UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

AMANDA PEREIRA DE SOUZA

Mecanismos fotossintéticos e relação fonte-
dreno em cana-de-açúcar cultivada em
atmosfera enriquecida em CO₂

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

AMANDA PEREIRA DE SOUZA

Mecanismos fotossintéticos e relação fonte-dreno
em cana-de-açúcar cultivada em atmosfera
enriquecida em CO₂

Photosynthetic mechanisms and source-sink
relationship in sugarcane grown in elevated CO₂

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

de Souza, Amanda Pereira

Mecanismos fotossintéticos e relação fonte-dreno em cana-de-açúcar cultivada em atmosfera enriquecida em CO₂

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. 208p.

1. Mudanças climáticas globais. 2. Bioenergia. 3. Cana-de-açúcar; 4. Fotossíntese C₄. I. de Souza, Amanda Pereira. II. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade de São Paulo. IV. Título

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a). Dr(a).

Prof (a). Dr (a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge
Orientador

Aos meus queridos pais, meus exemplos de
coragem, determinação e amor

DEDICO

Ao meu marido, meu amor

OFEREÇO

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

(Anatole France)

AGRADECIMENTOS

Ao Marcos, pela orientação, pelas oportunidades, pela confiança depositada e por todo o aprendizado adquirido ao longo de todos esses anos de convivência.

Aos colaboradores Camila Caldana, Lothar Willmitzer, Carlos Labate, Fernanda Salvato, Felipe Boareto, Glaucia Souza e Carolina Lembke pelo auxílio e sugestões nas análises.

Ao Laboratório Max Feffer da ESALq/USP e a todos os seus integrantes pela disposição que me receberam durante a execução das análises de proteômica.

Ao Laboratório de Transdução de Sinal do IQ/USP por ceder o espaço para a realização das análises de expressão gênica.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Plantas do IB/USP pelo espaço e equipamentos cedidos.

À seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo pelo espaço e equipamentos cedidos.

Ao Laboratório de Ecologia Isotópica, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelas análises de carbono e nitrogênio.

À Sandra e João Claudemir por ceder as plantas de cana-de-açúcar que foram utilizadas em todos os experimentos. Obrigada pelo carinho que vocês sempre me receberam.

Aos meus pais Fátima e Valmir e irmãos Rafael e Nicole pelo incansável incentivo e imenso carinho. Amo vocês!

Ao Adriano, meu querido e amado marido, por ser esse companheiro fantástico, por acreditar nos meus sonhos, por viver toda essa loucura comigo. Te amo!

À toda minha família por compreender os momentos de ausência.

À Adriana Grandis que se revelou durante este tempo uma grande amiga. Obrigada pelos momentos de alegria, desabafo, por toda a ajuda até o último segundo...

À Bruna Arenque pela amizade. Conviver com você é maravilhoso.

À Thalita, Augusto e Débora por proporcionarem um lugar mais agradável e divertido para nosso trabalho. Obrigada pela ajuda que vocês me deram!

Aos amigos Wando, Greg e Simone pelos momentos de descontração durante nossos almoços e cervejadas no fim de tarde.

Às queridas amigas Vanessa, Amanda Asega, Kelly, Fê K., Fê M., Paty, Aline e Marília que mesmo de longe sempre me deram apoio.

À nossa equipe técnica atual e antiga: Eglee, Viviane, Lu, Paloma, Danilo e Vanessa. A ajuda de vocês foi de grande importância para este trabalho e a convivência com vocês, divertida.

À secretaria e ao programa de pós-graduação do Instituto de Biociências - IB/USP.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (Processo nº 2007/55457-4)

Ao CNPq e à FAPESP que por meio do Projeto Instituto Nacional de Ciência e Biotecnologia do Bioetanol (Processos nº 574002/2008-1 e nº 2008/57908-6) financiaram parte desta pesquisa.

Ao Ministério de Ciência e Tecnologia pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
INTRODUÇÃO GERAL	1
MUDANÇAS NO CLIMA E BIOENERGIA: IMPORTÂNCIA NO CENÁRIO MUNDIAL	3
CANA-DE-AÇÚCAR: PLANTA DE INTERESSE NO CAMPO DA BIOENERGIA	4
FOTOSSÍNTESE C_4 : O PRINCIPAL MOTIVO PELO QUAL A CANA-DE-AÇÚCAR É ALTAMENTE PRODUTIVA	6
RELAÇÃO FONTE-DRENO: PONTO DE CONTROLE IMPORTANTE PARA A MANUTENÇÃO DO CRESCIMENTO	8
PLANTAS C_4 E ELEVADO CO_2 : O QUE É CONHECIDO?	10
NOVAS FORMAS DE ABORDAGEM QUE AUXILIAM NA COMPREENSÃO DO METABOLISMO DE CARBONO EM PLANTAS	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
CAPÍTULO 1: Metabolismo primário de cana-de-açúcar durante um ciclo diurno ..	27
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	33
Cultivo e coleta das plantas.....	33
Desenvolvimento das plantas.....	33
Medidas de trocas gasosas.....	33
Quantificação de açúcares solúveis e amido.....	34
Análise de metabólitos	35
Análise dos dados	35
RESULTADOS	37
Temperatura e umidade relativa.....	37
Desenvolvimento e Trocas gasosas	37
Açúcares solúveis e amido.....	39

Análise dos perfis metabólicos	46
DISCUSSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO 2: Fotossíntese e crescimento da cana-de-açúcar cultivada em atmosfera enriquecida com CO₂	77
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS	82
Obtenção e cultivo das plantas	82
Crescimento das plantas.....	83
Medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	83
Medidas de trocas gasosas no campo	87
Conteúdo de clorofila	87
Quantificação de açúcares solúveis e amido.....	88
Quantificação de ácido málico	89
Quantificação de Carbono e Nitrogênio	90
Análise estatística	90
RESULTADOS	91
Temperatura e umidade relativa.....	91
Crescimento.....	92
Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	96
Trocas gasosas no campo	104
Conteúdo de clorofila	107
Açúcares solúveis e amido.....	109
Conteúdo de ácido málico	114
Carbono e nitrogênio.....	114
DISCUSSÃO	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
CAPÍTULO 3: Proteínas diferencialmente expressas em folhas de cana-de-açúcar cultivada em elevado CO₂	131
INTRODUÇÃO	133
MATERIAL E MÉTODOS	135
Obtenção do material vegetal e escolha das amostras a serem analisadas	135

Extração, solubilização e quantificação das proteínas	135
Eletroforese em gel de poliacrilamida (mini-gel)	136
Eletroforese bidimensional	136
Análise de imagens	137
Digestão das proteínas	138
Sequenciamento dos peptídeos – LC-MS/MS	139
Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas	140
RESULTADOS	141
Gel de poliacrilamida	141
Eletroforese bidimensional	141
DISCUSSÃO	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159
CAPÍTULO 4: Expressão de genes relacionados à fotossíntese e ao metabolismo de carboidratos em folhas de cana-de-açúcar cultivadas sob elevada concentração de CO₂	163
INTRODUÇÃO	165
MATERIAL E MÉTODOS	167
Obtenção do material vegetal	167
Extração e quantificação de RNA	167
Síntese de cDNA.....	168
Escolha dos genes de interesse	169
Genes de referência interna (normalizadores)	170
Eficiência da reação e testes de diluição	170
Reações de PCR em tempo real (qRT-PCR)	170
Cálculo da expressão e análise estatística.....	171
RESULTADOS	172
Genes de referência.....	172
Expressão gênica	172
DISCUSSÃO	176
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	180
CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191

ANEXOS.....	193
--------------------	------------

RESUMO

A concentração de CO₂ na atmosfera tem aumentado progressivamente nos últimos anos. Este aumento é atribuído em sua maior parte à ação humana e à atividades como mudanças no uso da terra, desflorestamento e uso de combustíveis fósseis. É previsto que as mudanças do clima decorrentes desse aumento do CO₂ irão impactar de forma significativa na agricultura. A cana-de-açúcar é uma planta de grande importância na economia mundial devido ao seu uso na indústria sucroalcooleira. Neste sentido, conhecer como o aumento de CO₂ irá impactar nesta cultura é de importância estratégica para o país e para o mundo. Experimentos com cana-de-açúcar cultivada em elevado CO₂ têm demonstrado aumento na taxa de fotossíntese, biomassa e no conteúdo de sacarose. Especula-se que a maior taxa de fotossíntese observada nesses experimentos é regulada por meio da taxa de transporte de elétrons, uma vez que genes relacionados a este processo foram observados com maior expressão em alto CO₂. No entanto, os mecanismos que envolvem este processo ainda são desconhecidos. Com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na regulação e funcionamento da fotossíntese em cana-de-açúcar, este trabalho apresenta dados sobre o ciclo diário de fotossíntese e carboidratos não estruturais, bem como dados fisiológicos, bioquímicos e de expressão gênica de plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO₂. Os resultados obtidos mostram que a regulação da fotossíntese em alto CO₂ é dada pela manutenção do crescimento que esta condição proporciona às plantas, uma vez que o cultivo no vaso limita o crescimento na raiz e leva a um possível déficit hídrico. Genes e proteínas relacionados direta ou indiretamente ao processo de transporte de elétrons foram encontrados com expressão diferencial, corroborando os dados obtidos nas medidas *in vivo*. Por outro lado, os dados mostram pouca variação no sistema de captação de CO₂, indicando que a principal regulação da fotossíntese em cana-de-açúcar ocorre por meio do sistema de captura de luz. Foram observados proteínas e genes relacionados com o conteúdo de açúcares e com o crescimento, que podem ser pontos importantes de regulação da fotossíntese em cana-de-açúcar. Com os dados obtidos foi possível inferir que o aumento do CO₂ na atmosfera irá beneficiar as plantas de cana-de-açúcar, sendo que pontos de regulação descritos neste trabalho têm potencial de

utilização como ferramentas que auxiliem na determinação de cultivares mais produtivos.

Palavras-chave: mudanças climáticas globais, bioenergia, cana-de-açúcar, fotossíntese C_4 , relação fonte-dreno.

ABSTRACT

The atmospheric CO₂ concentration has been increasing progressively along the last years. This increase is attributed mainly to human's action and to land use changes, deforestation and fossil fuel burning. It is predicted that the global climate changes resulting from CO₂ increase will impact significantly agriculture. Sugarcane is very important for world's economy due to its use for sugar and alcohol industry. In this way, the knowledge of how sugarcane will respond at elevated CO₂ is important to design strategies for biofuel production and use in Brazil and in the world. In experiments with sugarcane grown under elevated CO₂ sugarcane plants have shown an increase in photosynthesis, biomass and sucrose content. It was then speculated that the higher photosynthesis observed in these experiments might be regulated by electron transport rates, since genes related to this process were observed with higher expression in elevated CO₂. However, the mechanisms that are related with this process are still unknown. The aim of this thesis was to understand the mechanisms related in the regulation and functioning of photosynthesis in sugarcane in elevated CO₂. This work presents data about diurnal cycle of photosynthesis and non structural carbohydrates, physiology, biochemistry and gene expression. The results show that photosynthesis regulation in elevated CO₂ is linked with the plant growth that remains under these conditions, since the pots cause roots growth limitations and leads a possibly water deficit. Genes and proteins were found that are related directly or indirectly to electron transport process as seen from differential expression. This corroborates the data obtained from in vivo measurements. On the other hand, our data show little variation in CO₂ capture system, indicating that the mainly regulations of photosynthesis in sugarcane occurs due changes in light capture system. Proteins and genes have been observed that associated with sugar content and growth. These might be key for understanding regulation of photosynthesis in sugarcane. With the data obtained it is possible to speculate that elevation of CO₂ will benefit the sugarcane plants in the future. Also, the regulation points described in this work have potential to be used as tools to help finding more productive cultivars.

Key – words: global climate changes, bioenergy, sugarcane, C₄ photosynthesis, source-sink relationship.

INTRODUÇÃO GERAL

MUDANÇAS NO CLIMA E BIOENERGIA: IMPORTÂNCIA NO CENÁRIO MUNDIAL

Mudanças na concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera são datadas de 650 mil anos (Körner 2006). Avaliações de testemunhas de gelo antártico dos últimos 430 mil anos mostram que as variações na concentração de CO₂ na atmosfera terrestre, ao longo dos ciclos glaciais e interglaciais, estão positivamente correlacionadas com as mudanças nas temperaturas antárticas (Mudelsee 2001), sendo que a variação da concentração desse gás observada durante esse período foi entre 180 e 265 partes por milhão (ppm) (Monnin *et al.* 2001). No entanto, concentrações acima destas estão sendo registradas pela *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) desde 1958. Na base em Mauna Loa (Havaí, USA), a NOAA mostra que a média na concentração de CO₂ em 1960 já era de 317ppm e que atualmente está em 394ppm. No Brasil, as bases de Arembepe (BA) e Maxaranguape (RN) registraram as concentrações de 391,5ppm e 390ppm, respectivamente, no mês de fevereiro de 2011 (NOAA 2011).

Este aumento na concentração de CO₂ que vêm ocorrendo rapidamente (*ca.* 2,22ppm.ano⁻¹) (Tans & Keeling 2011), é atribuído em sua maior parte à ação humana e à atividades como mudança no uso da terra, desflorestamento e uso de combustíveis fósseis (IPCC 2007; Sampaio *et al.* 2008). Os modelos de projeção do *International Panel on Climate Changes* (IPCC) apontam que essas ações antrópicas proporcionarão até o final deste século um aumento de CO₂ atmosférico que irá atingir concentração próxima a 720ppm.

Com o aumento contínuo do CO₂ na atmosfera são previstas mudanças na temperatura e precipitação que poderão acarretar em consequências regionais e globais nos setores ambientais, sociais e econômicos (Karl & Trenberth 2003; IPCC 2007; Buckeridge 2008). Dentre as consequências esperadas, as que estão relacionadas com a segurança de alimentos e segurança energética se destacam devido à sua importância em nível mundial. Ambas estão associadas ao impacto que o aumento da concentração de CO₂ e mudanças no clima irão ter na produtividade de plantas de metabolismo fotossintético C₄.

As plantas C₄ contribuem com aproximadamente 18% da produtividade primária global (Ehleringer *et al.* 1997) sendo que no ano de 2006 foram responsáveis por 40% do total de grãos colhidos no mundo (USDA-FAS, 2006). Além disso, a busca por fontes

de energia renovável devido a incentivos governamentais para a redução da emissão de CO₂ e a redução na disponibilidade de combustíveis fósseis, tem colocado as plantas C₄ em destaque por serem fontes primárias importantes na produção de bioenergia.

A bioenergia, que teoricamente pode ser proveniente de qualquer material vegetal, é uma alternativa promissora como forma de mitigação aos efeitos das mudanças no clima que pode ser utilizada tanto para a geração de energia elétrica por meio de gaseificação e pirólise quanto para a produção de combustível líquido (Karp & Shield 2008). Neste sentido, diversas espécies cultivadas que possuem potencial de serem utilizadas como fonte de bioenergia tais como álamo (*Populus ssp.*), salgueiro (*Salix ssp.*), eucalipto (*Eucalyptus ssp.*), milho (*Zea mays*), miscantus (*Miscanthus x giganteus*), switchgrass (*Panicum virgatum*) e cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) têm sido estudadas.

CANA-DE-AÇÚCAR: PLANTA DE INTERESSE NO CAMPO DA BIOENERGIA

O setor de transportes contribui com cerca de 50% de emissão de CO₂ por queima de combustíveis fósseis (Goldemberg 2011). Por este motivo, a produção de etanol como forma de mitigação das mudanças climáticas globais tem se tornado tão importante. Atualmente o bioetanol conhecido como o de primeira geração é produzido a partir da sacarose e do amido, carboidratos presentes no colmo da cana-de-açúcar e no grão de milho, respectivamente (CGEE 2009). No entanto, com o aumento da demanda da utilização desse combustível em nível mundial, há a perspectiva da utilização de biomassa, ou seja, material lignocelulósico, para a produção de bioetanol de segunda geração (Buckeridge *et al.* 2010).

No Brasil, a cana-de-açúcar aparece em destaque nas pesquisas que envolvem o bioetanol. Além da vasta experiência que o país possui em produzir bioetanol a partir desta planta (BNDES & CGEE 2008; CGEE 2009; Cortez 2010), a cana-de-açúcar é altamente adaptada ao clima tropical (Figueiredo 2008). Por ser uma planta de interesse econômico desde a sua introdução no país (Lucchesi 1995), vêm sendo selecionada para produzir grande conteúdo de sacarose e pouca fibra (Landell & Bressiani 2010). Esse processo de seleção ao longo dos anos permitiu um aumento de 60% na produtividade da cana principalmente entre 1980 e 2005, o que proporcionou um acréscimo de quase

100% na produção de etanol ($\text{L.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$) (Leal *et al.* 2010). No ano de 2010-2011, a safra brasileira gerou aproximadamente 625 milhões de toneladas de cana, dos quais 42% foram destinados à produção de açúcar e 58% à produção de etanol (CONAB 2011). Além disso, a utilização de 50% da palha e do bagaço de cana, após o desenvolvimento da tecnologia do etanol de segunda geração, pode gerar um adicional de 3700-4000 L/ha de etanol, contribuindo para o suprimento deste combustível em escala mundial (Socol *et al.* 2010).

Neste contexto os estudos que abordam os mecanismos que promovam uma melhor compreensão de como esses carboidratos são acumulados na cana-de-açúcar, bem como a interferência de componentes relacionados às mudanças climáticas globais, são relevantes a fim de proporcionar conhecimento para a geração de variedades mais produtivas, bem como fornecer dados para a modelagem em sistemas agrícolas (da Silva *et al.* 2008).

A cana-de-açúcar é originária das regiões da Indonésia e Nova Guiné e foi introduzida no Brasil em 1533 (Doorembos & Kassam 1979). Pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*. Os cultivares atuais são altamente poliplóides apresentando de 100 a 120 cromossomos (Ming *et al.* 1998), sendo essa poliploidia decorrente de cruzamentos interespecíficos derivados de *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barbieri*, *S. spontaneum*, *S. robustum* e *S. edule* (Gupta *et al.* 2010).

Embora possua flores férteis (Paranhos 1987), a propagação dessa cultura é realizada vegetativamente por meio da brotação das gemas presentes no colmo. A cana-de-açúcar é caracterizada por quatro diferentes estádios de desenvolvimento conhecidos como: (i) emergência dos brotos, (ii) perfilhamento e estabelecimento da cultura (da emergência dos brotos ao final do perfilhamento); (iii) período de grande crescimento (do final do perfilhamento ao início do acúmulo de sacarose) e; (iv) maturação (intenso acúmulo de sacarose nos colmos) (Gascho & Shih 1983). Dentre estes, o primeiro e o segundo estádios são determinantes para um bom estabelecimento da cultura e fornecimento de colmos adequados para uma alta produtividade (Câmara 1993).

O comportamento vegetativo da cana-de-açúcar é altamente dependente de fatores climáticos, sendo que as variações de temperatura, disponibilidade de água e

intensidade de luz exercem grande influência sobre o desenvolvimento fenológico da cultura afetando sua produtividade (Silva *et al.* 2010). O crescimento dessa planta ocorre quando a temperatura ultrapassa 20°C, sendo a faixa de 25°C a 33°C a mais favorável ao desenvolvimento (Liu *et al.* 1998; Almeida *et al.* 2008). Além de temperaturas baixas, a baixa disponibilidade de água interfere no crescimento da cana-de-açúcar (Inman-Bamber 2004). Para atingir uma alta produtividade, é necessário um volume anual de chuvas de 1.000 mm bem distribuído durante as fases iniciais de desenvolvimento, seguido de restrição hídrica para favorecer o acúmulo de sacarose na época do corte (Inman-Bamber & Smith 2005).

O colmo, constituído de nós e entrenós (Paranhos 1987), é o órgão responsável pelo acúmulo de sacarose na cana-de-açúcar. Em um mesmo colmo são observados entrenós em diferentes estádios fisiológicos, ou seja, entrenós maduros, em maturação e imaturos. Os internós imaturos possuem crescimento intenso e estão localizados na região apical do colmo que ainda possui folhas verdes. Na medida em que esses internós se desenvolvem, a taxa de crescimento diminui e ocorre diminuição no conteúdo de água e o armazenamento de sacarose (Machado 1987). Os cultivares atuais, sob condições, ideais, são capazes de acumular até 50% ou cerca de 0,7 M de sacarose por massa seca dos colmos (Moore 1995).

FOTOSSÍNTESE C₄: O PRINCIPAL MOTIVO PELO QUAL A CANA-DE-AÇÚCAR É ALTAMENTE PRODUTIVA

Durante o processo fotossintético, a luz incidente é absorvida por principalmente por moléculas de clorofila, que estão organizadas em estruturas denominadas complexo antena, localizados na membrana do tilacóide nos cloroplastos. Os complexos antena transferem a energia captada para os centros de reação dos fotossistemas I (P700) e II (P680), que direcionam a energia para a cadeia transportadora de elétrons que irão formar NADPH (Lambers *et al.* 2008). Parte da energia captada é utilizada pelo fotossistema II para a oxidação da água, que é a molécula doadora do primeiro elétron que participa da cadeia transportadora de elétrons. Com a oxidação da água, há a formação de um gradiente de prótons no interior na membrana dos tilacóides que são utilizados como força motriz para a síntese de ATP (Malkin & Niyogi 2000). Da cadeia

transportadora de elétrons participam, além dos complexos protéicos dos fotossistemas I e II, o citocromo b_6f , a plastoquinona, plastocianina, ferredoxina e ferredoxina NADP⁺ redutase. As moléculas de NADPH e ATP formadas nesta etapa da fotossíntese (etapa fotoquímica) são utilizadas no ciclo de redução do carbono ou ciclo de Calvin.

Uma das principais diferenças entre a fotossíntese C_3 e C_4 deve-se à anatomia foliar desta última, que possui dois tipos distintos de células foliares que se arranjam radialmente em volta do tecido vascular: (i) as células do mesofilo (mais externas) e (ii) as células da bainha vascular (mais internas) (Dengler & Nelson 1999). Em todas as plantas que possuem metabolismo fotossintético C_4 , o CO_2 que se difunde pelos estômatos é hidratado pela enzima anidrase carbônica, formando ácido carbônico (HCO_3^-) (Hatch & Burnell 1990). Este CO_2 é então fixado nas células do mesofilo pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPc). O produto desta carboxilação, o oxaloacetato, é rapidamente convertido a malato ou aspartato e um destes dois ácidos, dependendo da espécie, é difundido para as células da bainha vascular. Nas células da bainha vascular, eles são descarboxilados, fornecendo CO_2 para a enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco). O composto remanescente da descarboxilação retorna à célula do mesofilo e é regenerado para a formação de fosfoenolpiruvato (PEP) (Furbank *et al.* 2000). A Rubisco catalisa a reação entre o CO_2 e a ribulose 1,5 bisfosfato (RuBP) e dá início ao Ciclo de Calvin (ciclo C_3) formando 3-fosfoglicerato, que é reduzido a gliceraldeído 3-fosfato (3PGA). O 3PGA é convertido em trioses fosfato (trioses-P) que são exportadas para a síntese de sacarose ou permanecem no cloroplasto dando origem ao amido (Dennis & Blakeley 2000).

De forma simplificada é possível dizer que a função do ciclo C_4 é transferir CO_2 das células do mesofilo para as células da bainha vascular, promovendo uma alta concentração de CO_2 no sítio ativo da Rubisco (Furbank *et al.* 2000). Com este mecanismo, as reações de oxigenase da enzima Rubisco são praticamente extintas e, conseqüentemente há pouca ou nenhuma fotorrespiração, favorecendo a redução do carbono, especialmente em ambientes com alta irradiância e temperatura (Kanai & Edwards 1999). A fotorrespiração, que é decorrente da função de oxigenase da enzima Rubisco, promove uma perda de aproximadamente $\frac{1}{4}$ do carbono na forma de 2-fosfoglicerato em plantas C_3 .

As plantas com metabolismo fotossintético C_4 podem apresentar variações bioquímicas em relação ao tipo de enzima de descarboxilação presente na célula da bainha vascular (Kanai & Edwards 1999), resultando em três diferentes subtipos de fotossíntese C_4 : (i) NADP-ME ($NADP^+$ - *malic enzyme*), (ii) NAD-ME (NAD^+ - *malic enzyme*) e (iii) PCK ou PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*) (Sage & Pearcy 2000). Além disso, os subgrupos podem apresentar diferenças na morfologia e ultraestrutura dos cloroplastos da bainha vascular e no modo de transporte de metabólitos entre as células (Gutierrez *et al.* 1974; Hatch *et al.* 1975). Embora a cana-de-açúcar possa trabalhar com as enzimas do metabolismo de PEPCK (Calsa Jr. & Figueira 2007), ela é considerada é considerada uma planta C_4 do subtipo NADP-ME (Bowyer & Leegood 1997).

Plantas com a via de fotossíntese C_4 são referidas como altamente eficientes na conversão de energia luminosa em biomassa quando comparadas a plantas C_3 (Pearcy & Ehleringer 1984). Essas plantas também são capazes de utilizar com mais eficiência a água por possuírem valores de condutância estomática de 50 a 70% menores do que plantas C_3 com uma mesma assimilação (Long 1985; Sage & Pearcy 2000). Além disso, utilizam melhor o nitrogênio (Long 1999). Existem três causas principais que fazem com que plantas C_4 tenham uma melhor eficiência do uso do nitrogênio do que plantas C_3 : (i) a alta concentração de CO_2 nas células da bainha vascular, permite que a Rubisco trabalhe próximo à sua velocidade máxima de carboxilação, fazendo com que para uma mesma temperatura, plantas C_4 necessitem somente da metade de Rubisco que é requerida para uma planta C_3 ; (ii) a supressão da fotorrespiração aumenta a eficiência da Rubisco e (iii) a capacidade de renovação da Rubisco (dentro do ciclo fotossintético) em plantas C_4 é de 20 a 30% maior do que em plantas C_3 e desta forma menos enzima é requerida para uma mesma taxa fotossintética (Sage & Pearcy 2000).

RELAÇÃO FONTE-DRENO: PONTO DE CONTROLE IMPORTANTE PARA A MANUTENÇÃO DO CRESCIMENTO

Um dos pontos-chave na manutenção do crescimento vegetal é a coordenação entre a disponibilidade e o uso de recursos (Foyer & Paul 2001). Os órgãos que disponibilizam e exportam os recursos são denominados fonte e podem ser folhas

maduras que produzem fotoassimilados além de suas necessidades ou ainda órgãos de reserva. Por outro lado, os órgãos que importam esses recursos são definidos como dreno, que são tecidos não fotossintetizantes ou que não produzem fotoassimilados suficientes para suprir sua demanda (Taiz & Zeiger 2004).

Nos órgãos fonte a disponibilidade de recursos é proveniente direta ou indiretamente da fotossíntese e da produção de carboidratos. O principal carboidrato proveniente do processo fotossintético é a sacarose (Dennis & Blakeley 2000), que é exportada e utilizada para o crescimento e desenvolvimento do dreno. Caso a capacidade fotossintética exceda a demanda, o excesso de fotoassimilados permanece no cloroplasto e é estocado na forma de amido (Stitt 1991; Santos *et al.* 2004). E desta forma acredita-se que o dreno pode controlar a atividade da fonte (Foyer & Paul 2001). Além disto, há uma relação intrincada entre fonte e dreno, pois ambas as atividades (dreno e fonte) são controladas por fatores ambientais e trocam sinais internos entre si (Santos *et al.* 2004; Tonini *et al.* 2010).

Como a disponibilidade de recursos é percebida em todos os órgãos e é utilizada como forma de sinalização para a regulação de diversos genes, é imprescindível a coordenação entre os metabolismos dos tecidos fonte e dreno. Nesta coordenação, estão envolvidos mecanismos metabólicos e moleculares que são determinantes na produtividade (Foyer & Paul 2001; Rolland *et al.* 2006).

Um dos pontos de controle desse processo é o transporte dos fotoassimilados via floema (van Bel 2003), que direciona o particionamento dos açúcares entre os tecidos. O carregamento e o descarregamento do floema podem ocorrer de duas maneiras: (i) via simplástica, onde a sacarose flui passivamente através dos plasmodesmatas sem gasto energético e (ii) via apoplástica, no qual a sacarose é carregada através de transportadores específicos da membrana plasmática (Lambers *et al.* 2008). Na cana-de-açúcar, as células do floema não são conectadas às células da folha por meio de plasmodesmatas (Robinson-Beers & Evert 1991), o que sugere que o carregamento do floema nesta planta é realizado pela via apoplástica e dependente de mecanismos com gasto de energia (Rae *et al.* 2005). Por outro lado, a presença de inúmeros plasmodesmatas entre as células do parênquima o tecido vascular no colmo sugere que o descarregamento neste órgão é feito por meio simplástico (Walsh *et al.* 1996). No

entanto, para que o fluxo de sacarose continue a favor desse órgão, esse açúcar é exportado para o apoplasto ou vacúolo (Welbaum & Meinzer 1990).

A dinâmica entre fonte e dreno é regulada também por meio de sensores e sinalizadores de açúcares, que estão envolvidos no controle do crescimento e desenvolvimento tanto em ciclos diários (Smith & Stitt 2007; Tonini *et al.* 2010) quanto em toda a vida da planta (Rolland *et al.* 2002). Diversos genes relacionados à fotossíntese, acúmulo e mobilização de reservas, ciclo celular e crescimento têm se mostrado sensíveis a modificações nas concentrações de açúcares (Rolland *et al.* 2006), que envolvem principalmente a sacarose e seus produtos de degradação, glicose e frutose (Hanson & Smeekens 2009).

Na literatura são descritos diferentes tipos de sensores e sinalizadores de açúcares (Smith & Stitt 2007), dentre os quais pode se destacar as proteínas hexoquinases (HXK), trealoses 6-fosfato (T6P), proteínas da família SnRK1 (*Sucrose Non-Fermenting- related protein kinase 1*) e da família TOR (*Target of Rapamycin*) (Smeekens *et al.* 2010). McCormick e colaboradores (2008) sugerem que estas mesmas proteínas estejam envolvidas nos mecanismos de sinalização e percepção de açúcares em cana-de-açúcar.

PLANTAS C₄ E ELEVADO CO₂: O QUE É CONHECIDO?

Os modelos de predição existentes normalmente apontam que plantas C₄, especialmente as cultivadas, irão reduzir sua produtividade com as mudanças no clima. No entanto, estes modelos não levam em consideração o efeito que o aumento do CO₂ proporciona na fisiologia destas plantas (Parry *et al.* 2004).

O aumento da concentração de CO₂ na atmosfera pode afetar os processos biológicos em diferentes níveis de organização (Mooney *et al.* 1999) sendo que os controles fisiológicos e ecológicos são os estudados há mais tempo (Ward & Strain 1999). Para plantas C₃, há uma série de trabalhos demonstrando que o aumento do CO₂ age sobre mecanismos fisiológicos das plantas levando a um aumento médio de 25% na fotossíntese, 12% na altura, 49% na biomassa e 20% de redução na condutância estomática (Ainsworth & Long 2005). Por outro lado, para plantas C₄ existem comparativamente poucos estudos e geralmente são encontradas diferentes respostas

provenientes do cultivo destas plantas em elevado CO₂. Por este motivo o mecanismo pelo qual estas plantas respondem ao CO₂ ainda está em debate (Leakey 2009; Reddy *et al.* 2010).

Em plantas C₃, a alta concentração de CO₂ na atmosfera aumenta a taxa de carboxilação da Rubisco uma vez que proporciona redução da competição entre CO₂ e O₂ pelo sítio ativo da enzima e, consequentemente, reduz a fotorrespiração (Andrews & Lorimer 1987). Plantas C₄ possuem uma concentração de CO₂ cinco vezes maior do que a do ambiente nas células da bainha vascular (Furbank & Hatch 1987). Por este motivo, em teoria, plantas com metabolismo fotossintético C₄ não são capazes de apresentar respostas ao incremento de CO₂. No entanto, o que se observa em diversos experimentos (Knapp *et al.* 1993; Amthor *et al.* 1994; Poorter *et al.* 1996; Ziska & Bunce 1997; Wand *et al.* 1999; Anderson *et al.* 2001; Vu *et al.* 2006; de Souza *et al.* 2008) é que existem respostas que estão associadas ao cultivo de plantas C₄ em elevado CO₂, embora elas sejam variadas.

Proposições iniciais do motivo pelo qual as plantas C₄ apresentam variações na resposta ao elevado CO₂ foram baseadas no fato de que as espécies C₄ possuem diferentes tipos de enzima de descarboxilação. No entanto, estudos realizados por LeCain & Morgan (1998) e Ziska *et al.* (1999) mostraram que não há relação entre o subtipo de C₄ e resposta ao elevado CO₂. Uma revisão realizada por Ghannoum *et al.* (2000) aponta três fatores que poderiam contribuir com as diferentes respostas observadas em plantas C₄: (i) algumas espécies C₄ podem estar saturadas às concentrações atuais de CO₂ enquanto outras não, (ii) a diminuição da transpiração pode aumentar a temperatura foliar, proporcionando a temperatura ótima para o processo fotossintético e (iii) o efeito observado pode ser devido à redução da condutância estomática que reduz a transpiração e melhora a eficiência do uso da água.

Os estudos mais recentes baseados principalmente na tecnologia FACE (*Free-Air Carbon Enrichment*) mostram que a resposta de plantas C₄ ao alto CO₂ só é observada quando há déficit hídrico pelo efeito indireto que o CO₂ pode proporcionar devido ao fechamento estomático e consequente redução na transpiração (Ainsworth *et al.* 2008; Leakey 2009). Por outro lado, estudos conduzidos em casa-de-vegetação ou câmaras de topo aberto (OTCs) apresentam dados de aumento nas taxas fotossintéticas devido ao aumento na atividade da enzima Rubisco (Vu *et al.* 2006; Vara Prasad *et al.* 2009) e

mudanças na taxa de transpiração, no metabolismo de carboidratos e no acúmulo de proteínas (Prins *et al.* 2010).

Em cana-de-açúcar, de Souza e colaboradores (2008) mostraram que as respostas do aumento observado de 30% em fotossíntese, 60% na biomassa do colmo, 25% na biomassa da folha e de 29% no conteúdo de sacarose após 1 ano de cultivo em elevado CO₂ estavam possivelmente correlacionadas com o aumento na taxa de elétrons destas plantas. Esses mesmos autores observaram por análise de transcrição gênica que genes relacionados à captura de luz e transporte de elétrons estavam com maior expressão do que o controle, o que indicaria também que a capacidade da planta em capturar luz poderia estar aumentada. Normalmente é observada uma repressão dos genes de captura de luz em elevado CO₂, fato que está associado ao processo de aclimatação das plantas a estas condições. Entretanto, este fato pode ser revertido quando o dreno da planta aumenta (Guo *et al.* 2006). Desta forma, a presença de um forte dreno, como o colmo na cana-de-açúcar, pode estar associada ao aumento da fotossíntese em elevado CO₂ por meio do aumento na captura de luz e no transporte de elétrons.

NOVAS FORMAS DE ABORDAGEM QUE AUXILIAM NA COMPREENSÃO DO METABOLISMO DE CARBONO EM PLANTAS

No campo da ciência, é comum que os estudos nos diferentes níveis de organização de um indivíduo sejam realizados separadamente, gerando conceitos e princípios que explicam fenômenos biológicos em uma escala particular. Embora esses estudos tenham uma enorme relevância para todo o conhecimento gerado até o momento, a individualização dos fenômenos pode reduzir a complexidade organizacional que existe entre as diferentes escalas (Moore 2005).

Com o advento das tecnologias de transcriptômica, proteômica e metabolômica e o grande número de informações que é possível adquirir por meio destas técnicas, há um movimento a favor do emprego de abordagens que favoreçam a integração dos dados obtidos em diferentes níveis de organização. Neste sentido, a abordagem de biologia de sistemas ou, em inglês, *systems biology*, vem sendo bastante utilizada nos últimos anos (Lucas *et al.* 2011). Esta abordagem considera o fato de que todos os

sistemas dentro do indivíduo estão interconectados por meio de redes que possuem diferentes hierarquias (Oltavai & Barabasi 2002).

Em plantas, esse tipo de abordagem tem auxiliado na compreensão de como o suprimento de carbono está coordenado com o crescimento (Bläsing et al. 2005; Smith & Stitt 2007; Sulpice et al. 2009) e nos mecanismos da ação de estresses abióticos sobre as plantas (Hirayama & Shinozaki 2010), sendo também de grande interesse para as modelagens do metabolismo de cana-de-açúcar (Moore 2005).

No presente trabalho, procuramos avançar o conhecimento sobre os comportamentos fisiológico, bioquímico e molecular da cana-de-açúcar em suas diferentes escalas temporais. Foram realizados experimentos na escala de horas (24h), período médio em que os sistemas vegetais reiteram seus mecanismos de funcionamento através dos ritmos circadianos e na escala de dias (75 dias), período em que vários ciclos de 24h se reiteram, culminando no desenvolvimento de novos órgãos e se desdobrando em crescimento por altura e aumento de biomassa. Para o experimento ao longo de dias foi utilizado o acréscimo de CO₂, como ferramenta para alterar as relações fonte-dreno da planta. Ao examinar as alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares relacionadas ao metabolismo do carbono, teve-se como objetivo observar eventos importantes que auxiliam na explicação dos mecanismos que fazem com que as plantas de cana-de-açúcar controlem o crescimento e a partição do carbono em diferentes compostos no corpo da planta.

No Capítulo 1, é descrita a variação diária da taxa fotossintética e dos carboidratos não estruturais em folha, colmo e raiz de cana-de-açúcar e a variação diária de metabólitos primários em folha e raiz destas mesmas plantas. O Capítulo 2 mostra como a fisiologia e os açúcares de folha e colmo da cana-de-açúcar são modificados com o cultivo em elevado CO₂, com enfoque principal nas alterações fotossintéticas. As proteínas diferencialmente expressas e a expressão dos genes decorrentes destas modificações são mostradas nos Capítulos 3 e 4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth EA & Long SP (2005). What have we learned from 15 years of free air-CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165: 351-372.
- Ainsworth EA, Leakey ADB, Ort DR & Long SP (2008). FACE-ing the facts: inconsistencies and interdependence among field, chamber and modeling studies of elevated [CO₂] impacts on crop yield and food supply. *New Phytologist* 179: 5–9.
- Almeida ACS, Souza JL, Teodoro I, Barbosa GVSB, Moura Filho G & Ferreira Junior RAF (2008). Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação a disponibilidade hídrica e unidades térmicas. *Ciência e Agrotecnologia* 32: 1441-1448.
- Anderson LJ, Maherali H, Johnson HB, Polley HW & Jackson RB (2001) Gas exchange and photosynthetic acclimation over subambient to elevated CO₂ in a C₃–C₄ grassland. *Global Change Biology* 7: 693–707.
- Andrews JT & Lorimer GH (1987). Rubisco: structure, mechanisms and prospects improvements In: *Biochemistry of Plants*. Haleh MD & Boardman (eds.). Academic Press, New York, pp.132-207.
- Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible W-R & Stitt M (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 3257-3281.
- BNDES & CGEE (2008). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, RJ, 316p.
- Bowyer JR & Leegood RC (1997). Photosynthesis. In: *Plant biochemistry*. Day PM & Harbone JB (eds). Academic Press, San Diego, pp. 49-110.
- Buckeridge MS (org.) (2008). *Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil*. São Carlos, Rima, 316p.
- Buckeridge MS, dos Santos WD & de Souza AP (2010). As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: *BioEtanol de cana-de-açúcar: Pesquisa & Desenvolvimento para*

- produtividade e sustentabilidade. Cortez LAB (coord). Editora Edgard Blucher, pp.365-380.
- Calsa Jr T & Figueira A (2007). Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum spp.*) leaves revealed alternative C₄ metabolism and putative antisense transcripts. *Plant Molecular Biology* 63: 745 – 762.
- Câmara GMS (1993). Ecofisiologia da cultura da cana-de-açúcar. *In: Produção da cana-de-açúcar. Câmara GMS & Oliveira EAM (eds.). Piracicaba, FEALQ, pp.31-64.*
- CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (2009). Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. Brasília, DF, 536pp.
- CONAB (Conselho Nacional de Abastecimento) (2011). Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-Açúcar (Safra 2010/2011). 3º Levantamento.
- Cortez LAB (2010). Introdução. *In: BioEtanol de cana-de-açúcar: Pesquisa & Desenvolvimento para produtividade e sustentabilidade. Cortez LAB (coord). Editora Edgard Blucher, pp.3-18.*
- da Silva FC, Diaz-Ambrona CGH, Buckeridge MS, Souza AP, Barbieri V & Dourado Neto D (2008). Sugarcane and Climate Change: effects of CO₂ on potential growth and development. *Acta Horticulturae* 802: 331-336.
- de Souza AP, Gaspar M, da Silva E A, Ulian E C, Waclawovsky A J, Nishiyama-Jr MY, dos Santos RV, Teixeira MM, Souza G & Buckeridge MS (2008). Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* 31:1116–1127.
- Dengler NG & Nelson T (1999). Leaf structure and development in C₄ plants. *In: C₄ Plant Biology. Sage RF & Monson RK (eds.) Academic Press, San Diego, CA, pp.133 – 172.*
- Dennis DT & Blakeley SD (2000). Carbohydrate metabolism. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 630 – 675.*
- Doorenbos J & Kassam AH (1979). Yield response to water. Irrigation and drainage paper, nº 33, FAO, Rome. 193p.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E. & Helliker, B.R. 1997. C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecologia* 112: 285-299.
- Figueiredo P (2008). Breve história da cana de açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. *In: Cana de açúcar. Dinardo-Miranda LL,*

- Vanconcelos, ACM & Landell MGA (eds). Campinas: Instituto Agronômico, pp. 31-44.
- Foyer CH & Paul MJ (2001) Source–Sink Relationships. *In: Encyclopedia of Life Science*. Wiley-Blackwell, doi: 10.1038/npg.els.0001304.
- Furbank RT & Hatch MD (1987) Mechanism of C₄ photosynthesis—the size and composition of the inorganic carbon pool in bundle sheath cells. *Plant Physiology* 85: 958–964.
- Furbank RT, Hatch MD & Jenkins CLD (2000). C₄ photosynthesis: mechanism and regulation. *In: Photosynthesis: physiology and metabolism*. Leegood RC, Sharkey TD & von Caemmerer S (eds). Academic Publishers, Netherlands, pp. 435-457.
- Gascho GJ & Shih SF (1983). Sugarcane. *In: Crop-water relations*. Teare ID & Peet MM (eds.) New York: Wiley- Interscience, pp.445-479.
- Ghannoum O, von Caemmerer S, Ziska LH & Conroy JP (2000). The growth response of C₄ plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant, Cell & Environment* 23: 931-942.
- Goldemberg J (2011). The role of biomass in the world's energy system. *In: Routes to cellulosic ethanol*. Buckeridge MS & Goldman GH (eds.). Springer New York, pp. 3-14.
- Guo J, Trotter CM & Newton PCD (2006). Initial observations of increased requirements for light-energy dissipation in ryegrass (*Lolium perenne*) when source/sink ratios become high at a naturally grazed Free Air CO₂ Enrichment (FACE) site. *Functional Plant Biology* 33: 1045-1053.
- Gupta V, Raghuvanshi S, Gupta A, Saini N, Gaur A, Khan MN, Gupta RS, Singh J, Dutta-Majumder SK, Suman A, Khurana JP, Kapur R & Tyagi AK (2010). The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. *Functional Integrative Genomics* 10: 207-214.
- Gutierrez M, Kanai R, Huber SC, Ku SB & Edwards GE (1974). Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of various types of C₄ plants I. Carboxylases and CO₂ fixation studies. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 72: 305-319.
- Hanson J & Smeekens S (2009). Sugar perception and signaling —an update. *Current Opinion Plant Biology* 12: 562-567.

