacchi *et al.*, 2001), e a manutenção da capacidade fotossintética determinou a taxa e intensidade de recuperação da planta no período de reidratação.

O metabolismo do N é limitante a capacidade fotossintética apenas em condições severas de D.H

As análises quanto ao metabolismo do N mostraram alta sensibilidade na assimilação de N com expressivas reduções na atividade da RN, e reflexos na atividade da GS durante a deficiência hídrica (Fig. 10A e 10B). No entanto, os níveis de NO_3^- e NH_4^+ em folhas +1 não sofreram reduções. Estes metabólitos podem estar sendo translocados de órgãos inferiores ao não se observar reduções no conteúdo de NO_3^- no xilema com decréscimos em sua concentração na raiz (Tabela 3). A atividade da GS foi reflexo, em menor proporção das reduções na RN, possivelmente ao conteúdo constante de amônio nas folhas +1. Por outro lado, a atividade da GDH também se manteve constante.

Embora tenha ocorrido uma redução expressiva da atividade da RN correlacionado positivamente com A desde o quinto dia sem irrigação, as reduções no metabolismo assimilatório do N possivelmente não estão envolvidos nas causas da L_m até a fase de estresse moderado. Os níveis constantes de NO_3^- , NH_4^+ , N total e incrementos em aminoácidos nas folhas +1 evidenciam que os metabólitos nitrogenados não foram limitantes a síntese de proteínas e clorofilas, que não foram alteradas neste período, e assim não podemos correlacioná-los a regulação negativa da fotossíntese nesta fase (Hauler *et al.*, 1994). Talvez pelo fato da cana-de-açúcar absorver preferencialmente amônio (Robinson *et al.*, 2011), a redução da RN nesta espécie tenha induzido pouco impacto na assimilação nitrogenada e a fotossíntese seria menos afetada pela RN nesta espécie em condições de deficit hídrico.

Quanto a regulação, a inativação inicial da RN por mecanismos dependentes da disponibilidade de CO₂ e produção de NADPH pode ser descartada já que estes fatores não acompanharam o declínio na atividade de RN (Foyer *et al.*, 1998). No entanto, o metabolismo do C e N podem ser regulados por um fator em comum (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Sinalização hormonal, via ABA ou citocinina, é um forte candidato para esta regulação. Estes hormônios estão envolvidos em respostas primárias ao deficit hídrico atuando no fechamento estomático (Osakabi *et al.*, 2014; Chaves *et al.*, 2009) e também podem inibir a síntese de transcritos da RN (Lu *et al.*, 1992).

A cultivar IACSP95-3028 apresenta menores danos fotossintéticos associados a uma rápida recuperação aos efeitos do deficit hídrico

Diferenças entre as cultivares durante a L_m pelo deficit hídrico foram mostradas com maior evidência quanto a V_{cmax} (Fig. 7). A cultivar IACS95-3028 apresentou menores reduções em V_{cmax} com a progressão do deficit hídrico, possivelmente contribuindo com as menores taxas de L_m neste cultivar. Adicionalmente, os dados da atividade *in vivo* de Rubisco também foram superiores na cultivar IACSP95-3028. Apenas na fase de recuperação, a cultivar IACSP95-5000 apresentou atividade de Rubisco superior (Fig. 9B). Martins (2012) encontrou resposta idêntica para a cultivar IACSP95-5000 em condições de recuperação, apresentando também maior porcentagem de ativação desta enzima. No entanto, embora no ensaio *in vitro* este cultivar tenha apresentado maior capacidade de assimilação para o CO₂, isto não se refletiu numa maior taxa de A_{pot} , já que no período de recuperação esta cultivar manteve maiores taxas de L_m .

O comportamento da atividade da enzima PEPC *in vitro* diferiu com os resultados observado em V_{pmax} . A atividade da PEPC *in vitro* na cultivar IACSP95-3028 aumentou conforme a progressão da seca, enquanto na cultivar IACSP95-5000 não houve fortes decréscimos pelos efeitos do deficit hídrico (Fig. 9A). Estas diferenças entre os resultados estimados *in vivo* e *in vitro* são encontradas na literatura (Sharwood *et al.*, 2014). O meio de ensaio *in vitro* pode desfavorecer a atuação de inibidores das enzimas, como o glutamato e malato.