- Hatch MD, Kagawa T & Craig S (1975). Subdivision of C₄-pathway species based on differing C₄ decarboxylating system and ultrastructural features. *Australian Journal of Plant Physiology* 2: 111-128.
- Hatch M D & Burnell JN (1990). Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C₄ photosynthesis. *Plant Physiology* 93: 825-828.
- Hirayama T & Shinozaki K (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The plant journal* 61: 1041-1052.
- Inmar-Bamber NG & Smith DM (2005). Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research* 92: 185-202.
- Inmar-Bamber NG (2004). Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. *Field Crops Research* 89: 107-122.
- IPCC (2007). Climate change 2007: the physical science basis. *In*: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds). Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, UK/New York, NY: Cambridge University Press.
- Kanai R & Edwards GE (1999). The Biochemistry of C₄ photosynthesis. *In*: C₄ Plant Biology Sage RF & Monson RK (eds.) Academic Press, San Diego, CA, pp.49 – 87.
- Karl TR & Trenberth KE (2003). Modern global climate changes. *Science* 302: 1719-1723.
- Karp A & Shield I (2008). Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* 179: 15-32.
- Knapp AK, Hamerlynck EP & Owensby CE (1993). Photosynthetic and water relations responses to elevated CO₂ in the C₄ grass *Andropogon gerardii*. *International Journal of Plant Science* 154: 459–466.
- Körner C (2006). Plants CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytologist* 172: 393-411.
- Lambers H, Stuart Chapin III F & Pons T (2008). *Plant Physiological Ecology*. 2.ed. Springer. 604p.
- Landell MGA & Bressiani JA (2008). Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. *In*: Cana-de-açúcar. Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM & Landell MGA (eds.). Campinas: Instituto Agrônomo, pp. 101-155.

- Leakey ADB (2009). Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C₄ crops for food and fuel. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 276: 2333-2343.
- Leal MRLV, Valle, TL, Feltan JC & Carvalho CRL (2010). Outras materias primas para a produção de etanol. *In: BioEtanol de cana-de-açúcar: Pesquisa & Desenvolvimento para produtividade e sustentabilidade*. Cortez LAB (coord). Editora Edgard Blucher, pp.519-539.
- LeCain DR & Morgan JA (1998). Growth, gas exchange, leaf nitrogen and carbohydrate concentrations in NAD-ME and NADP-ME C₄ grasses grown in elevated CO₂. *Physiologia Plantarum* 102: 297-306.
- Liu DL, Kingston G & Bull TA (1998). A new technique for determining the thermal parameters of phenological development in sugarcane, including sub optimum and supra-optimum temperature regimes. *Agricultural and Forest Meteorology* 90: 119-139.
- Long SP (1985). Leaf gas exchange. *In: Photosynthetic Mechanisms and the Environment* (Barber J & Baker NR (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 453-500.
- Long SP (1999). Environmental responses. *In: C₄ Plant Biology*. Sage RF & Monson RK (eds.) Academic Press, San Diego, CA, pp. 215-249.
- Lucas M, Laplaze L & Bennet MJ (2011). Plant systems biology: network matters. *Plant, Cell & Environment* 34 (4): 535-553.
- Lucchesi AA (1995) Processos fisiológicos da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Piracicaba, ESALQ/CENA, 50 p.
- Machado EC (1987). Fisiologia de produção de cana – de – açúcar. *In: Paranhos, S.B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Vol.1. Campinas, Fundação Cargill.
- Malkin R & Niyogi K (2000). Photosynthesis. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 568-628
- McCormick AJ, Cramer MD & Watt DA (2008). Differential Expression of Genes in the Leaves of Sugarcane in Response to Sugar Accumulation. *Tropical Plant Biology* 1: 142-158.

- Ming R, Liu SC, Moore PH, Irvine JE & Paterson AH (1998). QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. *Genetics research* 11: 2075-2084.
- Monnin E, Indermühle A, Dällenbach A, Flückiger J, Stauffer B, Stocker TF, Raynaud D & Barnola J-M (2001). Atmospheric CO₂ concentrations over the last glacial termination. *Science*, 291: 112–114.
- Mooney HA, Canadell J, Chapin FS, Ehleringer JR, Körner C, McMurtrie RE, Arton WJ, Pitelka LF & Schulze ED (1999). Ecosystem physiology responses to global change. *In: The terrestrial biosphere and global change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Moore G (1995). Cereal genome evolution: pastoral pursuits with ‘Lego’ genomes. *Current Opinion Genetics Devices* 5: 717–724.
- Moore PH (2005). Integration of sucrose accumulation process across hierarchical scales: towards developing an understanding of gene-to-crop continuum. *Fields Crops research* 92: 119-135.
- Mudelsee M (2001). The phase relations among atmospheric CO₂ content, temperature and global ice volume over the past 420 ka. *Quaternary Science Reviews* 20: 583–589.
- NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration (2011). Disponível em: <www.cmdr.noaa.gov/projects/src/web/trends/co2_mm_meo.dat>. Acesso em: fev 2011.
- Oltvai AN, Barabasi A-L (2002). Life’s complexity pyramid. *Science* 298: 763–764.
- Paranhos SB (Coord) (1987). Cana-de-açúcar. Cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargill, 856p.
- Parry ML, Rosenzweig C, Iglesias A, Livermore M & Fischer G (2004). Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios. *Global Environmental Change* 14: 53–67.
- Pearcy RW & Ehleringer J (1984) Comparative ecophysiology of C₃ and C₄ plants. *Plant Cell & Environment* 7:1–13.
- Poorter H, Roumet C & Campbell BD (1996). Interspecific variation in the growth response of plants to elevated [CO₂]: a search for functional types. *In: Carbon*

- dioxide, populations, and communities. Korner C & Bazzaz FA (eds). Academic Press, New York, pp. 375–412.
- Prins A, Mukubi JM, Pellny TK, Verrier PJ, Beyene G, Lopes MS, Emami K, Treumann A, Lelarge-Trouverie C, Noctor G, Kunert KJ, Kerchev P & Foyer CH (2010). Acclimation to high CO₂ in maize is related to water status and dependent on leaf rank. *Plant, Cell & Environment* 34: 314-331.
- Rae AL, Grof CPL, Casu RE & Bonnett GD (2005). Sucrose accumulations in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. *Field Crops Research* 92: 159 – 168.
- Reddy AR, Rasineni GK & Raghavenfra AS (2010). The impact of global elevated CO₂ concentration on photosynthesis and plant productivity. *Current science* 99: 46-57.
- Robinson-Beers K & Evert RF (1991). Ultrastructure of and plasmodesmatal frequency in mature leaves of sugarcane. *Planta* 184: 291–306.
- Rolland F, Baena-Gonzales E & Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:676-709.
- Rolland F, Moore B & Sheen J (2002). Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell*: S185–S205.
- Sage RF & Pearcy RW (2000). The physiological ecology of C₄ photosynthesis. *In: Photosynthesis: physiology and metabolism*. Leegood RC, Sharkey TD & von Caemmerer S (eds). Academic Publishers, Netherlands, pp. 497-532.
- Sampaio G, Marengo J & Nobre C (2008). A atmosfera e as mudanças climáticas. *In: Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil*. Buckeridge MS (org.) São Carlos, Rima, pp.5-28.
- Santos HP, Purgato E, Mercier H & Buckeridge MS (2004). The Control of Storage Xyloglucan Mobilization in Cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. *Plant Physiology* 135: 287-299.
- Silva MA, Santos CM, Arantes MT & Pincelli RP (2010). Fenologia da cana-de-açúcar. *In: Tópicos em Ecofisiologia da cana-de-açúcar*. Crusciol CAC, Silva MA, Rossetto R & Soratto RP (eds.). Botucatu, FEPAF, pp. 8-21.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J & Rolland F (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 274-279.

- Smith AM & Stitt M (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* 30: 1126-1149.
- Socol CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge MS, Ramos LP, Pitarelo AP, Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Bom EPS, Moraes LMP, Araújo JÁ & Torres FAG (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology* 101: 4820-4825.
- Stitt M (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 395-436.
- Sulpice R, Pyl E-T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Korff MV, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T & Stitt M (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of National Academy of Science* 106: 10348-10253.
- Taiz L & Zeiger E (2004). *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 719pp.
- Tans P & Keeling R (2011). Trends in Atmospheric Carbon Dioxide, Mauna Loa, Hawaii. Disponível em: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em abr 2011.
- Tonini PP, Purgato E & Buckeridge MS (2010). Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Annals of Botany* 106: 607-616.
- USDA-FAS – United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service (2006). Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/wap/current/toc.asp>.
- van Bel AJE (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell & Environment* 26: 125–149.
- Vara Prasad PV, Vu JCV, Boote KJ, Allen Jr H (2009). Enhancement in leaf photosynthesis and upregulation of Rubisco in the C₄ sorghum plant at elevated growth carbon dioxide and temperature occur at early stages of leaf ontogeny. *Functional Plant Biology* 36: 761-769.
- Vu JCV, Allen LH & Gesch RW (2006). Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO₂. *Plant Science* 171: 123-131.

- Walsh KB, Sky C & Brown SM (1996). Pathway of sucrose unloading from the phloem in sugarcane stalk. *In: Sugarcane: Research towards efficient and sustainable production*. Wilson JR, Hogarth DM, Campbell JA & Garside AL (eds.) CSIRO Division of Tropical Crops and Pastures, Brisbane, pp. 105–107.
- Ward SJE, Midgley GF, Jones MH & Curtis PS (1999). Responses of wild C₄ and C₃ grass (Poaceae) species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a meta-analytic test of current theories and perceptions. *Global Change Biology* 5: 723-741
- Ward JK & Strain BR (1999). Elevated CO₂ studies: past, present and future. *Tree Physiology* 19:211-220.
- Welbaum GE & Meinzer FC (1990). Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. *Plant Physiol.* 93, 1147–1153.
- Ziska LH & Bunce JA (1997). Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C₄ crops and weeds. *Photosynthesis Research* 54: 199-208.
- Ziska LH, Sicher RC & Bunce JA (1999). The impact of elevated carbon dioxide on the growth and gas exchange of three C₄ species differing in CO₂ leak rates. *Physiologia Plantarum* 105: 74-80.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo investigar o sistema fotossintético e a relação fonte-dreno em cana-de-açúcar cultivada em elevado CO₂, a fim de compreender os mecanismos envolvidos na regulação e funcionamento desses processos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Descrever o padrão da variação diária de fotossíntese, carboidratos não estruturais e outros metabólitos primários da cana-de-açúcar;
- 2) Avaliar as taxas de trocas gasosas juntamente com parâmetros de fluorescência ao longo de 75 dias de cultivo em alto CO₂;
- 3) Avaliar o crescimento e conteúdo de carboidratos não estruturais em folha e colmo ao longo de 75 dias de cultivo em alto CO₂;
- 4) Detectar as proteínas diferencialmente expressas em folha com o cultivo em alto CO₂;
- 5) Avaliar a expressão de genes relacionados ao processo fotossintético;
- 6) Relacionar as taxas de fotossíntese com: (i) conteúdo de carboidratos não estruturais, (ii) proteínas diferencialmente expressas, (iii) expressão de genes.

CAPÍTULO 1

Metabolismo primário de cana-de-açúcar durante um ciclo diurno

Colaboradores:

Dra. Camila Caldana (Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de Plantas, Postdam, Alemanha; Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE, Campinas, São Paulo)

Dr. Lothar Willmützer (Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de Plantas, Postdam, Alemanha)

INTRODUÇÃO

As plantas estão expostas a diversas variações ambientais e uma das mais perturbadoras está relacionada com alterações de luz e escuro que ocorrem no período de 24 horas. O ciclo dia e noite é o que controla os ritmos diários e sazonais nas plantas e a sincronização dos ritmos internos (ritmo circadiano e disponibilidade de carbono) e externos (luminosidade e temperatura) resulta em melhor desempenho, vantagens competitivas e crescimento (Hayes *et al.* 2010). Além disso, o ciclo dia e noite é responsável pela alteração da expressão de genes proporcionando mudanças em diversos processos metabólicos e fisiológicos (Schaffer *et al.* 2001; Tepperman *et al.* 2004).

O metabolismo na folha é diretamente influenciado pela fotossíntese. Embora outras variáveis ambientais como temperatura e nutrição possam determinar a taxa de uso dos produtos da fotossíntese, a variação da intensidade luminosa é o principal fator que influencia na taxa fotossintética (Paul & Pellny 2003), especialmente em plantas C₄ (Moss *et al.* 1961). Alterações na expressão de genes da fotossíntese e na atividade das enzimas do ciclo fotossintético podem ocorrer em poucos minutos ou até mesmo em segundos sob condições naturais, geralmente associadas a flutuações na intensidade de luz (Stitt 1996; Leegood & Walker 2000).

Assim como no ciclo de Calvin-Benson, a maioria das enzimas envolvidas no ciclo C₄ está sujeita ao controle direto ou indireto pela luz. Com alterações na intensidade luminosa, mudanças na concentração de metabólitos podem ocorrer e estes, por sua vez, podem modular a atividade das enzimas deste ciclo (Leegood & Walker 2000).

Outro controle da taxa fotossintética é proveniente do uso dos produtos da fotossíntese, que são predominantemente sacarose, amido e aminoácidos (Paul & Pellny 2003). Um dos pontos chave para que ocorra a manutenção do processo fotossintético é a coordenação entre a produção de fotoassimilados e a utilização destes produtos para o metabolismo e crescimento (Graham & Martin 2000). Em outras palavras, é necessária uma coordenação da relação fonte-dreno da planta.

Se no período luminoso, o metabolismo e o crescimento são comandados pela taxa de fotossíntese das folhas (Graf *et al.* 2010), no período noturno, o metabolismo e crescimento são completamente dependentes das reservas da planta (Walter & Schurr

2005; Nozue & Maloof 2006). Essa manutenção do metabolismo e crescimento noturno só é possível porque a taxa de assimilação de carbono pelo processo fotossintético é suficiente para suprir a demanda durante o dia e para acumular carboidratos na folha que são mobilizados durante a noite (Smith & Stitt 2007). Estes compostos são então direcionados para crescimento vegetal, que pode ser determinado pelo aumento da massa seca, volume, altura ou área que resulta de divisão, expansão e diferenciação celular (Lambers *et al.* 2008).

Na maioria das plantas, o carbono para suprimento noturno é acumulado em forma de amido (Geiger *et al.* 2000). Os produtos intermediários do processo fotossintético são particionados em sacarose, que é imediatamente disponibilizada para o crescimento, e em amido, que é acumulado na folha ao longo do dia. Durante a noite, este amido é degradado para produzir sacarose (Smith & Stitt 2007). A degradação do amido pode ocorrer através da via fosforolítica ou da via hidrolítica. Enquanto a via fosforolítica gera hexoses fosfato como produto, a via hidrolítica produz açúcares livres, tais como glicose e maltose (Sharkey *et al.* 2004)

Ainda que este seja o padrão clássico de utilização de reservas na maioria das espécies, em algumas gramíneas como *Hordeum vulgare* e *Poa annua*, o carbono assimilado durante o dia produz tanto sacarose para exportação aos órgãos dreno quanto para acúmulo nos vacúolos das células da folha para prover carbono para o crescimento noturno (Gordon *et al.* 1980; Borland & Farrar 1988).

Embora haja uma aparente simplicidade do padrão de acúmulo e utilização do carbono ao longo de 24 horas, este processo é complexo e compreende uma flexibilidade e controle sutis (Smith & Stitt 2007). A degradação das reservas precisa ocorrer de forma extremamente integrada com o metabolismo citosólico e, em particular, com o metabolismo de sacarose (Tretheway & Smith 2000). A quantidade de reserva que é acumulada durante o dia precisa antecipar a demanda que será necessária durante a noite, o que implica o envolvimento de uma série de mecanismos capazes de realizar esta percepção (Smith & Stitt 2007) que estão associados, por exemplo, com o ritmo circadiano (Harmer *et al.* 2000). A taxa de síntese de amido é inversamente relacionada ao período luminoso do dia. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, experimentos demonstram que plantas crescidas em fotoperíodo 6h luz/18h escuro

acumulam 80% a mais de amido do que aquelas crescidas em fotoperíodo 12h luz/12h escuro (Gibon *et al.* 2004).

A percepção da disponibilidade de carbono é realizada por uma rede de sinalização que envolve principalmente os açúcares sacarose, glicose e frutose (Smith & Stitt 2007). Além de substratos importantes no metabolismo de carbono e na biossíntese de polímeros (Rolland *et al.* 2006), diversos estudos demonstram que esses açúcares regulam a expressão de genes relacionados à fotossíntese, crescimento e metabolismo de carboidratos (Koch 2004; Foyer & Paul 2001). Além disso, eles podem estabelecer um mecanismo de *feedback* entre a disponibilidade de carbono e a capacidade da planta em fotossintetizar, estocar, mobilizar e utilizar este carbono (Koch 1996; Stitt & Krapp 1999; Foyer & Paul 2001). Na literatura são descritos diferentes tipos de sensores e sinalizadores de açúcares (Smith & Stitt 2007) que são parte da rede de sinalização que interliga a disponibilidade de açúcares com o crescimento.

Mudanças na concentração de sacarose ao longo das horas e dos dias podem ser por si só, mensageiras entre os tecidos fonte e dreno e vice-versa (Pollock & Farrar 1996). O acúmulo de sacarose na folha leva à desativação da enzima sacarose fosfato sintase (SPS) e ao aumento da frutose 2,6- bisfosfato. Como resultado há um aumento deste metabolito no citosol, redução da exportação de triose-P pelo cloroplasto e a síntese de amido é aumentada (Stitt, 1996). Além disso, os transportadores de açúcares da família da sacarose (SUS) são descritos como sendo sensores de açúcar (Lalonde *et al.* 1999). Em *Arabidopsis*, Moore *et al.* (2003) identificaram a enzima hexoquinase (HXK) como um sensor de açúcar, que na presença de glicose é capaz de reprimir genes relacionados à fotossíntese. A trealose 6-fosfato (T6P), embora encontrada em quantidade muito pequena nas plantas (Lunn *et al.* 2006), também é considerada um sensor de açúcares (Paul *et al.*, 2008). O metabolismo de T6P afeta a modulação do metabolismo primário, crescimento e desenvolvimento das plantas (Eastmond *et al.* 2002) e pode também influenciar no acúmulo de amido em *Arabidopsis* (Paul & Foyer 2001; Schuepmann *et al.* 2003). Outro tipo de sensor de açúcar descrito na literatura são os da família SnRK1 (*Sucrose Non-Fermenting- related protein kinase 1*), que são ativados por alta quantidade de sacarose e/ou baixa quantidade de glicose nas células (Halford *et al.* 2003). Em plantas, a SnRK1 parece ser a principal ligação entre estresse e sinalização

energética, causando modificações na expressão de genes e regulando o crescimento (Baena-Gonzalez *et al.* 2007; Semeekens *et al.* 2010).

Estudos demonstrando a variação diária de metabólitos têm permitido a identificação de compostos chave na regulação destes processos de sinalização (Smith & Stitt 2007). Uma das técnicas utilizadas nestes estudos é a identificação de perfis metabólicos (Fiehn *et al.* 2000), que possibilita a visualização qualitativa e quantitativa do conjunto de metabólitos em um sistema biológico. Os metabólitos não são apenas produtos catalíticos de reações enzimáticas, mas também podem ser reguladores ativos destes processos, e por isto são os produtos mais representativos do fenótipo (Kusano *et al.* 2010).

Na literatura, pouco se descreve sobre a variação diária do conteúdo de carboidratos em gramíneas e suas relações com as taxas fotossintéticas e nenhuma referência foi encontrada apresentando dados de variação diária de metabólitos nestas espécies. Neste sentido, a cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), uma gramínea C₄ de importância econômica para o mercado nacional e internacional de açúcar e etanol, se mostra como um modelo fisiológico e bioquímico pertinente para o entendimento destas relações. Os eventos que ocorrem a cada 24 horas podem auxiliar no conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo da relação fonte-dreno e na sua interferência na regulação da fotossíntese.

Desta maneira, com o objetivo de descrever as mudanças ocorridas ao longo de um ciclo diurno no metabolismo primário de carbono da cana-de-açúcar, este capítulo apresenta dados de trocas gasosas, conteúdo de açúcares solúveis e amido e também a variação dos metabólitos e suas relações, obtidos em um período de 24 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e coleta das plantas

As plantas de cana-de-açúcar foram obtidas a partir de colmos da variedade SP80-3280, coletados no Sítio Vitória na cidade de Piracicaba, SP. Os colmos foram seccionados com auxílio de serra de fita e selecionados de acordo com seu tamanho para a homogeneização do conteúdo de reserva para brotação. As secções de colmo (toletes) foram plantadas em vasos plásticos de 14 L com substrato Plantmax® (lascas de pinus, vermiculita e turfa) e mantidas em pleno sol. No total, foram montados 50 vasos com uma planta por vaso.

Os vasos foram irrigados diariamente e adubados com N:P:K (18:00:27) de acordo com especificações do Centro de Tecnologia Canavieira (de Souza *et al.* 2008). A temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas por sensores acoplados a um sistema de monitoramento contínuo (RICS® -*Remote Integrated Control System*) instalados no Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO- IB/USP).

Após 60 dias de cultivo as plantas foram coletadas ao longo de 24 horas. As coletas foram realizadas as 7, 10, 13, 16, 19, 22, 1, 4 e 7 horas do dia seguinte, totalizando 9 pontos de coleta de dados. Em cada ponto, foram coletadas 5 plantas.

Desenvolvimento das plantas

O desenvolvimento das plantas foi avaliado a partir da produção de biomassa de folhas, colmo e raiz, que foi determinada após coleta destrutiva de 5 plantas aos 60 dias de cultivo. O material vegetal foi seco em estufa a 60°C até peso constante e posteriormente pesado.

Medidas de trocas gasosas

A taxa fotossintética e condutância estomática foram avaliadas através de medidas pontuais utilizando um medidor portátil de fotossíntese (LI-6400 XT, Li-Cor, USA). As medidas foram realizadas na parte central da folha +1. Durante todas as

medidas, a intensidade luminosa, a temperatura foliar e o déficit de pressão de vapor na folha variaram de acordo com as condições ambientais no horário da coleta.

Quantificação de açúcares solúveis e amido

Durante as coletas destrutivas, a folha +1, colmo e raízes foram separados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Todo o material foi seco em liofilizador e pulverizado em moinho de bola. Para a quantificação de açúcares solúveis e amido, 20 mg de material vegetal foram submetidos à extração com etanol 80% a 80°C durante 20 min por seis vezes para a retirada completa dos açúcares solúveis. A cada extração, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes reservados. Os sobrenadantes das seis extrações foram unidos e secos em concentrador de amostras (Speed-vac®). Após secas, as amostras foram ressuspensas em água deionizada e alíquotas equivalentes de cada uma das amostras foram analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta performance (HPAEC/PAD), utilizando-se uma coluna Carbowax PA1 eluída com 50% de água e 50% de hidróxido de sódio 200 mM com fluxo constante de 1 mL/min em sistema Dionex-DX500.

Para a quantificação do amido foi utilizado o protocolo de Amaral *et al.* (2007). O precipitado resultante da última extração com etanol 80% foi lavado com água destilada e seco durante 1 h em estufa a 60°C. Ao precipitado seco, foram adicionados 500 µL da enzima α -amilase (120U/mL) (MEGAZYME®) e a mistura foi incubada a 75°C durante 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1 mL de enzima. Após resfriamento até 50°C foram adicionados 400 µL da enzima amiloglicosidase (30U/mL) (MEGAZYME®) e as amostras foram incubadas por 30 min nesta temperatura. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1,8 mL de enzima. Para cessar a reação foram adicionados 50 µL de ácido perclórico 0,8M. Após centrifugação a 10.000g por 2 min, alíquotas das amostras foram incubadas com GODPOD (Glicose PAP Liquiform 1) (Labtest®) a 30°C por 15 min. Após a incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 490 nm, utilizando glicose (1mg/mL) como padrão.

Análise de metabólitos

A análise de metabólitos foi realizada no Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de Plantas (Postdam, Alemanha) com colaboração da Dra. Camila Caldana e Dr. Lothar Willmitzer.

A extração dos metabólitos foi realizada a partir do material de folha e raiz secos em liofilizador. A partir de 10 mg de material, os metabólitos foram extraídos e derivatizados seguindo a metodologia descrita por Lisec *et al.* (2006). Os dados foram obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) (Agilent 6890 – Leco Pegasus 2 time-of flight). Os cromatogramas foram obtidos com os parâmetros descritos em Weckwerth *et al.* (2004). Após a aquisição dos dados, os cromatogramas foram exportados para o software R para a análise. A detecção do pico, tempo de retenção e o alinhamento com padrões específicos foram verificados e comparados a correspondentes da biblioteca de substâncias utilizando o pacote R Target Search (Cuadros-Inostroza *et al.* 2009). Os metabólitos foram quantificados pela intensidade do pico de uma massa selecionada que foi normalizada pela massa seca inicial e pelo padrão interno (sorbitol C13).

Análise dos dados

Os dados obtidos de trocas gasosas, açúcares solúveis e amido foram submetidos a análises univariadas e bivariadas. Para as análises univariadas foram utilizados testes de variância de um fator (ANOVA *one-way*) e dois fatores (ANOVA *two-way*), considerando para esta última análise a hora da coleta, o órgão e a interação hora da coleta e órgão como fatores fixos na análise. Ambas as análises consideraram $\alpha=0,05$. Quando houve contraste entre médias pelo ANOVA, foi realizado o teste *post-hoc* Tukey HSD, com significância de 5%.

Para as análises bivariadas foi realizado o cálculo de correlação de Pearson de acordo com Zar (1999) e foram consideradas significativas as correlações que apresentaram valor de $p < 0.05$.

Nestas análises foi utilizado o pacote estatístico JMP® *Statistical Discovery Software*, versão 5.0.1.

Os dados de metabólitos foram analisados através da análise de componentes principais (PCA) (Legendre & Legendre, 1998), utilizando o pacote estatístico MINITAB® Release 14.12.0. Além da matriz geral, envolvendo todos os metabólitos identificados, foram montadas mais quatro matrizes distintas considerando a classificação das classes dos metabólitos de acordo com o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg>) e PMN (*Plant Metabolic Network*, <http://www.plantcyc.org/>). Desta forma, os dados foram analisados de acordo com o seguinte agrupamento: 1) metabólitos da classe dos carboidratos, incluindo os dados de açúcares solúveis e amido; 2) metabólitos da classe dos aminoácidos; 3) metabólitos da classe dos ácidos orgânicos; 4) outros metabólitos, incluindo as classes poliaminas, ácidos nucleicos, lipídeos, cofatores e vitaminas, metabolismo secundário e hormônios.

Cada matriz foi previamente testada para normalidade pelo teste de Anderson-Darling ($p < 0,05$), para homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett e Levene ($p < 0,05$) e para simetria dada pelo valor do *Skewness* permitindo uma variação entre +2 a -2. Dentre as componentes geradas foram escolhidas para a análise as cinco primeiras, uma vez que estas representaram a maior parte da variação dos dados. Para verificar o quanto da variação representada nos eixos foi referente à mudança das horas do dia e a significância de cada componente foi realizado o teste GLM (*General Linear Model*). Para os componentes que apresentaram significância, foram confeccionados gráficos de biplots de distância, plotando no plano os vetores das variáveis (metabólitos) que mais representaram a variação observada.

Os *heatmaps* foram gerados utilizando o software R.

RESULTADOS

Temperatura e umidade relativa

Ao longo dos 60 dias de cultivo das plantas, que foi realizado durante a primavera de 2010, a média de temperatura foi de $21,3 \pm 2,9^{\circ}\text{C}$. A temperatura máxima registrada foi de $27,15^{\circ}\text{C}$ e a mínima de $15,58^{\circ}\text{C}$. A umidade relativa variou de 56,07 % a 87,20% durante este período.

Durante a coleta ao longo de 24 horas, a temperatura média foi de $24,15^{\circ}\text{C}$, sendo a máxima de $32,2^{\circ}\text{C}$ entre as 10 e 13h e a mínima de $20,8^{\circ}\text{C}$ entre as 4 e 7h (Figura 1). Em relação à umidade relativa, foi registrada média de 77,39% durante o período. A máxima umidade (89%) foi observada às 7h e a mínima (51,3 %) entre as 10 e 13h (Figura 1).

Figura 1 - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (%) ao longo do período de coleta de dados do experimento 24 horas com cana-de-açúcar.

Desenvolvimento e Trocas gasosas

Após 60 dias de crescimento, as plantas apresentaram, em média, $8,11 \pm 1,29\text{g}$ de biomassa de folha, $0,49 \pm 0,09\text{g}$ de biomassa de colmo e $2,38 \pm 0,37\text{g}$ de biomassa de raiz.

Ao longo de 24 horas, a assimilação de CO₂ ocorreu entre as 7 e 16h (Figura 2A). A variação na assimilação de CO₂ (5 – 35 $\mu\text{mol.CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foi concomitante a variação de intensidade luminosa (Figuras 2A e 2C), sendo os maiores valores obtidos as 10 e 13h. Os valores de respiração noturna apresentaram em média 0,6 $\mu\text{mol.CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 2A).

Figura 2 - Assimilação de CO₂ (A) (A), condutância estomática (gs) (B), fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA) (C) e déficit de pressão de vapor (VpdL) (D) das plantas de cana-de-açúcar ao longo de 24 horas. Pontos representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=5$.

A condutância estomática também variou ao longo do dia (Figura 2B) acompanhando as variações observadas na assimilação de CO₂. O déficit de pressão de vapor na folha (Figura 2D), variou entre 0,85 e 2,47 acompanhado a variação observada para a umidade relativa do ar (Figura 1).

Açúcares solúveis e amido

Na folha, foi observada uma variação diária significativa ($p < 0.0001$) de todos os açúcares analisados (Figura 3).

Figura 3- Conteúdo de glicose (Glc) (A), frutose (Fru) (B), sacarose (Sac) (C), rafinose (Raf) (D) e amido (E) por miligrama de massa seca (mgMS^{-1}) nas folhas de cana-de-açúcar ao longo de 24 horas. Pontos representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=5$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0.05$.

Glicose (Glc) e frutose (Fru) apresentaram os maiores valores às 10h (Figuras 3A e 3B). Durante a noite, Glc e Fru apresentaram queda gradativa, indicando que mais de 50% desses açúcares foram consumidos ao longo deste período.

O conteúdo de sacarose (Sac) aumentou a partir das 10h, atingindo valores máximos às 13 e 16h (Figura 3C). Após as 19h, foi observado um declínio de 62,8% no conteúdo deste açúcar, que voltou a ser produzido às 7h do dia seguinte. Embora em níveis bem mais baixos do que os outros açúcares, a rafinose (Raf), também apresentou variações significativas ao longo do dia (Figura 3D). O conteúdo de rafinose aumentou progressivamente das 7 às 13h, atingindo o máximo de concentração na folha neste último horário. Após as 16h, houve redução de 43% deste açúcar neste órgão.

Glc, Fru, Sac e Raf na folha apresentam também uma correlação positiva e significativa com as taxas de fotossíntese (Tabela 1), salientando que a produção destes açúcares pode estar relacionada com a assimilação de CO₂.

Para o amido, foi observado aumento a partir das 10h, com pico máximo às 16h (Figura 3E). Assim como o verificado para os outros açúcares analisados, a queda do amido na folha inicia-se a partir das 19h e de 92,6% do amido produzido na folha é consumido no período noturno. A variação deste açúcar ao longo do dia na folha é correlacionada positivamente com a variação de Sac e Raf neste mesmo órgão (Tabela 1).

A Glc e Fru no colmo apresentam uma alta correlação (0.895) entre si (Tabela 1) e não variaram de forma significativa ($p=0.0579$ e $p=0.1423$, respectivamente) ao longo do dia neste órgão (Figuras 4A e 4B). Por outro lado, o conteúdo de Sac variou significativamente ($p<0.0001$), apresentando o maior teor às 16h (Figura 4C). Após este horário, o conteúdo de Sac no colmo decresce 22,8% até as 19h se mantendo constante até as 4h, onde há, novamente, uma redução de 21,3%.

Em relação à Raf no colmo, também foi verificada uma variação significativa ao longo do dia ($p<0.0001$) (Figura 4D). Os maiores conteúdos deste açúcar no colmo foram observados no período entre 16 e 22h. Após as 22h, a Raf diminui, não sendo mais detectada às 4h. A Raf e Sac no colmo apresentaram uma correlação positiva e significativa (0.493, $p=0.001$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores obtidos pela correlação de Pearson e seus respectivos valores de p entre as variáveis de açúcares não estruturais e fotossíntese obtidas ao longo de 24 horas para cana-de-açúcar. $n= 45$. Valores em negrito representam correlação significativa ($p \leq 0.05$). Siglas descritas no Anexo 1.

	Glc_F	Fru_F	Sac_F	Raf_F	Ami_F	Glc_C	Fru_C	Sac_C	Raf_C	Ami_C	Glc_R	Fru_R	Sac_R	Raf_R	Ami_R
Fru_F	0.938														
p	<0.0001														
Sac_F	0.697	0.701													
p	<0.0001	<0.0001													
Raf_F	0.437	0.339	0.751												
p	0.005	0.032	<0.0001												
Ami_F	0.149	0.215	0.709	0.556											
p	0.357	0.182	<0.0001	<0.0001											
Glc_C	0.189	0.177	0.181	0.218	-0.014										
p	0.249	0.281	0.27	0.183	0.935										
Fru_C	0.038	0.01	0.138	0.186	0.066	0.895									
p	0.819	0.953	0.402	0.258	0.692	<0.0001									
Sac_C	0.409	0.403	0.756	0.632	0.777	0.101	0.027								
p	0.009	0.010	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.542	0.869								
Raf_C	0.317	0.383	0.455	0.148	0.558	-0.187	-0.139	0.493							
p	0.046	0.015	0.003	0.361	<0.0001	0.255	0.400	0.001							
Ami_C	-0.207	-0.179	-0.134	-0.144	0.133	-0.158	-0.029	-0.141	0.163						
p	0.205	0.276	0.417	0.381	0.419	0.342	0.862	0.392	0.321						
Glc_R	0.187	0.162	0.136	0.016	-0.152	0.186	0.037	0.088	-0.128	-0.059					
p	0.248	0.317	0.401	0.923	0.348	0.258	0.823	0.590	0.432	0.721					
Fru_R	0.313	0.314	0.298	0.214	-0.105	0.254	0.052	0.146	-0.181	-0.233	0.83				
p	0.049	0.048	0.062	0.185	0.519	0.119	0.755	0.368	0.263	0.154	<0.0001				
Sac_R	0.424	0.408	0.555	0.558	0.321	0.191	0.153	0.528	0.036	-0.313	-0.157	0.071			
p	0.006	0.009	<0.0001	<0.0001	0.044	0.243	0.351	<0.0001	0.827	0.053	0.332	0.661			
Raf_R	0.185	0.143	0.285	0.101	0.241	0.096	0.046	0.342	0.351	-0.033	0.309	0.300	0.255		
p	0.252	0.379	0.075	0.534	0.134	0.563	0.782	0.031	0.026	0.841	0.052	0.060	0.113		
Ami_R	0.058	0.059	0.386	0.265	0.712	-0.148	-0.049	0.541	0.512	0.244	-0.106	-0.193	0.084	0.203	
p	0.724	0.717	0.014	0.098	<0.0001	0.368	0.767	<0.0001	0.001	0.135	0.514	0.233	0.605	0.209	
Photo	0.658	0.694	0.500	0.355	-0.042	0.307	0.115	0.225	0.056	-0.281	0.205	0.429	0.349	-0.098	-0.322
p	<0.0001	<0.0001	0.001	0.025	0.795	0.058	0.487	0.164	0.730	0.083	0.205	0.006	0.027	0.549	0.043

Figura 4- Conteúdo de glicose (Glc) **(A)**, frutose (Fru) **(B)**, sacarose (Sac) **(C)**, rafinose (Raf) **(D)** e amido **(E)** por miligrama de massa seca (mgMS^{-1}) no colmo de cana-de-açúcar ao longo de 24 horas. Pontos representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=5$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0.05$.

Embora em pequena quantidade em relação às folhas, o amido no colmo varia significativamente ao longo do dia ($p < 0.0001$), aumentando gradativamente desde as

10h e atingindo o máximo às 16h (Figura 4E). Entre as 19 e 4h, há uma redução de 48% no conteúdo deste açúcar no colmo. Não foram constatadas correlações significativas entre o amido do colmo e os outros açúcares deste mesmo órgão (Tabela 1).

Na raiz, somente a Sac e o amido foram significativamente diferentes ao longo de 24 horas ($p=0.0028$ e $p=0.0062$, respectivamente) (Figura 5). A Sac apresentou valores mais altos às 13h, com redução de 32,2% seu conteúdo após este horário (Figura 5C).

Figura 5 - Conteúdo de glicose (Glc) (A), frutose (Fru) (B), sacarose (Sac) (C), rafinose (Raf) (D) e amido (E) por miligrama de massa seca ($mgMS^{-1}$) nas raízes de cana-de-açúcar ao longo de 24 horas. Pontos representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=5$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0.05$.

O amido na raiz se mantém constante ao longo do dia aumentando em 38% somente quando se inicia o período noturno, as 19h (Figura 5E). Ao longo do período noturno, o amido da raiz diminui à 1h, mas aumentar novamente às 4h.

Entre os açúcares da raiz, foi observada somente correlação entre Glc e Fru (Tabela 1).

Comparando os açúcares da folha, colmo e raiz, é possível observar que Glc e Fru são açúcares predominantemente ($p < 0.0001$) encontrados na raiz (Figuras 6A e 6B) e que, considerando a planta como um todo, a variação destes açúcares não é significativa ao longo do dia ($p = 0.0742$ para Glc e $p = 0.1214$ para Fru). Para Sac, foi observada uma variação significativa em todos os órgãos ao longo do dia ($p < 0.0001$), sendo que o colmo é o órgão que apresenta a maior quantidade deste açúcar ($p < 0.0001$) (Figura 6C). Ainda pode ser verificado que o conteúdo de Sac do colmo se correlaciona positivamente com todos os açúcares da folha, bem como com os conteúdos de Sac, Raf e amido na raiz (Tabela 1).

A Raf e o amido são encontrados predominantemente nas folhas ($p < 0.0001$) (Figuras 6D e 6E) e a variação diária de ambos é significativa para os órgãos ($p < 0.0001$). É possível ainda relatar que o conteúdo de Raf na folha se correlaciona positivamente com o conteúdo de Sac no colmo e na raiz e que o amido da folha se correlaciona também positivamente com Sac e Raf no colmo e Sac e amido na raiz (Tabela 1).

Figura 6 – Comparação dos conteúdos de glicose (Glc) (A), frutose (Fru) (B), sacarose (Sac) (C), rafinose (Raf) (D) e amido (E) por miligrama de massa seca (mgMS^{-1}) em folha (—●—), colmo (—●—) e raiz (—●—) de cana-de-açúcar ao longo de 24 horas. Pontos representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=5$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0.05$.

Análise dos perfis metabólicos

Na Figura 7, é possível verificar a variação diária de 91 metabólitos que foram detectados pela análise em GC-MS em folhas de cana-de-açúcar.

Figura 7 – Representação da dinâmica das mudanças do metabolismo primário ao longo de 24 horas em folhas de cana-de-açúcar. Dados coletados as 7, 10, 13, 16, 19, 22, 1, 4 e 7 horas. $n=5$.

De uma forma geral, é possível observar que a principal diferença no conteúdo dos metabólitos refere-se à alteração entre dia e noite. A verificação deste padrão pode ser complementada com a análise de PCA, onde pode ser observada uma variação do conteúdo de metabólitos entre as diferentes horas avaliadas (Figura 8). No PC1, que explica 65,6% da variação dos dados, fica clara a separação entre os períodos dia e noite.

Figura 8 – Biplot de distância dos dados da matriz de metabólitos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e segundo componentes (PC1 e PC2). $n=5$.

Na folha, 75% da variação diária dos carboidratos é explicada pelos componentes de 1 a 5 (PC1 a PC5) (Anexo 2), sendo estes cinco primeiros componentes significativos para esta variação entre horários (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de F, significância (P) e coeficiente de determinação (R^2 ajustado) derivados da análise de variância (ANOVA) das variáveis sintéticas (PC1 a PC5) obtidas pela análise de componente principal (PCA) para metabólitos nas folhas de cana-de-açúcar. Fator de variância = horários. $n = 45$. Valores em negrito representam significância na análise ($p \leq 0.05$).

		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
	F	17.33	7.01	2.39	6.01	2.63
	P	<0.0001	<0.0001	0.035	<0.0001	0.022
	R^2 ajustado	74.80%	52.23%	20.21%	47.69%	22.88%
Carboidratos		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
	F	37.09	2.65	1.92	2.07	3.64
	P	<0.0001	0.021	0.088	0.066	0.003
	R^2 ajustado	86.78%	23.09%	14.29%	16.25%	32.44%
Ácidos orgânicos		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
	F	0.97	31.92	2.3	6.45	2.18
	P	0.474	<0.0001	0.042	<0.0001	0.053
	R^2 ajustado	0.00%	84.90%	19.08%	49.77%	17.61%
Aminoácidos		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
	F	47.95	0.9	1.69	3.87	1.03
	P	<0.0001	0.526	0.136	0.002	0.435
	R^2 ajustado	89.51%	0.00%	11.08%	34.29%	0.46%
Outros metabólitos*		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
	F	47.95	0.9	1.69	3.87	1.03
	P	<0.0001	0.526	0.136	0.002	0.435
	R^2 ajustado	89.51%	0.00%	11.08%	34.29%	0.46%

* A matriz denominada 'Outros metabólitos', refere-se aos seguintes metabólitos: poliaminas, ácidos nucleicos, lipídeos, cofatores e vitaminas, metabolismo secundário, hormônios e desconhecidos.

Na representação dos eixos PC1 e PC2 (Figura 9), que contribuem em conjunto com 49,7% da variação dos dados é possível observar que os pontos relacionados aos horários 10, 13 e 16h estão deslocados mais à esquerda dos demais. Ao mesmo tempo, verifica-se que os vetores que contribuíram para esta separação (Glc, Fru, Sor|Taga, Lyx, Rib|Xylu, Galt, Xyl e Sac) são vetores relacionados à metabólitos de produção e transporte de açúcares solúveis (Glc, Fru, Sor|Taga, Galt e Sac) e parede celular (Lyx, Rib|Xylu e Xyl). Na separação realizada pelo PC2, é possível verificar que os pontos das 13, 16, 22, 1 e 4h são os que estão posicionados mais abaixo no plano, sendo o ponto das 16h, o que mais se distancia dos demais, sugerindo que este é o horário com maior conteúdo de Cell, Galn, Lacto, N-ace e Rham, todos eles relacionados ao metabolismo de parede celular. Observa-se ainda neste mesmo horário maiores teores de Psi e Malt (transporte de açúcares e sinalização). No início da noite (19h), há uma redução no

conteúdo destes compostos na folha, que voltam a ser observados às 22h (Figuras 7 e 9).

Figura 9 – Biplot de distância dos dados da matriz de carboidratos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de carboidratos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e segundo componentes (PC1 e PC2). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

Observando o eixo PC3, que representa 11,7% da variação dos dados, é possível verificar a presença do vetor referente ao metabolito Man|All (Figura 10). Os pontos que correspondem aos horários das 19 às 4h estão posicionados na parte mais inferior do plano, indicando que são nestes horários que a Man | All, um metabolito relacionado à parede celular está presente em maior quantidade (Figuras 7 e 10).

Figura 10 – Biplot de distância dos dados da matriz de carboidratos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de carboidratos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e terceiro componentes (PC1 e PC3). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

No quarto componente (PC4), observa-se a presença das variáveis Ami, Raf e Mel (Figura 11). Ami e Raf estão presentes em maior quantidade as 13 e 16h na folha. Observa-se que Mel, composto da via da rafinose aumenta gradativamente a partir das 19h, atingindo teores máximos as 4 e as 7h (Figuras 7 e 11).

Figura 11 – Biplot de distância dos dados da matriz de carboidratos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de carboidratos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e quarto componentes (PC1 e PC4). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

A partir da análise da matriz de ácidos orgânicos da folha, observa-se que os cinco primeiros componentes (PC1 a PC5) explicam 90,6% da variação destes compostos ao longo dia (Anexo 4), sendo os cinco significativos para esta variação (Tabela 2).

Na Figura 12, que representa os eixos PC1 e PC2 e que contribuem em conjunto com 62,3% da variação dos dados, verifica-se uma clara separação entre os pontos das 10, 13 e 16h (à esquerda) dos pontos das 19, 22, 1 e 4h (à direita). Esta separação é explicada pelos vetores Pyr, Keto Cit e Aspart que são intermediários do ciclo C_4 e também compostos envolvidos no Ciclo de Krebs. Entre as 10 e 16h, foram observados os maiores conteúdos de Pyr e Keto, que reduziram após o início do período noturno

(Figuras 7 e 12). Por outro lado, com o início da noite (19h), os teores de Cit e Aspart aumentaram, se mantendo constante até as 4h. Às 7h é possível observar novamente uma redução destes metabólitos (Figuras 7 e 12).

Figura 12 – Biplot de distância dos dados da matriz de ácidos orgânicos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de ácidos orgânicos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e segundo componentes (PC1 e PC2). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

Ao analisar o plano descrito pelos eixos 1 e 3 (PC1 e PC3) (Figura 13) da matriz de ácidos orgânicos, observa-se a presença de dois vetores que contribuem para o PC3 e que são bastante representativos dentro da variação de 13,7% dada por este componente. Estes dois vetores correspondem aos metabólitos Ici e cis-Aco, que estão

presentes em maior quantidade no início da manhã (Figuras 7 e 13). Estes metabólitos estão relacionados com processos respiratórios na mitocôndria.

Figura 13 – Biplot de distância dos dados da matriz de ácidos orgânicos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de ácidos orgânicos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e terceiro componentes (PC1 e PC3). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

Aproximadamente 85% da variação dos dados da matriz de aminoácidos da folha são explicados pelos cinco primeiros componentes gerados na análise (Anexo 5). Destes, somente o PC2, PC3 e PC4 são significativos para a variação entre os horários (Tabela 2). Da mesma forma que nos carboidratos e ácidos orgânicos, nos aminoácidos observa-se uma separação entre período diurno e noturno. A separação no eixo PC2, que explica 14,7% da variação, é dada principalmente pelos aminoácidos Ala, O-ace e Gly, presentes

em maior quantidade no período das 10 às 16h e pelos aminoácidos 5-Oxop, Glu e His, presente no período noturno (Figura 14). No PC3 que representa 9,3% da variação de aminoácidos ao longo do dia (Figura 14), é possível observar que os aminoácidos Phe, Leu e Tyr estão em maior quantidade no início da manhã (7h) (Figuras 7 e 14). Já as no período das 13 às 19h, observam-se os maiores teores de Homo, Orn e Gln (Figuras 7 e 14).

Figura 14 – Biplot de distância dos dados da matriz de aminoácidos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de aminoácidos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo segundo e terceiro componentes (PC2 e PC3). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

A matriz denominada “outros metabólitos”, que inclui poliaminas, ácidos nucleicos, lipídeos, cofatores e vitaminas, metabolismo secundário, hormônios e substâncias desconhecidas tem 77% da variação compreendida entre os cinco primeiros componentes (Anexo 6). No entanto, a variação diária só é significativa nos componentes 1 e 4 (PC1 e PC4) (Tabela 2).

Na representação destes dois componentes (Figura 15) é possível observar que no período noturno, especialmente as 22 e 1h, há a presença de maiores teores de Thren (envolvido no metabolismo de vitamina C), 3-Indo (precursor da auxina), Caff e Sina (envolvidos no metabolismo de lignina) na folha. Os pontos do período diurno se apresentam mais à esquerda do plano, indicando que neste período há maior quantidade de Nicot (produção de energia), Glyt (fotossíntese, respiração e metabolismo de lipídeos) e um composto ainda não identificado (At_RI345320, com índice de retenção de 345320). No eixo PC4, representando 8,6% da variação, observa-se a presença de Gluc, Dehy, 2-Hydrop e 2-Hydroc, sendo o primeiro encontrado em maior quantidade no final da tarde e início da noite (16 e 19h) e os demais observados em maiores proporções às 13h e 7h do segundo dia (Figuras 7 e 15). Gluc e Dehy são metabólitos relacionados com o metabolismo de ácido ascórbico, 2-Hydrop com o de fenilpropanóides e 2-Hydroc com o metabolismo de ácidos nucleicos.

Figura 15 – Biplot de distância dos dados da matriz de “outros metabólitos” de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de poliaminas, ácidos nucleicos, lipídeos, cofatores e vitaminas, metabolismo secundário, hormônios e substâncias desconhecidas detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo segundo e terceiro componentes (PC2 e PC3). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

Diferentemente do encontrado para folha, a análise global dos metabólitos na raiz não apresentaram uma separação definida entre os diferentes horários. Ainda assim, é possível identificar um padrão que estabelece diferenças entre período diurno e noturno (Figuras 16 e 17).

Figura 16 – Biplot de distância dos dados da matriz de metabólitos de folha de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e segundo componentes (PC1 e PC2). $n=5$.

Figura 17 – Representação da dinâmica das mudanças do metabolismo primário ao longo de 24 horas em raízes de cana-de-açúcar. Dados coletados as 7, 10, 13, 16, 19, 22, 1, 4 e 7 horas. $n=5$.

Em relação aos carboidratos da raiz é possível observar que os cinco primeiros componentes (PC1 a PC5) explicam 70,5% da variação dos dados (Anexo 7), embora somente os PC2, PC3 e PC4 sejam significativos para as diferenças entre as horas do dia (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de F, significância (P) e coeficiente de determinação (R^2 ajustado) derivados da análise de variância (ANOVA) das variáveis sintéticas (PC1 a PC5) obtidas pela análise de componente principal (PCA) para metabólitos em raízes de cana-de-açúcar. Fator de variância = horários. $n= 45$. Valores em negrito representam significância na análise ($p \leq 0.05$).

		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Carboidratos	F	1.84	2.7	2.35	6.37	1.2
	P	0.101	0.019	0.038	<0.0001	0.327
	R^2 ajustado	13.27%	23.63%	19.70%	49.40%	3.49%
		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Ácidos orgânicos	F	4.08	4.34	5.16	2.32	0.89
	P	0.002	0.001	<0.0001	0.041	0.538
	R^2 ajustado	35.93%	37.78%	43.05%	19.31%	0.00%
		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Aminoácidos	F	1.99	1.1	3.11	3.43	1.53
	P	0.076	0.383	0.009	0.005	0.18
	R^2 ajustado	15.24%	1.86%	27.72%	30.62%	8.86%
		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Outros metabólitos*	F	3.28	3.08	8.23	1.72	3.15
	P	0.007	0.009	<0.0001	0.127	0.008
	R^2 ajustado	29.29%	27.49%	56.80%	11.57%	28.08%

* A matriz denominada 'Outros metabólitos', refere-se aos seguintes metabólitos: poliaminas, ácidos nucleicos, lipídeos, cofatores e vitaminas, metabolismo secundário, hormônios e *unknowns*.

Os componentes 2 e 3 (PC2 e PC3) na matriz de carboidratos na raiz representam, em conjunto, 28% da variação dos dados analisados. Neste plano, observa-se que os metabólitos Sor|Taga, Glc 6-P|Gal 6-P, Rib|Xylu, Fuc|Epi, Glun e Xyl, que explicam a variação no eixo do PC2, estão presentes em maior quantidade no período diurno (Figura 18). Ainda é possível verificar que estes metabólitos aparecem em maior quantidade às 7h (Figuras 17 e 18). Todos estes metabólitos estão relacionados à síntese de parede celular e transporte de açúcares. No eixo PC3, os vetores Glc, Fru e Raf indicam a presença de maior conteúdo destes açúcares solúveis às 16h, sendo Glc e Fru mais significativas para a análise do que a Raf (Figura 18). Rham e

Mel também aparecem no eixo PC3 e é possível observar que estes compostos, relacionados com parede celular e metabolismo de rafinose, estão em maior quantidade às 4h.

Figura 18 - Biplot de distância dos dados da matriz de carboidratos de raiz de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de carboidratos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo segundo e terceiro componentes (PC2 e PC3). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

No componente 4 (PC4), que representa 7,7% da variação, nota-se a presença dos metabólitos Sac, Tur, N-ace, Lev e Galn, sendo os três últimos também relacionados com parede celular (Figura 19). Os conteúdos destes compostos são observados em maior proporção no período diurno, entre as 13h e 16h (Figuras 17 e 19).

Figura 19 - Biplot de distância dos dados da matriz de carboidratos de raiz de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de carboidratos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo segundo e quarto componentes (PC2 e PC4). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

Para a matriz de ácidos orgânicos os três primeiros componentes apresentaram significância para variação entre horários (Tabela 3). Os primeiros dois componentes (PC1 e PC2) que explicam 52,7% da variação estão representados na Figura 21. No PC1, é possível observar Fum|Mal, Cit, Keto, Pyr e cis-Aco (integrantes do metabolismo respiratórios na mitocôndria) presentes em maior quantidade no período diurno, especialmente às 7h e às 13h (Figuras 17 e 20). No PC2, verifica-se que os pontos referentes às 7h estão mais acima no plano, indicando que neste horário há maior conteúdo de Suc e Mal, também relacionados a processos respiratórios. Ainda no PC2, é

possível identificar o metabólito Ita, que está presente em maior concentração às 13, 19 e 22h.

Figura 20 - Biplot de distância dos dados da matriz de ácidos orgânicos de raiz de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de ácidos orgânicos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e segundo componentes (PC1 e PC2). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

A análise da matriz de aminoácidos da raiz indica que estes metabólitos variam pouco durante 24 horas neste órgão (Figura 21). Somente os terceiro e quarto componentes são significativos, representando apenas 12% da variação entre horários (Tabela 3, Anexo 9). Avaliando o eixo do PC3, observa-se que Homo e t-4-Hyd estão em maior quantidade no período diurno, enquanto Gly e Pro se apresentam em maior proporção no período noturno, especialmente às 22h (Figuras 17 e 21). No PC4, destaca-

se o aminoácido Arg, que apresenta o maior conteúdo às 7h do segundo dia de coleta e às 16h (Figura 21). Além disso, observa-se maior quantidade de Orn, b-Ala, Ura e Met entre 7 e 10h e entre 19 e 4h.

Figura 21 - Biplot de distância dos dados da matriz de aminoácidos de raiz de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo de aminoácidos detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo terceiro e quarto componentes (PC3 e PC4). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

A Figura 22 representa os eixos do PC1 e PC2 provenientes da matriz de “outros metabólitos” da raiz, que são significativos para a variação de horários (Tabela 3) e representam, em conjunto, 36,6% desta variação (Anexo 10). Os vetores que contribuíram para o primeiro componente (PC1) foram Sper e Put (poliaminas), Rib|RibU (metabolismo de ácidos nucleicos), Gluc (metabolismo de ácido ascórbico) e At_RI345320. Este componente diferencia os pontos das 7h (2º dia), 16 e 4h indicando

que os metabólitos citados estão em maior teor nestes horários (Figura 17 e 22). O segundo componente (PC2) contribuiu com 16,3% para a separação entre os pontos do período diurno e noturno, sendo que Glyt, Nicot e 3-Hydroc envolvidos no metabolismo de lipídeos e respiração, produção de energia e fenilpropanóides respectivamente, estão presentes durante o dia e 4-Hydrob, relacionado com o metabolismo de ácido ascórbico, presente à noite.

Figura 22 - Biplot de distância dos dados da matriz de “outros metabólitos” de raiz de cana-de-açúcar. Cada ponto integra todos os metabólitos relacionados ao metabolismo poliaminas, ácidos nucleicos, lipídeos, cofatores e vitaminas, metabolismo secundário, hormônios e substâncias desconhecidas (unknowns) detectados pela análise de GC-MS em cada um dos horários avaliados no plano definido pelo primeiro e segundo componentes (PC1 e PC2). Os pontos (■) representam os horários do período noturno e os pontos (□) representam os horários do período diurno. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Siglas descritas no Anexo 3. Vetores pouco representativos não são mostrados. $n=5$.

DISCUSSÃO

A alta taxa de assimilação de CO₂ e produção de açúcares solúveis observados nas folhas de cana-de-açúcar confirmam o observado por Ledon & Gonzales (1950), que descreveram esta planta como uma das mais eficientes em produzir carboidratos através do processo fotossintético. A variação diária da taxa de fotossíntese em cana segue o mesmo padrão de variação observado para a luz e para a condutância estomática (Figuras 2A, 2B e 2C). Na literatura, há diversas descrições da regulação da atividade das enzimas fotossintetizantes pela luz (para revisão ver Furbank *et al.* 2000) e, por este motivo, é esperado que ambas as medidas variem da mesma forma ao longo do dia. No milho, já foi descrito que 90% da flutuação de assimilação de carbono pode ser explicada por mudanças na intensidade de luz (Moss *et al.* 1961). No entanto, essas mudanças podem ocorrer também pela baixa disponibilidade de ATP para manter o fluxo de carbono (Leegood *et al.* 1989) e pela baixa condutância estomática observada em condições de pouca luminosidade (Du *et al.* 2000).

Os dados obtidos mostraram que a taxa fotossintética está correlacionada positivamente com a produção de açúcares solúveis na folha (Tabela 1), corroborando Paul & Pellny (2003), que descreveram que a produção de açúcares e o metabolismo da folha são guiados pela fotossíntese. Embora não tenha sido observada a mesma correlação para os outros dois órgãos analisados, foi mostrado que Sac e Raf da folha estão correlacionadas com estes mesmos açúcares no colmo e na raiz, sugerindo que a translocação de açúcares ocorre no mesmo período em que há produção dos mesmos na folha. Em outras palavras, os açúcares provenientes do carbono assimilado pela folha são exportados para os outros órgãos ao mesmo tempo em que é produzido. Hartt & Kortschak (1967) propuseram que na cana-de-açúcar a luz participa do processo de translocação de açúcares da folha para o colmo, podendo ser este o motivo pelo qual a exportação dos fotoassimilados ocorre ao mesmo tempo da produção dos mesmos. Estes mesmos autores destacam que embora a exportação massiva de açúcares ocorra durante o dia, durante a noite também há translocação. A translocação noturna é proveniente de carboidratos, principalmente amido, produzidos durante o dia e degradados durante a noite (Smith & Stitt 2007), como foi observado também por este trabalho. No caso da cana, os conteúdos de amido observado em folha, colmo e raiz

(Figuras 3, 4 e 5) decrescem a partir das 19h, sugerindo que este amido está sendo degradado para o suprimento de carbono noturno para a planta. Percebe-se ainda que ao longo do período noturno, há pequenas oscilações no conteúdo de Sac, Glc e Fru na raiz (Figura 5), Glc e Fru no colmo (Figura 4) e Raf na folha (Figura 3), corroborando a idéia que a degradação de amido mantém o fornecimento de carbono durante a noite. Como proposto por diversos autores (Stitt 1996; Geiger *et al.* 2000; Bläsing *et al.* 2005; Smith & Stitt 2007), é imprescindível que a planta seja capaz de utilizar o carbono reservado ao longo do dia para manter o suprimento de carbono durante à noite. Plantas mutantes de *Arabidopsis* incapazes de armazenar amido e consequentemente incapazes de manter o fluxo de carbono noturno reduzem o crescimento devido à privação deste carboidrato e mantêm o crescimento desacelerado por várias horas do dia seguinte (Gibon *et al.* 2004).

Ao final da noite (4h), praticamente todo o carbono encontrado em Glc, Fru, Sac, Raf e amido nos três órgãos foi utilizado pela planta. A redução do conteúdo destes açúcares, aumenta a força do dreno, sendo um provável sinal fisiológico para o aumento das taxas de fotossíntese (van Bel 2003), podendo ser esta a razão pela qual a cana-de-açúcar mantém altas taxas fotossintéticas (*ca.* 30-35 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante o dia.

Parte dos fotoassimilados produzidos ao longo do dia parece estar sendo direcionada para a produção de compostos relacionados à parede celular na folha e raiz (Figuras 9, 10, 11, 18 e 19), ou seja, estes fotoassimilados estão sendo utilizados para o crescimento. A presença dos metabólitos Lyx, Xyl e Rib|Xylu na folha e Fuc|Epi e Xyl na raiz durante o período diurno, indicam que hemiceluloses estão sendo produzidas entre as 10 e 16 horas na folha e por volta das 7h na raiz. Uma das principais hemiceluloses da cana-de-açúcar é o glucoronoarabinosilano (GAX) (Silva 2005) e a presença de Lyx, Rib|Xylu e Xyl pode indicar que este polissacarídeo esteja sendo produzido nestes horários, uma vez que a Lyx e Rib|Xylu fazem parte da via metabólica da Xyl (KEGG 2011) e esta é o monossacarídeo presente na cadeia principal do GAX. Recentemente, também foi descoberta a presença de xiloglucano em parede celular de cana (Crivellari & Buckeridge, resultados não publicados) e a presença dos metabólitos Fuc|Epi e Xyl sugerem a produção de xiloglucano no início da manhã. Os metabólitos Cell e Lev, que aparecem em maior quantidade às 16h na folha e às 4h na raiz (Figuras 9 e 19), respectivamente, estão descritos na literatura como sendo compostos da via de

degradação da celulose (KEGG 2011; Sykes *et al.* 2009). Embora não haja referência à degradação de celulose *in vivo*, estes metabólitos podem estar associados a mudanças na estrutura da parede celular que ocorrem no início e durante a noite devido à expansão da mesma durante o crescimento. Harmer *et al.* (2000) após avaliar cerca de 8000 genes em *Arabidopsis*, propuseram que durante o dia há síntese de parede celular, enquanto à noite há somente expansão, o que corrobora os dados obtidos para a cana-de-açúcar.

A presença de Rham, bem como a presença de Galn, Lacto e N-ace, metabólitos da via da galactose (KEGG 2011, Maischberger *et al.* 2008), indicam metabolismo de pectinas no final do dia e durante a noite na folha e às 4h na raiz (Figuras 9 e 19). Na cana-de-açúcar, assim como em outras gramíneas, o ácido galacturônico e ramnogalacturonano I são as pectinas observadas em maior quantidade (Carpita & McCann 2000). Estas pectinas também podem estar associadas à expansão celular, uma vez que devido à sua função de determinar a porosidade da célula podem interferir no acesso às enzimas relacionadas à expansão.

Ao longo das 24 horas analisadas, observou-se a presença de diferentes metabólitos relacionados ao transporte de açúcares tanto na folha (Sor|Taga e Psi, Figura 9) quanto na raiz (Sor|Taga, Mel e Tur, Figuras 17 e 18) fortalecendo o argumento de que o transporte e o fornecimento de carbono se mantêm por todo o período, como discutido anteriormente. Psi e Tur além de relacionados com o transporte de açúcares, por serem, respectivamente, similar a frutose e um isômero da sacarose, também podem ser associados à sinalização por açúcares via SnRK1 e hexoquinase (Sinha 2002; Cho & Yoo 2011). A Malt observada em maior quantidade na folha às 16h (Figura 9) está relacionada com degradação do amido que se inicia neste período na folha (Figura 3E), uma vez que este metabolito é parte da via de degradação do amido (KEGG 2011). Assim como Psi e Tur, a Malt pode fazer parte da rede de sinalização por açúcares via hexoquinase (Sharkey *et al.* 2004).

O aumento dos metabólitos Pyr, Keto, Fum|Mal, Male e Citm durante o período diurno na folha segue o padrão de aumento gradativo da taxa fotossintética (Figuras 2A e 12). Este padrão é esperado, uma vez que todos estes estão relacionados ao metabolismo do ciclo C₄ (Malkin & Niyogi 2000). Por outro lado, os metabólitos Cit e Aspart que também fazem parte do ciclo de assimilação de carbono, são observados em

maior quantidade durante o período noturno (Figura 12). É possível que com o término do período fotossintético tenha havido acúmulo destes metabólitos e por isso eles foram detectados em maior quantidade. Embora não tenham sido detectadas altas taxas de respiração durante a noite (Figura 2A), a presença de maior quantidade destes metabólitos no período noturno pode indicar metabolismo respiratório na mitocôndria, uma vez que todos estes metabólitos também fazem parte do ciclo de Krebs. Na raiz, a maioria dos ácidos orgânicos relacionados à respiração celular está presente das 7 às 22h (Figura 20), sugerindo que o metabolismo da raiz após as 22h diminui.

Os aminoácidos na folha e raiz aparecem com uma grande variação ao longo do dia (Figuras 14 e 21). O metabolismo de aminoácidos normalmente está associado ao metabolismo de síntese ou degradação de proteínas para manutenção de estruturas celulares ou para o estoque e fornecimento de nitrogênio (Sprengli 2000). No período noturno, observa-se a presença de Homo e 5-Oxop na folha e de Gly e Pro na raiz (Figuras 14 e 21). Segundo Carpita & McCann (2000), as três maiores classes de proteínas estruturais de parede celular são constituídas por estes ou derivações destes aminoácidos supracitados. Estes mesmo autores descrevem que a extensina, uma proteína chave no processo de afrouxamento da parede celular durante o crescimento, consiste de uma sequência repetida de aminoácidos que contém serina e tirosina. Desta forma, com a presença de Homo e Tyr na folha no período noturno, tem-se mais um indício que durante este período está havendo crescimento da planta e modificações na parede celular. Somado a isso, a presença do hormônio auxina (3-Indo, Figura 15) durante este mesmo período corrobora esta idéia. Os metabólitos 2-Hydroc e 3-Hydroc, que aparecem na folha e raiz, respectivamente, bem no início da manhã (7h) (Figuras 15 e 22) podem estar associados ao travamento da parede celular após o término do crescimento noturno, uma vez que ambos pertencem à via dos fenilpropanóides (KEGG 2011). Os fenilpropanóides fazem parte da parede celular de gramíneas, interligando os glucoarabinoxilanos (Buckeridge *et al.* 2010).

No período noturno também há aumento de Asp na folha, um aminoácido reconhecidamente relacionado com o transporte e estoque de nitrogênio (Coruzzi & Last 2000). Ainda na folha, nota-se que no período das 7h há maior quantidade de Leu, Phe e Try (Figura 14), podendo estes aminoácidos estar associados ao fornecimento de

nitrogênio em um período que a disponibilidade de carbono já se encontra limitante (Usadel *et al.* 2008).

Sendo assim, tem-se que o metabolismo primário da cana-de-açúcar está ativado durante 24 horas. A dinâmica do que ocorre em cada órgão em 24 horas, está resumido na Figura 23 e, nos Anexos 11 e 12 é possível visualizar a variação individual de cada metabólito nos diferentes órgãos. Durante o dia, a fotossíntese na folha produz carboidratos que são acumulados neste órgão e transportados para colmo e raiz. No final do dia, quando a fotossíntese reduz, os açúcares acumulados ao longo do dia começam a ser utilizados para a manutenção do metabolismo noturno. Ao mesmo tempo, na folha inicia-se o processo de modificação da parede celular, que se estende durante a noite, provavelmente devido a eventos associados ao crescimento. Na raiz, o processo de modificação de parede celular ocorre próximo ao fim da noite, sugerindo que o crescimento radicular não ocorre ao mesmo tempo em que o da folha. Com o consumo de grande parte dos carboidratos, há um aumento na força do dreno e possivelmente uma sinalização para a fotossíntese gerando um mecanismo de *feedback* positivo.

Figura 23 – Esquema resumido dos acontecimentos relacionados ao metabolismo primário em folha, colmo e raiz de cana-de-açúcar em 24 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral LIV, Gaspar M, Costa PMF, Aida MPM & Buckeridge MS (2007). Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34 (4): 425-431.
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM & Sheen J (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448: 938-942.
- Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible W-R & Stitt M (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 3257-3281.
- Borland A & Farrar JF (1988). Compartmentation and fluxes of carbon in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L. and *Poa x jemtlandica* (Almq.) Richt. *Plant Cell & Environment* 11: 535-543.
- BuckeridgeMS, dos Santos WD & de Souza AP (2010). As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: *BioEtanol de cana-de-açúcar: Pesquisa & Desenvolvimento para produtividade e sustentabilidade*. Cortez LAB (coord). Editora Edgard Blucher, pp.365-380.
- Carpita N & McCann M (2000). The cell wall. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 52-108.
- Cho Y-H & Yoo S-D (2011). Signaling Role of Fructose Mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 7(1): e1001263.
- Coruzzi G & Last R (2000). Amino acids. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp.358-410.
- Cuadros-Inostroza A, Caldana C, Redestig H, Kusano M, Lisec J, Pena-Cortes H, Willmitzer L & Hannah MA (2009). TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* 10: 12.
- de Souza AP, Gaspar M, da Silva E A, Ulian E C, Waclawovsky A J, Nishiyama-Jr MY, dos Santos RV, Teixeira MM, Souza G & Buckeridge MS (2008). Elevated CO₂ increases

- photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* 31:1116–1127.
- Du Y-C, Nose A, Kondo A & Wasano K (2000). Diurnal changes in photosynthesis in sugarcane leaves. *Plant Production Science* 3(1): 3-8.
- Eastmond PJ, van Dijken AJH, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickison HG, Jones JD, Smeekens SC & Graham IA (2002) Trehalose 6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant Journal* 29: 225-235.
- Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN & Willmitzer L (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18 (11): 1157-1161.
- Foyer CH & Paul MJ (2001). Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 360 (52): 1383-1400.
- Furbank RT, Hatch MD & Jenkins CLD (2000). C4 Photosynthesis: Mechanisms and regulation. In: *Photosynthesis; Physiology and Metabolism*. Leegood RC, Sharkey TD & von Caemmerer S (eds). Kluwer Academic Press, pp. 435-457.
- Geiger DR, Servaites JC & Fuchs MA (2000). Role of starch in carbon translocation and partitioning at plant level. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 571-582.
- Gibon Y, Bläsing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JH, Fisahn J, Höhne M, Gunther M & Stitt M (2004). Adjustment of diurnal starch turnover to short days, depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant Journal* 39: 847-862.
- Gordon AJ, Ryle GJA, Powell CE & Mitchell D (1980). Export, mobilization, and respiration of assimilates in unculm barley during light and darkness. *Journal of Experimental Botany* 31: 461-473.
- Graf A, Schlereth A, Stitt M & Smith AM (2010). Circadian control of carbohydrates availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proceedings of the National Academic of Sciences* 107 (20): 9458-9463.
- Graham IA & Martin T. Control of Photosynthesis, Allocation and Partitioning by Sugar Regulated Gene Expression. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*.

- Leegood RC, Sharkey TD & von Caemmerer S (eds). Kluwer Academic Publisher, pp. 233–248.
- Halford NG, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M & Zhang Y. 2003. Metabolic signaling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany* 54: 467–475.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA & Kay SA. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290: 2110–2113.
- Hartt CE & Kortschak HP (1957). Translocation of ^{14}C in the sugarcane plant during the day and night. *Plant Physiology* 42: 89-94.
- Hayes KR, Beatty M, Meng X, Simmons CR, Habben JE & Danilevskaya ON (2010). Maize global transcriptomics reveals pervasive leaf diurnal rhythms but rhythms in developing ears are largely limited to the core oscillator. *PLoS ONE* 5(9): e12887. doi:10.1371/journal.pone.0012887
- KEGG- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: abril 2011.
- Koch KE (2004). Sucrose metabolism, regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current opinion in Plant Biology* 7: 235-246.
- Kusano M, Fukushima A, Redestig H, Kobayashi M, Otsuki H, Onouchi H, Naito S, Hirai MY & Saito K (2010). Comparative metabolomics charts the impact of genotype-dependent methionine accumulation in Arabidopsis thaliana. *Amino Acids* 39: 1013–1021.
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW & Frommer WB (1999). The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11: 707–726.
- Lambers H, Stuart Chapin III F & Pons T (2008). *Plant Physiological Ecology*. 2.ed. Springer. 604p.
- Ledon AC & Gonzales FAZ (1950). Industrialization of photosynthesis through the use of sugar cane. *Proceedings of Cuban Sugar Technology* 24: 563-72.
- Leegood RC & Walker RP (1999). Regulation of the C_4 pathway. *In: C₄ Plant Biology*. Sage R & Monson RK (eds). Academic Press, pp. 89-131.

- Leegood RC, Adcock MD & Doncaster HD (1989). Analysis of the control of photosynthesis in plants by changes in light and carbon dioxide. Philosophical Transactions of the Royal Society in London 323: 339–355.
- Legendre, P. & Legendre, L. 1998. Numerical Ecology. 2 ed. Elsevier, 852p.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, & Fernie AR (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nature Protocols 1: 387-396.
- Lunn J, Feil R, Hendriks JH, Gibo Y, Morcuende R, Scheible WR, Osuna D, Carillo P, Hajirezaei M & Stitt M (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical Journal 397: 139-148.
- Maischberger T, Nguyen T-H, Sukyai P, Kittl R, Riva S, Ludwiga R & Haltrichb D (2008). Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. Carbohydrate Research 343: 2140–2147.
- Malkin R & Niyogi K (2000). Photosynthesis. *In*: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville,pp. 568-628
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T & Sheen J (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science 300: 332-336.
- Moss DN, RB Musgrave RB & Lemon ER (1961). Photosynthesis under field conditions.III. Some effects of light, carbon dioxide, temperature, and soil moisture on photosynthesis, respiration, and transpiration of corn. Crop Science 1: 83-87.
- Nozue K & Maloof J (2006). Diurnal regulation of plant growth. Plant, Cell & Environment 29: 396-408.
- Paul MJ & Pellny TK (2003). Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development . Journal of Experimental Botany 54: 539-547.
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea & Zhang Y (2008). Trehalose metabolism and signaling. Annual Review of Plant Biology 59:417-441.
- Pollock CJ & Farrar JF (1996). Source-Sink Relations: The Role of Sucrose. *In*: Photosynthesis and the Environment Baker NR (ed). Kluwer Academic Publishers, pp. 261–279.

- Rolland F, Baena-Gonzales E & Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:676-709.
- Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M & Wisman E (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 113-123.
- Schuepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S & Paul M (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6849-6854.
- Sharkey TD, Laporte M, Lu Y, Weise S & Weber APM (2004). Engineering plants for elevated CO₂: A relationship between starch degradation and sugar sensing. *Plant Biology* 6: 280-288.
- Silva AM (2005). Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária). Tese de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural - Universidade Estadual de Campinas.
- Sinha AK, Hofmann MG, Romer U, Kockenberger W, Elling L & Roitsch T (2002). Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology* 128: 1480–1489.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J & Rolland F (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 274–279.
- Smith AM & Stitt M (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* 30: 1126-1149.
- Spremulli L (2000). Protein synthesis, assembly and degradation. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp.412-454.
- Stitt M & Krapp A (1999). The molecular physiological basis for interaction between elevated carbon dioxide and nutrients. *Plant, Cell & Environment* 22: 583-622.
- Stitt M (1996). Metabolic Regulation of Photosynthesis. *In: Photosynthesis and the Environment*. Baker NR (ed). Kluwer Academic Publishers, pp. 151–190.
- Sykes R, Yung M, Novaes E, Kirst M, Peter G & Davis M (2009). High-Throughput screening of plant cell-wall composition using pyrolysis molecular beam mass spectroscopy. *In: Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Mielenz JR (ed). Vol. 581. Human Press, pp. 169-183.

- Tepperman JM, Hudson ME, Khanna R, Zhu T, Chang SH, Wang X & Quail PH (2004). Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant Journal* 38: 725-739.
- Trethaway R & Smith AM (2000). Starch metabolism in leaves. *In*: Leegood R, Sharkey T & von Caemmerer S (eds). *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, pp. 205-231.
- Usadel B, Bläsing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Höhne M, Günther M & Stitt M (2008). Global transcripts levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes. *Plant Physiology* 146: 1834-1861.
- van Bel AJE (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* 26: 125-149.
- Walter A & Schurr W (2005). Dynamics of leaf and root growth: endogenous control versus environmental impact. *Annals of Botany* 95: 891-900.
- Weckwerth W, Wenzel K & Fiehn O (2004). Process for the integrated extraction identification, and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 4: 78-83.
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. 4.ed. Prentice Hall, New Jersey, 929p.

CAPÍTULO 2

*Fotossíntese e crescimento da
cana-de-açúcar cultivada em
atmosfera enriquecida com CO₂*

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) é uma planta de grande importância para a economia mundial devido ao seu uso na indústria de alimentos e, mais recentemente, na produção de etanol. Cerca de 100 países produzem cana-de-açúcar, totalizando uma área plantada de 22 milhões de hectares (0,5% do total da área mundial utilizada para agricultura) (FAOSTAT 2008). No Brasil, a safra do ano de 2010-2011 gerou aproximadamente 625 milhões de toneladas de cana, dos quais 42% foram destinados à produção de açúcar e 58% à produção de etanol (CONAB 2011).

Assim como em todas as outras plantas, a presença de estresses abióticos pode afetar o crescimento, desenvolvimento e a produtividade da cana. De acordo com estudos realizados pelo *International Panel of Climate Changes* (IPCC) (<http://www.ipcc.ch>), alterações na temperatura, concentração de CO₂ e no padrão de chuvas decorrentes das mudanças climáticas irão, em conjunto, impactar de forma significativa na agricultura mundial. A presença destes fatores também irá influenciar em decisões futuras referentes ao manejo das culturas, melhoramento genético de variedades e economia agrícola (Easterling *et al.* 2007). Desta forma, o conhecimento acerca das respostas de plantas de importância econômica a estes fatores são de grande valia para projeções de produtividade agrícola nos próximos anos.

Como amplamente divulgado nos últimos anos, há um crescente aumento da concentração CO₂ na atmosfera, decorrente principalmente de mudanças do uso do solo e queima de combustíveis fósseis (IPCC 2007). A média de concentração de CO₂ na atmosfera atualmente é de aproximadamente 394ppm (NOAA 2010) e cálculos realizados pelo IPCC estimam para o ano de 2075, concentrações próximas a 720ppm.

O cultivo de plantas sob elevada concentração de CO₂ frequentemente promove o aumento da taxa fotossintética e, conseqüentemente, há um incremento de biomassa nessas plantas (Poorter & Pérez-Soba 2002). Embora isso seja observado para a maioria das plantas, as que apresentam esse tipo de resposta são plantas com metabolismo fotossintético do tipo C₃. Para plantas com fotossíntese do tipo C₄, como a cana-de-açúcar, não é comum encontrar na literatura resultados que demonstrem aumento na taxa fotossintética e/ou aumento de biomassa. Diversos estudos mostram que as alterações de fotossíntese e biomassa nessas plantas estão relacionadas principalmente

a condições de déficit hídrico, em que as plantas crescidas em altas concentrações de CO₂ seriam beneficiadas pela redução na condutância estomática e consequente melhora nas relações hídricas (Ainsworth & Long 2005; Cousins *et al.* 2003; Leakey *et al.* 2006). Por outro lado, os experimentos realizados até o momento com cana-de-açúcar mostram que podem ocorrer alterações na taxa fotossintética e acúmulo de biomassa nessas plantas mesmo em condições de rega constante (Ziska *et al.* 1997; Vu *et al.* 2006; de Souza *et al.* 2008).