A rápida recuperação metabólica da cultivar IACSP95-3028 após o período de reidratação, pode estar associada aos menores danos no sistema fotossintético durante a progressão do deficit hídrico (Chen *et al.*, 2016). Desde a fase de estresse leve, este cultivar apresentou respostas mais tardias aos efeitos do deficit hídrico, como reportado acima sobre a atividade de Rubisco. Com a progressão do estresse, na fase severa, a ocorrência de menores

danos oxidativos podem estar contribuindo com a manutenção da capacidade fotossintética. Menores danos na integridade das membranas dos cloroplastos, podem ter sido refletidos em F_v/F_m , permitindo uma baixa, mas equilibrada relação entre as fases fotoquímica e de carboxilação. Além disto, a cultivar ISCP95-3028 foi mais eficiente em PNUE, apresentando altas taxas fotossintéticas com o mesmo conteúdo de N foliar, o que se torna importante quando a disponibilidade de N é afetada. O investimento de N em clorofilas também pode ter sido uma característica relevante para a rápida recuperação deste cultivar.

4.7. Conclusões

Os resultados obtidos permitiram identificar alterações no metabolismo fotossintético que são envolvidas com a limitação metabólica induzida pelo deficit hídrico em folhas de cana-de-açúcar. Dentre estas alterações, o metabolismo de N foi limitante para a regulação fotossintética apenas em condições de estresse severo quando são observadas reduções significativas em componentes nitrogenados. Além disto, decréscimos mais lentos no metabolismo de N, associado a menores danos na capacidade fotossintética contribuem com uma recuperação mais rápida ao deficit hídrico, possibilitando que a cultivar IACSPS95-3028 se sobressaia em condições de deficit hídrico e reidratação.

REFERÊNCIAS

- Aragão, R. M.; Silva, E.N.; Vieira, C.F.; Silveira, J. A. G. High supply of NO_3^- mitigates salinity effects through an enhancement in the efficiency of photosystem II and CO_2 assimilation in *Jatropha curcas* plants. **Acta Physiol Plantarum**, Heidelberg, v. 34, p. 2135-2143, 2012.
- Baker, N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto v. 59, p. 89–113, 2008.
- Betti, M.; Garcia-Calderón, M.; Pérez-Delgado, C.M.; Creddali, A.; Estivill, G.; Galván, F.; Veja, J.M.; Márquez, A.J. Glutamine Synthetase in Legumes: Recent Advances in Enzyme Structure and Functional Genomics. **International Journal of Molecular Science**, n Basel. v. 13 p. 7994- 8024, 2012.
- Berkovitz, G.A.; Cheng, C.; Gibbs, M. Stromal acidification mediates *in vivo* water stress inhibition of non stomatal controlled photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville. v. 72: 1123–1126, 1983.
- Beyel, V.; Bruggemann, W. Differential inhibition of photosynthesis during pre-flowering drought stress in *Sorghum bicolor* genotypes with different senescence traits. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.124, p.249-259, 2005.
- von Caemmerer. **Biochemical models of leaf photosynthesis**. CSIRO Publishing, Collingwood, 2000.
- Carvalho, M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species. **Plant Signaling Behavior**. Bonn v.3, p. 156–165, 2008.
- Chaves, M.M., Flexas J, Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt Stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Oxford. 103, 551-560, 2009.
- Chen, D.; Wang, S.; Xiong, B.; Cao, B.; Deg, X. Carbon/ nitrogen imbalance associated with drought-induced leaf senescence in sorghum bicolor. **Plos One**, San Francisco, 10:e0137026.
- Collatz, G.J., Ribas-Carbo, M., Berry, J.A. Coupled photosynthesis-stomatal conductance model for leaves of C_4 plants. **Aust. J. Plant Physiol**, Collingwood. V. 19, 519–538, 1992.
- Dugo, V. G.; Durand, J. L.; Gastal, F. Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis v.30, p. 529–544, 2010.
- Hatch, M.D.; Slack, C.R. Photosynthesis by sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. **Biochemical Journal**, Londres v.101, p.103-111, 1966.

- Flexas, J.; Bota, J.; Loreto, F.; Cornic, G.; Sharkey, T.D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, Malden v. 6: 269–279, 2004.
- Foyer, C.H.; Valadier, M.H.; Migge, A.; Becker, T. W. Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. **Plant Physiology**, Rockville v. 117, p. 283–292, 1998.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. Photosynthetic nitrogen assimilation: Inter-pathway control and signalling. In: Foyer CH, Noctor G, eds. *Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism*. **Advances in Photosynthesis Research**, Kluwer Academic. Vol. 12, p. 1–22, 2002.
- Foyer, C.H.; Neukermans, J. Queval, G.; Noctor, G.; Harbinson, J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal Experimental Botany**, Oxford v. **63**: 1637–166, 2012.
- Genty, B.; Briantais, J. M.; Baker, N. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochemistry Biophysical Acta**, Amsterdam . v. 990, p. 87–92, 1989.
- Ghannoum, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, p. 635 – 644, 2009.
- Ghannoum, O., Evans, J.R., Von Caemmerer, S. Nitrogen and water use efficiency in C4plants. In: Raghavendra AS, Sage RF, editors. **C4 photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms**. Dordrecht, The Netherlands: Springer; p. 129-146, 2011.
- Hausler, R., E.; Blackwell, R.D.; Lea, P.J.; Leegood, R.C.; Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthetase. I Plant characteristics and changes in nitrate, ammonium and aminoacids. **Planta**, New York, v. 194, p. 406-417, 1994.
- Lawlor, D.W.; Cornic, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Malden v. 25, p. 275–294, 2002.
- Lawlor, D.W.; Tezara, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, Oxford v. 103, p.561-579, 2009.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R.. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Trans**, London, v. 11, 591–592., 1983.

- Liu F., Jensen C.R. & Andersen M.N. A review of drought adaptation in crop plants: changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. **Australian Journal of Agricultural Research**. Australia v. **56**, 1245–1252, 2005.
- Lu J-L, Ertl Jr, Chen C-M. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, p. 1255–1260, 2011.
- Marchiori, P. E.R. ; Machado, E. C.; Ribeiro, R.V. Photosynthetic limitations imposed by self-shading in field-grown sugarcane varieties. **Field Crops Research**, Amsterdam v.155 p.30–37, 2014.
- Marchiori, P.E.R. **Fisiologia de cana-de-açúcar sob déficit hídrico: plasticidade fenotípica, transporte de água, metabolismo antioxidante e fotossíntese**. 2014. 102 p. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Sub-tropical. Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2014.
- Martins, M. O. **Regulação da fotossíntese por deficiência hídrica, nitrogênio e CO₂ elevado em cana - de -açúcar**. Tese. (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, 2012.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London v.7, p.405-410, 2002.
- Nunes-Nesi A, Fernie Ar, Stitt M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, Oxford v.3, p. 973–996, 2010.
- Osakabe, Y.; Osakabe K.; Shinozaki, K.; Tra, L-S. Response of plants to water stress. **Frontiers in plant Science**, Lausanne, 2014.
- Pinheiro, C.; Chaves, M.M.; Ricardo, C.P. Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of lupinus albus L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1063-1070, 2001.
- Ripley, B.S., Gilbert, M.E., Ibrahim, D.G.; Osborne, C.P. Drought constraints on C₄ photosynthesis: stomatal and metabolic limitations in C₃ and C₄ subspecies of *Alloteropsis semialata*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v.58, p.1351-1363, 2007
- Robinson N, Brackin R, Vinall K, Soper F, Gamage H, Paungfoolonhienne C, Rennenberg H, Lakshmanan P, Schmidt S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **Plos One**, San Francisco v. 6, p. 1–9, 2011.
- Roth ,J.A., Ciampitti, I.A.; Vyn ,T.J. Physiological evaluations of recent drought-tolerant maize hybrids at varying stress levels. **Crop Science**. Madison, 105, 1129–1141, 2013.