Vu e colaboradores (2006) demonstraram que com o cultivo em elevado CO₂ as plantas de cana-de-açúcar apresentaram um aumento na fotossíntese aos 20, 7 e 10% depois de 7, 14 e 32 dias, respectivamente, após a emergência da folha +7. Estes autores observaram aumento na atividade das enzimas sacarose sintase (SS), ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e NADP- malato desidrogenase (NADP-MDH) e diminuição da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPc) e da NADP- enzima málica (NADP-ME), além do aumento na concentração de sacarose após 14 dias de desenvolvimento da folha. Em outro experimento, de Souza *et al.* (2008) verificaram que após 13 semanas de cultivo em alto CO₂ houve um incremento na taxa fotossintética de 60% e indução na expressão de genes relacionados ao transporte de elétrons nos cloroplastos. Houve também redução na condutância estomática, aumento no conteúdo de biomassa de folhas e colmo e aumento de 30% no conteúdo de sacarose após um ano de cultivo.

Além da importância em conhecer como a cana-de-açúcar regula sua resposta ao elevado CO₂, a possibilidade de que as alterações na expressão de genes ligados ao transporte de elétrons provavelmente estão relacionados à maior produção de biomassa e açúcares, sugere um alvo importante para estudos da regulação da cana-de-açúcar como um todo, uma vez que este processo é pouco conhecido (McCormick *et al.* 2009).

Até o momento, a maior parte do conhecimento acerca da regulação da fotossíntese em cana é proveniente de estudos que possuem interesse em identificar mecanismos relacionados ao acúmulo de sacarose no colmo (Pammenter & Allison 2002; Inmar-Bamber *et al.* 2005; McCormick *et al.* 2006, 2008; Moore 2010). É conhecido que a relação fonte-dreno pode ser considerada um processo-chave nesta regulação (Inmar-Bamber *et al.* 2005), assim como o observado para outras plantas (Rolland & Sheen 2005).

Considerando os resultados obtidos por de Souza *et al.* (2008), onde foi observado aumento de 30% de sacarose no colmo sob o cultivo em elevado CO₂, o estudo das relações de fonte-dreno nessas condições também podem prover informações a respeito da influência desta relação na regulação fotossintética, bem como na dinâmica de acúmulo de sacarose no colmo.

Sendo assim, este capítulo apresenta dados provenientes de um experimento com cana-de-açúcar crescida em elevada concentração de CO₂, dando ênfase ao processo de assimilação fotossintética e possíveis vias de regulação desta por meio da investigação do sistema de captura de luz, CO₂ e relação fonte-dreno.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e cultivo das plantas

As plantas foram obtidas a partir de colmos de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 coletados no Sítio Vitória, localizado na cidade de Piracicaba, SP, no mês de outubro de 2008. Os colmos foram seccionados e selecionados de acordo com a massa fresca para garantir homogeneidade do conteúdo de reserva para brotação. As secções do colmo (toletes) foram plantadas em bandejas de plástico com substrato Plantmax® (lascas de pinus, vermiculita e turfa) e mantidas em casa de vegetação.

Após 10 dias de plantio, os indivíduos que se desenvolveram foram transferidas para vasos plásticos de 40 L contendo substrato Plantmax® e em cada vaso foram colocadas três plantas. Os vasos foram distribuídos aleatoriamente nas quatro câmaras de topo aberto, sendo duas delas com concentração atmosférica de CO₂ ambiente (aproximadamente 390ppm) e as outras duas contendo elevada concentração de CO₂ (aproximadamente 750ppm). Em cada câmara foram colocados seis vasos. Nas três primeiras semanas foram aplicadas doses preventivas de acaricida e fungicida nas plantas. Semanalmente as plantas foram rotacionadas dentro da câmara e a cada 15 dias elas foram trocadas de câmara para evitar a aclimação ao microambiente.

As câmaras possuem sensores de umidade e temperatura acoplados a um sistema de monitoramento contínuo (RICS® -*Remote Integrated Control System*) que permitiu o registro da umidade relativa do ar e temperatura ao longo de todo o experimento. O monitoramento e controle da concentração de CO₂ dentro das câmaras foram realizados manualmente a cada dois dias, utilizando um sensor de CO₂ (Testo®, modelo 435).

Para o auxílio no controle do conteúdo de água no solo, foram instalados dois tensiômetros em cada câmara, de modo que a tensão da água do solo nunca ultrapasse 20 kPa. Diariamente, os tensiômetros foram checados e, quando necessário, as plantas foram irrigadas. A adubação foi realizada com N:P:K (18:00:27) de acordo com especificações do Centro de Tecnologia Canavieira (de Souza *et al.* 2008).

Crescimento das plantas

O crescimento das plantas foi avaliado a partir de medidas de altura e produção de biomassa de folhas e colmo após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo. As medidas de altura foram realizadas da base do tolete até a ponta da folha mais jovem em todas as plantas do experimento.

A produção de biomassa foi determinada após coletas destrutivas de 4 plantas por tratamento. Para as folhas, o material vegetal foi seco em estufa a 60°C até peso constante e posterior pesagem. Para o colmo, foi realizada pesagem do material fresco e a biomassa seca foi estimada a partir do conteúdo de água presente neste órgão determinada em experimento anterior (de Souza 2007).

Medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As taxas fotossintéticas e fluorescência da clorofila *a* foram obtidas com medidas após 30, 45, 60 e 75 dias, na folha mais jovem completamente expandida (folha +1) de cada planta.

As medidas foram realizadas com um medidor portátil de fotossíntese (LI-6400 XT, Li-Cor, USA), equipado com uma câmara de fluorescência (LI-6400-40, Li-Cor) para medidas de fluorescência da clorofila em sistema modular. Em todas as medidas a temperatura da folha foi mantida a 28°C ± 1°C e o déficit de pressão de vapor na folha entre 1-2KPa. As medidas foram realizadas na parte central da folha.

Para determinar a resposta da fotossíntese (*A*) em relação ao fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA) incidente, foram realizadas curvas de luz (*A*xFFFA) em 4 plantas de cada tratamento. Simultaneamente, foram realizadas as medidas dos parâmetros de fluorescência da clorofila. A concentração de CO₂ dentro da câmara do equipamento foi mantida a mesma na qual a planta foi cultivada (390 ou 750 ppm).

Antes de cada medida, as folhas foram mantidas durante 30 minutos no escuro para permitir a completa oxidação dos centros de reação e, assim, a obtenção do valor de fluorescência mínima das folhas adaptadas ao escuro (*F*_o). O valor de fluorescência máxima das folhas adaptadas ao escuro (*F*_m) foi obtido após pulso de luz saturante. Para a readaptação à luz, as plantas foram mantidas durante 20 minutos sob um FFFA de

2500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Quando foi observado que a fotossíntese havia novamente se estabelecido e apresentava valores constantes (*steady-state*), foram iniciadas as medidas de fotossíntese juntamente com os parâmetros de fluorescência. Cada curva foi realizada iniciando as medidas com 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de FFFA até completa ausência de luz.

Os parâmetros de fluorescência foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989), conforme descrito a seguir, e a nomenclatura dos parâmetros segue Baker & Oxborough (2004).

A máxima eficiência quântica fotoquímica sob luz (F_v'/F_m') foi determinada pela equação:

$$F_v'/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m'$$

onde: **Fm'** é a fluorescência máxima da folha adaptada à luz e **Fo'** a fluorescência mínima da folha adaptada à luz.

A estimativa da eficiência quântica fotoquímica operante do fotossistema II (F_q'/F_m'), também conhecida como ϕPSII , foi calculada pela seguinte equação:

$$F_q'/F_m' = (F_m' - F')/F_m'$$

onde: **Fm'** é a fluorescência máxima da folha adaptada à luz e **F'** o nível de fluorescência entre F_o' e F_m' .

A razão F_q'/F_v' estima a fração de eficiência máxima utilizada pelo fotossistema II. Essa razão também é conhecida como qP (*quenching fotoquímico*) e é calculada pela equação:

$$F_q'/F_v' = (F_m' - F') / (F_m' - F_o')$$

onde: **Fm'** é a fluorescência máxima da folha adaptada à luz; **F'**, o nível de fluorescência entre F_o' e F_m' e **Fo'**, a fluorescência mínima da folha adaptada à luz.

Para o cálculo da taxa de transporte de elétrons foi utilizada a seguinte equação:

$$J_{PSII} = (Fq'/Fm') * FFFA * \alpha_{leaf} * f$$

onde: **Fq'** é a diferença entre Fm' e F' medido imediatamente após a aplicação do pulso de luz saturante; **Fm'**, a fluorescência máxima da folha adaptada à luz; **FFFA**, o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos incidente ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); **α_{leaf}** , a absorção de luz pela folha e **f**, a fração de elétrons utilizados pelo fotossistema II (assumido como sendo 0,4 para plantas C₄, de acordo com von Caemmerer 2000).

O *quenching* não fotoquímico (NPQ) foi calculado a partir da equação:

$$NPQ = (Fm - Fm')/Fm'$$

onde: **Fm** é a fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro e **Fm'**, a fluorescência máxima da folha adaptada à luz.

O rendimento quântico do CO₂, também pode ser calculado a partir das medidas de trocas gasosas, seguindo a equação:

$$\phi_{CO_2} = (A - R_d) * FFFA * \alpha_{leaf}$$

onde: **A** é taxa líquida de assimilação de CO₂ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); **R_d**, a respiração no escuro ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); **FFFA**, o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos incidente ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e **α_{leaf}** , a absorção de luz pela folha.

Os parâmetros derivados das curvas de luz foram obtidos a partir da equação da hipérbole não retangular, como descrito por Long & Hällgren (1993):

$$A = \frac{\Phi FFFA + A_{sat} - \sqrt{[(\Phi FFFA + A_{sat})^2 - 4 \theta \Phi FFFA * A_{sat}]}}{2 \theta} - R_d$$

onde: **A** é a taxa de assimilação líquida de CO₂ (μmol.m⁻².s⁻¹); **Φ**, o rendimento quântico aparente; **FFFA**, o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (μmol.m⁻².s⁻¹); **A_{sat}**, taxa de assimilação máxima (μmol.m⁻².s⁻¹); **θ**, coeficiente de convexidade e **R_d**, respiração no escuro (μmol.m⁻².s⁻¹).

As respostas fotossintéticas (A) em função da concentração interna de CO₂ (Ci) (curvas AxCi) foram determinadas através de medidas ao longo de um gradiente de concentração externa de CO₂, de acordo com metodologia descrita por Long & Bernacchi (2003). Para estas medidas foram utilizadas 3 plantas de cada tratamento e luz incidente constante (2500 μmol.m⁻².s⁻¹).

Para o cálculo dos parâmetros de velocidade máxima de carboxilação da fosfoenolpiruvato carboxilase (V_{pmáx}) foram utilizadas as equações descritas por von Caemmerer (2000).

Segundo von Caemmerer, V_{pmáx} pode ser dado pela inclinação inicial (dA/dCi) de resposta da curva AxCi. Neste caso, a inclinação inicial foi dada pelos valores de Ci < 100 μmol.m⁻².s⁻¹.

Para as correções da constante cinética em função da temperatura medida em graus Celsius (T_m) foi utilizada a equação de Arrhenius:

$$K_p(T_m) = K_{p(25^\circ\text{C})} \exp [E(25-T_m) / (298 R(273,15+T_m))]$$

onde: **K_{p(25°C)}** é o valor de K_p a 25°C; **E**, a energia de ativação para a constante (68663,52 J mol⁻¹, de acordo com Uedan & Sugiyama 1976) e **R**, a constante universal dos gases (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹).

A velocidade de regeneração do substrato fosfoenolpiruvato (V_{pr}) foi calculada como sendo a média dos valores de assimilação após a estabilização da curva AxCi, como sugerido por Dohleman & Long (2009).

A partir das curvas AxCi também foi calculada a limitação estomática (I_s), de acordo com Long & Bernacchi (2003). Para esse cálculo foi utilizado o Ci obtido no ponto de 400 μmol.m⁻².s⁻¹ para as plantas crescidas no CO₂ ambiente e no ponto de 800 μmol.m⁻².s⁻¹ para as plantas em alto CO₂. Segundo os autores, se a folha possui uma

taxa fotossintética A' em uma dada concentração de CO_2 , podemos prever um valor hipotético para A (A'') para uma folha que possui livre acesso ao CO_2 ($g_s = \infty$) e, neste caso, $C_i = C_a$ (concentração interna de CO_2 = concentração externa de CO_2). Para o cálculo da limitação estomática foi utilizada a equação:

$$l_s = (A'' - A')/A''$$

onde: A'' é o valor de assimilação hipotético, considerando $C_i = C_a$ e A' é a assimilação fotossintética em $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de CO_2 (para plantas do CO_2 ambiente) e em $800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (para plantas do alto CO_2).

Os valores de C_i/C_a e condutância estomática foram obtidos dos pontos de medida das curvas $A \times C_i$ referente à concentração de CO_2 que a planta foi cultivada.

Medidas de trocas gasosas no campo

Com o objetivo de comparar as taxas fotossintéticas do controle experimental (CO_2 ambiente) com o que é observado em campo, medidas de trocas gasosas a partir de curvas de luz e curvas de CO_2 foram realizadas no mesmo estágio de desenvolvimento considerados no experimento em câmaras de topo aberto (após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo). A cada coleta de dados, foram selecionadas quatro plantas de um talhão de cana do Sítio Vitória em Piracicaba, SP.

As medidas e os cálculos apresentados seguem a mesma metodologia descrita para o experimento entre CO_2 ambiente e alto CO_2 , mantendo a concentração de CO_2 durante as medidas iguais às encontradas no ambiente.

Conteúdo de clorofila

O extrato de clorofila foi obtido a partir do disco foliar de $1,53 \text{ cm}^2$ da região central das folhas +1. O disco foi macerado em 2 mL de acetona 80%, sob baixa temperatura e luminosidade para evitar a degradação dos pigmentos (Porra *et al.* 1989). O extrato foi centrifugado a 600g por 5 min e a leitura da densidade óptica foi realizada, sob penumbra, nos comprimentos de onda referentes à absorção máxima pela clorofila

b (645nm) e pela clorofila *a* (663nm). O conteúdo de clorofila foi calculado em relação à área do disco foliar, seguindo as equações apresentadas por Lichtenthaler & Wellburn (1983):

$$\text{Clorofila } a = (12,25 \cdot A_{663} - 2,79 \cdot A_{645}) \cdot (V/F)$$

$$\text{Clorofila } b = (21,50 \cdot A_{645} - 2,79 \cdot A_{663}) \cdot (V/F)$$

$$\text{Clorofila } a+b = (7,14 \cdot A_{663} + 18,71 \cdot A_{645}) \cdot (V/F)$$

onde: **A** é a absorbância; **V**, o volume da amostra (mL) e **F**, a área do disco foliar (cm²).

Quantificação de açúcares solúveis e amido

Durante as coletas destrutivas aos 30, 45, 60 e 75 dias de experimento foram separados a folha +1 e o colmo das plantas, que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Os colmos da coleta dos 75 dias foram separados em jovens (internós 1 a 3), intermediários (internós 4 a 6) e maduros (internós 7 e 8 a 9, quando presentes). Esse material foi macerado em nitrogênio líquido e uma parte foi seca em liofilizador, enquanto a outra permaneceu armazenada a -80°C.

O material seco em liofilizador foi utilizado para a quantificação de açúcares solúveis e amido. Vinte miligramas do material foram submetidos à extração com etanol 80% a 80°C durante 20 min por 6 vezes para a retirada completa dos açúcares solúveis. A cada extração, as amostras foram centrifugadas a 12.000 *g* por 5 min e os sobrenadantes reservados. Os sobrenadantes das 6 extrações foram unidos e secos em concentrador de amostras (Speed-vac®). Após secagem, as amostras foram ressuspensas em água deionizada e alíquotas equivalentes de cada uma das amostras foram analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta performance (HPAEC/PAD), utilizando-se uma coluna Carbowax PA1 eluída com hidróxido de sódio 100 mM com fluxo constante de 1 mL/min em sistema Dionex-DX500®.

Para a quantificação do amido foi utilizado o protocolo de Amaral *et al.* (2007). O precipitado resultante da última extração com etanol 80% foi lavado com água destilada e seco durante 1 h em estufa a 60°C. Ao precipitado seco, foram adicionados 500µL da

enzima α -amilase (120U/mL) (MEGAZYME[®]) e a mistura foi incubada a 75°C durante 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1mL de enzima. Após resfriamento até 50°C foram adicionados 400 μ L da enzima amiloglucosidase (30U/mL) (MEGAZYME[®]) e as amostras foram incubadas por 30 min nesta temperatura. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1,8mL de enzima. Para cessar a reação foram adicionados 50 μ L de ácido perclórico 0,8M. Após centrifugação a 10.000g por 2 min, alíquotas das amostras foram incubadas com GODPOD (Glicose PAP Liquiform 1) (Labtest[®]) a 30°C por 15 min. Após a incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 490nm, utilizando glicose (1mg/mL) como padrão.

Quantificação de ácido málico

Para a quantificação de ácido málico foram utilizadas amostras de folhas secas em liofilizador. Em 20 mg de material de folha, foram adicionados 500 μ L da solução de metanol:clorofórmio:água (12:5:3) contendo 200 μ g de fenil- β -D-glucopiranosideo, como padrão interno. As amostras foram incubadas a 60°C durante 30 min. Após resfriamento até temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 2 min. Da fase superior, uma alíquota de 150 μ L de cada amostra foi seca sob vácuo durante 12 h.

Para a derivatização, foram adicionados 200 μ L de piridina e 50 μ L de uma mistura contendo N-O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamina (BSTFA) e trimetil-clorosilano (TCMS) ao resíduo seco. As amostras foram incubadas num banho-seco a 75°C por 1 h. Os compostos trimetil-sililados foram analisados em cromatógrafo a gás (CG, modelo GC System 6890, Agilent) acoplado a um detector de massa quadripolo (MS, modelo 5973, Agilent), utilizando uma coluna de 30 m de comprimento e 250 μ m de diâmetro. Durante a análise, a programação da temperatura iniciou em 95°C por 2 min e aumentou progressivamente até 320°C, na razão de 8°C/min. O fluxo foi mantido constante em 1 mL/min.

Quantificação de Carbono e Nitrogênio

A quantificação do carbono (C) e nitrogênio (N) em folhas e colmos de cana de açúcar foi realizada no Laboratório de Ecologia Isotópica, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em Piracicaba-SP.

Utilizando uma balança analítica, foram pesados de 1,8 a 2 mg das amostras de folha e colmo secas em liofilizador. Essas amostras foram colocadas em cápsulas de estanho e foram analisadas em Elemental para C e N (Carlo-Erba modelo 1110). O sistema Elemental consiste em um processo de combustão que volatiliza o material e o carrega para as colunas específicas através de um fluxo contínuo de gás hélio para a obtenção da concentração de C e N das amostras.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo método ANOVA two-way, utilizando tratamento, data da coleta e a interação tratamento e data da coleta como fatores fixos da análise, com $\alpha=0,05$. Quando houve contraste entre médias pelo ANOVA referente a data da coleta e a interação tratamento e data da coleta, foi realizado o teste *post-hoc* Tukey HSD, com significância de 5%.

Com o intuito de avaliar mudanças nas relações entre as concentrações de carboidratos e nas relações da fotossíntese, foram realizadas análises bivariadas utilizando o cálculo de correlação de Pearson de acordo com Zar (1999) e foram consideradas significativas as correlações que apresentaram valor de $p \leq 0.05$.

Em todas as análises foi utilizado o pacote estatístico JMP® *Statistical Discovery Software*, versão 5.0.1.

RESULTADOS

Temperatura e umidade relativa

O experimento foi realizado durante a estação primavera-verão do ano de 2008. As médias diárias de temperatura dentro das câmaras ao longo de todo o experimento foram de $24,85 \pm 2,7^{\circ}\text{C}$ (Figura 1A). A média de temperatura diária máxima registrada foi de $30,53^{\circ}\text{C}$ e a mínima de $19,02^{\circ}\text{C}$.

A umidade relativa média do ar dentro das câmaras foi de $69,75 \pm 7,9\%$ (Figura 1B), sendo que a média diária máxima registrada foi de $90,15\%$ e a mínima de $52,27\%$.

Não foram observadas diferenças de temperatura e umidade relativa entre as câmaras controle (CO_2 ambiente) e as com altas concentrações de CO_2 .

Figura 1 – Temperatura média ($^{\circ}\text{C}$) (**A**) e umidade relativa média (%) (**B**) do ar dentro das câmaras durante o experimento com cana-de-açúcar. Câmaras com CO_2 ambiente ($\square$ / linha tracejada) e câmaras com alto CO_2 ($\blacksquare$ / linha inteira). As setas indicam o período em que foram realizadas as coletas de dados (30, 45, 60 e 75 dias de cultivo).

Crescimento

A partir da avaliação do crescimento da altura das plantas foi verificado que há diferenças significativas para os tratamentos ($p<0.0001$), para as coletas ($p<0.0001$) e para a interação tratamento e coleta ($p<0.0001$). Em ambos os tratamentos as plantas cresceram ao longo do tempo. No entanto, a partir dos 45 dias as plantas crescidas em alto CO_2 apresentaram alturas maiores do que as plantas controle, sendo que a diferença entre os tratamentos aumentou progressivamente ao longo do tempo (Figura 2). A diferença observada foi de 4,77, 6,5 e 11,45% nas coletas dos 45, 60 e 75 dias, respectivamente.

Através da análise estatística de interação entre tratamento e coleta obtida neste experimento é possível verificar que as plantas crescidas sob alta concentração de CO_2 apresentam, aos 60 dias, altura similar àquelas crescidas em CO_2 ambiente aos 45 dias. O mesmo acontece aos 75 dias em relação aos 60 dias das plantas do CO_2 ambiente, sugerindo uma aceleração no crescimento em altura das plantas crescidas em alto CO_2 a partir dos 45 dias de tratamento.

Figura 2 – Altura das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em atmosfera com CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■) aos 30, 45, 60 e 75 dias após o início do experimento. Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=20$ ou mais. Diferenças significativas indicadas por valor de $p\leq 0.05$.

A biomassa das folhas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0.0260$) e entre as coletas ($p<0.0001$), mas não houve interação entre tratamento e coleta ($p=0.2708$) (Figura 3A). A biomassa de folha das plantas de ambos os tratamentos aumentou ao longo do tempo, sendo que no período entre 60 e 75 dias foi observado o maior aumento na produção de biomassa foliar (210,9% para as plantas do CO_2 ambiente e 174,53% para as crescidas em alto CO_2). Embora as plantas do alto CO_2 tenham produzido maior biomassa de folhas durante o experimento, foi observado que durante esse período (entre 60 e 75 dias) as plantas do CO_2 ambiente produziram, proporcionalmente, mais biomassa de folhas do que as das plantas do alto CO_2 (aumento de 45,6% em CO_2 ambiente vs. 28,5% em alto CO_2), sugerindo que houve redução na produção de biomassa fotossintetizante das plantas crescidas em alto CO_2 nesse período.

Figura 3 – Biomassa de folhas **(A)** e biomassa do colmo **(B)** das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em atmosfera com CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■) aos 30, 45, 60 e 75 dias após o início do experimento. Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p\leq 0.05$.

O colmo apresenta diferenças significativas em biomassa entre os tratamentos ($p=0.0002$) (Figura 3B), sendo que as plantas crescidas sob alta concentração de CO_2 apresentam médias de biomassa maiores do que as plantas crescidas em CO_2 ambiente. O maior incremento de biomassa foi observado em ambos os tratamentos entre 60 e 75 dias de coleta, sendo esta última com valores bastante distintos das demais ($p<0.0001$). A Figura 4 mostra o aspecto geral das plantas e o detalhe do colmo em ambos os tratamentos após 75 dias de cultivo.

A interação entre tratamento e coleta revela que aos 60 dias as plantas crescidas em CO_2 ambiente apresentaram biomassa de colmo similar as plantas do alto CO_2 aos 45 dias e o mesmo aconteceu nos 75 dias em relação aos 60 dias ($p=0.0003$), indicando o maior acúmulo de biomassa no colmo das plantas do alto CO_2 a partir dos 45 dias de tratamento. A média de biomassa de colmo das plantas do alto CO_2 foi aproximadamente 178 % maior do que as do CO_2 ambiente aos 75 dias.

Assim como nas folhas, as plantas do CO_2 ambiente acumularam, proporcionalmente, mais biomassa no colmo entre 60 e 75 dias do que as plantas crescidas em alto CO_2 (525,4% para CO_2 ambiente e 371,7% para alto CO_2).

Figura 4 – Aspecto geral das plantas de cana-de-açúcar nas câmaras de CO₂ **(A)**; comparação entre as plantas do CO₂ ambiente com as do alto CO₂ **(B)** e detalhe do colmo **(C)** após 75 dias de cultivo.

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A partir das curvas AxFFFA foram obtidos os valores de assimilação líquida máxima (A_{sat}), rendimento quântico do CO_2 (ϕCO_2), coeficiente de convexidade (θ) e respiração no escuro (R_d). Esses valores são apresentados na Tabela 1.

A taxa de assimilação líquida máxima (A_{sat}) foi maior nas plantas cultivadas em alto CO_2 durante todo o experimento ($p=0.0247$). Em ambos os tratamentos o A_{sat} variou ao longo do tempo, sendo que aos 30 dias após o início do experimento foram observados os maiores valores A_{sat} ($p=0.0147$). A maior diferença entre os tratamentos pode ser observada aos 45 e 60 dias, período em que as plantas do alto CO_2 apresentaram valores para A_{sat} 32,52 e 51,86% maiores do que as plantas do CO_2 ambiente nestas duas datas, respectivamente.

O rendimento quântico do CO_2 (ϕCO_2) e o coeficiente de convexidade (θ) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0.9463$; $p=0.4594$, respectivamente), entre as coletas ($p=0.0649$; $p=0.0969$) e na interação tratamento e coleta ($p=0.5521$; $p=0.1831$).

Ao longo do experimento foram observadas diferenças entre as coletas ($p=0.0002$) e na interação entre tratamento e coleta ($p=0.0033$) para os valores de respiração no escuro (R_d). É possível observar um aumento na taxa de R_d nas folhas de plantas crescidas sob alta concentração de CO_2 aos 60 dias de cultivo. No entanto, esse valor decresce novamente aos 75 dias, igualando-se ao tratamento de CO_2 ambiente e também às coletas anteriores.

Tabela 1 – Parâmetros calculados a partir das curvas de luz (AxFFFA) obtidas aos 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo das plantas de cana-de-açúcar crescidas em atmosfera de CO₂ ambiente e alto CO₂. A_{sat} = taxa de assimilação líquida máxima; ϕCO_2 = rendimento quântico do CO₂; θ = coeficiente de convexidade e R_d = respiração foliar no escuro. Valores representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas em A_{sat} entre tratamentos ($p=0.0247$) e entre coletas ($p=0.0147$) e em R_d entre coletas ($p=0.0002$) e na interação entre tratamento e coleta ($p=0.0033$). Para os demais parâmetros não há diferenças significativas.

Parâmetro	30		45		60		75	
	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂
A_{sat} ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	54,01 $\pm$ 2,66	58,26 $\pm$ 5,65	32,34 $\pm$ 3,22	42,86 $\pm$ 5,73	39,06 $\pm$ 3,65	59,32 $\pm$ 6,11	31,49 $\pm$ 2,32	40,66 $\pm$ 2,57
$\phi\text{CO}_{2,\text{máx}}$	0,074 $\pm$ 0,009	0,056 $\pm$ 0,009	0,047 $\pm$ 0,007	0,046 $\pm$ 0,015	0,064 $\pm$ 0,017	0,054 $\pm$ 0,013	0,040 $\pm$ 0,001	0,029 $\pm$ 0,002
θ	0,64 $\pm$ 0,087	0,77 $\pm$ 0,074	0,78 $\pm$ 0,041	0,95 $\pm$ 0,013	0,64 $\pm$ 0,143	0,74 $\pm$ 0,102	0,74 $\pm$ 0,035	0,57 $\pm$ 0,073
R_d ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	2,21 $\pm$ 0,350	1,34 $\pm$ 0,215	1,69 $\pm$ 0,361	1,54 $\pm$ 0,231	1,86 $\pm$ 0,310	2,90 $\pm$ 0,090	1,98 $\pm$ 0,440	1,49 $\pm$ 0,200

Em relação à taxa de transporte de elétrons pelo fotossistema II (J_{PSII}) (Figura 5) há diferença significativa entre os tratamentos ($p=0.0389$). Aos 45 e 60 dias a J_{PSII} foi, respectivamente, 32,19 e 40,97% maior nas plantas cultivadas na atmosfera com alto CO_2 . Esse aumento é condizente com as maiores taxas de A_{sat} verificadas nessas mesmas datas (Tabela 1). Aos 75 dias, observa-se uma queda em J_{PSII} nas plantas do alto CO_2 , que coincide com a redução na taxa fotossintética e redução de crescimento nestas plantas. Também podem ser observadas diferenças significativas entre coletas, onde os valores de J_{PSII} são maiores para ambos os tratamentos aos 30 dias ($p=0.0128$).

Figura 5 – Taxa de transporte de elétrons pelo fotossistema II (J_{PSII}) das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em atmosfera com CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■) aos 30, 45, 60 e 75 dias após o início do experimento. Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferença significativa entre tratamentos ($p=0.0389$) e entre coletas ($p=0.0128$).

Através da análise do parâmetro Fq'/Fm' , verifica-se que as plantas crescidas sob alta concentração de CO_2 apresentam uma maior eficiência quântica fotoquímica operante do fotossistema II ($p=0.0425$)(Figura 6A), onde as maiores diferenças entre alto CO_2 e CO_2 ambiente podem ser observadas após 45 e 60 dias de cultivo (32,20 e 41,09% maiores em alto CO_2 , respectivamente). As diferenças entre tratamentos observadas

em Fq'/Fm' estão bem próximas das observadas para J_{PSII} , indicando que os elétrons transportados estão sendo utilizados para assimilação de CO_2 .

O aumento de Fq'/Fm' nas plantas do alto CO_2 foi influenciado especialmente pelo aumento da eficiência máxima do fotossistema II (Fv'/Fm') (Figura 6B) ($p=0.0022$) e não pela eficiência máxima de utilização dos elétrons (Fq'/Fv') (Figura 6C) ($p=0.3414$).

Figura 6 – Eficiência operante do fotossistema II (Fq'/Fm') (A), eficiência máxima do fotossistema II (Fv'/Fm') (B) e eficiência máxima utilizada no fotossistema II (Fq'/Fv') (C) nas plantas de cana-de-açúcar após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo em concentrações de CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■). Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0,05$.

Devido ao aumento do F_q'/F_m' nas plantas cultivadas em alto CO_2 era esperado que o *quenching* não fotoquímico nestas plantas (NPQ) diminuísse, mas não é o que foi observado neste experimento (Figura 7). Não há diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0.1010$) e entre interação entre tratamento e coleta ($p=0.9022$), embora possa ser observada em todos os pontos de coleta uma tendência de redução no NPQ nas plantas crescidas sob alto CO_2 .

Figura 7 – *Quenching* não fotoquímico (NPQ) das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em atmosfera com CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■) aos 30, 45, 60 e 75 dias após o início do experimento. Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Não há diferença significativa entre tratamentos.

A assimilação de CO_2 (A) em função da taxa de transporte de elétrons pelo fotossistema II (J_{PSII}) pode dar uma indicação da existência de drenos alternativos (ex. fotorrespiração, metabolismo de nitrogênio, doação de elétrons para o oxigênio – reação de Mehler) que estão competindo pelos elétrons transportados e, conseqüentemente, reduzindo a taxa de assimilação de CO_2 na planta.

Neste experimento, não foram observadas diferenças significativas em AxJ_{PSII} entre os tratamentos ($p=0.3569$) e entre a interação tratamento e coleta ($p=0.9663$) (Figura 8). No entanto, pode ser observada diferença entre 30 e 75 dias ($p= 0.0484$),

onde o coeficiente angular das retas aos 75 dias é menor do que aos 30 dias, indicando uma redução do uso de elétrons para assimilação fotossintética no final do experimento.

Figura 8 – Assimilação de CO_2 (A) em função da taxa de transporte de elétrons do fotossistema II (J_{PSII}) nas plantas de cana-de-açúcar após 30 (A), 45 (B), 60 (C) e 75 dias (D) de cultivo em concentrações de CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■). Linha inteira, regressão linear para alto CO_2 ($R^2=0.9585$; 0.9448 ; 0.9295 e 0.9053 para 30; 45; 60 e 75 dias, respectivamente). Linha tracejada, regressão linear para CO_2 ambiente ($R^2= 0.9439$; 0.9302 ; 0.9311 ; 0.9585). Diferença significativa somente entre coletas ($p=0.0484$). $n=4$.

A relação entre o transporte de elétrons e a assimilação de CO_2 também foi avaliada pela correlação entre a eficiência operante do fotossistema II (Fq'/Fm') e rendimento quântico do CO_2 (ϕCO_2) (Figura 9). Para as plantas cultivadas em alto CO_2 , observa-se que a relação entre CO_2 fixado e elétrons transportados é menor do que nas plantas cultivadas em CO_2 ambiente ($p=0.0127$), ou seja, para cada molécula de CO_2 fixada, há, aparentemente, menor taxa de elétrons sendo transportados nessas plantas. Essa diferença pode ser observada desde o 30º dia, mas fica evidenciada após 45 e 60

dias de tratamento. Não foram observadas diferenças entre coletas ($p=0.5678$) e na interação entre tratamento e coleta ($p=0.7807$).

Figura 9 – Eficiência operante do fotossistema II (Fq'/Fm') em função do rendimento quântico do CO_2 (ϕCO_2) nas plantas de cana-de-açúcar após 30 (A), 45 (B), 60 (C) e 75 dias (D) de cultivo em concentrações de CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■). Linha inteira, regressão linear para alto CO_2 ($R^2=0.8341$; 0.903 ; 0.5446 e 0.6454 para 30; 45; 60 e 75 dias, respectivamente). Linha tracejada, regressão linear para CO_2 ambiente ($R^2= 0.5444$; 0.8991 ; 0.7758 ; 0.594). Diferença significativa somente entre tratamentos ($p=0.0127$). $n=4$.

A análise das curvas de assimilação (A) pela concentração interna de CO_2 (C_i) mostra que não há diferenças significativas na velocidade máxima de carboxilação da PEPc ($V_{pm\acute{a}x}$) ($p= 0.5564$) e na velocidade de regeneração do PEP (V_{pr}) ($p=0,6298$) entre os tratamentos, indicando que nas plantas crescidas em alto CO_2 não há limitação das enzimas responsáveis pela captação de CO_2 (Tabela 2). Embora não haja diferença entre os tratamentos, foi observado que houve uma redução em $V_{pm\acute{a}x}$ ao longo do experimento para ambos os tratamentos ($p<0.0001$).

Tabela 2 – Parâmetros calculados a partir das curvas de CO₂ (AxCi) obtidas aos 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo das plantas de cana-de-açúcar crescidas em atmosfera de CO₂ ambiente e alto CO₂. V_{pmáx} = velocidade máxima de carboxilação da PEPc; V_{pr} = velocidade máxima de regeneração do PEP; g_s = condutância estomática; Ci= concentração interna de CO₂; I_s = limitação estomática e Ci/Ca= relação ente concentração interna e externa de CO₂. Valores representam média aritmética ± erro padrão. n=4. Diferenças significativas em V_{pmáx} e V_{pr} entre coletas (p<0.0001 e p = 0.0001), em g_s entre tratamentos (p<0.0001) e entre coletas (p<0.0001), em I_s entre tratamentos (p=0.0035) e entre coletas (p=0.0241) e em Ci entre tratamentos (p<0.0001) e entre coletas (p=0.0163). Em Ci/Ca não foram encontradas diferenças significativas.

Parâmetro	30		45		60		75	
	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂
V _{pmáx} (μmol.m ⁻² .s ⁻¹)	86,65 ± 3,15	74,21 ± 4,34	39,70 ± 1,89	44,84 ± 3,26	39,11 ± 8,70	41,54 ± 5,91	24,26 ± 4,50	26,28 ± 7,18
V _{pr} (μmol.m ⁻² .s ⁻¹)	49,81 ± 3,26	47,33 ± 3,93	27,24 ± 2,61	32,84 ± 4,19	44,62 ± 4,34	42,23 ± 2,59	31,18 ± 3,27	30,37 ± 2,21
g _s (μmol.m ⁻² .s ⁻¹)	0,30 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,036	0,13 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,08 ± 0,02
I _s	0,39 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,080	0,34 ± 0,03	0,43 ± 0,05	0,29 ± 0,01
Ci	243,56 ± 18,10	503,25 ± 23,88	201,78 ± 17,02	424,00 ± 19,21	211,90 ± 34,12	528,89 ± 29,19	229,65 ± 22,45	567,78 ± 12,76
Ci/Ca	0,30 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,29 ± 0,06	0,34 ± 0,011	0,32 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,23 ± 0,05

Para V_{pr} , também foi verificada uma redução ao longo dos pontos de coleta ($p=0.0001$), sendo que aos 60 dias observa-se um aumento desse parâmetro, coincidindo com o aumento do A_{sat} neste mesmo período em ambos os tratamentos (Tabelas 1 e 2).

A condutância estomática (g_s) variou durante o experimento ($p<0.0001$) e em todos os pontos de coleta as plantas do alto CO_2 apresentaram menores taxas de condutância estomática ($p<0.0001$) (Tabela 2). Ainda que a condutância estomática tenha sido menor nas plantas crescidas em alto CO_2 , foi observado um aumento na concentração interna de CO_2 (C_i) nestas plantas ($p<0.0001$) e não foi observado aumento na limitação estomática para a entrada de CO_2 . Ao contrário disso, foi observado que as plantas do alto CO_2 apresentaram menores taxas de limitação estomática do que as plantas crescidas no CO_2 ambiente ($p=0.0035$) e que essa limitação foi diminuindo ainda mais ao longo do experimento ($p=0.0241$) (Tabela 2). A relação C_i/C_a não foi diferente entre os tratamentos ($p=0.8862$).

Trocas gasosas no campo

Na Tabela 3 são apresentados os valores correspondentes aos parâmetros provenientes das curvas A_{xFFFA} e A_{xCi} das plantas de cana de açúcar crescidas no campo. Os valores de A_{sat} e ϕCO_2 se mantêm praticamente constantes durante todo o período do experimento, não apresentando diferenças significativas entre as datas de coleta ($p=0.225$ e $p=0.572$, respectivamente).

A respiração no escuro (R_d) é maior aos 30 dias de experimento ($p=0.0169$) quando comparada com as outras datas de coleta. Foi observado também um aumento em V_{pmax} aos 60 dias ($p=0.0016$), mas que não refletiu em aumento de assimilação de CO_2 . Embora tenha sido verificado um aumento em V_{pmax} , não foram observadas diferenças significativas em V_{pr} ao longo do experimento ($p=0.2093$). Tanto V_{pmax} quanto V_{pr} não apresentaram correlação significativa com a taxa de fotossíntese ($p=0.5957$ e $p=0.2090$).

Embora os valores de C_i/C_a tenham variado pouco durante o experimento ($p=0.1553$) foi verificado uma redução significativa na condutância estomática aos 60 dias de experimento ($p=0.0022$), que proporcionou um aumento de 23% na limitação

estomática para a entrada de CO₂ (p=0.0012) e consequente redução de aproximadamente 25% na concentração interna de CO₂ (Ci) (p=0.0012).

Tabela 3 – Parâmetros calculados a partir das curvas de luz (AxFFFA) e de CO₂ (AxCi) obtidas aos 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo das plantas de cana-de-açúcar crescidas na campo, na cidade de Piracicaba, SP. A_{sat} = taxa de assimilação líquida máxima; ϕCO_2 = rendimento quântico do CO₂; θ = coeficiente de convexidade; R_d = respiração no escuro; $V_{pm\acute{a}x}$ = velocidade máxima de carboxilação da PEPc; V_{pr} = velocidade máxima de regeneração do PEP; g_s = condutância estomática; C_i = concentração interna de CO₂; I_s = limitação estomática e C_i/C_a = relação ente concentração interna e externa de CO₂. Valores representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$.

Parâmetro	Dias de experimento			
	30	45	60	75
A_{sat} ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	58,08 $\pm$ 2,45	49,3 $\pm$ 5,51	49,17 $\pm$ 6,16	42,4 $\pm$ 3,03
$\phi CO_{2,m\acute{a}x}$	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
θ	0,52 $\pm$ 0,11	0,71 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,13
R_d ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	3,45 $\pm$ 0,14	2,60 $\pm$ 0,28	2,50 $\pm$ 0,23	2,43 $\pm$ 0,11
$V_{pm\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	51,27 $\pm$ 1,44	43,49 $\pm$ 5,84	81,27 $\pm$ 6,49	-
V_{pr}	46,16 $\pm$ 1,41	41,21 $\pm$ 2,73	49,47 $\pm$ 4,27	-
g_s ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	0,57 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,03	-
I_s	0,51 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,01	-
C_i/C_a	0,59 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,02	-
C_i	196,46 $\pm$ 4,45	190,16 $\pm$ 11,55	145,33 $\pm$ 5,36	-

Com a obtenção dos dados de trocas gasosas no campo, foi possível estabelecer uma comparação entre os principais dados relacionados à assimilação de CO₂ obtidos das plantas crescidas no campo, no CO₂ ambiente e no alto CO₂. A assimilação máxima de CO₂ (A_{sat}) apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (p=0.0034), sendo que as plantas crescidas no campo apresentaram valores de A_{sat} similares aos das plantas crescidas em alto CO₂ e maiores do que aos das plantas crescidas em CO₂ ambiente (Figura 10A).

Os valores de respiração no escuro (R_d) também se apresentaram diferentes entre os tratamentos, sendo que os valores obtidos no campo foram, com exceção dos 60 dias de experimento, maiores do que os obtidos para as plantas do CO₂ ambiente e alto CO₂ (Figura 10B).

A velocidade máxima de carboxilação ($V_{pm\acute{a}x}$) apresentou diferenças pontuais entre os tratamentos, sendo que a maior variação foi observada nas plantas crescidas no campo, onde aos 30 dias o $V_{pm\acute{a}x}$ foi menor e aos 60 dias foi maior do que os valores verificados para as plantas do CO_2 ambiente e alto CO_2 (Figura 10C). A V_{pr} não apresentou mudanças nem entre os tratamentos ($p=0.9913$) e nem na interação tratamento e coleta ($p=0.1983$) (Figura 10D).

Figura 10 – Taxa de assimilação líquida máxima (A_{sat}) (**A**); respiração no escuro (R_d) (**B**); velocidade máxima de carboxilação da PEPc ($V_{pm\acute{a}x}$) (**C**) e velocidade máxima de regeneração do PEP (V_{pr}) das plantas de cana de açúcar após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo em campo (■) e em concentrações de CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■). Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas indicadas por valores de $p<0,05$.

Conteúdo de clorofila

Os conteúdos de clorofila total (Chl a+b), clorofila a (Chl a) e de clorofila b (Chl b) não variaram entre os tratamentos durante todo o experimento ($p=0.5235$; $p=0.2478$ e $p=0.4733$, respectivamente) (Tabela 4). No entanto, foram observadas diferenças entre os pontos de coletas ($p<0.0001$). O conteúdo de Chl a + b foi maior aos 30 dias de experimento coincidindo com as maiores taxas fotossintéticas das plantas e diminuiu após 45 dias. Aos 60 dias houve novamente um aumento da Chl a + b que se manteve estável até os 75 dias, especialmente devido ao aumento Chl b observado neste período.

Embora os conteúdos de clorofila não tenham se alterado, a razão entre Chl a e Chl b foi diferente entre os tratamentos ($p=0.0380$) (Tabela 4), sendo que as plantas cultivadas sob alta concentração de CO_2 apresentaram razões Chl a/Chl b maiores que as plantas do CO_2 ambiente. Também foram observadas diferenças em relação ao tempo de cultivo, onde até os 45 dias de tratamento as razões observadas foram maiores do que após esse período ($p=0.0016$).

Tabela 4 – Conteúdo de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl a + b) e razão de clorofila a e b (Chl a/ Chl b) obtidos aos 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo das plantas de cana-de-açúcar crescidas em atmosfera de CO₂ ambiente e alto CO₂. Valores representam média aritmética ± erro padrão. *n*=4. Diferenças significativas em Chl a, Chl b e Chl a +b entre coletas (*p*<0.0001) e na razão Chl a/Chl b entre tratamentos (*p*=0.0380) e entre coletas (*p*=0.0016).

Parâmetro	30		45		60		75	
	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂	CO ₂ ambiente	alto CO ₂
Chl a	65,13 ± 1,78	63,37 ± 5,62	30,49 ± 10,06	39,07 ± 2,42	39,87 ± 0,44	40,65 ± 0,43	39,83 ± 0,89	45,42 ± 2,86
Chl b	25,00 ± 0,73	24,43 ± 2,28	13,99 ± 2,02	14,15 ± 2,65	21,79 ± 1,08	21,63 ± 0,46	25,07 ± 3,81	22,36 ± 0,53
Chl a+b	76,90 ± 2,15	74,93 ± 6,76	41,00 ± 10,02	47,43 ± 5,29	56,73 ± 1,51	57,11 ± 0,87	60,84 ± 2,64	64,47 ± 3,57
Razão Chl a/Chl b	2,61 ± 0,01	2,60 ± 0,03	2,04 ± 0,50	2,88 ± 0,33	1,84 ± 0,09	1,88 ± 0,02	1,62 ± 0,13	2,04 ± 0,15

Açúcares solúveis e amido

As folhas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos nos açúcares glicose (Glc) e frutose (Fru) ($p = 0.5581$ e $p = 0.3255$, respectivamente) (Figura 11A e B). No entanto, houve mudança no conteúdo desses açúcares ao longo do experimento, onde aos 75 dias ambos os tratamentos apresentaram maiores conteúdo de Glc e Fru ($p = 0.0058$ e $p = 0.0020$). Essas maiores taxas de Glc e Fru coincidem com o período de redução na taxa de assimilação das folhas destas plantas (Tabela 1).

Figura 11 – Conteúdo de glicose (Glc) **(A)**, frutose (Fru) **(B)**, sacarose (Sac) **(C)** e amido **(D)** por miligrama de massa seca (mgMS⁻¹) nas folhas das plantas de cana-de-açúcar após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo em concentrações de CO₂ ambiente (■) e alto CO₂ (□). Barras representam média aritmética ± erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0.05$.

Em relação à sacarose (Sac) na folha não foram observadas diferenças significativas entre tratamento ($p=0.2767$), bem como entre os pontos de coleta ($p=0.2095$) (Figura 11C).

Na Figura 11D, são apresentados os conteúdos de amido nas folhas de cana ao longo do experimento. Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos ($p=0.1434$). Porém, foi possível observar diferenças quanto à interação tratamento e coleta ($p=0.0035$). As plantas do alto CO_2 possuem 76,74% menos amido do que as plantas do CO_2 ambiente aos 75 dias de cultivo. Essa diferença aos 75 dias coincidiu com um aumento do conteúdo de amido nas plantas do CO_2 ambiente em relação aos pontos de coleta anteriores. Esse aumento não foi observado nas plantas crescidas em alto CO_2 , que apresentaram pouca variação no nível de amido durante o experimento. Entre coletas, observa-se que aos 45 dias há uma redução no conteúdo de amido nas folhas em ambos os tratamentos ($p=0.0121$), coincidindo com um período de temperaturas mais baixas e redução na taxa fotossintética.

No colmo, os conteúdos de Glc e Fru são significativamente diferentes entre tratamentos ($p<0.0001$), entre coletas ($p<0.0001$) e na interação tratamento e coleta ($p=0.0003$; $p=0.0002$) (Figura 12A e B). A diferença entre os tratamentos em ambos os açúcares é mais pronunciada a partir dos 45 dias de cultivo. Nesse período, as plantas em alto CO_2 apresentam o conteúdo de Glc 80,81 % maior do que as plantas em CO_2 ambiente. Aos 60 dias a diferença aumenta para aproximadamente 289 %, aos 75 dias é de 136,22% no colmo intermediário e de 250,75% no colmo maduro.

A Fru também é maior nas plantas do alto CO_2 , sendo que a diferença aos 45 dias é de 320%, aos 60 dias de 464,15% e aos 75 dias de 118,58% para o colmo intermediário e 379% para o colmo maduro.

Nas plantas do alto CO_2 , é possível verificar que o aumento do conteúdo de Glc e Fru no colmo inicia-se aos 45 dias de cultivo, enquanto que nas plantas do CO_2 ambiente o aumento destes açúcares só é observado no colmo intermediário, aos 75 dias (Figura 12A e B).

O conteúdo de sacarose também apresenta diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0.0033$) (Figura 12C), sendo que, neste caso, as plantas do alto CO_2 apresentam menores teores de Sac do que as plantas do CO_2 ambiente. Analisando os

diferentes pontos de coleta, observou-se, como esperado, que o colmo maduro é o que apresenta os maiores conteúdos de sacarose em ambos os tratamentos ($p < 0.0001$).

Figura 12 – Conteúdo de glicose (Glc) **(A)**, frutose (Fru) **(B)**, sacarose (Sac) **(C)** e amido **(D)** por miligrama de massa seca (mgMS^{-1}) nos colmos das plantas de cana-de-açúcar após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo em concentrações de CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■). Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0.05$.

As plantas crescidas no alto CO_2 apresentam discreta redução no conteúdo de amido no colmo em relação às plantas do CO_2 ambiente ($p=0.0504$) (Figura 12D). Essa redução é observada principalmente aos 75 dias, no colmo intermediário. Para ambos os tratamentos, os maiores teores de amido são encontrados aos 30 dias e aos 75 dias no colmo jovem ($p = 0.0003$).

Analisando os dados de açúcares solúveis e amido na folha e no colmo em conjunto, é possível verificar que com as modificações nos conteúdos destes carboidratos entre os tratamentos, as correlações entre eles são modificadas (Tabela 5). Enquanto a Glc no colmo é correlacionada com a Glc na folha no tratamento ambiente ($p=0.005$), em alto CO_2 esta correlação não é significativa ($p=0.072$). O mesmo acontece com Fru no colmo versus Glc e Sac na folha e Sac no colmo versus Glc, Fru e Sac na folha.

Por outro lado, o amido no colmo que não apresentou correlação com Glc e Fru neste mesmo órgão em CO_2 ambiente ($p=0.49$ e $p=0.44$), passa a ter correlação nas plantas crescidas em alto CO_2 ($p=0.037$ e $p=0.017$).

Tabela 5 – Valores obtidos pela correlação de Pearson entre as variáveis de açúcares solúveis e amido obtidas em CO₂ ambiente e alto CO₂ para cana-de-açúcar. *n*= 16. Valores de p entre parênteses. Valores em negrito representam correlação significativa (*p*≤0.05). Siglas descritas no Anexo 1.

		Glc_F	Fru_F	Sac_F	Glc_C	Fru_C	Sac_C	Ami_F
Fru_F	CO ₂ ambiente	0.987 (<0.0001)						
	alto CO ₂	0.92 (<0.0001)						
Sac_F	CO ₂ ambiente	0.301 (0.258)	0.372 (0.156)					
	alto CO ₂	0.227 (0.397)	0.217 (0.420)					
Glc_C	CO ₂ ambiente	0.604 (0.013)	0.647 (0.007)	0.484 (0.057)				
	alto CO ₂	0.433 (0.094)	0.599 (0.014)	0.109 (0.688)				
Fru_C	CO ₂ ambiente	0.659 (0.005)	0.693 (0.003)	0.562 (0.023)	0.962 (<0.0001)			
	alto CO ₂	0.461 (0.072)	0.623 (0.01)	0.093 (0.732)	0.994 (<0.0001)			
Sac_C	CO ₂ ambiente	0.517 (0.04)	0.572 (0.021)	0.43 (0.097)	0.223 (0.406)	0.234 (0.383)		
	alto CO ₂	-0.064 (0.812)	0.056 (0.837)	0.142 (0.600)	-0.183 (0.499)	-0.192 (0.475)		
Ami_F	CO ₂ ambiente	0.091 (0.738)	0.15 (0.581)	0.804 (<0.0001)	0.391 (0.135)	0.483 (0.058)	0.139 (0.609)	
	alto CO ₂	-0.118 (0.663)	-0.038 (0.89)	0.723 (0.002)	-0.032 (0.907)	-0.063 (0.818)	0.2 (0.459)	
Ami_C	CO ₂ ambiente	-0.259 (0.332)	-0.207 (0.442)	0.258 (0.335)	0.186 (0.49)	0.208 (0.44)	-0.089 (0.743)	0.485 (0.057)
	alto CO ₂	-0.351 (0.182)	-0.406 (0.118)	-0.249 (0.353)	-0.526 (0.037)	-0.588 (0.017)	0.286 (0.283)	0.035 (0.898)

Conteúdo de ácido málico

A quantidade de ácido málico nas folhas de cana de açúcar apresentou diferença significativa entre os tratamentos somente aos 45 dias de tratamento, onde as folhas das plantas crescidas em CO₂ ambiente apresentaram maiores teores deste composto ($p=0.0395$) (Figura 2). Ao longo do tempo observa-se uma redução no conteúdo de ácido málico nas folhas, onde valores próximos a 5 $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ são encontrados após 75 dias de experimento.

Figura 13 – Conteúdo de ácido málico (μg) por miligrama de massa seca (mgMS^{-1}) nas folhas das plantas de cana de açúcar após 30, 45, 60 e 75 dias de plantio e cultivo em concentrações de CO₂ ambiente ($\square$) e alto CO₂ ($\blacksquare$). Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas indicadas por asteriscos.

Carbono e nitrogênio

As porcentagens de carbono e nitrogênio não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos nas coletas analisadas, tanto em folha ($p=0.9072$ e $p=0.7816$) quanto em colmo ($p=0.5030$ e $p=0.0753$) (Figuras 14A, B, C e D). Em ambos os órgãos o carbono não variou entre as coletas ($p=0.8803$ e $p=0.2855$). Em contrapartida, o conteúdo relativo de nitrogênio apresentou variação ao longo das coletas, sendo que

na folha, observou-se uma redução de aproximadamente 16% nitrogênio a partir dos 60 dias e, no colmo, verificou-se um menor teor (*ca.* -39%) deste elemento aos 75 dias nos internós intermediários e maduros em ambos os tratamentos. Na interação entre tratamento e coleta foi possível observar que aos 75 dias, o internó intermediário do alto CO₂ possui 43,2% menos nitrogênio do que o CO₂ ambiente ($p=0.0014$) (Figura 14B).

A relação C/N é diferente entre os tratamentos somente no colmo ($p=0.0171$) (Figura 14F). Esta relação é maior em alto CO₂ aos 30 e 75 dias no colmo intermediário. Comparando as diferentes coletas, observa-se que o C/N é maior aos 75 dias nos colmos intermediário e maduro ($p<0.0001$). Na folha, é possível notar um aumento da relação C/N aos 60 e 75 dias em ambos os tratamentos (Figura 14E).

Figura 14 – Porcentagem de carbono (%C) (**A** e **B**), de nitrogênio (%N) (**C** e **D**) e relação carbono e nitrogênio (C/N) (**E** e **F**) de folhas (**A**, **C** e **E**) e colmo (**B**, **D** e **F**) das plantas de cana-de-açúcar após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo em concentrações de CO_2 ambiente (□) e alto CO_2 (■). Barras representam média aritmética $\pm$ erro padrão. $n=4$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p\leq0.05$.

Na Tabela 6, são mostradas as correlações entre fotossíntese e as outras variáveis (parâmetros de fluorescência, crescimento e conteúdo de açúcares) obtidas durante o experimento para ambos os tratamentos. Observa-se que em ambos os tratamentos a fotossíntese é correlacionada positivamente com ϕCO_2 , R_d e JPSII. Não há correlação entre Glc_F, Sac_F, Glc_C, Fru_C, Ami_F e Ami_C e fotossíntese tanto em alto CO_2 quanto em CO_2 ambiente.

Embora na maioria das variáveis as correlações permaneceram semelhantes (significativas ou não) para ambos os tratamentos, é possível observar que há algumas diferenças. Sob CO_2 ambiente, a fotossíntese se correlaciona positivamente e significativamente com h , Chla, Chl total, V_{pmax} , V_{pr} , c_i , I_s , F_v'/F_m' , NPQ, Fo, Fru_F, Sac_C, %F e C/N_F, enquanto no alto CO_2 não apresenta correlação significativa com nenhuma destas variáveis.

Tabela 6 – Valores obtidos pela correlação de Pearson e seus respectivos valores de p entre assimilação de CO₂ e as variáveis obtidas em CO₂ ambiente e alto CO₂ para cana-de-açúcar. *n*= 16. Valores em negrito representam correlação significativa (*p*≤0.05). Siglas descritas no Anexo 1.

	h	BSF	BSC	Chla	Chlb	Chl total	φCO₂	Rd	V_{pmáx}	V_{pr}	g_s	Ci	I_s
CO₂ ambiente	-0.659	-0.44	-0.326	0.666	0.316	0.55	0.695	0.54	0.855	0.795	0.846	0.615	-0.616
p	0.005	0.088	0.218	0.005	0.234	0.027	0.003	0.031	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.011	0.011
alto CO₂	-0.42	-0.369	-0.393	0.453	0.477	0.447	0.847	0.604	0.366	0.496	0.548	0.143	-0.143
p	0.106	0.16	0.133	0.078	0.062	0.082	<0.0001	0.013	0.163	0.051	0.028	0.596	0.597

	J_{PSII}	Fq'/Fm'	Fv'/Fm'	Fq'/Fv'	NPQ	Fo	Fm	Fv/Fm	Glc_F	Fru_F	Sac_F	Glc_C	Fru_C
CO₂ ambiente	0.583	0.764	0.867	0.551	-0.679	-0.566	-0.246	0.338	-0.486	-0.523	-0.247	-0.339	-0.315
p	0.018	0.001	<0.0001	0.027	0.004	0.022	0.357	0.2	0.056	0.037	0.357	0.199	0.234
alto CO₂	0.503	0.591	0.494	0.551	-0.341	-0.402	-0.159	0.413	-0.386	-0.338	0.263	0.007	-0.069
p	0.047	0.016	0.052	0.027	0.196	0.123	0.557	0.111	0.139	0.201	0.326	0.978	0.799

	Sac_C	Ami_F	Ami_C	Malato	%N_F	%C_F	C/N_F	%N_C	%C_C	C/N_C
CO₂ ambiente	-0.704	-0.18	-0.17	0.455	0.618	-0.237	-0.651	-0.074	0.335	0.039
p	0.002	0.505	0.528	0.077	0.011	0.376	0.006	0.785	0.204	0.887
alto CO₂	0.195	0.348	0.468	0.414	0.042	-0.003	-0.072	0.114	-0.243	-0.306
p	0.47	0.187	0.068	0.111	0.877	0.99	0.792	0.675	0.364	0.248

DISCUSSÃO

O aumento na altura e no acúmulo de biomassa observados em folhas e colmo das plantas cultivadas em alta concentração de CO₂ (Figuras 2 e 3) foram decorrentes provavelmente da maior taxa de assimilação verificada nestas plantas (Tabela 1). A maior taxa de fotossíntese observada nas plantas sob alto CO₂ foi devido à redução desta taxa nas plantas controle após 45 dias e não pelo incremento na taxa fotossintética das plantas do alto CO₂ em relação às plantas do CO₂ ambiente (Tabela 1). Esse resultado associado ao que foi observado em campo (Figura 11A) sugere que as diferenças encontradas nas taxas fotossintéticas entre os tratamentos podem estar relacionadas com melhora das relações hídricas proporcionada pelo cultivo em alto CO₂. Como sugerido por diversos autores, o cultivo em vaso pode ser responsável pela limitação do crescimento radicular e consequentemente prejudicar a absorção de água pela planta. Uma vez que as plantas em alto CO₂ apresentam menor condutância e maior eficiência no uso da água, a limitação radicular exerceria menor influência nas plantas deste tratamento (Ainsworth & Long 2005; Cousins *et al.* 2003; Leakey *et al.* 2006; Leakey 2009).

Contudo, é possível que para cana-de-açúcar em alto CO₂ também haja um estímulo na taxa de fotossíntese nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta e que isso contribua para o crescimento e acúmulo de biomassa nessa planta. O experimento de Vu *et al.* (2006) demonstrou que a taxa de assimilação de CO₂ na cana-de-açúcar crescida a 720ppm de CO₂ foi 5-9% maior do que as plantas controle, mesmo com o conteúdo de água no solo igual entre os tratamentos e em recipientes de metal que acomodavam melhor as raízes do que vasos.

A maior taxa de fotossíntese nas plantas em elevado CO₂ parece não estar relacionada com o aumento da eficiência de carboxilação pela enzima PEPC nem com a regeneração do substrato para a reação de carboxilação, uma vez que não foram observadas diferenças em $V_{pmáx}$ e V_{pr} entre tratamentos (Tabela 2). Além disso, as correlações entre fotossíntese e estas duas variáveis não foram significativas para o tratamento em alto CO₂ (Tabela 6), assim como o observado em campo. O conteúdo de malato também não apresenta uma correlação significativa com a taxa de fotossíntese (Tabela 6). No entanto, aos 45 dias observa-se uma redução significativa do conteúdo de

malato nas plantas em elevado CO₂ (Figura 13), que pode indicar uma regulação momentânea da fotossíntese por meio da enzima malato desidrogenase. Foi observado por Vu *et al.* (2006) uma maior atividade desta enzima (ca. 174%) em folhas de cana-de-açúcar após 14 dias de cultivo em elevado CO₂, que após este período voltou a apresentar atividade similar aos das plantas crescidas em CO₂ ambiente.

Ainda que não haja aumento na taxa de carboxilação do CO₂ nas plantas cultivadas em alto CO₂ é possível observar que estas plantas apresentam maior concentração interna de CO₂ (Ci) (Tabela 2). Em plantas crescidas em alta concentração de CO₂, o Ci aumenta mesmo quando não há resposta a este tratamento (Leakey *et al.* 2006). Em CO₂ ambiente o Ci se correlaciona positivamente com a taxa fotossintética, enquanto em alto CO₂ esta correlação desaparece (Tabela 6). Este desacoplamento observado para o tratamento de alto CO₂ pode ser resultante do aumento do Ci sem a modificação na eficiência da carboxilação do CO₂.

A relação entre Ci/Ca não foi diferente entre os tratamentos (Tabela 2). Para plantas de milho cultivadas em concentração ambiente e elevada de CO₂ também não foram observadas diferenças em Ci/Ca, mesmo quando existiam diferenças em assimilação (Leakey *et al.* 2004).

A condutância estomática foi menor nas plantas cultivadas em alto CO₂ durante todo o experimento (Tabela 2). A redução na condutância estomática é a resposta mais comum para plantas C₄ sob alto CO₂ e ocorre tanto em plantas submetidas a déficit hídrico quanto em plantas com rega constante (Leakey 2009). Mesmo com a redução na condutância estomática observada para as plantas do alto CO₂, a limitação ocasionada pela abertura estomática foi menor para estas, mostrando que neste caso, os estômatos não representam grande limitação para a entrada de CO₂ nas células. Resultados similares foram encontrados por Bernacchi *et al.* (2005), onde plantas de soja cultivadas sob concentrações elevadas de CO₂ apresentaram redução na limitação estomática ao longo da estação de crescimento. Ainda que em alto CO₂ a limitação estomática não esteja interferindo na entrada de CO₂ para ambos os tratamentos, observa-se que em CO₂ ambiente esta limitação está correlacionada positivamente com a taxa de fotossíntese (Tabela 6), podendo neste tratamento influenciar na assimilação de CO₂ e ser responsável pela correlação positiva entre assimilação de V_{pmax} e V_{pr}. A condutância estomática no tratamento ambiente é menor do que a observada em campo (Tabelas 1

e 3), podendo este ser mais um indício de resposta ao possível déficit hídrico e o responsável pela limitação estomática.

Ao contrário dos resultados obtidos nas curvas de CO_2 , os obtidos nas curvas de luz e parâmetros de fluorescência apresentam diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo que esses parâmetros exercem maior influência na regulação da fotossíntese em cana-de-açúcar.

As diferenças nos parâmetros de fluorescência indicam que o aumento na fotossíntese está relacionado com mudanças na capacidade de captação de luz (Figuras 5 a 10). A hipótese de que este seria o mecanismo de manutenção da taxa fotossintética da cana em alto CO_2 foi proposta em experimento anterior (de Souza *et al.* 2008), onde três genes relacionados com o sistema de captação de luz foram super expressos nessas mesmas condições. McCormick e colaboradores (2006) também observaram um aumento de 37% na taxa de transporte de elétrons em plantas de cana de açúcar que tiveram sua capacidade de dreno aumentada por meio do sombreamento das folhas. Valores próximos a este foram obtidos neste experimento, onde após 45 e 60 dias, foi observado aumento de 32,19 e 40,97%, respectivamente, na taxa de transporte de elétrons para as plantas cultivadas em alto CO_2 (Figura 5). Nesse mesmo período o acúmulo de biomassa nas plantas do alto CO_2 também foi maior (Figura 3), mostrando a relação do aumento do dreno com o aumento da taxa de transporte de elétrons.

Os elétrons transportados podem ser utilizados em diversos tipos de reações metabólicas na planta (Lambers *et al.* 2008). Neste experimento há evidências que em ambos os tratamentos os elétrons transportados estão sendo utilizados para a fixação de carbono, uma vez que a relação entre A e J_{PSII} é linear (Figura 9). No entanto, a análise da relação entre quantidade de elétrons transportados e moléculas de CO_2 fixadas (Figura 10), sugere que as plantas crescidas em alto CO_2 utilizam menos elétrons para drenos alternativos do que as plantas sob concentração de CO_2 ambiente. Esse resultado pode indicar que as plantas crescidas em CO_2 ambiente estão sob algum estresse (possivelmente hídrico, como discutido anteriormente) e, por este motivo, estão utilizando mais elétrons por molécula de CO_2 fixada.

Embora haja estudos demonstrando que a maior disponibilidade de carbono possa promover a produção de moléculas de clorofila (Qaderi *et al.* 2006), o cultivo em alto CO_2 não alterou o conteúdo de clorofilas na cana-de-açúcar (Tabela 3). Vu *et al.*

(2006) observou alterações no teor de clorofila total na cana após 14 dias de exposição ao alto CO₂, mas essas mudanças não coincidiram temporalmente com as diferenças encontradas em fotossíntese.

O aumento na concentração de Chl *a* indica maior investimento na formação do fotossistema II (Lambers *et al.* 2008). Com as plantas de cana de açúcar crescidas em altas concentrações de CO₂ esse investimento pode ter ocorrido uma vez que a razão Chl *a*/Chl *b* é maior nessas plantas. O investimento em formação do fotossistema II também auxiliaria na manutenção da maior eficiência máxima do fotossistema II na luz (F_v'/F_m') observada para as plantas do alto CO₂ (Figura 6B). Este aumento no investimento pode também explicar o motivo pelo qual em alto CO₂ as correlações entre Chl *a* e F_v'/F_m' com fotossíntese foram perdida (Tabela 6).

A maior taxa de transporte de elétrons e maior eficiência do fotossistema II mantêm elevadas as taxas de assimilação na cana cultivada em alto CO₂. No entanto, isso só é possível porque a demanda por fotoassimilados nessas plantas é maior, uma vez que o principal controle da taxa de fotossíntese é a síntese e utilização dos produtos finais – amido e sacarose (Sonnewald 2001).

Nas folhas, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos açúcares glicose (Glc), frutose (Fru) e sacarose (Sac) (Figuras 11A, B e C), bem como as relações entre eles não foram alteradas pelo tratamento em alto CO₂ (Tabela 5). Há um aumento no conteúdo de Glc e Fru após 75 dias em ambos os tratamentos, que coincide com o período de redução na taxa de assimilação pelas plantas (Tabela 1). Ainda que não significativa, tanto Glc quanto Fru na folha possuem uma correlação negativa com as taxas de fotossíntese (Tabela 6). A correlação negativa entre o acúmulo de hexoses nas folhas e as taxas de assimilação de CO₂ também foi demonstrada por McCormick *et al.* (2006, 2008a) em cana-de-açúcar, sugerindo que Glc e Fru tem um papel na regulação da fotossíntese na cana-de-açúcar. A relação entre Glc e Fru na regulação da taxa fotossintética pode estar envolvida com a atividade de hexoquinases, que possuem um papel importante na regulação na fotossíntese, como já descrito para diversas plantas C₃ (Rolland & Sheen 2005). A taxa fotossintética e exportação de fotoassimilados parecem ser regulados positivamente com baixas concentrações de açúcares (Rolland *et al.* 2006) enquanto há, ao mesmo tempo, uma regulação coordenada do dreno quando a fonte de carbono é abundante (Roitsch 1999).

Embora não tenha sido detectada uma diferença entre os tratamentos nesses açúcares que acompanhasse a alteração na taxa de fotossíntese, é interessante notar que há uma tendência de redução no conteúdo de Glc, Fru e Sac nas plantas do alto CO₂ (Figuras 11A e B). Essa redução pode significar que estes açúcares estão sendo convertidos e transportados com maior velocidade do que nas plantas do CO₂ ambiente, auxiliando na manutenção da taxa fotossintética em alto CO₂ (McCormick *et al.* 2009). Outra evidência de que os açúcares produzidos nas folhas das plantas crescidas em alto CO₂ estão sendo transportados e utilizados com maior eficiência é a baixa concentração de amido observada nas folhas e no colmo aos 75 dias nestas plantas quando comparadas ao CO₂ ambiente (Figura 11D e 12D). Nas folhas, o baixo conteúdo de amido está possivelmente relacionado com o aumento na síntese de sacarose para exportação, que utiliza a triose-P, não permitindo seu acúmulo no cloroplasto. Consequentemente, não há a ativação da enzima ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) e não há favorecimento da síntese de amido (Sonnewald 2001). Neste experimento, a rafinose não foi detectada em nenhum dos tratamentos devido a problemas com o equipamento. No entanto, devido ao seu provável envolvimento no transporte de açúcares (Capítulo 1), é possível supor que em alto CO₂ a rafinose esteja em maior concentração do que em CO₂ ambiente.

O colmo, como principal dreno de açúcares da cana (Grenn & Vaidyanaytha 1986), também pode desempenhar um papel importante no processo de regulação da fotossíntese. Experimentos realizados com cana-de-açúcar, utilizando a manipulação do dreno a partir do sombreamento parcial ou do resfriamento da folha, mostraram que há uma correlação positiva entre aumento de Glc e Fru em internós imaturos e aumento na taxa de fotossíntese (McCormick *et al.* 2006, 2008). Considerando os dados obtidos ao longo de todo o experimento, verifica-se que não há correlação significativa entre Glc e Fru no colmo com a taxa de fotossíntese (Tabela 6). No entanto, analisando as coletas separadamente, é possível observar que os colmos das plantas crescidas em alto CO₂ apresentaram maior conteúdo de Glc e Fru a partir dos 45 dias enquanto que nas plantas do CO₂ ambiente, esse aumento foi observado somente aos 75 dias no internó intermediário (Figuras 12A e B). Estes resultados sugerem que o colmo das plantas em alto CO₂ se torna um dreno mais forte antes do colmo das plantas em CO₂ ambiente, podendo ser este outro motivo pelo qual a fotossíntese em alto CO₂ se mantém elevada.

No mesmo período que é observado o aumento de Glc e Fru no colmo das plantas cultivadas em altas concentrações de CO₂, é observado a redução do conteúdo de Sac nesse mesmo órgão (Figura 12C). McCormick *et al.* (2006) encontraram uma relação linear entre a taxa de assimilação máxima na folha e o decréscimo das concentrações de sacarose no colmo imaturo, corroborando evidências de que menores teores de sacarose no dreno é um provável sinal fisiológico para aumento das taxas de fotossíntese na fonte (van Bel 2003).

Além do metabolismo de carbono, faz parte da regulação fotossintética e do crescimento o metabolismo de nitrogênio. A exposição prolongada ao elevado CO₂, na maioria das vezes, leva a um decréscimo do conteúdo de nitrogênio nos diferentes tecidos da planta (Stitt & Krapp 1999). Em cana-de-açúcar esta redução foi observada somente no colmo intermediário das plantas em alto CO₂ aos 75 dias de experimento (Figura 14D). A redução no conteúdo de nitrogênio ao mesmo tempo em que não houve alteração do conteúdo de carbono no tratamento do elevado CO₂ acarretou no aumento da relação C/N (Figura 14F) e na perda de correlação desta relação com a fotossíntese (Tabela 6).

A redução do conteúdo de nitrogênio no colmo pode estar associada à diluição deste elemento no tecido devido ao maior crescimento observado em alto CO₂ (Baxter *et al.* 1997), ou ainda à redução da assimilação de nitrogênio pelas raízes (Stitt & Krapp 1999), indicando em ambos os casos, um aumento da eficiência do uso do nitrogênio neste órgão.

Desta forma, os resultados obtidos neste experimento sugerem que o alto CO₂ beneficia a planta em condições de redução na disponibilidade de água devido ao fechamento estomático e consequente aumento na eficiência do uso da água. A manutenção da taxa fotossintética é dada por intermédio da regulação do transporte de elétrons e não pela mudança na eficiência de carboxilação. Além disso, a fotossíntese é mantida em alto CO₂ devido ao crescimento, que se mantém nestas plantas, favorecendo o transporte de açúcares da folha para o colmo e mantendo as concentrações de glicose e frutose foliar e a concentração de sacarose no colmo em níveis baixos. Os baixos níveis de glicose e frutose na folha e de sacarose no colmo podem ser os responsáveis pela sinalização e auxílio na manutenção da taxa de fotossíntese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth EA & Long SP (2005). What have we learned from 15 years of free air-CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165: 351-372.
- Amaral LIV, Gaspar M, Costa PMF, Aidar MPM & Buckeridge MS (2007). Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34 (4): 425-431.
- Baker NR & Oxborough K (2004). Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. *In: Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Papageorgiou G, Govindjee (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 66–82.
- Baxter R, Ashenden TW & Farrar J (1997). Effect of elevated carbon dioxide and nutrient status on growth, dry matter partitioning and nutrient content of *Poa alpina* var. *vivpara* L. *Journal of Experimental Botany* 48: 1477–1486.
- Bernacchi CJ, Morgan PB, Ort DR & Long SP (2005). The growth of soybean under free air [CO₂] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing in vivo Rubisco capacity. *Planta*: 434-446.
- CONAB (Conselho Nacional de Abastecimento) (2011). Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-Açúcar (Safra 2010/2011). 3º Levantamento.
- Cousins AB, Adam NR, Wall GW, Kimball BA, Pinter Jr PJ, Ottman MJ, Leavitt SW & Weber AN (2003). Development of C₄ photosynthesis in sorghum leaves grown under free-air CO₂ enrichment (FACE). *Journal of Experimental Botany* 54: 1969–1975.
- de Souza AP (2007). A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Saccharum* ssp. Tese de Mestrado: Universidade Estadual de Campinas, SP - Instituto de Biologia.
- de Souza AP, Gaspar M, da Silva E A, Ulian E C, Wacławovsky A J, Nishiyama-Jr MY, dos Santos RV, Teixeira MM, Souza G & Buckeridge MS (2008). Elevated CO₂ increases

- photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* 31:1116–1127.
- Easterling W, Aggarwal P, Batima P, Brander K, Erda L, Howden M, Kirilenko A, Morton J, Soussana J-F, Schmidhuber S, & Tubiello F (2007). Food, fibre and forest products. *In: Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ & Hanson CE. (eds). Cambridge University Press, pp. 273-313.
- FAOSTAT (United Nations Food and Agricultural Organization) (2008). Disponível em: [http:// faostat.fao.org/default.aspx](http://faostat.fao.org/default.aspx)
- Genty B, Briantais JM & Baker NR (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 82-87.
- Green CF & Vaidyanathan LV (1986). A reappraisal of biomass accumulation by temperate cereal crops. *Speculation in Science and Technology* 9: 193-202.
- Inmar-Bamber NG, Bonnett GD, Smith DM & Thorburn PJ (2005). Sugarcane physiology: integrating from cell to crop to advance sugarcane production. *Field Crops Research* 92: 115-117.
- IPCC (2007). Climate change 2007: the physical science basis. *In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds). Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge, UK/New York, NY: Cambridge University Press.
- Lambers H, Stuart Chapin III F & Pons T (2008). *Plant Physiological Ecology*. 2.ed. Springer. 604p.
- Leakey ADB (2009). Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C₄ crops for food and fuel. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 276: 2333-2343.
- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP & Ort DR (2009). Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany*: on line published. doi: 10.1093/jxb/erp096.

- Leakey ADB, Bernacchi CJ, Dohleman FG, Ort DR & Long SP (2004). Will photosynthesis of maize (*Zea mays*) in the US Corn Belt increase in future [CO₂] rich atmospheres? An analyses of diurnal courses of CO₂ uptake under free-air concentration enrichment (FACE). *Global Change Biology* 10: 951- 962.
- Leakey ADB, Uribeharrea M, Ainsworth EA, Naidu SL, Rogers A, Ort DR & Long SP (2006). Photosynthesis, productivity and yield of maize are not affected by open –air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought. *Plant Physiology* 140: 779 – 790.
- Leakey ADB, Xu F, Gillespie KM, McGrath JM, Ainsworth EA & Ort DR (2009). Genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. *PNAS* 106 (9): 3597-3602.
- Lichtenthaler HK & Wellburn AR (1983). Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591 – 592.
- Long SP & Bernacchi CJ (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations of photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 54(392): 2393-2401
- Long SP & Hällgren JE (1993). Measurements of CO₂ assimilation by plants in the field and laboratory. In: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (eds.). *Photosynthesis and productivity in a changing environment: a field and laboratory manual*. Chapman and Hall, London, pp. 129-167.
- McCormick AJ, Cramer MD & Watt DA (2008). Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 1817-1829.
- McCormick AJ, Cramer MD & Watt DA (2006). Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. *New Phytologist* 171: 759- 770.
- McCormick AJ, Watt DA & Cramer MD (2009). Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* 60 (2): 357-364.
- Moore PH (2010). Introdução. In: *Tópicos em Ecofisiologia da cana-de-açúcar*. Crusciol CAC, Silva MA, Rossetto R & Soratto RP (eds.) Fundação de Estudos e Pesquisa Agrícolas e Florestais, Botucatu, pp. 5-7.

- NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration. 2010. Disponível em: <www.cmd.noaa.gov/projects/src/web/trends/co2_mm_meo.dat>. Acesso em: dez 2010.
- Pammenter NW & Allison JCS (2002). Effects of treatments potentially influencing the supply of assimilate on its partitioning in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* 53: 123–129.
- Poorter H & Pérez-Soba M (2002). Plant growth at elevated CO₂. In: *Encyclopedia of global environmental change*, John Wiley & Sons, Chichester, pp.489-496.
- Porra RJ, Thompson WA & Kriedmann PE (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and chlorophyll b extracted with 4 different solvents - verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochimical and Biophysical Acta* 975: 384–394.
- Qaderi MM, Kurepin LV & Reid DM (2006). Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to three components of global climate change: temperature, carbon dioxide and drought. *Physiologia Plantarum* 128: 710-721
- Roitsch T (1999). Source-sink regulation by sugars and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198–206
- Rolland F & Sheen S (2005). Sugar sensing and signalling network in plants. *Biochemical Society Transactions* 33: 269 – 271.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E & Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:675–709.
- Sonneveld U (2001). Sugar sensing and regulation of photosynthetic carbon metabolism. Eva-Mari Aro & Bertil Andersson (eds). *Regulation of Photosynthesis*, pp. 109–120. Kluwer Academic Publishers.
- Stitt M & Krapp A (1999). The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell & Environment* 22: 583-621.
- Uedan K & Sugiyama T (1976). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiology* 57: 906–910.
- van Bel AJE (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* 26: 125-149.

- von Caemmerer S (2000). Biochemical models of leaf photosynthesis. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing.
- Vu JCV, Allen LH & Gesch RW (2006). Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO₂. Plant Science 171: 123-131.
- Zar JH (1999). Biostatistical Analysis. 4.ed. Prentice Hall, New Jersey, 929p.
- Ziska LH & Bunce JA (1997). Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C₄ crops and weeds. Photosynthesis Research 54: 199-208.

CAPÍTULO 3

Proteínas diferencialmente expressas em folhas de cana- de-açúcar cultivada em elevado CO₂

Colaboradores:

Dr. Carlos Alberto Labate

Dra. Fernanda Salvato

MsC. Felipe Boaretto

*Laboratório Max Feffer, Escola de Agricultura Luiz de Queiróz, ESALq/USP,
Piracicaba*

INTRODUÇÃO

O aumento populacional, o desmatamento, a industrialização e a queima de combustíveis fósseis têm contribuído para alterações na composição da atmosfera decorrentes principalmente do aumento da concentração de CO₂ (IPCC 2007). De acordo com dados do *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) do ano 2000 a 2010, a concentração de CO₂ aumentou em 22,19ppm, atingindo a concentração média de 394ppm (Tans & Keeling 2011). Estudos mostram que o aumento do CO₂ na atmosfera irá impactar de forma significativa na população e na biodiversidade devido ao aumento da temperatura global e mudança no padrão de precipitação (IPCC 2007). A perspectiva destas alterações está impulsionando uma série de pesquisas no campo da bioenergia, a fim de obter tecnologias que auxiliem na mitigação das mudanças no clima.