- Sage, R.F. Photosynthetic acclimation to elevated CO₂. The gas exchange perspective. **Photosynthesis Research**. Dordrecht, v. **39**, 351–368, 1994.
- Sage, R.; PEIXOTO, M.M.; SAGE, T. Photosynthesis in surcane. In: **Sugarcane: Physiology, biochemistry and functional biology**, First Edition. Moore, P.H.; Botha, F.C.; John Willey e Sons, 716 páginas, 2014.
- Sales, C.R.G; Marchiori, P.E.R.; Machado, R.S.; Fontenele, A.V.; Machado, E.C.; Silveira, J.A.G.; Ribeiro, R.V. Photosynthetic and antioxidant responses to drought during the sugarcane ripening. **Photosynthetica**, Dordrecht v. 53, p.547-554, 2015
- Saliendra, N.Z.; Meinzer, F.C.; Perry, M.; Thom, M. Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO₂, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. **Journal Experimental Botany**, Oxford v. 47, p. 907–914, 1996.
- Sharwood Re, Caemmerer S Von, Maliga P, Whitney Sm. The Catalytic Properties of Hybrid Rubisco Comprising Tobacco Small and Sunflower Large Subunits Mirror the Kinetically Equivalent Source Rubiscos and Can Support Tobacco Growth. **Plant Physiology**, v. 146: 83–96, 2008
- Silva, M.A.; Jifon, J.L.; Da Silva, J.A.; Sharma. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes v.19, p. 193-207, 2007.
- Smit, M.A.; Singels, A. the response of sugarcane canopy development to water streses. **Field Crops Research**, Amsterdam v. 98- 91-97 2006
- Vu, J.C.V.; Allen Jr. L.H. Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C₄ sugarcane **Journal of Plant Physiology**., Rockville v. 166, p. 107–116, 2009
- Yin, Z.H.; Heber, U.; Raghavendra, A.S. Light-induced pH changes in leaves of C₄ plants. **Planta**. New York, v. 189: 267–277, 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A.

Tabela S1. Correlações genéticas entre os parâmetros de trocas gasosas, nitrogênio foliar (N), amônio, nitrato e MSPA em folhas +5 de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições de baixo N (-N) e condições adequadas de N (+N).

Folha +5:										
-N \ +N	N	A	g_s	E	A/g_s	A/C_i	PNUE	NO₃⁻	NH₄⁺	MSPA
N		0.01	-0.28	-0.03	0.47	0.77	-0.73	0.41	-0.36	-0.74
A	-0.31		0.94	0.85	-0.79	0.39	0.62	-0.61	0.06	0.25
g _s	-0.26	0.96		0.81	-0.87	0.09	0.80	-0.62	0.14	0.42
E	-0.02	0.79	0.86		-0.77	0.34	0.68	-0.54	-0.13	-0.01
A/g _s	-0.24	0.02	-0.23	-0.44		0.09	-0.86	0.65	-0.03	-0.55
A/C _i	-0.57	0.81	0.69	0.47	0.38		-0.29	0.00	-0.20	-0.48
PNUE	-0.74	0.85	0.77	0.52	0.22	0.84		-0.69	0.26	0.56
NO ₃ ⁻	0.11	-0.08	-0.15	-0.44	0.28	-0.10	-0.05		-0.64	-0.52
NH ₄ ⁺	0.27	0.36	0.47	0.41	-0.33	0.16	0.04	-0.40		0.55
MSPA	-0.71	0.17	0.23	0.01	-0.10	0.17	0.48	-0.12	0.12	

Tabela S2. Correlações genéticas entre os parâmetros de trocas gasosas, nitrogênio foliar (N), amônio, nitrato e MSPA em folhas +1 de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições de baixo N (-N) e condições adequadas de N (+N).

Folha +1:										
-N \ +N	N	A	g_s	E	A/g_s	A/C_i	PNUE	NO₃⁻	NH₄⁺	MSPA
N		-0.24	-0.24	0.02	-0.01	-0.40	-0.72	0.29	-0.40	-0.22
A	0.51		0.88	0.55	-0.79	0.25	0.77	-0.81	0.17	0.09
g _s	0.47	0.96		0.61	-0.94	-0.15	0.76	-0.57	0.08	0.18
E	0.45	0.76	0.71		-0.74	-0.05	0.44	-0.36	0.14	0.00
A/g _s	-0.36	-0.71	-0.86	-0.58		0.34	-0.61	0.49	0.03	-0.20
A/C _i	-0.48	0.02	0.05	-0.36	0.00		0.21	-0.38	0.48	-0.20
PNUE	0.08	0.88	0.84	0.65	-0.55	0.23		-0.61	0.36	0.25
NO ₃ ⁻	0.02	-0.13	-0.11	0.41	-0.01	-0.26	-0.09		-0.07	-0.27
NH ₄ ⁺	0.27	0.66	0.68	0.81	-0.68	0.10	0.60	0.46		0.47
MSPA	0.35	0.60	0.70	0.50	-0.67	-0.11	0.58	0.29	0.46	