A cana-de-açúcar é considerada uma cultura de grande sucesso no Brasil (Goldemberg 2007) e é utilizada como fonte de bioenergia através da produção de etanol de primeira geração, tendo grande potencial para ser utilizada na produção do etanol de segunda geração, ou o chamado etanol celulósico (Buckeridge *et al.* 2010; Soccol *et al.* 2010). Dada esta importância somada ao fato de que as alterações no clima irão influenciar em decisões futuras referentes à agricultura (Easterling *et al.* 2007), torna-se importante o conhecimento a respeito das respostas dessa cultura às modificações climáticas.

Experimentos com cana-de-açúcar cultivadas em elevado CO₂ têm demonstrado aumento no conteúdo de sacarose após um ano de cultivo (de Souza *et al.* 2008), além do aumento em fotossíntese e biomassa (de Souza *et al.* 2008; Capítulo 2). A maior taxa de fotossíntese observada nestes experimentos é explicada pela maior taxa de transporte de elétrons (*ca.* 36,5% maior) e pela maior expressão de genes relacionados a este processo que se mantém provavelmente devido à manutenção do crescimento em alto CO₂, que é um dreno importante e também um regulador da taxa de assimilação. No Capítulo 2, é demonstrado que a diferença em fotossíntese e taxa de transporte de elétrons entre os tratamentos inicia-se aos 45 dias de cultivo em alto CO₂, sendo este período adequado para o estudo da regulação desta resposta.

O entendimento de como todo o processo é regulado (*i.e.* do gene até o processo fisiológico) pode trazer informações importantes que auxiliem na compreensão dos mecanismos de respostas da cana-de-açúcar ao cultivo em elevado CO₂ e também indicar caminhos para o melhoramento genético e na produção de novas variedades. A maioria dos experimentos em alto CO₂ tem investigado somente os parâmetros fisiológicos e/ou de transcrição gênica, sem se preocupar com os mecanismos regulatórios que podem acontecer entre estes dois fenômenos.

Neste sentido, a técnica de proteômica que é baseada no conceito de que o proteoma corresponde ao conjunto completo de proteínas produzidas por uma célula ou organismo em uma dada condição (Wilkins *et al.* 1995), é uma opção para o estudo destas possíveis regulações. Assim como as outras técnicas de “omics”, a proteômica tem como objetivo fornecer informações complementares aos mecanismos de regulação, quantidade, atividade e interação de cada proteína no interior da célula (Plomion *et al.* 2006). Por serem representações do fenótipo, podem fornecer um maior número de informações do que os genes isoladamente (Graves & Haystead 2002). Além disso, podem indicar modificações pós-transcricionais (Cánovas *et al.* 2004). Dentre as tecnologias existentes, a mais difundida e utilizada é de géis bidimensionais associada à espectrometria de massas (Jorrín-Novo *et al.* 2009). Em plantas, a difusão da técnica de proteômica vem crescendo nos últimos anos, mas a maioria dos estudos ainda se concentra em organelas, órgãos e tecidos de *Arabidopsis* e de arroz, modelos para eudicotiledôneas e monocotiledôneas, respectivamente (Rossignol *et al.* 2006; Jorrín-Novo *et al.* 2009).

Na literatura foram encontrados somente três estudos que descreveram a utilização da técnica de proteômica em plantas crescidas em elevado CO₂, sendo um deles com *Arabidopsis* (Bae & Sincher 2004) e os outros dois com arroz (Bokhari *et al.* 2007; Fukayama *et al.* 2009), denotando a escassez de estudos de perfil protéico nestas condições.

Neste capítulo é descrita a investigação realizada das proteínas diferenciais em folhas de cana-de-açúcar cultivadas por 45 dias em CO₂ ambiente e elevado CO₂, com o objetivo de auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas celulares a estas condições de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal e escolha das amostras a serem analisadas

As folhas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 foram obtidas a partir do experimento descrito no Capítulo 2. Durante as coletas destrutivas, que ocorreram aos 30, 45, 60 e 75 dias nos tratamentos de CO₂ ambiente e alto CO₂, parte das folhas coletadas em nitrogênio líquido foi armazenada a -80°C até o início das análises de proteínas.

A partir dos dados de fotossíntese, crescimento e conteúdo de açúcares, escolheu-se a coleta dos 45 dias para realizar as análises de proteínas diferenciais. Este ponto de coleta foi escolhido por ser o primeiro ponto em que os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre eles.

Extração, solubilização e quantificação das proteínas

A extração de proteínas foi realizada seguindo a metodologia proposta por Hurkman & Tanaka (1986), com modificações sugeridas por Saravanan & Rose (2004).

Dois gramas de folha maceradas e armazenadas a -80°C foram homogeneizados em 15 mL de tampão de extração (0,5 M de Tris HCl pH 7,5; 0,7 M de sacarose; 0,1M de KCl; 50 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1 mM de fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF); 2% de β-mercaptoetanol; polivinilpirrolidona (PVPP)). Esta mistura foi mantida sob agitação por 30 min a 4°C. Em seguida, 15 mL de fenol saturado em Tris HCl pH 8,5 foram adicionados aos tubos contendo as amostras. Novamente a mistura foi mantida sob agitação por 30 min a 4°C. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo PVPP. Este procedimento foi realizado por mais uma vez, a fim de aumentar o rendimento da extração.

As proteínas foram precipitadas com a adição de 5 volumes de 0,1M de acetato de amônio em metanol e mantidas por 12h a -20°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições citadas acima e o precipitado resultante, contendo as proteínas, foi lavado duas vezes com 0,1M de acetato de amônio em

metanol e uma vez com metanol 100%. A cada lavagem, as amostras foram mantidas por 1h a -20°C antes de serem centrifugadas. O precipitado resultante da extração foi seco em dessecador a 4°C. Os precipitados secos foram solubilizados em 1 mL de tampão de solubilização, contendo 7 M de uréia, 2 M de tiuréia, 0,4% de Triton-X 100, 10 mM de dithiothreitol (DTT).

As proteínas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando-se como padrão albumina de soro bovino (BSA).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (mini-gel)

O extrato protéico foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli 1970) para verificar a qualidade das proteínas. Para este gel, foi realizada uma mistura do extrato das três réplicas biológicas. Foram misturados 10 µg de proteína ao tampão de desnaturação (0,5 M de Tris HCl pH 6,8; 40% glicerol; 9,2% SDS; 20% β-mercaptoetanol; 1% azul de bromofenol). As amostras foram incubadas por 1 min a 95°C.

O gel de poliacrilamida foi montado, sendo a parte inferior (gel de corrida) com 10% de poliacrilamida e a parte superior (gel empilhador) com 4%. As amostras foram submetidas a uma corrente de 100V, durante 1h, com tampão Laemmli (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 7,3 mM EDTA e 0,1% de SDS).

Após o término da eletroforese, o gel foi corado com uma solução de 0,15% de Coomassie Brilliant Blue R250, 40% metanol e 10% ácido acético durante 1 h sob agitação constante. O excesso de corante foi retirado com uma solução descolorante (80% metanol e 20% ácido acético) que foi trocada a cada 30 min, durante 2h.

Eletroforese bidimensional

A primeira etapa da eletroforese bidimensional, que consiste na focalização isoeletrica, foi conduzida em sistema Ettan IPGPhor (GE Healthcare) a 20°C utilizando-se fitas de IEF de pH 4-7 (IPG strips, GE Healthcare). Para cada amostra, foram utilizados 500 µg de proteínas. Os volumes de cada amostra foram ajustados para 370 µL com solução de 7 M de uréia, 4% de Triton-X 100, 90 mM DTT, 2 mM de tris 2-

carboxietilfosfina (TCEP), 4% CHAPS, 4 µL de anfólitos e traços de corante bromofenol blue. A cada fita foram adicionados os 370 µL da solução contendo as proteínas e 1 mL de óleo mineral para evitar a evaporação da solução. Para a focalização, foi estabelecido o seguinte programa: reidratação por 12 h, seguidos de 100V por 1h, 500V por 1h, 1000V por 1h, 5000V por 1h e 8000V até atingir 80.000Vh.

Após a focalização, o excesso de óleo mineral foi retirado com água milli-Q e as fitas foram armazenadas a -20°C.

Para a segunda etapa, que consiste na eletroforese vertical, as fitas foram reduzidas e alquiladas em solução de equilíbrio (50 mM de Tris HCl pH 6,8; 6 mM uréia; 30% glicerol; 2% SDS). A redução foi realizada com a imersão da fita em solução de equilíbrio com 1% (p/v) de DTT por 15 min. Em seguida, foi realizada a alquilação por 15 min., utilizando a solução de equilíbrio com adição de 2,5% (p/V) de iodoacetamida (IAA) e traços do corante azul de bromofenol.

As fitas foram colocadas no alto de um gel vertical e seladas com 0,5% de agarose. A eletroforese foi realizada em gel de 12 % de poliacrilamida com 1,5 mm de espessura utilizando-se o sistema SE-630 (GE Healthcare). Os tampões utilizados foram os de Laemmli superior (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS) e inferior (25 mM de Tris e 192 mM de glicina). A migração das proteínas foi efetuada em 16 mA nos primeiros 30 min e em 30 mA no restante do tempo.

Para cada tratamento foram obtidos três géis bidimensionais, provenientes de três extrações protéicas com indivíduos diferentes. Os géis foram mantidos durante 1 h em solução de 40% de etanol e 10% de ácido acético e corados com solução de 0,1% de Coomassie Brilliant Blue G -250, 2% ácido fosfórico e 10% de sulfato de amônio em metanol, sob agitação constante. O excesso de corante foi removido com água Milli-Q e os géis conservados em ácido acético 5% a 4°C.

Análise de imagens

Os géis foram digitalizados com auxílio do programa LabScan versão 5.0 (GE Healthcare) em um digitalizador modelo UTA-1100 e as imagens foram analisadas pelo programa Image Master 2D Platinum 7 software (GE Healthcare). Os *spots* foram inicialmente detectados automaticamente pelo software. Em caso da detecção

automática não ter sido satisfatória, ela foi realizada manualmente. Em seguida, os géis relacionados às triplicatas de cada tratamento foram sobrepostos para a avaliação dos *spots* com variação inferior a 30%. Os *spots* que apresentaram uma variação maior do que 25% foram excluídos da análise.

Para analisar as diferenças entre CO₂ ambiente e elevado CO₂, o volume de cada *spot* selecionado foi comparado entre os tratamentos utilizando a análise de variância (ANOVA), com significância de 1%. Os pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (PI) teóricos foram sugeridos pelo banco de dados SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot/>).

Digestão das proteínas

Cada *spot* selecionado pela análise de imagens foi isolado de cada uma das repetições do gel, fragmentado com auxílio de bisturi e imerso em uma solução de descoloração (50% acetronitrila e 25 mM de bicarbonato de amônio) até completa remoção do corante.

Após desidratação com 100% de acetonitrila, os fragmentos de gel foram reduzidos e alquilados. Os fragmentos foram reidratados com 20 mM de DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados a 55°C por 40 min. O excesso de líquido foi removido e substituído por 55 mM de IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio. As amostras permaneceram 30 min no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, o líquido excedente foi removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio, seguido de nova desidratação com 100% de acetronitrila. Após esta etapa, os fragmentos foram reidratados com solução de 10 ng.µL⁻¹ de tripsina (Promega V5111) em 25 mM de bicarbonato de amônio, pH 8. Após a reidratação total, os géis foram cobertos com 25 mM de bicarbonato de amônio e a digestão foi realizada por 14 h a 37°C.

A ação da tripsina foi bloqueada pela adição de uma solução de 50% de acetonitrila e 5% de ácido fórmico e os peptídeos eluídos dos fragmentos por lavagens sucessivas com solução de metanol 60% e ácido fórmico 1% e solução de acetonitrila 50 % e ácido fórmico 1%, seguidas de lavagem final com 100% de acetronitrila. Em cada uma das etapas de eluição, os fragmentos de gel foram sonicados por 20 min a 45°C. Os

sobrenadantes de cada *spot* foram transferidos para novos tubos e o volume reduzido em concentrador a vácuo em temperatura ambiente.

Sequenciamento dos peptídeos – LC-MS/MS

Os peptídeos foram solubilizados em 1% (v/v) de ácido fórmico e transferidos para tubos específicos para realização da espectrometria de massas. O sequenciamento das proteínas foi conduzido em uma plataforma LC-MS/MS em espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador de massas híbrido quadrupolo/"time of flight" (Q-TOF) Ultima API (Waters), acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar CapLC XE Pump (Waters). A separação dos peptídeos foi realizada utilizando-se uma pré-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 µm 0,32 x 150 mm Waters®). A eluição dos peptídeos ocorreu com a variação do gradiente do eluente A (95% H₂O, 5% acetonitrila e 0,1% ácido fórmico) e do eluente B (95% acetonitrila, 5% H₂O e 0,1% ácido fórmico). A variação de gradiente do eluente B foi de 10% a 15% de 0 a 5 min, de 15% a 35% de 5 a 20 min, de 35% a 45% de 20 a 25min, de 45% a 80% de 25 a 30 min, mantendo-se constante em 80% até aos 40 min e de 10% nos últimos 5 min. O fluxo se manteve em 5 µL.min⁻¹ nos primeiros 15 min, 2 µL.min⁻¹ entre 15 e 40 min e 5 µL.min⁻¹ entre 40 e 45 min.

A ionização por *electrospray* foi realizada com a voltagem da fonte ajustada para 3,0 KV e temperatura do cone igual a 90°C, na presença de 5 psi de nitrogênio. A energia de colisão por gás argônio foi mantida em 15 psi. Todos os parâmetros foram definidos através do programa MassLynx v 2.1 (Waters Corporation). O Q-TOF modelo Ultima API, utilizado nas análises, conta com um sistema *Nanolock Spray* (Waters), que corrige as variações de calibração que ocorrem ao longo do período de aquisição dos espectros de cada amostra. Todas as aquisições foram calibradas com um peptídeo padrão GFP (GLU1-fibrinopeptide B; Sigma), em concentração igual a 100 fmol.µL⁻¹ e injeção automática de 1 µL.min⁻¹.

Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas

Os espectros de massas gerados de cada amostra foram processados com o auxílio dos programas MassLynx NT BioLynx V.4.0 e ProteinLynx V.2.1 da Waters. Após este processamento, os arquivos dos espectros foram contrastados com o banco de dados MSDB (*Mass Spectrometry protein sequence Data Base*), através da utilização da ferramenta MASCOT MS/MS Ion Search (<http://www.matrixscience.com>). Para esta análise foram escolhidos os parâmetros listados na Tabela 1. Os resultados foram avaliados de acordo com os maiores *scores*, área de cobertura e número de peptídeos. Em posse da sequência de proteínas do banco de dados foi realizada uma busca no banco de dados do SUCEST (<http://sucest-fun.org/>), através da ferramenta BLAST, para a verificação de homologia com sequências de cana-de-açúcar.

Tabela 1 – Parâmetros escolhidos para a análise dos espectros no banco de dados MSDB com a ferramenta MASCOT MS/MS Ion Search.

Variáveis	Parâmetros utilizados
Banco de dados	MSDB
Taxonomia	Viridiplantae
Enzima	Tripsina
Número de clivagens perdidas	1
Modificações fixas	Carbamidomethyl (C)
Modificações variáveis	Oxidação (M)
Tolerância de peptídeos	50ppm
Tolerância do fragmento	0.2D
Carga do ion	+2, +3, +4
Valores de massa	monoisotópicas
Formato dos dados	.PKL
Instrumento	ESI-QUAD-TOF

RESULTADOS

Gel de poliacrilamida

Após a eletroforese, verificou-se que a extração de proteínas foi eficiente, uma vez que as amostras não apresentaram sinais de contaminação e degradação (Figura 1).

Figura 1 – Proteínas de folha de cana-de-açúcar separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Padrão = Kaleidoscope prestained standards (BioRad®).

Eletroforese bidimensional

Após a análise entre as réplicas de um mesmo tratamento e a exclusão dos spots com variação maior que 30%, foi constatada a detecção de 180 proteínas no tratamento ambiente e de 169 proteínas no tratamento elevado CO_2 , não sendo observada grande variação no número de proteínas entre os tratamentos. Um gel representativo de cada tratamento pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Perfil de distribuição das proteínas de folha de cana-de-açúcar na faixa de pH 4-7 após 45 dias de cultivo em **(A)** CO₂ ambiente e **(B)** alto CO₂.

Comparando os géis entre tratamentos e considerando a significância do teste de variância foram obtidas 13 proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos (Tabela 2). Além disso, verificou-se 4 proteínas que apareceram exclusivamente em alto CO₂ (Tabela 3) e 3 exclusivas em CO₂ ambiente (Tabela 4).

Das proteínas diferencialmente expressas, foram encontradas proteínas predominantemente relacionadas ao processo fotossintético: 3 *spots* da *malate dehydrogenase* (*spots* 5, 6 e 59), 2 *spots* da *putative peptidylprolyl isomerase* (*spots* 19 e 24) e 3 *spots* de *oxygen evolving enhancer protein 1 precursor* (*spots* 81, 87 e 110) sendo que desses somente 1 da *putative peptidylprolyl isomerase* (*spot* 24) e 1 da *oxygen*

evolving enhancer protein 1 precursor (spot 87) (Figura 3) foi observado em maior quantidade em CO₂ ambiente (Figura 3). Foram identificadas também 1 *putative ribosomal protein S5* (spot 31), 1 *phosphoglycerate mutase* (spot 74), 1 *germin-like protei* (spot 93), 1 *heat shock protein 18* (spot 94) e 1 *putative 26S proteasome regulatory* (Tabela 2). Todas estas em maior quantidade no tratamento do alto CO₂ (Figuras 3).

Como proteínas exclusivas identificadas em alto CO₂ observa-se *ribulose biphosphate carboxylase small chain precursor* (spot 138), *translation initiation factor eIF-5A* (spot 145), *thioredoxin peroxidase* (spot 147) e *glutathione s-transferase* (spot 154) (Tabela 3). Em CO₂ ambiente, foram identificadas como proteínas exclusivas a *proteasome subunit alpha type 2* (spot 172), *fructose-bisphosphate aldolase* (spot 173) e *photosystem II oxygen-evolving complex protein 1 precursor* (spot 176) (Tabela 4).

Tabela 2 – Proteínas de folha de cana-de-açúcar diferencialmente expressas entre CO₂ ambiente e alto CO₂ após 45 dias de experimento.

Spot	Proteína	Espécie	n° acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pl teórico	Cluster SUCEST
5	Malate dehydrogenase	<i>Zea mays</i>	Q2PYY8	1110	K.IVQGLPIDEFSR.K K.IVQGLPIDEFSRK.K K.AQASALEAHAAPNCK.V K.LSSALSAASSACDHIR R.KLSSALSAASSACDHIR R.KLSSALSAASSACDHIR K.EFAPSIPEKNVTCLTR.L K.EFAPSIPEKNISCLTR.L R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G K.NVIIWGNHSSSTQYPDVNHATVK.T R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M + Oxidation (M) R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M + Oxidation (M) R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M + 2 Oxidation (M) R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVKMELVDAAFPLK.G + 3 Oxidation (M) R.DWVLGTPEGTFVSMGVYSDGSYGVPISGLIYSFPVTCSSGEW K.I + Oxidation (M)	35805	5.74	SCRLAM1007E04.g

Tabela 2 – Continuação.

Spot	Proteína	Espécie	n° acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pI teórico	Cluster SUCEST
6	Malate dehydrogenase-like protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2PYY8	1326	R.ALGQISER.L R.LSVQVSDVK.N K.MELVDAAFPLLK.G K.MELVDAAFPLLK.G + Oxidation (M) K.IVQGLPIDEFSR.K K.IVQGLPIDEFSRK.K K.AQASALEAHAAPNCK.V K.LSSALSAASSACDHIR K.LSSALSAASSACDHIR K.VLVVANPANTNALILK.E R.KLSSALSAASSACDHIR K.EFAPSIPEKNVTCLTR.L K.EFAPSIPEKNISCLTR.L R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G + Oxidation (M) R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G + Oxidation (M) K.NVIIWGNHSSTQYPDVNHATVK.T K.VLVVANPANTNALILKEFAPSIPEK.N R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M + Oxidation (M) R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M + Oxidation (M) R.GVMLGADQPVILHMLDIPPAEALNGVK.M + 2 Oxidation (M) R.DWVLGTPEGTFVSMGVYSDGSYGVPSGLIYSFPVTCSSGGEW K.I + Oxidation (M)	35805	5.74	SCCCFL6003H02.g

Tabela 2 – Continuação.

Spot	Proteína	Espécie	n° acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pI teórico	Cluster SUCEST
19	Putative peptidylprolyl isomerase	<i>Oryza sativa</i>	Q75M32	1325	K.GSSFHR.V K.TPWLDGR.H K.VYFDISIGNPVGK.N R.HVVFGQVIEGMDIVK.M R.HVVFGQVIEGMDIVK.M R.HVVFGQVIEGMDIVK.M + Oxidation (M) R.HVVFGQVIEGMDIVK.M + Oxidation (M) K.ITNKVYFDISIGNPVGK.N K.LVHTGPGVVSMANAGPNTNGSQFFICTVK.T K.LVHTGPGVVSMANAGPNTNGSQFFICTVK.T + Oxidation (M)	26745	9.36	SCRLAM1007E04.g
24	Putative peptidylprolyl isomerase	<i>Oryza sativa</i>	Q75M32	1375	K.GSSFHR.V K.TPWLDGR.H R.TFKDENFK.L R.TFKDENFK.L K.VYFDISIGNPVGK.N R.HVVFGQVIEGMDIVK.M R.HVVFGQVIEGMDIVK.M R.HVVFGQVIEGMDIVK.M + Oxidation (M) R.HVVFGQVIEGMDIVK.M + Oxidation (M) K.LVHTGPGVVSMANAGPNTNGSQFFICTVK.T K.LVHTGPGVVSMANAGPNTNGSQFFICTVK.T + Oxidation (M)	26745	9.36	SCRLAM1007E04.g

Tabela 2 – Continuação.

Spot	Proteína	Espécie	n° acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pI teórico	Cluster SUCEST
31	Putative ribosomal protein S5	<i>Oryza sativa</i>	Q84SS7	81	R.VVLEMAGVENALGK.Q + Oxidation (M) R.AIVVVGDMKGVGVGVGK.A + Oxidation (M)	35008	4.97	SCJFHR1C01B11.b
59	Malate dehydrogenase-like protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2PYY8	251	K.MELVDAAFPLK.G K.IVQGLPIDEFSR.K R.KLSSALSAASSACDHIR.D R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G + Oxidation (M)	35008	5.74	SCCCFL6003H02.g
74	Phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.1), 2,3-bisphosphoglycerate-independent	<i>Zea mays</i>	A42807	698	R.DALLSGKFDQVR.V R.YAGMLQYDGELK.L + Oxidation (M) K.ALEYADFDKFDR.V K.ALEYADFDKFDR.V R.YAGMLQYDGELKLPSR.Y + Oxidation (M) R.VNLPNGDMVGHTGDIEATVVACK.A + Oxidation (M) K.AHGTA VGLPSDDDMGNSEVGHNALGAGR.I + Oxidation (M) K.AHGTA VGLPSDDDMGNSEVGHNALGAGR.I + Oxidation (M) K.IILDAVEQVGGIYLV TADHGNAEDMVK.R K.IILDAIEKVGGIYV TADHGNAEDMVK.R K.IILDAVEQVGGIYLV TADHGNAEDMVK.R + Oxidation (M) K.IILDAIEKVGGIYV TADHGNAEDMVK.R + Oxidation (M) K.IILDAVEQVGGIYLV TADHGNAEDMVKR.N + Oxidation (M)	60753	5.29	SCJLAM2092H03.g

Tabela 2 – Continuação.

Spot	Proteína	Espécie	n° acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pI teórico	Cluster SUCEST
81	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Q9LRC4	325	K.TYLEVK.G R.VPFLFTVK.Q R.LTYDEIQSK.T K.RLTYDEIQSK.T K.LCLEPTSFTVK.A K.DGIDYAAVTVQLPGGERVPFLFTVK.Q	35344	6.48	SCCCLR1070D02.g
87	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Q9LRC4	114	K.RLTYDEIQSK.T K.DGIDYAAVTVQLPGGER.V K.DGIDYAAVTVQLPGGERVPFLFTVK.Q	35344	6.48	SCCCLR1070D02.g
93	Germin-like protein	<i>Zea mays</i>	Q6TM44	365	K.VTFLDDAQVK.K K.AAVTPAFVGQFPGVNLGISAAR.L K.AAVTPAFVGQFPGVNLGISAAR.L	22101	6.02	SCVPHR1096E03.g
94	Heat shock protein 18	<i>Zea mays</i>	S14998	214	K.FVLDPNADMDK.I R.DGVLTVTVEKLPPPEPK.K K.FVLDPNADMDKISAVCR.D + Oxidation (M) K.ELPGAYAFVVDMPGLGTGDIK.V K.ELPGAYAFVVDMPGLGTGDIK.V + Oxidation (M)	17557	5.56	SCACFL5033E03.g
98	Putative 26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit 5a	<i>Oryza sativa</i>	Q5SNC0	373	R.ADILDPALMR.S + Oxidation (M) K.GVLLYGPPGTGK.T K.AVCVEAGMLALR.R + Oxidation (M) R.KIEFPHPSSEAR.A K.LAGPQLVQMFIGDGAK.L + Oxidation (M) K.MNVNPDVNFEELAR.S + Oxidation (M) R.TMLELLNQLDGFSSDER.I + Oxidation (M) K.EKAPCIIFIDEIDAIGTK.R K.AMEVDEKPTEDYNDIGGLEK.Q + Oxidation (M)	47978	4.94	SCEZAD1081D05.g

Tabela 2 – Continuação.

Spot	Proteína	Espécie	n° acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pI teórico	Cluster SUCEST
110	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	<i>Fritillaria agrestis</i>	AF037457	316	K.NAPPEFQK.T R.VPFLFTVK.Q R.LTYDEIQSK.T K.RLTYDEIQSK.T K.LCLEPTSFTVK.A K.KLCLEPTSFTVK.A R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G K.GRGGSTGYDNAVALPAGGR.G K.FEEKDGIDYAAVTVQLPGGER.V K.FKEEDGIDYAAVTVQLPGGER.V K.FEEKDGIDYAAVTVQLPGGER.V K.FKEEDGIDYAAVTVQLPGGER.V K.DGIDYAAVTVQLPGGERVPFLFTVK.Q	35076	6.26	SCEQSD1074A11.g

Tabela 3 – Proteínas de folha de cana-de-açúcar exclusivas do tratamento em alto CO₂ após 45 dias de experimento.

Spot	Proteínas	Espécie	N° de acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pl teórico	Cluster SUCEST
138	Ribulose-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) small chain precursor	<i>Saccharum sp.</i>	S33613	862	K.EGFVYR.E K.QVDYLIR.S R.YWTMWK.L R.YWTMWK.L + Oxidation (M) R.IIGFDNLR.Q R.NNWVPCLEFSK.E R.NDWVPCIEFSK.E R.ENSTSPCYDGR.Y K.LPMFGCTDASQVYK.E K.LPMFGCTDASQVYK.E + Oxidation (M) R.QTQCVSFIAYKPPGSE.- K.FETLSYLPPLTQEQLLK.Q K.KFETLSYLPPLTQEQLLK.Q K.KFETLSYLPPLTQEQLLK.Q K.EGFVYRENSTSPCYDGR.Y	19252	9.04	SCBGLR1120D06.g
145	Translation initiation factor eIF-5A	<i>Zea mays</i>	T01355	170	R.TEYQLIDISEDGFVSLTSDGNTK.D R.TEYQLIDISEDGFVSLTSDGNTK.D K.EGFESGKDLVVTVQSAMGEEQICALK.D + Oxidation (M)	17714	5.61	SCJLLB2076H12.g
147	Thioredoxin peroxidase	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q8RVF8	233	K.SYDVLIPDQGIALR.G K.EGVIQHSTINNLGIGR.S K.EGVIQHSTINNLGIGR.S K.SGGLGDLNYPLISDVTK.S K.SGGLGDLKYPLVSDVTK.S R.KSGGLGDLNYPLISDVTK.S R.KSGGLGDLNYPLISDVTK.S K.INTEILGVSVDVFSHLAWVQTER.K R.ASGELPLVGNSAPDFEAEAVFDQEFIK.V R.ASSELPLVGNSAPDFEAEAVFDQEFIK.V	30103	8.20	SCQSRT3054E02.g

Tabela 3 – Continuação.

Spot	Proteínas	Espécie	Nº de acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pl teórico	Cluster SUCEST
154	Glutathione s-transferase (EC 2.5.1.18)	<i>Zea mays</i>	1AXDA	341	R.NPFGQVPALQDGDLYLFESR.A R.NPFGQVPALQDGDLYLFESR.A R.CATALEEAGSDYEIVPINFATAEHK.S	23520	5.28	SCJFHR1C05C10.g

Tabela 4 – Proteínas de folha de cana-de-açúcar exclusivas do tratamento em CO₂ ambiente após 45 dias de experimento.

Spot	Proteínas	Espécie	Nº de acesso	Score Mascot	Peptídeos	Massa nominal (Mr)	pl teórico	Cluster SUCEST
172	Proteasome subunit alpha type 2 (EC 3.4.25.1)	<i>Oryza sativa</i>	ABF96319	244	K.KLP SILVDETSVQK.I K.KLP SILVDETSVQK.I K.VLSPA EIKDFLEEVE.- K.LVQIEHALTAVGSGQTSLGIK.A	25828	5.39	SCQSST1039H05.g
173	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast	<i>Oryza sativa</i>	Q2PER4	121	R.LASIGLENTEANR.Q R.TVVSIPNGPSELAVK.E K.YTSDGEAAEAKEGMFVK.N + Oxidation (M) R.LASIGLENTEANRQAYR.T K.ANSLAQLGKYTSDGEAAEAK.E R.TVVSIPNGPSELAVKEAAWGLAR.Y K.GLVPLAGSNNESWCQGLDGLASR.E K.GLVPLAGSNNESWCQGLDGLASR.E K.VDKGLVPLAGSNNESWCQGLDGLASR.E K.VDKGLVPLAGSNDESWCQGLDGLASR.S	42208	6.38	SCQSLB2053D11.g
176	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 1 precursor	<i>Solanum lycopersicum</i>	T06368	281	K.TKLMTR.L + Oxidation (M) R.VPFLFTVK.Q K.RLTYDEIQSK.T K.LCLEPTSFTVK.A K.KLCLEPTSFTVK.A K.KLCLEPTSFTVK.A K.FEEKDGIDYAAVTVQLPgger.V K.FKEEDGIDYAAVTVQLPgger.V K.FEEKDGIDYAAVTVQLPgger.V K.FKEEDGIDYAAVTVQLPgger.V R.GGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQK.E K.DGIDYAAVTVQLPggerVPFLFTVK.Q	35154	5.91	SCCCLR1070D02.g

Figura 3 – Volumes dos *spots* das proteínas diferencialmente expressas entre CO₂ ambiente e alto CO₂ após 45 dias de experimento. *n* = 3. **GST** = *Glutathione s-transferase*; **Eif 5A** = *Translation initiation factor eIF-5A*; **Rubisco** = *Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain precursor*; **Tioreddoxin** = *Thioredoxin peroxidase*; **OEE1** = *Oxygen-evolving enhancer protein 1*; **Proteassome** = *Proteasome subunit alpha type 2*; **Ribossomal 5S** = *Putative ribosomal protein S5*; **MDH** = *Malate dehydrogenase-like protein*; **FBA** = *Fructose-bisphosphate aldolase*; **GLP** = *Germin-like protein*; **PGAM** = *Phosphoglycerate mutase*; **26S Proteassome** = *Putative 26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit 5a*; **Heat shock** = *Heat shock protein 18*; **PPI** = *Putative peptidylprolyl isomerase*.

As proteínas identificadas também foram categorizadas de acordo com sua função. Do total de proteínas identificadas, é possível observar que a categoria funcional com maior quantidade de proteínas foi a de fotossíntese (12 proteínas) correspondendo a 60% das proteínas diferencialmente expressas, seguida de metabolismo de proteínas (8; 40%), desenvolvimento (1; 5%) e estresse (1; 5%) (Figura 4).

Figura 4 – Categorias funcionais das proteínas identificadas em folhas de cana-de-açúcar após 45 dias de experimento.

DISCUSSÃO

As alterações observadas no padrão de expressão de proteínas em cana-de-açúcar perfizeram 11% do total de proteínas separadas por eletroforese bidimensional. A comparação deste valor com a porcentagem de modificação observada no transcriptoma (~1%) que foi realizado em experimento similar por de Souza *et al.* (2008) denota a importância do estudo utilizando-se de diferentes técnicas de abordagem.

Dentre as proteínas diferencialmente expressas destacaram-se as relacionadas ao processo fotossintético e ao processamento de proteínas (Figura 4). O mesmo padrão foi observado para arroz, onde 34% das proteínas diferencialmente expressas foram relacionadas à fotossíntese, 17% ao metabolismo de carbono e 13% ao processamento de proteínas (Bokhari *et al.* 2007) e para *Arabidopsis* onde foram observadas modificações em proteínas fotossintéticas, de desenvolvimento e da via de processamento de proteínas (Bae & Sicher 2004). Foi possível observar também que alguns dos *spots* foram identificados como sendo a mesma proteína, indicando a presença de diferentes isoformas ou ainda diferentes processamentos pós-traducionais de uma mesma isoforma (Godovac-Zimmerman *et al.* 2005)

Em alto CO₂ foram verificados três *spots* com maior expressão que foram identificados pela espectrometria de massas como *malate dehydrogenase cytosolic* (cytNADP-MDH) (Tabela 2; Figura 3). Na literatura são descritas quatro isoformas da cytNADP-MDH (Maier *et al.* 2011) e acredita-se que elas estejam relacionadas com o controle do conteúdo de malato e com o fornecimento de substrato para as enzimas do cloroplasto (Lai *et al.* 2002). Neste sentido é possível que a maior quantidade destas proteínas em alto CO₂ esteja envolvida na conversão de malato excedente do ciclo fotossintético em oxaloacetato retroalimentando o ciclo, uma vez que a fotossíntese é maior nesse tratamento e a concentração de malato foi menor nessas plantas aos 45 dias (Capítulo 2 – Figura 13).

Também relacionado ao processo fotossintético, foram observados quatro *spots* da *oxygen evolving enhancer protein 1 precursor* (OEE1), sendo dois deles encontrados em maior quantidade em alto CO₂, um deles em CO₂ ambiente e um encontrado somente no tratamento do CO₂ ambiente (Tabela 2; Figura 3). A OEE1 faz parte do

complexo do fotossistema II e está localizada na superfície do interior do tilacóide no cloroplasto estabilizando a associação da membrana com os íons de magnésio, sendo essencial para a hidrólise da água (Murata & Miyao 1985) e para o reparo e renovação do fotossistema II (Lundin *et al.* 2007). Em *Arabidopsis* foram identificadas duas isoformas da OOE1 (Kieselbach *et al.* 2000; Peltier *et al.* 2002) e como esta proteína é bastante conservada entre as espécies (De Las Rivas *et al.* 2004) é possível que os dois *spots* encontrados em cana-de-açúcar em elevado CO₂ sejam estas duas isoformas, que estão em maior quantidade neste tratamento devido à maior taxa de fotossíntese observada (Capítulo 2 – Tabela 1). Em milho cultivado a 700ppm de CO₂ também foi observado um aumento destas proteínas, mesmo sem a detecção de mudanças na fotossíntese (Prins *et al.* 2011). Os *spots* observados em maior quantidade e exclusivamente no tratamento do CO₂ ambiente podem indicar processamentos diferentes desta enzima, uma vez que a taxa fotossintética destas plantas encontra-se reduzida em relação ao que se observa no campo e provavelmente prejudicada devido à diminuição da disponibilidade de água (Capítulo 2 – Figura 10A).

A enzima *phosphoglycerate mutase* que foi observada em dois *spots* (um em maior expressão em alto CO₂ e outro com maior expressão em CO₂ ambiente) (Tabela 2) é uma enzima que participa da conversão do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato podendo fazer parte da via glicotítica ou da via de gluconeogênese (KEGG 2011). A presença de maior quantidade de duas isoformas desta enzima também foi observada em arroz crescidos a 1140 e 1520ppm de CO₂ (Bokhari *et al.* 2007). Estes autores propuseram que as diferenças entre as isoformas podem indicar diferentes processamentos do carbono proveniente da fotossíntese entre os tratamentos. Um aumento da *phosphoglycerate mutase* está possivelmente relacionado ao aumento no processo de síntese de proteínas e respiratório, uma vez que por um lado ela aumenta a velocidade de produção de piruvato e consequentemente de aminoácidos como leucina, valina e isoleucina e, por outro, fornece acetil-CoA para o ciclo de Krebs. A observação de que há um aumento na respiração foliar aos 45 dias, que se estende até aos 60 dias (Capítulo 2 – Tabela 1) corrobora esta hipótese.

Além das três já citadas, há outras proteínas relacionadas à fotossíntese que foram identificadas. No entanto, elas foram observadas somente em um dos tratamentos (ou alto CO₂ ou CO₂ ambiente). A presença de *ribulose bisphosphate*

carboxylase small chain precursor em alto CO₂ (Tabela 3), sugere uma maior quantidade da enzima Rubisco neste tratamento. É possível que esta enzima não tenha sido verificada em CO₂ ambiente devido à menor taxa fotossintética nestas plantas (Capítulo 2 – Tabela 1) ou ainda devido a problemas de detecção durante a análise de imagens. A presença de *thioredoxin peroxidase* e a *glutathione s-transferase*, ambas relacionadas com os processos de antioxição e detoxificação do cloroplasto (Foyer & Shigeoka 2011; Qi *et al.* 2010), são corroboradas pelas maiores taxas fotossintéticas observadas em elevado CO₂, que demandam maior atividade antioxidante.

Por outro lado, a identificação da proteína *fructose-bisphosphate aldolase chloroplastic* somente em CO₂ ambiente é corroborada pela presença de maiores teores de amido nas folhas destas plantas (Capítulo 2 – Figura 3D), uma vez que esta enzima participa da via de síntese de amido no cloroplasto quando a exportação de fotoassimilados não é suficiente para drenar todo o carbono produzido (Dennis & Blakeley 2000; Roland *et al.* 2006).

As diferenças de expressão de enzimas relacionadas ao processamento de proteínas (*putative peptidylprolyl isomerase*, *putative ribosomal protein S5*, *putative 26S proteasome*, *regulatory translation*, *initiation factor eIF-5A* e *proteasome subunit alpha type 2*) sugerem que em alto CO₂ a síntese e o processamento de proteínas estejam ocorrendo de forma mais intensa do que em CO₂ ambiente, sendo esta resposta compatível com o maior crescimento das plantas nessas condições, bem como com as maiores taxas de fotossíntese, respiração e exportação de açúcares (Capítulo 2), que demandam síntese de proteínas.

A enzima *germin-like protein* que foi observada com maior expressão em alto CO₂ faz parte de uma família multigênica (GLPs) que está relacionada com desenvolvimento e defesa na planta (Bernier & Berna 2001). Estas enzimas que estão localizadas na matriz extracelular apresentam expressão diferencial durante períodos específicos do crescimento e desenvolvimento da planta e também podem ser parte de uma resposta a estresses bióticos e abióticos (Dunwell *et al.* 2008). Em arroz, esta enzima também foi observada com maior expressão em elevado CO₂ (Fukayama *et al.* 2009), podendo estar relacionada com o maior crescimento das plantas nestas condições.

Embora as enzimas da família *heat shock protein* (HSPs) estejam identificadas como proteínas de estresse oxidativo, elas também podem contribuir para o desenvolvimento das plantas (Su & Li 2009). Sob cultivo em elevado CO₂, foram observados que estas proteínas ou os genes que as codificam aparecem superexpressas em arroz, milho e *Arabidopsis* (Bae & Sincher 2004; Miyazaki *et al.* 2004; Bakhari *et al.* 2007).

Os resultados obtidos com a análise das proteínas corroboram de forma geral as modificações nos parâmetros fisiológicos que foram observadas no Capítulo 2. O cultivo em elevado CO₂ altera proteínas relacionadas principalmente ao processo fotossintético. Embora tenha sido observada a maior expressão de duas enzimas relacionadas ao processamento de CO₂ (*malate dehydrogenase citosolic* e *ribulose biphosphate carboxylase small chain precursor*) verificou-se que a maioria das enzimas relacionadas a este processo não foram modificadas, indicando, assim como o observado nos parâmetros fisiológicos, que as proteínas envolvidas na captura e processamento de CO₂ na cana-de-açúcar encontram-se em quantidades suficientes dentro das células, não necessitando de modificações para sua regulação.

Uma das hipóteses plausíveis é a de que proteínas relacionadas com eventos fisiológicos importantes tais como as mudanças encontradas nos açúcares e possíveis modificações no padrão de sinalização (eg. hexoquinases, sacaroses sintases, invertases) pudessem ter sido aumentadas em alto CO₂. No entanto, estas enzimas não foram observadas, possivelmente porque encontram-se estão em pequena quantidades e não podem ser detectadas através de eletroforese bidimensional devido a dificuldades inerentes à técnica. Por outro lado, o crescimento, que foi maior nas plantas em elevado CO₂, é verificado em nível traducional pela expressão diferencial de diversas enzimas relacionadas ao processamento protéico e desenvolvimento vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bae H & Sicher R (2004). Changes of soluble protein expression and leaf metabolite levels in *Arabidopsis thaliana* grown in elevated atmospheric carbon dioxide Fields Crops Research 90: 61-73.
- Bernier F & Berna A (2001). Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? Plant Physiology and Biochemistry 39: 545-554.
- Bokhari SA, Wan X-Y, Yang Y-W, Zhou L, Tang W-L & Liu J-Y (2007). Proteomic response of rice seedling leaves to elevated CO₂ levels. Journal of proteome research 6: 4624-4633.
- Bradford MM (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, New York, v.72, p.248-254.
- Buckeridge M, Santos WD & de Souza AP (2010). As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: BioEtanol de cana de açúcar: Pesquisa & Desenvolvimento para produtividade e sustentabilidade. Cortez LAB (coord.) Editora Edgard Blucher, São Paulo, pp. 365-380.
- Cánovas FM, Dumas-GAudot E, Recobert G, Jorrín J, Mock H-P & Rossignol M (2004). Plant proteome analysis. Proteomics 2 (4): 285-298.
- De Las Rivas J, Balsera M & Barber J (2004). Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. Trends in Plant Science 9: 18-25.
- de Souza AP, Gaspar M, da Silva E A, Ulian E C, Wacławovsky A J, Nishiyama-Jr MY, dos Santos RV, Teixeira MM, Souza G & Buckeridge MS (2008). Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. Plant, Cell & Environment 31:1116–1127.
- Dennis DT & Blakeley SD (2000). Carbohydrate metabolism. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 630 – 675.
- Dunwell JM, Gibbings G, Mahmood T & Naqvi SM (2008) Germin and Germin-like Proteins: Evolution, Structure, and Function. Critical Reviews in Plant Sciences 27: 342-375.

- Easterling W, Aggarwal P, Batima P, Brander K, Erda L, Howden M, Kirilenko A, Morton J, Soussana J-F, Schmidhuber S & Tubiello F (2007). Food, fibre and forest products. *In: Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ & Hanson CE. (eds). Cambridge University Press, pp. 273-313.
- Foyer CH & Shigeoka S (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant physiology* 155: 93-100.
- Fukayama H, Fukuda T, Masumoto C, Taniguchi Y, Sakai H, Cheng W, Hasegawa T & Miyao M (2009). Rice plant response to long term CO₂ enrichment: Gene expression profiling. *Plant Science* 177 (3): 203-210.
- Godovac-Zimmerman J, Kleiner O, Brown LR, Drukier AK (2005). Perspectives in spicing up proteomics with splicing. *Proteomics* 5: 699-709.
- Goldenberg J (2007). Ethanol for a sustainable energy future. *Science* 315: 808-810.
- Graves PR & Haystead TAJ (2002). Molecular Biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (1): 39-63.
- Hurkman WJ & Tanaka CK (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant physiology* 81: 802-806.
- IPCC (2007). Climate change 2007: the physical science basis. *In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds). Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, UK/New York, NY: Cambridge University Press.*
- Jorrín-Novo JV, Maldonado AM, Echevarría-Zomeño S, Valledor L, Castillejo MA, Curto M, Valero J, Sghaier B, Donosco G & Redondo I (2009). Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of Proteomics* 72 (3): 285-314.
- KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: abril 2011.

- Kieselbach T, Bystedt M, Hynds P, Robinson C & Schöder WP (2000). A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplast thylakoid lumen, FEBS Letter 480: 271-236.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lai LB, Lin W & Nelson TM (2002). Distinct but conserved functions for two chloroplastic NADP-malic isoforms in C₃ and C₄ Flaveria species. Plant Physiology 128: 125–139.
- Lundin B, Thuswaldner S, Shutova, T, Eshaghi S, Samuelsson G, Barber J, Andersson B & Spetea C (2007). Subsequent events to GTP binding by the plant PsbO protein: structural changes, GTP hydrolysis and dissociation from the photosystem II complex. Biochimica et Biophysica Acta 1767: 500-508.
- Maier A, Zell MB & Maurino VG (2011). Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C₄ and C₃ photosynthesis. Journal of Experimental Botany. doi:10.1093/jxb/err024.
- Miyazakia S, Fredricksen M, Hollis KC, Poroyko V, Shepley D, Galbraith DW, Long SP & Bohnerta HJ. Transcript expression profiles of Arabidopsis thaliana grown under controlled conditions and open-air elevated concentrations of CO₂ and of O₃. Field Crops Research 90: 47-59.
- Murata N & Miyana M (1985). Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. Trends in Biochemical Science 10: 122-124.
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Söderberg L, Roepstorff P, von Heijne G & van Wijk KJ (2002). Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. Plant Cell 12: 319-342.
- Plomion C, Lalanne C, Claverol S, Meddour H, Kohler A & Borgeatrouboulot M. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. Proteomics 24 (6): 6509–6527.
- Prins A, Mukubi JM, Pellny TK, Verrier PJ, Beyene G, Lopes MS, Emami K, Treumann A, Lelarge-Trouverie C, Noctor G, Kunert KJ, Kerchev P & Foyer CH (2010). Acclimation to high CO₂ in maize is related to water status and dependent on leaf rank. Plant, Cell & Environment 34: 314-331.

- Qi YC, Liu WQ, Qiu LY, Zhang SM, Ma L & Zhang H (2010) Overexpression of Glutathione S-Transferase Gene Increases Salt Tolerance of *Arabidopsis*. Russian Journal of Plant Physiology 57: 233-240.
- Rolland F, Baena-Gonzales E & Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annual Review of Plant Biology 57:676-709.
- Rossignol M, Peltier J-B, Mock H-P, Matros A, Maldonado AM, Jorrín JJ (2006). Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. Proteomics 20 (6): 5529-5548.
- Saravanan RS & Rose JKC (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomics analysis of recalcitrant plant tissues. Proteomics 4: 2522-2532.
- Socol CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge MS, Ramos LP, Pitarelo AP, Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Bom EPS, Moraes LMP, Araújo JÁ & Torres FAG (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. Bioresource Technology 101: 4820-4825.
- Sum P-H & Li H-m (2009). *Arabidopsis* stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. Plant Physiology 146:1231-1241.
- Tans P & Keeling R (2011). Trends in Atmospheric Carbon Dioxide, Mauna Loa, Hawaii. Disponível em: [http:// www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/](http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/). Acesso em abr 2011.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Williams KL & Kochstrasser DF (1995). Current challenges and future applications for protein maps and pos-translational vector maps in proteome projects. Electrophoresis 17: 830-838.

CAPÍTULO 4

Expressão de genes relacionados à fotossíntese e ao metabolismo de carboidratos em folhas de cana-de-açúcar cultivadas sob elevada concentração de CO₂

Colaboradores:

*Dra. Gláucia Mendes Souza
M^sC. Carolina Lembke*

*Laboratório de Transdução de Sinal, Instituto de Química, Universidade
de São Paulo*

INTRODUÇÃO

Os altos níveis de emissão de dióxido de carbono (CO₂) devido à industrialização, queima de combustíveis fósseis e desmatamento acarretam em mudanças na composição atmosférica que, por sua vez, influenciam nas mudanças do clima (IPCC 2007). É previsto que as mudanças no clima irão impactar de forma negativa em diversas partes do mundo, prejudicando a agricultura e a vida da população humana (Leakey 2009). Além disso, algumas pesquisas apontam que a disponibilidade de combustível fóssil será de, no máximo, 155 anos (British Petroleum 2006). Isto tem incentivado diversos países a buscar novas fontes de energia renovável. No Brasil, a principal fonte deste tipo de energia é proveniente do etanol, obtido pela cana-de-açúcar, uma gramínea proveniente do continente asiático, bem adaptada ao clima tropical e subtropical (Figueiredo 2008). Essa planta foi introduzida no Brasil com a chegada dos portugueses e ganhou grande importância econômica no país primeiramente com a produção de açúcar e após 1970, com a produção de açúcar e etanol (Cortez 2010).

A cana-de-açúcar, assim como o milho, o sorgo e alguns cereais possui fotossíntese do tipo C₄. Alguns autores acreditam que para este grupo de plantas os efeitos do aumento do CO₂ atmosférico ainda são incertos (Ainsworth & Long 2005) em parte devido a respostas variadas encontradas nos experimentos e, em parte, devido à escassez de estudos com essas espécies (Leakey 2009).

Estudos com cana-de-açúcar em elevado CO₂ mostram um aumento de fotossíntese, biomassa (de Souza *et al.* 2008; Capítulo 2) e conteúdo de sacarose (de Souza *et al.* 2008) que estão provavelmente associados à modificações no transporte de elétrons. Esses autores demonstraram que após 13 semanas de cultivo, genes relacionados ao processo de captação de luz (*chlorophyll A-B binding protein*, *ferredoxin I* e *photosystem II protein K*) e, após 22 semanas, o gene *phosphoenolpyruvate carboxylase* apresentaram com maior expressão em alto CO₂. Neste mesmo trabalho foram observadas alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e ao desenvolvimento.

Essas classes de genes são frequentemente alteradas em cultivo sob elevadas concentrações de CO₂. Empregando a técnica de *microarray* estudos com *Populus euramericana* e *Populus tremuloides* mostraram que em alto CO₂ há alterações na

expressão de genes relacionados à fotossíntese, metabolismo de carboidratos e de aminoácidos e ciclo celular e que estas alterações estão associadas principalmente à idade das folhas (Druart *et al.* 2006) e ao modo de partição de carboidratos (Cseke *et al.* 2009). Em soja, folhas jovens de plantas cultivadas sob 550ppm de CO₂ tiveram aumento na expressão de genes envolvidos com o crescimento, proliferação celular, processos respiratórios e de metabolismo de carboidratos (Ainsworth *et al.* 2006). No milho, a avaliação da transcrição gênica revelou que em elevado CO₂ genes que codificam proteínas relacionadas ao estresse apresentaram-se induzidos, enquanto genes envolvidos na fotossíntese e na captura de luz foram reprimidos. Além disso, 27 genes categorizados como participantes no metabolismo foram reprimidos e 24 induzidos nessas condições (Kim *et al.* 2006).

O uso da técnica de *microarray* permite uma análise de diversos genes possibilitando a condução de experimentos em larga escala (Epstein & Butow 2000; Schaffer *et al.* 2000). No entanto, quando o interesse é em alvos específicos do metabolismo, o mais recomendado é a técnica de PCR em tempo real ou RT-qPCR, que é considerada atualmente o método mais acurado para determinar a quantidade de transcritos de um gene (Exner 2010). Esta técnica, associada a dados de fisiologia e bioquímica pode auxiliar no entendimento da regulação das respostas das plantas a condições adversas.

Desta forma, com o objetivo de complementar as análises realizadas até o momento e compreender os mecanismos de regulação fotossintética e do metabolismo de carboidratos em nível transcricional da cana-de-açúcar cultivada em elevado CO₂, este capítulo apresenta dados da expressão de genes envolvidos em ambas as categorias citadas acima, após 45 e 60 dias de cultivo em alto CO₂.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

As folhas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 foram obtidas a partir do experimento descrito no Capítulo 2. Durante as coletas destrutivas, que ocorreram aos 30, 45, 60 e 75 dias nos tratamentos de CO₂ ambiente e alto CO₂, parte das folhas coletadas em nitrogênio líquido foi armazenada em freezer -80°C até o início das análises de expressão gênica.

A partir dos dados gerados nas análises anteriores, foram escolhidas as coletas de 45 e 60 dias para investigar os genes diferencialmente expressos, uma vez que nestas duas datas, os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si (ver Capítulo 2).

Extração e quantificação de RNA

A extração do RNA total das folhas das coletas após 45 e 60 dias foi realizada com o método fenol/isotiocianato de guanidina utilizando tampão TRIZOL[®], Invitrogen. Em 200 mg do material congelado e macerado foram adicionados 1,5 mL do tampão TRIZOL[®] e a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 300 µL de clorofórmio foi adicionado. As amostras foram misturadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente durante 5 min e posteriormente centrifugadas nas mesmas condições citadas acima. A fase aquosa formada após a centrifugação foi transferida para um novo microtubo e 750 µL de isopropanol (volume 1:1) foram adicionados. A mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 min. Uma nova centrifugação, nas mesmas condições, foi feita e o sobrenadante foi descartado. O precipitado formado foi lavado em etanol 70% e seco a temperatura ambiente por aproximadamente 20 min. O precipitado foi ressuscitado em 200 µL de água autoclavada e precipitado com 10% de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 3 volumes de etanol 100%. As amostras foram mantidas a -20°C por 12 horas.

Após 12 horas, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado novamente seco em temperatura ambiente por aproximadamente 20 min. O precipitado final foi ressuspensionado em 30 µL de água autoclavada e mantido a -80°C.

A pureza da amostra foi determinada pela razão da densidade óptica em comprimento de onda a 260 e 280nm e a qualidade e possível degradação foram checadas em gel de agarose. A quantificação foi realizada a partir da absorbância a 260nm, segundo a fórmula:

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260\text{nm}} \times F_c \times F_d}{1000}$$

onde: **Fc** é o fator de conversão que indica a equivalência de uma unidade de absorbância no comprimento de onda de 260nm correspondente a 40 µg RNA. mL⁻¹ e **Fd**, o fator de diluição da amostra.

Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foram utilizados 5 µg de RNA que foram tratados com 3 µL da enzima DNase I *Amplification Grade* (Invitrogen). Na reação também foi adicionado 1 µL do tampão *DNase reaction* 10X e volume de água DEPC suficiente para completar 10 µL de volume final. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min e a reação foi finalizada com adição de 1 µL de EDTA 25 mM. Para a inativação da DNase as amostras foram incubadas a 65°C por 10 min.

A transcrição reversa foi realizada com 7,5 µL do RNA tratado com DNase, utilizando o kit *First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Ao RNA foram adicionados, 1 µL de dNTPs 10 mM, 50 ng de *primers* hexâmeros randômicos, 0,25 µg de *primer* oligo (dT) e esta mistura foi incubada a 70°C por 5 min. Após resfriamento em gelo, foram adicionados em cada amostra 2 µL de tampão de transcrição reversa 10X (Tris-HCl 200 mM pH8,4; KCl 500 mM), 2 µL de MgCl₂ 25mM, 2 µL DTT 0,1 M e 40 U de *RNase OUT*, que foi incubada a 25°C por 10min, seguidos de 42°C por 2 min. Por último foi adicionado 50 U de *SuperScript II Reverse Transcriptase*, totalizando 20 µL de volume final de reação. As

amostras foram incubadas a 42°C por 90 min, seguidos de 72°C por 10 min e resfriamento em gelo. O cDNA foi tratado com 2U de RNaseH a 37°C por 30 min e armazenado a -20°C. Uma reação idêntica, mas sem a adição da enzima transcriptase reversa, foi realizada para confirmar a eficácia da DNase (ausência de DNA genômico).

Escolha dos genes de interesse

Os genes de interesse foram escolhidos com base nas sequências existentes no banco de dados do SUCEST (<http://sucest-fun.org/>). Para a escolha foram considerados os resultados obtidos com a fisiologia e bioquímica das plantas cultivadas em alto CO₂. Foram consideradas as variações nos conteúdos de açúcares, as proteínas diferencialmente expressas (Capítulos 3 e 4), bem como os dados obtidos pelo trabalho de de Souza *et al.* (2008). Cada um dos genes escolhidos tiveram sua identidade confirmada em banco de dados públicos. Os 23 genes que foram analisados estão listados na Tabela 1. As sequências dos respectivos *primers* encontram-se no Anexo 13.

Tabela 1 – Descrição dos genes utilizados nas análises.

SAS	Descrição do gene
1 SCACLR1129A11.g	<i>Photosystem I reaction centre subunit N, chloroplast precursor (PSI-N) (Fragment)</i>
2 SCACLR2007B05.g	<i>Chlorophyll a/b-binding apoprotein CP24 precursor</i>
3 SCCCCL3001A05.g	<i>Aconitate hydratase, cytoplasmic (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase) (Aconitase)</i>
4 SCCCCL4003E08.g	<i>T13D8.4 protein (Trehalose-6-phosphate synthase 3)</i>
5 SCCCRT1C06D06.g	<i>Cell wall invertase</i>
6 SCJLLR2020E06.g	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (EC 3.1.3.11)</i>
7 SCQGLR2025B12.g	<i>Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplast precursor (PSI-L) (PSI subunit V)</i>
8 SCRULR1020D09.g	<i>Putative phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31)</i>
9 SCRULR1020D11.g	<i>Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor (EC 4.1.2.13) (ALDP)</i>
10 SCSBSB1053D03.g	<i>Photosystem II reaction center protein K precursor (PSII-K)</i>
11 SCSBST3096E08.g	<i>Chlorophyll A-B binding protein of LHCII type III, chloroplast precursor (CAB)</i>
12 SCSBSD2029H02.g	<i>Ferredoxin I, chloroplast precursor (Fd I)</i>
13 SCVPRT2079H06.g	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49)</i>
14 SCCCLB1C06E01.g	<i>Cellulose synthase-like protein OsCslA9</i>
15 SCCCZR2002G07.g	<i>Cellulose synthase-7</i>
16 SCRLLR1038H01.g	<i>Zeaxanthin epoxidase</i>
17 SCJFLR1013H10.g	<i>UDP-glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.22)</i>
18 SCCCCL5004B03.g	<i>Hexose transporter</i>
19 SCEQRT2100B02.g	<i>Plasma membrane integral protein ZmPIP2-4 / Aquaporina</i>
20 SCEQLB1063G04.g	<i>Carbonic anhydrase</i>
21 SCAGLR1043E04.g	<i>Allene oxide synthase (EC 4.2.1.92) / Citocrome P450</i>
22 SCCCZR2001C01.g	<i>Thioredoxin h</i>
23 SCEPLB1042B08.g	<i>Timing of CAB expression 1 protein (Pseudo-response regulator 1)</i>

Genes de referência interna (normalizadores)

A escolha dos genes de referência interna foi realizada após a análise de cinco possíveis genes normalizadores: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), poliubiquitina (PUB), ubiquitina (UB), enzima conjugadora de ubiquitina (UBE2) e actina (ACT) através de reações de PCR em tempo real.

Eficiência da reação e testes de diluição

Para a validação de cada gene foi realizado o cálculo da eficiência da reação individual ($E = 10^{(-1/\text{slope})-1}$). Foram considerados válidos os genes que apresentaram eficiência entre 90 e 110%. A escolha da melhor diluição do cDNA a ser utilizada foi feita a partir reações de PCR em tempo real com o cDNA nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:100 e 1:200. Foi considerada a melhor diluição aquela em que o ΔC_t experimental foi o mais próximo do ΔC_t teórico ($\log(\text{diluição})/\log(2)$).

Reações de PCR em tempo real (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em um equipamento *GeneAmp 7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystem). Foram feitas três réplicas biológicas e três réplicas técnicas, totalizando nove reações para cada gene em cada um dos tratamentos e data de coleta. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se de 0,6 μL do cDNA sintetizado diluído (1:5, 1:25 ou 1:100 dependendo do gene), 600 nM de *primer R* (reverse), 600 nM de *primer F* (forward), 7,5 μL de *SYBR Green PCR Master Mix* e água autoclavada para um volume final de 15 μL . Os ciclos para as reações foram: 1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 min. Para analisar a especificidade dos produtos amplificados foram geradas curvas de dissociação adicionando-se aos ciclos de reação 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg e 95°C por 15 seg. Foram utilizados controles negativos sem adição de cDNA sintetizado para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional (*No Template Control*, NTC).

Cálculo da expressão e análise estatística

A expressão de cada gene foi calculada pelo método do ΔCt com o auxílio do programa qbase^{PLUS} (Mestdagh *et al.* 2009), utilizando-se a média geométrica de dois genes normalizadores para o cálculo.

A avaliação da significância estatística entre os tratamentos foi realizada separadamente para cada data de coleta (45 e 60 dias). Para as expressões de cada um dos genes foi assumido um modelo log-normal e a significância da expressão entre amostra experimental (alto CO₂) e amostra controle (CO₂ ambiente) foi calculada a partir da probabilidade da razão da expressão ser maior ou menor do que um. Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram $p \leq 0.1$. Nesta análise foi utilizado o pacote estatístico R.

RESULTADOS

Genes de referência

Dos genes avaliados, os que apresentaram menor variação de expressão entre as amostras foram o da enzima conjugadora de ubiquitina (UBE2) e da poliubiquitina (PUB) (Figura 1). Desta forma, estes dois foram os escolhidos como normalizadores para as demais análises.

Figura 1 – Variação de expressão dos genes actina (ACT) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), poliubiquitina (PUB), ubiquitina (UB) e enzima conjugadora de ubiquitina (UBE2) entre as amostras T45 AMB (CO₂ ambiente aos 45 dias), T45 CO₂ (alto CO₂ aos 45 dias), T60 AMB (CO₂ ambiente aos 60 dias) e T60 CO₂ (alto CO₂ aos 60 dias).

Expressão gênica

Após as análises de expressão gênica verificou-se que dos 23 genes avaliados, 17 apresentaram expressão diferencial entre os tratamentos em 45 ou 60 dias de cultivo. Aos 45 dias, os genes relacionados à fotossíntese descritos como *Putative phosphoenolpyruvate carboxylase*, *Timing of CAB expression 1 protein*, *Zeaxanthin epoxidase* e *Aconitate hydratase* encontraram-se reprimidos em elevado CO₂ ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.040$ e $p < 0.0001$, respectivamente) quando comparados ao CO₂ ambiente (Figura 2). Os demais não apresentaram expressão diferencial entre os tratamentos

nesta data. Após 60 dias de cultivo, foi observado que os genes *Photosystem II reaction center protein K* precursor e *Photosystem I reaction center subunit XI* estavam com maior expressão em alto CO₂ (p=0.001 e p=0.040, respectivamente) , enquanto *Carbonic anhydrase* e *Thioredoxin h* apresentaram menor expressão neste mesmo tratamento (p= 0.001 e p= 0.030) (Figura 2).

A Figura 3 demonstra os dados de expressão gênica obtidos com genes relacionados com o metabolismo de carboidratos. Foi observado que os três genes analisados que fazem parte da síntese de parede celular (*UDP-glucose dehydrogenase* *Cellulose synthase-like protein OsCslA9* e *Cellulose synthase-7*) estavam reprimidos aos 45 dias em alto CO₂ (p<0.0001), enquanto aos 60 dias *Cellulose synthase-like protein OsCslA9* e *Cellulose synthase-7* apareceram com maior expressão nesse tratamento (p=0.070 e p=0.020, respectivamente). Os genes da *cell wall invertase*, *fructose-1,6-bisphosphatase*, *glucose-6-phosphate dehydrogenase* e *trehalose-6-phosphate synthase* apresentaram menor expressão em alto CO₂ aos 45 dias (p<0.0001, p<0.0001, p= 0.030 e p<0.0001, respectivamente), enquanto que aos 60 dias estes mesmos genes não sofreram alteração. *Citocrome P450* e *Plasma membrane integral protein* apresentaram aos 45 dias, menor (p=0.030) e maior (p=0.010) expressão, respectivamente, em alto CO₂ em comparação ao CO₂ ambiente. Após 60 dias de cultivo, estes dois genes não apresentaram diferenças de expressão entre os dois tratamentos.

Figura 2 – Genes relacionados ao processo fotossintético diferencialmente expressos entre CO₂ ambiente (□) e alto CO₂ (■) após 45 e 60 dias de experimento. $n = 3$. Diferenças significativas indicadas por valor de $p \leq 0.1$. Valores superiores indicam valor de p referente aos 45 dias e os inferiores aos 60 dias. **PEPc** = Putative phosphoenolpyruvate carboxylase; **FBA** = Fructose-bisphosphate aldolase; **TOC1** = Timing of CAB expression 1 protein; **PSII-K** = Photosystem II reaction center protein K precursor; **CA** = Carbonic anhydrase; **PSI-N** = Photosystem I reaction centre subunit N; **CAB** = Chlorophyll a/b-binding; **PSI-L** = Photosystem I reaction center subunit XI; **CAB-III** = Chlorophyll A-B binding protein of LHCII type III; **ZE** = Zeaxanthin epoxidase; **Aconitase** = Aconitate hydratase.

Figura 3 – Genes relacionados ao metabolismo de carboidratos diferencialmente expressos entre CO₂ ambiente (□) e alto CO₂ (■) após 45 e 60 dias de experimento. *n* = 3. Diferenças significativas indicadas por valor de *p* ≤ 0.1. Valores superiores indicam valor de *p* referente aos 45 dias e os inferiores aos 60 dias. **UDP-Glc** = *UDP-glucose dehydrogenase*; **CSL9**= *Cellulose synthase-like protein OsCslA9*; **CesA7** = *Cellulose synthase-7*; **CWI** = *cell wall invertase*; **Fru 1,6 - bis** = *Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic*; **Glc 6P** = *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*; **TPS** = *Trehalose-6-phosphate synthase 3*; **Cit P450** = *Citocrome P450*; **Aquaporina** = *Plasma membrane integral protein ZmPIP2-4*.

DISCUSSÃO

As interações entre expressão gênica, conteúdo de proteínas, metabólitos e fenótipo são completamente dependentes da dinâmica temporal de renovação dos constituintes desses diferentes níveis funcionais. O impacto das mudanças na expressão dos genes, por exemplo, depende da taxa de renovação das proteínas que são codificadas por eles e da importância destas proteínas para o metabolismo (Gibon *et al.* 2006). Flutuações da expressão dos genes podem fazer parte de um sistema permanente que possibilita o ajuste dos metabólitos e de suas funções, mantendo o mesmo fenótipo por diversos dias. Isto implica no fato de que nem sempre as variações observadas na expressão dos genes refletem imediatamente em efeitos fisiológicos.

Observando os dados de expressão gênica obtidos neste trabalho é possível perceber um pouco desta diferença que ocorre na dinâmica temporal entre as respostas obtidas em expressão gênica, proteínas e fisiologia.

Embora tenha sido observada uma menor expressão do gene *Putative phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPc) aos 45 dias e *Carbonic anhydrase* (CA) aos 60 dias em alto CO₂ em relação ao CO₂ ambiente (Figura 2) não foram verificadas menores taxas de fotossíntese (Capítulo 2 – Tabela 1) nem detectadas diferenças nestas proteínas (Capítulo 3) nestes mesmos períodos. A PEPc catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato em oxaloacetato (Taiz & Zeiger 2004) enquanto a CA é responsável por catalisar a reação do CO₂ com a água nas células do mesófilo foliar (Chen *et al.* 1970). Em relação ao gene que codifica CA, verifica-se também que a diferença de expressão obtida aos 60 dias é devido ao aumento da sua expressão em CO₂ ambiente (Figura 2). Embora a condutância estomática aos 60 dias nesse tratamento não seja diferente do que foi observado aos 45 dias (Capítulo 2 – Tabela 2), mudanças na expressão do gene da CA podem estar relacionadas a uma resposta de fechamento estomático. Hu *et al.* (2010) verificaram que mutantes de *Arabidopsis* que não possuíam anidrase carbônica apresentaram aumento na densidade estomática e redução na função de seus estômatos.

A repressão dos genes *Timing of CAB expression 1 protein* (TOC1) e *Zeaxanthin epoxidase* (ZE) aos 45 dias, bem como a maior expressão de *Photosystem II reaction center protein K precursor* (PSII-K) e *Photosystem I reaction center subunit XI* (PSI-L) aos

60 dias em elevado CO₂ aparentam ter relação com as respostas observadas nos Capítulos 2 e 3.

O gene *TOC1* está relacionado com processos de controle circadiano e em condições normais apresenta-se reprimido durante o dia (Harmer *et al.* 2000). Quando esse gene apresenta maior expressão durante o dia, há a repressão de um gene da família *Pseudo-Response Regulator* (PRR9), que é conhecido por estar envolvido na sensibilidade à temperatura ambiental (Salome & McClung 2005) e também por desencadear processos que aumentam a tolerância da planta a estresses abióticos, tais como o frio e a seca (Fukushima *et al.* 2009). A ZE participa da via de modulação da dissipação da energia térmica (Esteban *et al.* 2009) e também da via de síntese de ácido abscísico (ABA) (Parry *et al.* 1990), hormônio vegetal relacionado à processos de germinação e desenvolvimento de sementes e respostas ao déficit hídrico. Desta forma, a maior expressão destes dois genes (*TOC1* e ZE) em CO₂ ambiente em relação ao alto CO₂ (Figura 2) pode ser mais um indicador de que as plantas do CO₂ ambiente estavam provavelmente sob déficit hídrico.

A maior expressão dos genes *PSII-K* e *PSI-L* em alto CO₂ aos 60 dias pode ser responsável pela manutenção da maior taxa de transporte de elétrons observada nesse tratamento (Capítulo 2), assim como observado anteriormente por de Souza *et al.* (2008), uma vez que ambos codificam proteínas da cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto.

Ainda que os genes *PSII-K* e *PSI-L* estejam induzidos aos 60 dias em elevado CO₂, outros dois genes relacionados ao transporte de elétrons e envolvidas na modulação da atividade de algumas enzimas do cloroplasto (Malkin & Niyogi 2000) (*Thioredoxin h* e *Ferredoxin*) apresentaram-se com menor expressão nesse mesmo período e tratamento (Figura 2). Essas respostas, que a princípio podem parecer antogônicas, sugerem que os genes que codificam estas quatro proteínas trabalham de forma diferente para manter a estabilidade dos fotossistemas.

Ainda que tenha sido verificada maior taxa respiratória em elevado CO₂ aos 45 dias (Capítulo 2 – Tabela 1), o gene *Aconitate hydratase* (aconitase) apresentou menor expressão nesse tratamento do que em CO₂ ambiente. A aconitase catalisa a interconversão de citrato e isocitrato participando do ciclo do ácido tricarboxílico

(Siedow & Day 2000), indicando que este a repressão deste gene possa ser um mecanismo de controle para a regulação da respiração.

Em relação ao metabolismo de carboidratos foi observado que em alto CO₂ genes relacionados à síntese de parede celular (*UDP-glucose dehydrogenase* (UDP-Glc desidrogenase), *Cellulose synthase-like protein OsCSLA9* (CSL9) e *Cellulose synthase-7* (CesA7)) estavam com menor expressão aos 45 dias, enquanto que aos 60 dias dois deles (CSL9 e CesA7) apresentaram maior expressão em relação ao CO₂ ambiente (Figura 3). A menor expressão do gene UDP-Glc desidrogenase também foi observada por de Souza e colaboradores (2008) após 13 semanas de cultivo de cana-de-açúcar em elevado CO₂. Como esses três genes estão associados à codificação de enzimas que participam da síntese de hemiceluloses e pectinas (UDP-Glc desidrogenase e CSL9) e celulose (CesA7), estes dados indicam que a cana-de-açúcar aos 45 dias em alto CO₂ está investindo menos em crescimento do que as plantas do CO₂ ambiente. De fato, ao observar os dados de biomassa foliar (Capítulo 2 – Figura 3A) verifica-se que neste período o investimento em biomassa nas plantas em elevado CO₂ é menor do que o do CO₂ ambiente. Aos 60 dias, CSL9 e CesA7 apresentam maior expressão em alto CO₂. No entanto, observa-se essa expressão obtida em elevado CO₂ aos 60 dias é semelhante aos dos 45 dias, indicando que é a expressão destes genes em CO₂ ambiente que está menor. Essa diferença pode ser reflexo da redução de crescimento destas plantas em relação às do elevado CO₂.

A menor expressão do gene *cell wall invertase* (CWI) observada aos 45 dias em alto CO₂ corrobora o que foi observado em de Souza *et al.* (2008), bem como o observado na relação fonte-dreno no Capítulo 2. A menor atividade desta enzima na folha pode ocorrer em favor de uma exportação massiva de fotoassimilados (Prioul *et al.* 1990). Sendo assim, a menor expressão de CWI aos 45 dias pode ser explicada pela maior taxa de fotossíntese nas plantas em elevado CO₂ e maior produção de fotoassimilados que estariam sendo exportados em maiores quantidades para o dreno. Da mesma forma, a maior taxa fotossintética das plantas cultivadas em elevado CO₂ podem ter contribuído para a maior expressão de *plasma membrane integral protein ZmPIP2-4* (aquaporina). O maior conteúdo de açúcares produzidos devido à maior taxa de fotossíntese pode ter estimulado a expressão de aquaporinas, que são responsáveis

por auxiliar no ajuste osmótico da célula, devido ao transporte seletivo de água que realizam (Yang & Verkman 1997).

O gene da *trehalose-6-phosphate synthase* (TPS) também está mais expresso em CO₂ ambiente aos 45 dias que em elevado CO₂ do (Figura 3). Este gene participa da regulação das enzimas do amido (Foyer & Paul 2001) através da ativação da enzima ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)(Kolbe *et al.* 2005). A maior expressão desse gene em CO₂ ambiente pode, em parte, explicar os maiores teores de amido observados neste tratamento (Capítulo 2). Além disso, a proteína *fructose-bisphosphate aldolase* foi identificada em CO₂ ambiente nesse mesmo período (Capítulo 3), corroborando o fato de que a via de síntese de amido está mais ativada nestas plantas.

O gene da enzima *Citocrome P450* foi observado com menor expressão em elevado CO₂ aos 45 dias. Esta enzima é importante na biossíntese de algumas substâncias do metabolismo secundário como flavonóides, alcalóides e hormônios (Irmiler *et al.* 2000) e a redução da expressão de seu gene pode indicar que as plantas em elevado CO₂ estão com menor investimento em metabolismo secundário. O fato do crescimento nas plantas do elevado CO₂ estar mais intenso neste período pode explicar o motivo pelo qual há menor investimento em metabolismo secundário. Em plântulas de cana-de-açúcar foi observado que este gene foi induzido quando o crescimento foi prejudicado por meio da aplicação de paclobutrazol, um inibidor da síntese de giberelinas (Brandão 2010).

Com estes dados, verifica-se que de maneira similar ao observado para as proteínas, a modificação na expressão de genes relacionados à fotossíntese e ao metabolismo de carbono em cana-de-açúcar reflete os processos observados em nível fisiológico. Como a maioria dos genes analisados apresentou modificações entre os tratamentos aos 45 dias, acredita-se que é durante este período que ocorre a maior sinalização e regulação destes processos em elevado CO₂. As proteínas codificadas pelos genes que não apresentaram alterações possivelmente estão presentes em quantidade suficiente não necessitando serem transcritas durante este período, ou ainda a transcrição referente a estas proteínas ocorreu em outro momento que não o da análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth EA & Long SP (2005). What have we learned from 15 years of free air-CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165: 351-372.
- Ainsworth EA, Rogers A, Vodkin LO, Walter A & Schurr U (2006). The effects of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. *Plant Physiology* 142: 135-147.
- Brandão AD (2010). Efeito da giberelina A3 e do paclobutrazol no metabolismo de carboidratos e expressão gênica em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*). Tese de doutorado: Universidade Estadual de Campinas, SP - Instituto de Biologia.
- British Petroleum (2006). BP Statistical review of world energy. Disponível em: http://www.bp.com/liveassets/bp_internet/russia/bp_russia_english/STAGING/local_assets/downloads_pdfs/s/Stat_Rev_2006_eng.pdf. Acesso em abr:2011.
- Chen TM, Brown RH & Black CC (1970). CO₂ compensation concentration, rate of photosynthesis, and carbonic anhydrase activity of plants. *Weed Science* 18: 399-403.
- Cortez LAB (2010). Introdução. In: BioEtanol de cana-de-açúcar: Pesquisa & Desenvolvimento para produtividade e sustentabilidade. Cortez LAB (coord). Editora Edgard Blucher, pp.3-18.
- Cseke LJ, Tsai C-J, Rogers A, Nelsen MP, White HL, Karnosky DF & Podila GK (2009). Transcriptomic comparison in the leaves of two aspen genotypes having similar carbon assimilation rates but different partitioning patterns under elevated [CO₂]. *New Phytologist* 182: 891-911.
- de Souza AP, Gaspar M, da Silva EA, Ulian EC, Wacławovsky AJ, Nishiyama-Jr MY, dos Santos RV, Teixeira MM, Souza G & Buckeridge MS (2008). Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* 31:1116–1127.
- Druart N, Rodríguez-BueyM, Barron-Gafford G, Sjödin,A, Bhalerao R & HurryV (2006). Molecular targets of elevated [CO₂] in leaves and stem of *Populus deltoides*:

- implications for future tree growth and carbon sequestration. *Functional Plant Biology* 33: 121-131.
- Epsteins CB & Butow RA (2000). Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge. *Current opinion in biotechnology* 11(1):36- 41.
- Esteban R, Becerril JM & García-Plazaola JI (2009). Lutein epoxide cycle, more than Just a forest tale. *Plant signaling & Behavior* 4 (4): 342-344.
- Exner V (2010). Quantitative real time PCR in plant developmental biology. *In: Plant developmental biology, Methods in Molecular Biology*. Hennig L & Köhler C (eds.). Springer, pp.275- 291.
- Figueiredo P (2008). Breve história da cana de açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. *In: Dinardo-Miranda LL, Vanconcelos, ACM & Landell MGA. Cana de açúcar*. Campinas: Instituto Agrônomo, 882p.
- Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, Kobayashi M, Hayashi N, Sakakibara H, Mizuno T & Saito K (2009). Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudoresponse regulators in metabolic coordination. *Proceedings of the National Academic of Sciences* 106 (17): 7251-7256.
- Gibon Y, Usadel B, Bläesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R & Stitt M (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biology* 7: R76.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA & Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290: 2110–2113.
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM & Schroeder JI (2010). Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology* 12: 87–93.
- IPCC (2007). Climate change 2007: the physical science basis. *In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds). Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge, UK/New York, NY: Cambridge University Press.
- Irmiler S, Schröder G, St-Pierre B, Crouch NP, Hotze M, Schidt J, Strack D, Matern U & Schröder J (2000) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme

- activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *The Plant Journal* 24 (6) 797-804.
- Kim SH, Sicher RC, Bae H, Gitz DC, Bakers JT, Timlin DJ & Reddy VR (2006). Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. *Global Change Biology* 12: 588- 600.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S & Geigenberger P (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academic of Sciences* 31 (102): 11118 – 11123.
- Leakey ADB (2009). Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C₄ crops for food and fuel. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 276: 2333-2343.
- Malkin R & Niyogi K (2000). Photosynthesis. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 568-628
- Mestdagh P, Vlierberghe PV, weer AD, Muth D, Westermann F, Speleman F & Vandesompele J (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology* 10: R64.
- Parry AD, Babiano MJ & Horgan R (1990). The role of carotenoids in abscisic acid biosynthesis. *Planta* 182: 118-128.
- Paul MJ & Foyer CH (2001). Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1383-1400.
- Prioul J-L, Reyss A & Schwebel-Dungué N (1990). Relationships between carbohydrate metabolism in ear adjacent leaf during grain filling in maize genotypes. *Plant Physiology & Biochemistry* 28: 485-493.
- Salome PA & McClung CR (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 17:791–803
- Schaffer MR, Landgraf J, Perez-Amador M & Wisman E (2000). Monitoring genome-wide expression in plants. *Current opinion in biotechnology* 11 (2): 162-167.

- Siedow JN & Day DA (2000). In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 676-728.
- Taiz L & Zeiger E (2004). Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: Artmed, 719pp.
- Yang B & Verkman AS (1997). Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus oocytes*. Journal of Biological Chemistry 272:16140-16146.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos com a cana-de-açúcar em elevado CO₂ mostram que o cultivo nessa condição aumenta a taxa fotossintética e o crescimento da planta ao longo do tempo em relação ao CO₂ ambiente. Há evidências (redução na taxa de assimilação observada nas plantas do CO₂ ambiente comparadas ao alto CO₂ e ao campo; menor taxa de condutância estomática no tratamento do CO₂ ambiente em relação ao campo) que sugerem que a maior parte dos efeitos observados seja devido ao benefício que estas plantas possuem em situações onde há redução da disponibilidade de água no ambiente, neste caso proporcionado pela limitação do crescimento da raiz no vaso. O benefício principal seria dado pelo fechamento estomático que melhora a eficiência do uso da água e mantém o crescimento da planta, assim como descrito em diversos trabalhos anteriores (Cousins *et al.* 2003; Ainsworth & Long 2005; Leakey *et al.* 2006; Ainsworth *et al.* 2008; Leakey 2009). No entanto, outros experimentos realizados com cana-de-açúcar em elevado CO₂ mostram que há variações na atividade das enzimas fotossintéticas, que podem explicar diferenças de assimilação nos estádios iniciais de desenvolvimento da folha (Vu *et al.* 2006; Vu & Allen 2009). No presente estudo não foram avaliadas as taxas de fotossíntese em folhas nos estádios iniciais de desenvolvimento, não permitindo saber se este foi um fator que auxiliou o maior crescimento das plantas em elevado CO₂.

Ainda que o aumento do CO₂ possa não promover uma resposta direta ao aumento da fotossíntese e ao incremento de biomassa, com os dados obtidos neste trabalho foi possível obter evidências de como o processo de fotossintético é regulado em cana-de-açúcar (Figura 1).

O crescimento, que foi mantido em elevado CO₂ parece ser o maior responsável por todas as modificações observadas na fotossíntese. Assim como o observado ao longo de 24 horas, o crescimento da planta ao longo do tempo é o responsável pela utilização dos açúcares produzidos por meio da fotossíntese. Na folha, a utilização desses açúcares não permite que o amido seja acumulado, provavelmente pela sinalização que estes açúcares devam promover sobre as enzimas frutose biscofosfato aldolase (FBA) e trealose 6-fosfato sintase (T6P), demonstrados neste trabalho por meio da expressão de sua proteína e gene, respectivamente. No colmo, o aumento do crescimento também leva a uma redução de açúcares não estruturais (solúveis e amido). Esse baixo nível de açúcares nos dois órgãos (folha e colmo) sinaliza para a fotossíntese

por intermédio principalmente do aumento da expressão das proteínas relacionadas indiretamente ao transporte de elétrons (OEE1, tiorredoxina e GST). Embora os genes relacionados ao transporte de elétrons de uma forma geral corroborem os resultados observados em relação às proteínas e à fisiologia, eles encontraram-se ora reprimidos, ora induzidos e às vezes inalterados, indicando uma grande variação na expressão gênica. Essa variação na expressão dos genes pode refletir as diferenças temporais de flutuação que existem entre os constituintes dos diferentes níveis funcionais (Gibon *et al.* 2006).

Figura 1 – Esquema resumindo as relações entre os dados obtidos com cana-de-açúcar durante um ciclo diário e sob o cultivo em elevado CO₂. Dados de fisiologia representados em (■), proteínas em (■) e genes em (■). Setas para cima indicam aumento e para baixo indicam redução. Triângulo representa variação.

Na cana-de-açúcar as enzimas relacionadas com o processamento de CO₂ parecem sofrer pouca alteração durante a regulação da fotossíntese, pois não foram observadas modificações nas velocidades de carboxilação da PEPc ($V_{pm\acute{a}x}$) e na

velocidade de regeneração do PEP (V_{pr}), bem como a menor expressão da PEPc observada não levou a uma redução da taxa de fotossíntese. Como a Rubisco foi identificada somente em alto CO_2 , onde havia um maior crescimento da planta, é difícil saber se há maior expressão desta enzima quando a fotossíntese está em funcionamento ou se houve problemas de detecção da mesma durante a análise.

Outro ponto de regulação da fotossíntese na cana-de-açúcar pode estar associado à manutenção de baixa concentração de malato no citossol, uma vez que a enzima malato desidrogenase citossólica (cytNADP-MDH) foi encontrada com maior expressão em alto CO_2 .

A presença de maior quantidade de proteínas envolvidas no processo de desenvolvimento da planta pode ser o responsável pela sinalização direta ou indireta da enzima fosfoglicerato mutase (PGAM), que está relacionada com a respiração, fenômeno decorrente do maior crescimento observado. Além das proteínas relacionadas ao desenvolvimento, foi observada maior expressão dos genes celulose sintase 7 e celulose sintase-like 9, que participam da biossíntese de parede celular. A maior expressão destes genes pode ser decorrente da maior disponibilidade de carboidratos que é percebida diariamente pelas células devido à maior taxa de fotossíntese. A maior disponibilidade de carboidratos também pode ser responsável pela indução do gene *germin-like protein* (GLP) que está envolvido no processo de crescimento. Sugere-se que o maior conteúdo de açúcares produzidos pela fotossíntese é rapidamente exportado para os órgãos dreno devido à maior expressão da invertase de parede celular (CWI). Estes açúcares exportados são os responsáveis pela promoção do maior crescimento das plantas que pode ainda estar associado à redução da expressão do gene do citocromo P450, envolvido no metabolismo secundário.

O papel da raiz não foi explorado neste trabalho, mas seu crescimento através de mecanismos que não foram determinados neste trabalho, também faz parte da sinalização da fotossíntese. Quando este crescimento foi limitado pelo vaso, proporcionou uma redução da taxa fotossintética.

Em cana-de-açúcar, embora estudos sobre regulação da fotossíntese estejam descritos na literatura (McCormick *et al.* 2006; McCormick *et al.* 2008; McCormick *et al.* 2009), nenhum deles aborda esta regulação em diferentes níveis funcionais, o que faz do presente trabalho um avanço significativo no conhecimento a cerca de como estes

diferentes níveis se relacionam para manter a fotossíntese e o crescimento na planta. Os dados apresentados neste trabalho abrem novas perspectivas para estudos mais aprofundados sobre cada um dos pontos de regulação, podendo estes serem fatores chave nos processos de regulação do metabolismo da cana-de-açúcar.

Considerando que a fotossíntese e o crescimento são processos que determinam a produtividade final de plantas de cana-de-açúcar, os pontos de regulação descritos por este trabalho têm o potencial de ser utilizados biotecnologicamente como ferramentas (marcadores) que auxiliem na determinação de cultivares mais produtivos.

Além disso, com os dados obtidos é possível inferir que o aumento do CO₂ na atmosfera irá beneficiar as plantas de cana-de-açúcar, seja este benefício decorrente do estímulo no início do desenvolvimento como visto por Vu *et al.* (2006) ou decorrente da melhora nas relações hídricas em regiões com menor disponibilidade de água como o observado neste e em outros experimento com plantas C₄. Segundo estudos brasileiros (BNDES & CGEE 2008) estima-se que para atender à demanda projetada para os próximos anos, deverá haver expansão da cultura de cana-de-açúcar em 6 milhões de hectares. Esta expansão deverá ocorrer principalmente para regiões onde o déficit hídrico é mais acentuado e desta forma, o aumento do CO₂ previsto com o avanço das mudanças climáticas poderá auxiliar induzir a manutenção da taxa de crescimento das plantas nessas regiões e/ou permitir a redução de irrigação. Os modelos de zoneamento agrícola atuais não levam em consideração esse fator (Brunini 2010) e, desta forma, a inclusão destes dados nas modelagens pode auxiliar na tomada de decisões estratégicas para o setor de produção de açúcar e etanol a partir de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth EA & Long SP (2005). What have we learned from 15 years of free air-CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165: 351- 372.
- Ainsworth EA, Leakey ADB, Ort DR & Long SP (2008). FACE-ing the facts: inconsistencies and interdependence among field, chamber and modeling studies of elevated [CO₂] impacts on crop yield and food supply. *New Phytologist* 179: 5–9.
- BNDES & CGEE (2008). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, RJ, 316p.
- Brunini O (2010). Zoneamento agrícola da cultura da cana-de-açúcar para o Brasil e estimativa de produtividade. *In: Tópicos em Ecofisiologia da cana-de-açúcar*. Crusciol CAC, Silva MA, Rossetto R & Soratto RP (eds.) Fundação de Estudos e Pesquisa Agrícolas e Florestais, Botucatu.pp. 27-33.
- Cousins AB, Adam NR, Wall GW, Kimball BA, Pinter Jr PJ, Ottman MJ, Leavitt SW & Weber AN (2003). Development of C₄ photosynthesis in sorghum leaves grown under free-air CO₂ enrichment (FACE). *Journal of Experimental Botany* 54: 1969–1975.
- Gibon Y, Usadel B, Bläesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R & Stitt M (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biology* 7: R76.
- Leakey ADB (2009). Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C₄ crops for food and fuel. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 276: 2333-2343.
- Leakey ADB, Uribeblanca M, Ainsworth EA, Naidu SL, Rogers A, Ort DR & Long SP (2006). Photosynthesis, productivity and yield of maize are not affected by open –air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought. *Plant Physiology* 140: 779 – 790.
- McCormick AJ, Cramer MD & Watt DA (2006). Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. *New Phytologist* 171: 759- 770.
- McCormick AJ, Cramer MD & Watt DA (2008). Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 1817-1829.
- McCormick AJ, Watt DA & Cramer MD (2009). Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* 60 (2): 357-364.
- Vu JCV & Allen LH (2009). Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of C₄ sugarcane. *Journal Plant Physiology* 166: 107-116.

Vu JCV, Allen LH & Gesch RW (2006). Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO₂. *Plant Science* 171: 123-131.

ANEXOS

Anexo 1 - Descrição das siglas utilizadas nas tabelas de correlação de Pearson.

Siglas	Descrição	Siglas	Descrição	Siglas	Descrição
Glc_F	Glicose na folha	h	Altura	Fq'/Fv'	Fração de eficiência máxima utilizada pelo fotossistema II
Fru_F	Frutose na folha	BSF	Biomassa da folha	NPQ	<i>Quenching</i> não fotoquímico
Sac_F	Sacarose na folha	BSC	Biomassa do colmo	Fo	Fluorescência mínima
Raf_F	Rafinose na folha	Chla	Clorofila a	Fm	Fluorescência máxima
Ami_F	Amido na Folha	Chlb	Clorofila b	Fv/Fm	Eficiência quântica máxima no escuro
Glc_C	Glicose no colmo	Chl total	Clorofila total	%N_F	Conteúdo de nitrogênio na folha
Fru_C	Frutose no colmo	ϕCO₂	Rendimento quântico do CO ₂	%C_F	Conteúdo de carbono na folha
Sac_C	Sacarose no colmo	Rd	Respiração no escuro	C/N_F	Razão C/N na folha
Raf_C	Rafinose no colmo	V_{pmáx}	Velocidade máxima de carboxilação da PEPc	%N_C	Conteúdo de nitrogênio no colmo
Ami_C	Amido no colmo	V_{pr}	Velocidade de regeneração de PEP	%C_C	Conteúdo de carbono no colmo
Glc_R	Glicose na raiz	g_s	Condutância estomática	C/N_C	Razão C/N no colmo
Fru_R	Frutose na raiz	Ci	Concentração interna de CO ₂		
Sac_R	Sacarose na raiz	I_s	Limitação estomática		
Raf_R	Rafinose na raiz	J_{PSII}	Taxa de transporte de elétrons		
Ami_R	Amido na raiz	Fq'/Fm'	Eficiência quântica fotoquímica operante do fotossistema II		
Photo	Fotossíntese	Fv'/Fm'	Máxima eficiência quântica fotoquímica sob luz		

Anexo 2 – (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC10) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz de carboidratos da folha. **(B)**- Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabolitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Auto valor	7.4112	5.0136	2.9225	2.2117	1.3893	1.2242	0.8413	0.7742	0.7017	0.5638
Proporção	0.296	0.201	0.117	0.088	0.056	0.049	0.034	0.031	0.028	0.023
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Ami	-0.185	-0.211	-0.051	-0.362	-0.211	0.14	-0.088	0.243	0.035	-0.248
Cell	-0.187	-0.275	-0.144	-0.198	0.049	0.192	-0.223	-0.14	0.246	-0.044
Fru	-0.299	0.067	0.203	0.103	0.025	0.055	0.289	-0.156	0.262	-0.038
Galn	-0.041	-0.316	0.156	-0.12	0.022	0.144	0.387	-0.084	-0.033	0.121
Galt	-0.247	-0.082	-0.272	0.158	0.017	-0.248	0.046	0.052	0.222	0.068
Gala Gluco	-0.193	-0.177	0.181	0.138	0.239	-0.291	-0.262	0.395	0.068	0.494
Glc 6-P Gal 6-P	0.158	-0.182	0.145	0.15	-0.48	0.001	0.276	-0.082	-0.297	-0.157
Glc	-0.274	0.084	0.248	0.038	0.053	0.002	0.221	-0.003	-0.044	0.227
Lacto	0.092	-0.279	0.101	0.221	0.155	0.148	-0.364	0.108	-0.233	-0.109
Lev	0.167	-0.108	0.098	0.091	-0.46	-0.29	-0.323	0.078	-0.218	0.238
Lyx	-0.229	-0.035	-0.245	0.299	-0.254	0.221	-0.036	-0.194	-0.121	0.219
Malt	-0.125	-0.317	-0.16	-0.128	0.131	0.272	-0.169	-0.027	-0.284	0.077
Man All	-0.08	-0.096	-0.458	-0.129	0.14	-0.272	0.101	0.098	-0.269	-0.261
Mel	0.216	-0.2	0.131	0.258	-0.066	0.121	-0.185	0.278	0.364	0.137
Myo- ino	0.185	-0.223	-0.214	0.143	0.324	-0.142	0.133	-0.181	0.087	-0.264
Ortho	0.138	-0.216	-0.228	0.156	-0.134	-0.375	0.152	0.243	0.035	-0.248
Raf	-0.119	-0.161	0.158	-0.35	-0.157	-0.353	-0.129	-0.336	0.211	-0.226
Rham	0.178	-0.247	-0.086	-0.163	-0.066	0.091	0.062	0.395	0.068	0.494
Rib Xylu	-0.263	-0.044	0.23	0.195	0.172	-0.254	-0.124	0.052	0.222	0.068
N-ace-	0.12	-0.34	0.072	0.09	0.191	0.081	0.244	-0.074	-0.126	-0.128
Psi	0.019	-0.362	0.218	0.049	0.01	-0.084	0.213	-0.003	-0.044	0.227
Sor Taga	-0.303	-0.027	-0.194	0.12	-0.142	-0.138	0.124	0.078	-0.218	0.238
Sac	-0.271	-0.112	0.125	-0.293	-0.157	-0.069	-0.009	-0.055	-0.011	0.087
Xyl	-0.29	-0.103	0.184	0.253	0.002	0.086	-0.073	-0.084	-0.033	0.121
Xyl Ara Lyx	-0.227	-0.039	-0.256	0.29	-0.237	0.23	-0.017	-0.156	0.262	-0.038

Anexo 3 - Descrição das siglas utilizadas nas análises de componente principal (PCA).

Aminoácidos		Carboidratos		Ácidos orgânicos		Outros	
Sigla	Descrição	Sigla	Descrição	Sigla	Descrição	Sigla	Descrição
5-Oxop	5-Oxoproline	Ami	Amido	Aspart	Aspartate	2-Hydroc	2-Hydroxycinnamate
Ala	Alanine	Cell	Cellobiitol	cis-Aco	cis-Aconitate	3-Hydroc	3-Hydroxycinnamate
Arg	Arginine	Fru	Fructose	Citm	Citramalate	2-Hydrop	2-Hydroxypyridine
Asp	Asparagine	Galn	Galactinol	Cit	Citrate	3-Indo	3-Indoleacetonitrile
b-Ala	beta-Alanine	Galt	Galactitol	Fum Mal	Fumarate Maleate	4-Hydrob	4-Hydroxybenzoate
Cit Arg	Citrulline Arginine	Gala Gluco	Galactonate Gluconate	Ici	Isocitrate	Ben	Benzoate
Cys	Cysteine	Glc 6-P Gal 6-P	Glc 6-P Gal 6-P	Ita	Itaconate	Dehy	Dehydroascorbate
Glu	Glutamate	Glun	Gluconate	Keto	Ketoglutarate	Ery Threi	Erythritol Threitol
Gln	Glutamine	Glus	Glucosamine	Mala	Malate	GABA	GABA
Gln1	Glutamine1	Glc	Glucose	Male	Maleate	Glyt	Glycerate
Gly	Glycine	Glucu	Glucuronate	Pyr	Pyruvate	Glyr	Glycerol
His	Histidine	Lac	Lactose	Suc	Succinate	Gluc	Glucarate
Homo	Homoserine	Lacto	Lactobionate			Hexa	Hexadecanoate
Ile	Isoleucine	Lev	Levoglucozan-like			Nic	Nicotinamide
Leu	Leucine	Lyx	Lyxose			Nicot	Nicotinate
Lys	Lysine	Malt	Maltose			Octa	Octacosanoate
Met	Methionine	Man All	Mannose Allose			Put	Putrescine
O-ace	O-acetylserine	Mel	Melibiose			Qui	Quinate
Orn	Ornithine	Myo- ino	Myo-inositol			Rib Ribu	Ribose Ribulose
Phe	Phenylalanine	Ortho	Orthophosphate			Ribf	Riboflavin

Anexo 3 – continuação.

Aminoácidos		Carboidratos		Ácidos orgânicos		Outros	
Sigla	Descrição	Sigla	Descrição	Sigla	Descrição	Sigla	Descrição
Pro	Proline	Raf	Raffinose			Shiki	Shikimate
Ser	Serine	Rham	Rhamnose			Caff	Similar to Caffeate
Thr	Threonine	Rib Xylu	Ribulose Xylulose			Sina	Sinapate
t-4-Hyd	Trans 4-Hydroproline	N-ace	Similar to N-Acetyl-[Glc Gal]			Sper	Spermidine
Try	Tryptophan	Psi	Similar to Psicose			Ste	Stearate
Tyr	Tyrosine	Sor Taga	Sorbose Tagatose			Tetra	Tetradecanoate
Ura	Uracil	Sac	Sucrose			Thren	Threonate
Val	Valine	Tur	Turanose			Unknown_At_RI345320	Unknown_At_RI345320
		Xyl	Xylose			Unknown_At_RI875200	Unknown_At_RI875200
		Xyl Ara Lyx	Xylose Arabinose Lyxose			Ure	Urea

Anexo 4 – (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC10) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz de ácidos orgânicos da folha. **(B)**- Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabolitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Auto valor	4.6324	2.8432	1.6442	0.9419	0.815	0.5645	0.2055	0.1919	0.1149	0.0328
Proporção	0.386	0.237	0.137	0.078	0.068	0.047	0.017	0.016	0.01	0.003
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Aspart	0.347	-0.323	0.226	0.009	0.07	-0.244	-0.151	-0.037	0.118	0.721
cis-Aco	0.085	-0.253	-0.523	-0.335	-0.206	-0.508	0.452	-0.172	-0.075	-0.05
Citra	-0.127	-0.493	0.198	-0.131	0.274	0.167	-0.066	-0.383	-0.647	-0.084
Cit	0.353	-0.282	-0.204	-0.12	-0.032	-0.09	-0.68	-0.096	0.271	-0.323
Fum Mal	-0.305	-0.413	0.157	0.028	0.122	-0.069	0.138	0.228	0.323	-0.107
Ici	-0.023	-0.088	-0.634	-0.121	0.474	0.4	-0.056	0.35	-0.038	0.226
Ita	-0.048	-0.138	-0.299	0.894	0.026	-0.235	-0.05	-0.047	-0.17	-0.009
Keto	-0.429	0.074	-0.171	-0.023	-0.076	0.124	-0.058	-0.504	0.276	0.464
Mala	-0.262	-0.235	-0.085	-0.052	-0.739	0.179	-0.25	0.354	-0.264	0.162
Male	-0.305	-0.413	0.157	0.028	0.122	-0.069	0.138	0.228	0.323	-0.107
Pyr	-0.44	0.083	-0.118	-0.065	0.044	-0.116	-0.315	-0.31	0.146	-0.182
Succ	0.31	-0.27	-0.057	0.184	-0.261	0.601	0.312	-0.329	0.288	-0.133

Anexo 5 – (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC10) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz de aminoácidos da folha. **(B)**- Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabolitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Auto valor	11.773	3.538	2.233	1.621	1.37	0.868	0.537	0.49	0.422	0.261
Proporção	0.491	0.147	0.093	0.068	0.057	0.036	0.022	0.02	0.018	0.011
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
5-Oxop	-0.173	0.285	0.071	-0.376	-0.021	0.117	-0.205	-0.366	0.048	0.03
Ala	-0.162	-0.353	0.107	-0.290	0.017	-0.014	-0.215	0.200	-0.126	0.068
Arg	-0.242	0.063	-0.027	0.247	-0.159	0.255	-0.133	-0.176	0.215	-0.189
Asp	-0.214	0.069	0.319	0.100	-0.256	0.136	0.143	0.220	-0.080	0.100
b-Ala	-0.065	0.226	0.245	0.151	0.523	-0.384	-0.237	0.061	-0.285	0.031
Cit Arg	-0.259	0.005	0.071	0.258	-0.006	-0.156	-0.158	-0.158	0.005	0.076
Cys	-0.23	0.132	0.153	0.002	-0.156	0.001	0.176	0.441	0.164	0.575
Glu	-0.113	0.393	-0.028	-0.315	0.126	0.17	-0.189	-0.002	0.241	-0.051
Gln	-0.207	-0.201	0.278	-0.050	-0.274	0.189	0.049	-0.053	-0.045	-0.197
Gly	-0.147	-0.367	-0.021	-0.015	0.243	-0.184	0.363	-0.245	0.1	-0.001
His	-0.227	0.227	-0.113	-0.113	-0.053	-0.276	0.115	-0.149	0.003	0.287
Homo	-0.209	0.200	0.293	-0.134	0.027	-0.085	0.172	0.088	-0.026	-0.518
Ile	-0.262	-0.047	-0.173	-0.02	0.014	0.096	-0.151	0.199	-0.298	-0.118
Leu	-0.227	-0.147	-0.258	0.223	0.005	0.029	-0.193	0.247	-0.054	-0.198
Lys	-0.229	0.015	-0.186	0.367	-0.021	-0.221	-0.128	-0.039	0.13	-0.025
Met	-0.238	0.134	0.209	0.043	0.034	-0.224	0.223	0.183	0.036	-0.262
O-ace	-0.103	-0.326	0.006	-0.45	-0.056	-0.369	-0.023	-0.011	0.017	0.005
Orn	-0.209	-0.152	0.266	0.169	-0.173	-0.100	-0.043	-0.488	0.06	0.152
Phe	-0.221	0.024	-0.412	0.015	-0.12	-0.06	0.031	0.031	-0.033	0.039
Pro	-0.195	0.065	-0.149	0.012	0.281	0.353	0.537	-0.182	-0.431	0.075
Ser	-0.197	-0.156	-0.122	-0.072	0.372	0.097	0.148	0.143	0.623	-0.084
Thr	-0.189	-0.133	0.180	0.049	0.418	0.360	-0.258	-0.027	0.021	0.246
Tyr	-0.192	0.227	-0.338	-0.132	-0.113	-0.142	0.059	-0.047	-0.043	-0.008
Val	-0.249	-0.161	-0.126	-0.196	-0.059	0.084	-0.196	-0.003	-0.243	0.014

Anexo 6 – (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC10) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz denominada outros metabólitos da folha. **(B)**- Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabólitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Auto valor	8.6419	5.0769	3.5633	2.4008	1.8629	1.166	0.9382	0.8302	0.7508	0.6365
Proporção	0.309	0.181	0.127	0.086	0.067	0.042	0.034	0.03	0.027	0.023
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
2-Hydroc	-0.066	0.213	-0.263	-0.258	-0.217	0.133	-0.272	0.091	-0.147	0.08
2-Hydrop	0.158	0.053	-0.154	-0.338	0.302	0.129	0.168	0.321	-0.03	-0.182
3-Indo	0.296	-0.108	-0.122	-0.004	0.019	-0.053	-0.269	0.032	-0.087	0.12
4-Hydrob	-0.062	0.199	-0.319	0.117	-0.247	-0.103	0.32	0.037	-0.074	0.071
Ben	-0.094	0.296	-0.056	-0.242	-0.018	0.29	0.292	-0.289	0.185	-0.002
Caff	0.303	0.031	0.108	-0.144	-0.027	-0.011	0.015	-0.121	-0.192	-0.196
Dehy	-0.122	0.074	-0.097	-0.502	0.134	-0.059	-0.069	0.137	-0.248	0.199
Ery Threi	0.103	0.139	-0.32	-0.039	-0.162	-0.237	0.242	0.042	-0.408	-0.092
GABA	-0.189	0.141	-0.161	0.154	0.223	0.357	-0.157	-0.252	-0.299	0.011
Gluc	-0.076	0.114	-0.219	0.389	0.244	-0.252	0.078	0.283	0.136	0.022
Glyt	-0.272	0.073	-0.224	-0.11	0.092	-0.127	-0.132	0.038	0.196	-0.008
Glyr	0.216	0.17	-0.187	0.203	-0.246	-0.017	0.114	0.023	-0.036	0.125
Hexa	0.042	-0.385	-0.24	-0.007	0.015	0.023	0.075	-0.024	-0.021	0.016
Nic	0.146	-0.07	-0.305	-0.23	-0.045	-0.104	-0.162	-0.208	0.46	-0.307
Nicot	-0.25	0.001	-0.245	0.168	0.104	0.246	-0.012	-0.126	-0.125	0.154
Octa	0.044	-0.359	-0.211	0.027	0.112	0.049	0.079	-0.141	-0.197	-0.023
Put	0.108	0.237	-0.179	0.147	0.279	-0.14	-0.042	-0.305	-0.009	-0.478
Qui	0.194	0.126	0.039	0.174	0.339	0.246	0.052	0.149	-0.001	-0.208
Ribf	-0.224	-0.119	0.011	0.104	-0.235	0.04	0.085	0.249	-0.226	-0.486
Shiki	0.22	0.073	-0.077	-0.003	0.174	0.371	0.127	0.463	0.172	0.114
Sina	0.299	0.078	0.088	-0.196	-0.01	-0.032	0.024	-0.103	-0.18	-0.088
Sper	0.221	0.038	-0.156	0.15	0.028	-0.086	-0.582	0.14	-0.132	0.058
Ste	0.036	-0.384	-0.209	-0.038	0.092	0.005	0.188	-0.056	0.05	0.06
Tetra	0.031	-0.399	-0.184	-0.056	0.06	0.029	0.092	-0.015	-0.013	0.031
Thren	0.263	0.109	-0.153	0.04	-0.256	-0.05	0.079	0.054	0.256	0.131
At_RI345320	-0.272	0.073	-0.224	-0.11	0.092	-0.127	-0.132	0.038	0.196	-0.008
At_RI875200	0.133	0.124	0.066	-0.014	0.406	-0.374	0.197	-0.226	-0.081	0.377
Ure	0.233	0.002	-0.151	0.138	-0.147	0.373	-0.048	-0.249	0.088	0.153

Anexo 7 – (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC10) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz de carboidratos da raiz. **(B)**- Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabolitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Auto Valor	7.3883	4.6733	2.6361	2.0099	1.6447	1.3491	1.0799	0.8524	0.7797	0.6899
Proporção	0.284	0.18	0.101	0.077	0.063	0.052	0.042	0.033	0.03	0.027
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Ami	0.043	-0.061	-0.186	-0.228	0.194	0.468	-0.233	-0.46	-0.034	0.164
Fru	-0.088	0.146	0.42	0.009	-0.124	0.332	0.302	0.038	-0.027	-0.102
Fuc Epi	-0.048	0.381	-0.153	-0.150	-0.134	-0.178	-0.095	-0.225	-0.092	-0.049
Galn	-0.224	0.217	0.063	0.236	0.276	0.074	-0.121	-0.016	0.093	-0.022
Gala Gluco	0.251	0.207	0.161	-0.024	-0.04	-0.11	-0.292	0.065	-0.007	0.266
Glc 6-P Gal 6-P	0.29	0.052	0.049	0.09	0.071	-0.107	-0.038	-0.381	0.204	-0.344
Glun	-0.077	0.386	-0.203	-0.014	0.013	0.009	0.031	-0.151	0.249	-0.040
Glus	0.236	0.175	0.148	-0.044	0.265	0.144	0.157	0.098	0.07	0.283
Glc	-0.075	0.108	0.449	-0.193	-0.182	0.191	0.269	-0.058	0.031	-0.235
Glucu	0.305	0.110	-0.051	0.152	-0.083	-0.032	-0.074	0.035	0.044	-0.219
Lac	0.275	-0.042	-0.118	0.120	-0.076	0.319	-0.018	-0.073	-0.257	-0.260
Lev	-0.186	0.153	0.088	0.244	0.082	0.291	-0.34	0.151	-0.164	-0.265
Lyx	0.316	0.064	-0.077	0.062	-0.187	-0.046	0.224	-0.036	-0.132	0.028
Malt	0.284	0.023	-0.146	0.179	0.165	0.27	0.073	0.005	0.047	-0.145
Mel	-0.049	0.228	-0.291	-0.03	0.091	0.201	0.221	0.201	0.59	-0.036
Myo- ino	0.33	-0.020	-0.026	-0.108	0.010	0.138	0.121	0.06	0.027	0.097
N-ace	-0.114	0.138	-0.073	0.247	-0.492	-0.061	-0.072	-0.078	0.079	-0.241
Ortho	-0.211	0.056	0.002	0.017	0.164	-0.066	0.348	-0.547	-0.28	0.044
Raf	0.033	-0.056	0.24	0.075	-0.462	0.27	-0.176	-0.231	0.28	0.423
Rham	-0.123	0.184	-0.316	-0.09	-0.194	0.268	0.155	0.315	-0.381	0.140
Rib Xylu	0.229	0.257	0.156	0.039	0.158	-0.027	-0.005	0.062	-0.268	-0.023
Sor Taga	0.198	0.281	0.234	-0.172	0.026	-0.131	-0.275	0.061	-0.064	0.015
Suc	-0.014	-0.122	-0.05	0.608	-0.029	0.11	-0.07	-0.056	-0.074	0.233
Tur	0.094	0.205	0.014	0.406	0.016	-0.216	0.354	-0.053	-0.018	0.274
Xyl	-0.049	0.36	-0.222	-0.13	-0.204	0.025	-0.079	-0.066	-0.135	0.142

Anexo 8 – (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC9) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz de ácidos orgânicos da raiz. **(B)** - Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabolitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
Auto Valor	2.9082	1.8373	1.3836	1.2183	0.7886	0.328	0.2455	0.1755	0.1151
Proporção	0.323	0.204	0.154	0.135	0.088	0.036	0.027	0.02	0.013
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
Mal	-0.266	0.478	-0.253	0.188	-0.349	0.638	-0.183	-0.085	-0.178
cis-Aco	-0.413	-0.302	0.04	0.412	-0.235	-0.137	0.04	-0.582	0.39
Cit	-0.321	0.042	0.101	0.3	0.828	0.294	0.145	0.047	0.024
Fum Mal	-0.402	0.147	0.528	0.086	-0.109	-0.344	-0.057	0.006	-0.63
Ita	-0.283	-0.529	-0.171	0.256	-0.243	0.101	0.09	0.682	-0.065
Keto	-0.429	-0.133	-0.023	-0.488	0.137	-0.007	-0.705	0.059	0.202
Mala	-0.122	0.028	-0.779	0.074	0.195	-0.425	-0.03	-0.15	-0.359
Pyr	-0.36	-0.121	-0.074	-0.623	-0.063	0.19	0.62	-0.169	-0.096
Suc	-0.293	0.587	-0.05	0.004	-0.078	-0.377	0.224	0.365	0.486

Anexo 9 – (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC10) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz de aminoácidos da raiz. **(B)**- Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabolitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Auto Valor	14.059	2.743	1.721	1.481	1.205	0.958	0.728	0.572	0.487	0.383
Proporção	0.541	0.106	0.066	0.057	0.046	0.037	0.028	0.022	0.019	0.015
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Ala	-0.186	0.146	0.153	-0.127	0.405	0.011	0.072	-0.418	0.102	0.110
Arg	-0.198	0.020	-0.018	-0.414	0.132	-0.042	0.156	0.366	-0.001	0.233
Asp	-0.182	0.381	0.077	0.04	0.188	0.129	0.068	-0.085	-0.052	0.144
b-Ala	-0.184	-0.115	0.279	0.306	-0.094	-0.332	0.101	-0.017	0.133	0.118
Cit Arg	-0.208	-0.005	-0.051	0.132	-0.092	-0.11	0.483	-0.292	-0.296	0.251
Cys	-0.192	0.349	0.056	-0.126	0.222	-0.036	0.167	0.017	-0.133	-0.116
Gln	-0.174	0.327	-0.213	-0.03	-0.146	-0.205	-0.256	0.099	0.221	-0.057
Gln1	-0.208	0.252	-0.130	-0.142	-0.126	-0.152	-0.128	0.12	-0.002	-0.004
Gly	-0.219	-0.087	0.282	0.073	-0.044	-0.263	-0.028	0.042	0.145	-0.303
His	-0.242	-0.055	-0.125	0.024	-0.154	0.013	0.125	0.035	-0.273	-0.028
Homo	-0.224	0.167	-0.235	0.005	-0.147	-0.078	-0.033	0.159	-0.026	-0.060
Ile	-0.206	-0.245	-0.011	-0.192	-0.080	0.199	0.014	0.300	-0.062	0.059
Leu	-0.214	-0.249	0.05	-0.068	-0.031	0.28	-0.149	-0.069	0.044	0.216
Lys	-0.231	-0.103	0.058	-0.147	0.136	-0.058	0.075	0.137	0.067	0.203
Met	-0.191	0.105	-0.237	0.301	-0.032	0.273	0.113	-0.159	0.130	-0.402
O-ace	-0.206	-0.017	-0.216	0.088	-0.217	-0.246	-0.263	-0.164	0.108	0.260
Orn	-0.091	0.198	0.369	0.412	-0.022	0.069	-0.250	0.357	-0.528	0.061
Phe	-0.231	-0.173	-0.021	-0.125	-0.100	-0.187	0.08	0.042	0.109	-0.22
Pro	-0.152	-0.258	0.415	-0.169	-0.049	-0.050	-0.127	-0.125	-0.058	-0.292
Ser	-0.235	0.162	0.175	0.045	0.070	0.020	-0.063	-0.101	0.116	-0.190
Thr	-0.196	0.027	0.053	0.167	0.059	0.468	-0.317	0.005	0.303	0.224
t-4-Hyd	-0.097	-0.212	-0.343	-0.087	0.413	-0.147	-0.438	-0.199	-0.464	-0.175
Try	-0.186	-0.160	-0.216	0.159	0.150	0.272	0.301	0.263	0.025	-0.304
Tyr	-0.208	-0.174	-0.128	0.101	-0.336	0.116	0.014	-0.248	-0.155	0.154
Ura	-0.052	-0.256	-0.168	0.443	0.478	-0.280	0.026	0.218	0.201	0.179
Val	-0.243	-0.128	0.119	-0.115	0.055	0.109	-0.108	-0.080	0.013	-0.025

Anexo 10 - (A) - Auto valores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC10) gerados pela análise de componentes principais dos dados da matriz denominada outros metabolitos da raiz. **(B)**- Valores dos coeficientes calculados para cada um dos metabolitos analisados. Valores em negrito são vetores considerados significativos na análise. Siglas encontram-se descritas no Anexo 3.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Auto Valor	4.4656	3.5857	2.8153	2.073	1.6669	1.3029	1.0986	0.9273	0.8892	0.6524
Proporção	0.203	0.163	0.128	0.094	0.076	0.059	0.05	0.042	0.04	0.03
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
2-Hydrop	0.145	0.26	0.295	0.168	-0.197	0.117	-0.268	-0.008	0.025	0.351
3-Hydroc	-0.151	0.316	0.066	0.292	0.247	0.009	-0.018	0.131	0.298	-0.339
4-Hydrob	-0.062	-0.306	0.054	0.413	-0.072	-0.252	0.126	-0.093	-0.038	-0.024
Ben	0.14	0.255	0.165	0.414	-0.124	-0.041	0.044	-0.118	-0.221	0.202
Dehy	0.024	0.11	0.013	-0.199	-0.427	-0.193	0.016	0.634	-0.286	-0.128
GABA	-0.22	0.112	-0.111	0.026	-0.5	-0.143	-0.07	-0.27	0.233	0.003
Gluc	-0.35	-0.143	-0.103	0.07	-0.068	-0.261	0.162	0.165	0	-0.117
Glyt	-0.056	0.401	0.028	0.274	0.24	-0.081	-0.062	0.022	0.086	-0.33
Glyr	-0.189	-0.268	0.245	0.214	0.19	0.085	-0.262	0.123	-0.235	0.229
Hexa	0.213	-0.004	-0.392	0.172	0.016	-0.223	-0.368	-0.085	-0.181	-0.098
Nic	-0.016	0.133	-0.393	0.088	0.131	0.193	0.33	0.039	-0.285	-0.085
Nicot	-0.138	0.307	0.356	-0.031	-0.02	-0.063	-0.062	0.174	-0.209	-0.167
Nona	0.219	0.2	-0.157	0.138	-0.086	0.283	0.375	0.029	0.185	0.238
Put	-0.337	0.084	-0.308	0.032	0.047	0.175	-0.005	0.071	-0.074	0.085
Qui	0.07	0.148	-0.105	-0.025	0.264	-0.461	0.151	0.381	0.307	0.537
Ribf	0.107	-0.124	-0.214	0.092	-0.175	0.261	-0.464	0.324	0.469	-0.102
Ribo Rib	-0.339	0.124	0.002	0.041	-0.281	-0.263	0.056	-0.241	0.145	0.065
Sper	-0.321	0.241	-0.202	-0.153	-0.072	0.166	-0.094	-0.085	-0.055	0.207
Ste	0.248	0.071	-0.358	0.212	-0.049	-0.264	-0.197	-0.038	-0.254	0.034
At_RI345320	-0.346	-0.227	-0.048	0.207	0.187	-0.03	-0.112	0.104	0.049	0.175
At_RI875200	0.248	-0.241	0.105	0.2	-0.171	-0.085	0.304	0.044	0.216	-0.198
Ure	-0.138	-0.109	-0.029	0.398	-0.266	0.354	0.155	0.26	-0.107	0.054

Anexo 11 - Representação do mapa metabólico da **folha** de cana-de-açúcar construído a partir dos dados obtidos pela análise de GC-MS.

Anexo 13 – Sequencia dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Sequencia (5' - 3')			
SAS	Direto (Foward)	Reverso (Reverse)	
1	SCACLR1129A11.g	CCTTCCCCTCGCACTCAAT	ACCTCGCCAAGCAGAAGAAA
2	SCACLR2007B05.g	AGTTAAAGAAGAGCGTAGCAGCAAT	AAAACAGAGAAGAACTCCCCCATT
3	SCCCCL3001A05.g	CTTCAAAGGGACACGATCATGA	TTGAGCTGGACCTTGATGAGGTA
4	SCCCCL4003E08.g	AACTGGGAAGCTGTCCTTCTCA	ACACAGCATCAGTCTCATTGAAAA
5	SCCCRT1C06D06.g	ACCGACCCACAAAGTATGC	GTGCAATGTGGTTGCTGTGAT
6	SCJLLR2020E06.g	CAACACAAGCGTGCAGGAAC	TACTGCAGCCTGGAACAAACA
7	SCQGLR2025B12.g	GGAGGGTCGTCTCCTTGTGA	CCTGAAGGCCCATCCAT
8	SCRULR1020D09.g	CACCATCAACGGGTCAATCC	TCCTCCCCGAACATGAATC
9	SCRULR1020D11.g	TGACACCATGGACCATGCAT	GGCGACTAGCTCGATCTTTTCA
10	SCSBSB1053D03.g	TTTCAACCCAATCGTGGATGT	AGCTTGCCAAACAAACGCTAA
11	SCSBST3096E08.g		
12	SCSBSD2029H02.g	CGTACTGCTTGTGCTTTGCA	CACGTTCGTAGGGCGTCTCT
13	SCVPRT2079H06.g	GGAAATCTTACTCCTTTGCTTCA	GGTCCCCGGCTTGTATGGA
14	SCCCLB1C06E01.g	GAGTCTGGACGAGGGCAATCT	AGCCCGAGTCCGATTTTCTC
15	SCCCRZ2002G07.g	AAAATCAATTGGAGCAAGTTGAGA	AGACTTACCTAGACCGGTGTCA
16	SCRLLR1038H01.g	TGCAACTGATGAAGAAGCAGTTC	GACCTTTCCCCAATTAATAGTAGGT
17	SCJFLR1013H10.g	TGCCCTGCTATTGAAGTTTGTG	GCTGATCGCTGTTCCATGCT
18	SCCCCL5004B03.g	GGAGTGGTCGGTGACCTTGA	CGGCGTGCAGATGTTCT
19	SCEQRT2100B02.g	TCCAGTACATGACGCCCTGTT	CACGTGCTTGACACAATACTAACG
20	SCEQLB1063G04.g	GGAGTACTACCTGCATGTTTTAGC	TGAAAGCTCGGCGTTAGAAATAA
21	SCAGLR1043E04.g	TGAAGCGGACGAATTTGAGTAG	AGCTCGCCATAGAGACTTGGAT
22	SCCCRZ2001C01.g	CTTCGTATGAGAACTAGTGCCTTTGT	CAGGGCATTATGCTACCGGT
23	SCEPLB1042B08.g	TTCTGCCTGAATTTGGCAAGTG	GGCATCGAGCACACCAATGC
Normalizadores			
UBE2	CAGGTCCTGCTGGTGAGGAT	CACCTCCAGCATATGGACTATCAG	
PUB	CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT	CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG	
UB	GGTGCCGGCTTGGA	TTTGTTTCGGTTTCAAGTCGATAA	
ACT	CCAGTTCCATTGTCACAAACAAG	TCTCCGGAATCCGTAGCAAA	
GAPDH	CACGGCCACTGGAAGCA	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC	