Bruna Cersózimo Arenque

Metabolismo de carboidratos da espécie
amazônica *Senna reticulata* sob
cultivo em alto CO₂

São Paulo

2010

Bruna Cersózimo Arenque

Metabolismo de carboidratos da espécie amazônica

Senna reticulata sob cultivo em alto CO₂

Carbohydrate metabolism of the amazonian tree

Senna reticulata under elevated CO₂

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Prof Dr. Marcos Silveira Buckeridge

São Paulo

2010

Arenque, Bruna Cersózimo

Metabolismo de carboidratos da espécie amazônica *Senna reticulata* sob cultivo em alto CO₂

112 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Carboidratos 2. Alto CO₂ 3. *Senna reticulata* I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge
Orientador

A meu jacaré dedico

“.... e na Paz, que é superior a todo intelecto, ele encontra a sua libertação de todas as aflições e dores da vida. Quando, porém, a sua mente está livre destes elementos de inquietação, fica aberta ao influxo da sabedoria e da ciência.”

Bhagavad - Gîtâ
(trad. Francisco Lorenz)

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as pessoas e oportunidades especiais que Ele coloca em minha vida.

Ao Dr. Marcos S. Buckeridge pela orientação e confiança depositada e ainda pela liberdade concedida nos momentos de decisões que contribuiu imensamente para que meu crescimento fosse triplicado. Obrigada Marcos.

A meu querido pai por ser meu porto seguro sempre.

A minha mãe, nona e irmãos por serem meus exemplos de vida.

A meu filho por todo amor e paciência nas incontáveis brincadeiras concomitantes a pilhas de livros, artigos e notebooks.

Ao meu companheiro Olidan que caminha ao meu lado e me traz ensinamentos que vão muito além das grandezas ecológicas e matemáticas.

A minha parceira Adriana Grandis por respirar *Senna reticulata* junto comigo e fazer nascer dessa convivência um imenso respeito, carinho e admiração. Sem palavras Dri.

A Dra. Helenice Mercier e Dr. Gilberto Barbante Kerbauy por toda a confiança, ensinamento e auxílio nas horas difíceis.

A Dra. Maria Tereza Piedade, Dra. Astrid Wittmann , Dra. Maria Astrid Rocha Liberato, Dr. J. Schöngart e Dr. José Francisco Gonçalves (INPA-AM) pelos comentários pertinentes e todo suporte na maravilhosa visita a Amazônia Central.

A Amanda P. Souza por todo carinho, amizade e extraordinária co-orientação extra-oficial.

Ao Mauro Marabesi, Wanderley D. dos Santos e Simone Godoy pelos duros ensinamentos teóricos porém sempre repletos de alegria, incentivo e amizade.

A Giovanna B. da Silva, Aline Cavalari e Eduardo Alberto Giachero pela paciência e valiosos ensinamentos a respeito das altas performances peculiares a um Dionex.

A Danilo Santos, Paloma Lopes, Vanessa, Norberto Palácios, Eglee Igarashi e Ana Maria pela ajuda impagável em toda a parte experimental, burocrática e laboratorial. Sem vocês tudo teria sido MUITO mais difícil.

A Leila Mortari, Augusto Crivellari e Thalita Encarnação por todas as pertinentes e inteligentes discussões e ainda mais por toda a alegria proporcionada.

A Mari Ionashiro por sua amizade tão querida, além de toda sua paciência e incentivo.

A todas as pessoas que fizeram do Lafieco sua casa para auxiliar nas coletas 24 horas. Muito obrigada.

A Isabela e Camila que mesmo de longe contribuem muito, há 15 anos, para a manutenção de minha integridade física e mental. Obrigada meninas.

A Andressa Barbara Scabin, Tatiana Cunha, Marco Antonio Rêgo e Ricardo Dutra Nicácio que me ensinaram que a biologia é aquele lugar maravilhoso onde voltamos a ser criança todos os dias ☺

A todos os colegas, professores e funcionários dos Departamentos de Botânica e Ecologia que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Eletronorte, a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) por financiarem este projeto.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo de carboidratos	1
<i>Amido e sacarose: principais carboidratos não estruturais</i>	3
<i>Constituintes da parede celular</i>	6
<i>Relações fonte-dreno</i>	7
<i>Sinalização por açúcares</i>	8
1.2 Elevada concentração de gás carbônico e o metabolismo de carboidratos	10
1.3 A espécie <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby (Leguminosae)	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Obtenção do material vegetal	16
3.2 Dados microclimáticos	17
3.3 Delineamento experimental	17
3.3.1 Experimento ao longo do crescimento	19
3.3.2 Experimento ao longo de 24 horas	20
3.4 Análises bioquímicas	21
3.4.1 Análises de açúcares solúveis	21
3.4.2 Análise de amido	22
3.4.3. Análise de lignina	23
3.4.4 Fracionamento da parede celular	24
3.4.5 Análise de dados	26
4. RESULTADOS	30
4.1 Experimento ao longo do crescimento	30
4.1.1 Dados microclimáticos	30
4.1.2 Carboidratos não estruturais	31
4.1.3 Carboidratos estruturais	49
4.1.4 Lignina	50
4.2 Experimento ao longo de 24 horas	51
4.2.1 Dados microclimáticos	51
4.2.2 Carboidratos não estruturais	52
5. DISCUSSÃO	69
<i>Caracterização do metabolismo de carboidratos de Senna reticulata</i>	69
<i>Efeitos do alto CO₂ sobre o metabolismo de carboidratos</i>	73
<i>Variações temporais no metabolismo</i>	76
6. CONCLUSÕES	84
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Resumo

Plantas típicas de regiões alagáveis tendem a apresentar diversas estratégias morfológicas e fisiológicas a fim de otimizar as chances de sobrevivência nestes ambientes. Um dos principais mecanismos, porém menos estudados, é a plasticidade encontrada no metabolismo de carboidratos que está diretamente ligado a alta demanda energética inerente a estes locais. *Senna reticulata* (Leguminosae) é uma espécie pioneira típica de planícies sujeitas ao regime anual de inundação da Amazônia Central, considerada uma das mais eficientes colonizadoras destes ambientes, além de extremamente tolerante ao alagamento. Neste trabalho, pela primeira vez foram caracterizados os padrões de reserva e de mobilização de açúcares desta espécie no período que corresponde ao seu estabelecimento no início da sua primeira fase terrestre. Adicionalmente o efeito da elevada concentração de gás carbônico foi verificada cultivando-se as plantas em câmaras de topo aberto (OTC's) em concentrações de CO₂ ambiente (~380 µmol) e elevado (~760 µmol). Foram realizadas coletas destrutivas para análises de conteúdo de carboidratos não estruturais ao longo de 90 dias e ao longo de 24 horas. Foi verificado que *S. reticulata* possui altos níveis de amido foliar indicando que essa reserva pode estar diretamente relacionada a estratégia de constante produções de novas folhas que esta espécie apresenta. As razões sacarose:monossacarídeos se apresentaram altas em todos os órgãos analisados especialmente na raiz indicando que esta espécie pode apresentar estratégias metabólicas relacionadas também a estação seca pois além da sacarose poder ser utilizada como principal substrato na formação de raízes adventícias em condições de alagamento, também pode ser útil na regulação osmótica da raiz em locais com solos que apresentam baixa disponibilidade hídrica. A elevada concentração de gás carbônico promoveu um aumento significativo das reservas de amido na folha e no caule além de diminuir a taxa de degradação de amido transitório durante o período noturno. As concentrações de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) apresentaram tendência de diminuição sob condições de atmosfera enriquecida provavelmente devido à maior utilização dos mesmos para o crescimento da raiz. Este conjunto de respostas indica que essa espécie responde de forma positiva a elevada concentração de gás carbônico utilizando-se de possíveis mecanismos que diminuem a sinalização mediada por açúcares como, por exemplo, a habilidade de aumentar a capacidade de seus drenos já existentes, promovendo a mobilização do excesso de carboidratos para reservas e crescimento.

Palavras – chave: carboidratos, elevado CO₂, *S. reticulata*, alagamento, Amazônia.

Abstract

Plants of floodplains tend to show many morphological and physiological strategies to get higher survival rates in this places. One of them but with received less attention is the plasticity showed by carbohydrate metabolism that is directly linked to high energy demand at this sites. *Senna reticulata* (Leguminosae) is a pioneer tree which is common in floodplains sites submitted to an annual pulse of flooding at Central Amazonian and one of the most efficient colonizers at this sites besides extremely flooding tolerant. In this work by the first time was made the characterization about reserves and mobilizations patterns of sugars on the time range that corresponding to the establishment at the initial first terrestrial phase. Additionally, the effect of high CO₂ was checked by growing plants in Open-Top-Chambers (OTC's) with ambient (~380 µmol) and elevated (~760 µmol) CO₂ concentrations. It was made systematic harvests along periods of 24 hours and 90 days to determinate the carbohydrate non-structural content. It was founded that *S. reticulata* had higher levels of starch in leaves showing evidences that this reserve is directly linked with constantly production of new leaves strategy. The ratio sucrose:monosaccharides was high in all organs but specially in roots showing evidences that this specie has metabolic strategies also related with drought periods because besides sucrose could be used as the aim substrate to adventitious root formation at flooding conditions and can be useful too on the osmotic regulation of roots in sites with low moisture content soil. The high levels of carbon dioxide promote significative increase of starch in leaves and stem besides decrease the degradation rate of transitory starch in leaves in the dark period. The levels of soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) showed tendency of decrease under high CO₂ conditions probably due to higher use in root growth. This set of answers evidence that this tree has positively response to high CO₂ useful by possible mechanisms that decrease the signaling through sugars like for example the big ability of increase capacity of preexistents sinks to promoting the surplus carbohydrates mobilization to reserves and growth.

Key words: carbohydrates, high CO₂, *S. reticulata*, flooding, Amazonian.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo de Carboidratos

Diversas características importantes diferenciam os vegetais de outros organismos e o metabolismo de carboidratos pode ser citado como uma importante propriedade que auxilia no entendimento da natureza singular de um ser vivo autotrófico (Dennis & Blakeley, 2000).

A partir da utilização de energia luminosa, as plantas são capazes de converter dióxido de carbono, água e íons inorgânicos em compostos orgânicos compatíveis com a necessidade da célula. Através desse processo denominado fotossíntese, os organismos produzem compostos que não poderiam ser formados sem um aporte de energia. Nestes, a energia armazenada é posteriormente utilizada em processos celulares do vegetal como por exemplo, no suprimento da demanda energética e de numerosas vias anabólicas (ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e polissacarídeos) e como fonte de energia para todas as outras formas de vida (Taiz & Zeiger, 2009).

O crescimento dos organismos e a produtividade primária dos ecossistemas são dependentes do processo fotossintético. A primeira etapa deste inicia-se quando a luz solar é capturada pelos complexos coletores de luz que direcionam a energia luminosa para os centros de reação fotoquímica nos fotossistemas I e II localizados nas membranas dos tilacóides dentro dos cloroplastos (Cruz *et al.*, 2004). A energia química liberada na reação de oxidação da água é processada pela cadeia de transporte de elétrons por uma série de carregadores que produzem poder redutor (NADPH) e moléculas de alta energia (ATP), que serão utilizados nas reações de redução do gás carbônico (Melis, 1999).

A mais importante rota de fixação do CO₂ é o Ciclo de Calvin (ciclo redutor das pentoses fosfato), encontrado em alguns procariotos e em todos os eucariotos fotossintetizantes, da alga mais primitiva até a angiosperma mais avançada. Portanto, este ciclo pode ser considerado como o ponto de partida do metabolismo de carbono das plantas superiores (Martin *et al.*, 2000).

O CO₂ é difundido da atmosfera para os espaços intercelulares do mesófilo foliar através dos estômatos. Após a difusão para o interior dos cloroplastos inicia-se a via C₃ com o gás carbônico sendo enzimaticamente combinado à ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) através da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO) e formando um intermediário instável de 6 carbonos. Este último dissocia-se em duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) que são convertidos à trioses-fosfato (triose-P) em reações que requerem ATP e NADPH (Sharkey, 1985).

As trioses-P são o principal produto da assimilação fotossintética de carbono nos cloroplastos. Essas moléculas podem ser exportadas para o citosol, sendo utilizadas na síntese de açúcares solúveis, açúcares alcoóis, oligossacarídeos solúveis (ex. frutanos), ou ainda na respiração. Alternativamente, a triose-P pode ser mantida dentro do cloroplasto para utilização na síntese de amido ou para regeneração do aceptor inicial do CO₂ no Ciclo de Calvin. A maior parte das trioses-P formadas (gliceraldeído 3- fosfato e dihidroxiacetona fosfato) é dirigida para a regeneração da RuBP, enquanto 1/6 delas podem ser desviadas para a síntese de amido e/ou sacarose (Leegood *et al.*, 2000).

Após a formação das trioses-P, dois importantes “pools” alimentam o metabolismo de carboidratos das plantas: um é composto pelos intermediários da via das pentoses fosfato, juntamente com as trioses-P; e o outro é constituído pelas hexoses fosfato. Esses “pools” metabólicos estão localizados tanto no citosol como nos plastídeos, comunicando-se através de proteínas carreadoras de membrana altamente específicas que exportam trioses-P em troca de fosfato inorgânico (Pi). A direção do fluxo entre esses “pools” é determinada pela demanda celular (Dennis & Blakeley, 2000). Em tecidos fotossintetizantes, esse fluxo também é regido pelas condições luminosas já que pelo menos cinco enzimas do Ciclo de Calvin são reguladas pela luz, incluindo a Rubisco (Taiz & Zeiger, 2009).

Os metabólitos do pool de hexoses fosfato (glicose 1-fosfato, glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato) estão em equilíbrio devido à ação de duas enzimas: a fosfoglucomutase e a glicose 6-fosfato isomerase, responsáveis pela interconversão destes três metabólitos. A entrada neste “pool” pode ser feita através de metabólitos provenientes da gliconeogênese e da fosforilação de hexoses livres (Dennis & Blakeley, 2000) e a saída ocorre em ocasiões onde há a síntese de amido a partir de glicose 1-fosfato, síntese de sacarose utilizando glicose 1-fosfato e frutose 6-fosfato,

formação de parede celular a partir de glicose 1-fosfato e através de reações oxidativas da via das pentoses fosfato (glicose 6-fosfato). É importante ressaltar que o maior dreno desses metabólitos é a utilização da frutose 6-fosfato como precursora da via glicolítica (Dennis & Blakeley, 2000).

Amido e sacarose: principais carboidratos não estruturais

O amido é o carboidrato de reserva mais abundante nas plantas em termos de quantidade, universalidade e distribuição em diferentes espécies. É constituído por diferentes polímeros de glicose arranjados em uma estrutura semicristalina tridimensional dando origem a um grânulo. Nos cloroplastos, os substratos para a síntese de amido são a glicose 1-fosfato (proveniente do “pool” de hexose) e o ATP, que após ação da enzima ADP glicose pirofosforilase (AGPase) formará ADP-glicose. Este resíduo de glicose será adicionado ao final não redutor da cadeia de glicanos via ligações $\alpha(1-4)$ e liberando o ADP. As ligações $\alpha(1-6)$ que são responsáveis pela ramificação do polímero de amido, ocorrem quando enzimas de ramificação do amido agem sobre a cadeia (Tretheway & Smith, 2000).

O amido pode ser quimicamente fracionado em dois tipos de polímeros: amilopectina e amilose. A amilopectina, maior componente do amido nas folhas, é uma molécula grande, com estrutura ramificada e responsável pelo arranjo granular. A amilose é menor, essencialmente linear e sintetizada dentro da matriz formada pela amilopectina (Zeeman *et al.*, 2004). A biossíntese de amido envolve não somente a produção de polímeros de glicose, mas também a estrutura do mesmo que se apresenta organizada dentro do grão de amido. A relativa simplicidade da via de biossíntese desse polímero não explica a enorme variabilidade de sua composição entre as diferentes espécies, variedades e tecidos. Em todas as espécies que têm sido investigadas, existem isoformas das enzimas de cada um dos passos envolvidos na biossíntese de amido, o que permite a flexibilidade para especialização e controle da biossíntese (Martin & Smith, 1995).

Existem dois tipos de amido, o de reserva e o transitório. O amido de reserva geralmente é acumulado em órgãos perenes ou de dispersão (p.ex. sementes) e está localizado em plastídeos não-verdes, denominados amiloplastos (Martin & Smith, 1995). O amido transitório é sintetizado nos cloroplastos das plantas superiores como resultado de um excesso de carbono recém assimilado. A assimilação da planta

geralmente é suficiente para suprir não somente a demanda imediata do crescimento (a partir da síntese e mobilização de sacarose), mas também para acumular compostos na folha (síntese de amido transitório). Durante a noite subsequente ao período de assimilação o amido transitório é degradado gerando substratos que serão utilizados na síntese de sacarose. Este açúcar proverá esqueletos de carbono e energia tanto para as células foliares como para os tecidos não fotossintetizantes. Portanto, a partir da degradação noturna do amido, dá-se continuidade à provisão de carbono necessária ao crescimento da planta (Smith & Stitt, 2007). Mutantes que sintetizam menores quantidades de amido durante o dia ou que possuem menor capacidade de degradação durante a noite, apresentam taxas de crescimento reduzidas sob diferentes condições ambientais (Smith *et al.*, 2005)

As taxas de acúmulo de amido e a magnitude da variação ao longo do ciclo claro/escuro variam de forma considerável. Primeiramente diferentes espécies acumulam proporções distintas de amido em seus cloroplastos. Enquanto *Poa annua* L. particiona a maioria do seu carbono recém fixado em sacarose e/ou frutanos e reduz sua síntese de amido a menos de 2% (Borland & Farrar, 1988), *Beta vulgaris* L. particiona 40% para a síntese de amido em suas folhas (Li *et al.*, 1992). Outros fatores que influenciam no conteúdo e na variação diária deste carboidrato são a idade foliar, os tipos de células fotossintetizantes (Williams *et al.*, 1989) e as condições de crescimento como: comprimento do fotoperíodo, densidade de fluxo de fótons e temperatura noturna (Hewitt *et al.*, 1985; Fondy *et al.*, 1989). Plantas sob deficiência de nutrientes (como nitrogênio ou fósforo) e plantas sob elevado nível de gás carbônico geralmente apresentam aumento na concentração de amido foliar (Paul & Stitt, 1993; Farrar and Williams, 1991; Rufty *et al.*, 1998).

A degradação do amido pode ocorrer através de duas rotas bioquímicas distintas – a fosforolítica que produz hexoses fosfato e a hidrolítica que produz açúcares livres como glicose e maltose. Existem diversas evidências demonstrando que, durante a noite, a via preferencial de degradação é a hidrolítica, indicando que as cadeias de glicose são primariamente quebradas pela atividade amilolítica e que o metabolismo da maltose é parte extremamente importante do metabolismo de carbono noturno (Sharkey *et al.*, 2004).

A degradação do amido transitório precisa ocorrer de forma extremamente integrada com o metabolismo citosólico, e em particular com o metabolismo de sacarose (Tretheway & Smith, 2000). Fondy e Geiger (1982) mostraram que a degradação do amido em folhas de beterraba ocorria em uma taxa de 0,23 mg C cm² por minuto, enquanto a síntese de sacarose apresentava valores bem próximos de 0,16 a 0,23 mg C cm² por minuto.

A sacarose é o principal produto da fotossíntese, respondendo por boa parte do carbono que é fixado nas folhas verdes (Dennis & Blakeley, 2000). Esse açúcar é composto por uma molécula de frutose e outra de glicose. Sua síntese ocorre no citosol e pode ser considerada uma forma de reserva nos vacúolos de diversas espécies (p.ex. beterraba, cana-de-açúcar e cenoura). Esse dissacarídeo também apresenta um importante papel como açúcar de transporte (de curta e longa distância) na maioria das árvores, principalmente pela característica não redutora que este composto apresenta (os átomos de carbono anomérico da glicose e da frutose estão envolvidos na ligação glicosídica impedindo os grupos redutores destes dois açúcares de sofrerem oxidação). Duas enzimas-chave são encontradas como principais reguladoras do fluxo de sacarose: frutose 1,6 bifosfatase (FBPase – que atua na formação da frutose 6-fosfato) e sacarose fosfato sintase (SPS - atua na etapa final da síntese). A atividade das duas enzimas podem ser reguladas tanto ao nível protéico da enzima quanto de forma alostérica (Magel *et al.*, 2000).

O nucleotídeo açúcar uridina difosfato glicose (UDP-glicose) é o substrato para diversas reações metabólicas dentro da planta, incluindo a síntese de sacarose. A reação que ocorre entre a glicose 1-fosfato e o nucleotídeo uridina trifosfato (UTP), é catalisada pela enzima UDP-glicose pirofosforilase e dá origem a UDP-glicose liberando fosfato inorgânico (Dennis & Blakeley, 2000). A UDP-glicose mais frutose 6-fosfato são transformados em sacarose 6-fosfato através da atividade da SPS. Após a formação de sacarose 6-fosfato, a enzima sacarose fosfato fosfatase (SPP) retira o fosfato do carbono 6 e dá origem à sacarose.

A degradação de sacarose pode ocorrer pela ação de duas enzimas: sacarose sintase e invertase. A sacarose sintase, apesar de também ser capaz de participar de etapas da síntese, é encontrada em elevadas concentrações nos tecidos que apresentam altas taxas de utilização da sacarose como por exemplo nos estádios de desenvolvimento das sementes (Dennis & Blakeley, 2000). Esta enzima também exerce um importante papel na síntese de celulose devido ao fato das moléculas

de UDP-glicose formadas a partir da degradação de sacarose serem precursoras da via de síntese de celulose na membrana plasmática (Amor *et al.*, 1995, Salnikov *et al.*, 2001)

Constituintes da parede celular

Moléculas que apresentam grande complexidade estrutural compõem a parede celular primária, estrutura que envolve as células vegetais em expansão (McNeil *et al.*, 1984). Os polissacarídeos são os principais constituintes desta parede (90%) seguido das proteínas (10%). Os polissacarídeos compreendem longas cadeias compostas por moléculas de açúcares ligadas covalentemente em variadas posições, podendo apresentar ramificações de diversos comprimentos (Carpita & McCann, 2000).

A celulose é considerada o polímero vegetal mais abundante, representando cerca de 15 a 30% da massa seca de paredes celulares primárias (Carpita & McCann, 2000) sendo ainda mais abundante em paredes secundárias (McNeil *et al.*, 1984). Este polissacarídeo é um glucano que apresenta longas cadeias de glicose onde os monômeros são unidos por ligações glicosídicas do tipo beta-(1-4), que necessitam de mais energia para serem quebradas quando comparadas as ligações alfa-(1-4). Ao contrário do amido, este polissacarídeo não apresenta ramificações em sua cadeia. A linearidade da molécula, juntamente com a disposição antiparalela de duas cadeias de celulose, facilita a formação de inúmeras pontes de hidrogênio entre as hidroxilas das moléculas de glicose, impedindo fortemente a hidratação do polissacarídeo (Buckeridge *et al.*, 2008). O polímero de celulose é caracterizado por sofrer pouca degradação ao longo da vida do vegetal (devendo-se a isso a nomenclatura de carboidrato estrutural) sendo mobilizado somente em circunstâncias singulares como, por exemplo na degradação de paredes celulares de reserva encontradas em sementes ou ainda na formação de aerênquima durante condições de alagamento (Buckeridge *et al.*, 2008).

A classe de glicanos que apresenta a propriedade de se ligarem às microfibrilas de celulose por meio de pontes de hidrogênio é denominada hemicelulose. Estas podem apresentar diversos níveis de ramificação, característica que influencia na solubilidade da molécula no apoplasto assim como na afinidade com as microfibrilas de celulose. As funções atribuídas às hemiceluloses são principalmente o equilíbrio das forças de tensão sofrida pelas paredes e o controle do crescimento celular. (Buckeridge *et al.*, 2008). Na parede primária das angiospermas, as duas principais hemiceluloses encontradas são o xiloglucano (XG) e o

glucoronoarabinoxilano (GAX), sendo o primeiro presente em todas as eudicotilêneas e o segundo aparecendo na maioria das monocotilêneas (Carpita & McCann, 2000).

As pectinas são polissacarídeos ácidos altamente hidratados que se apresentam embebendo as microfibrilas de celulose e hemiceluloses, porém não estando ligadas covalentemente as mesmas. A cadeia central é formada por resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações alfa-(1-4). Unidades de ramnose podem interromper esta cadeia, dando origem a longas ramificações com galactanos e arabinanos (Buckeridge *et al.*, 2008). As pectinas apresentam como principais funções a determinação da porosidade da parede, alterações de carga que modulam o pH e o balanço de íons e ainda como moléculas que reconhecem a presença de patógenos, herbívoros ou de possíveis relações simbióticas (Carpita & McCann, 2000).

Além da presença de carboidratos e proteínas, na parede celular também pode ser encontrados compostos fenólicos como a lignina. A lignina é encontrada nas paredes celulares de diversos tipos de tecidos de sustentação e vasculares, especialmente em traqueídes e elementos de vaso. A mesma é depositada, sobretudo, no espessamento da parede secundária, mas também pode ocorrer na parede primária e lamela média, em contato com a celulose e hemicelulose já existentes (Taiz & Zeiger, 2009). Porém, a deposição deste composto que confere rigidez a parede é encontrada predominantemente em paredes secundárias já que modificações posteriores da parede se tornam inviáveis (Buckeridge *et al.*, 2008). Após a celulose, a lignina é o composto orgânico mais abundante na natureza (Davin *et al.*, 2008, Dos Santos, 2008). É um polímero de constituição complexa que contém diferentes monômeros derivados do ácido cinâmico (via dos fenilpropanóides). Sua síntese se inicia no citoplasma onde os primeiros produtos (glicosídeos-monolignóis) são armazenados no vacúolo e na ocasião de síntese os mesmos são secretados para fora da membrana plasmática para a formação e deposição da lignina na parede celular (Raven *et al.*, 2001),

Relações fonte-dreno

As plantas lenhosas usam tanto os carboidratos estocados quanto os recém produzidos pela fotossíntese para o metabolismo e crescimento. Ao avançarem para os estágios sucessivos de crescimento, incluindo plântula, árvore jovem, madura e senescente, sua estrutura e a partição de carboidratos se torna complexa (Bloom *et al.*, 1985). O tecido responsável por realizar esta partição e transportar estes açúcares

ao longo da planta é o floema, capaz de levar através de fluxo de massa os carboidratos e outros solutos de uma região para a outra (Lambers *et al.*, 2008). A seiva não é transportada apenas na direção ascendente ou descendente e a translocação no floema não é determinada pela gravidade. A seiva é, na maioria das vezes, transportada das áreas de produção, denominadas *fontes* (pressão hidrostática relativamente alta no floema), para as áreas de metabolismo e/ou armazenamento, chamadas drenos (pressão hidrostática relativamente menor). Órgãos fonte podem ser folhas maduras que produzem fotossintatos além de suas necessidades ou ainda órgãos de reserva. Órgãos drenos são os não-fotossintetizantes e os que não produzem fotossintatos suficientes para suprir suas necessidades (ex.: folha jovem) (Taiz & Zeiger, 2009).

As espécies podem diferir significativamente em como os produtos da fotossíntese passam das células do mesófilo para os elementos de tubo crivado do floema (carregamento do floema) até o local onde esses compostos serão descarregados e metabolizados. Existem duas principais vias de carregamento e descarregamento do floema: simplástica e apoplástica. A primeira via ocorre através de plasmodesmos onde os solutos fluem passivamente sem gasto de energia. A via apoplástica acontece pelo meio celular apoplástico que compreende o espaço extra-membrana celular, incluindo a parede celular e os vasos condutores do xilema. Esta via geralmente funciona contra o gradiente de concentração, envolvendo transportadores específicos localizados na membrana plasmática (Lambers *et al.*, 2008).

Os tecidos-dreno competem pelos fotossintatos translocados disponíveis e a capacidade do dreno em mobilizar estes em sua direção é descrita como força do dreno, dependente de dois fatores: tamanho e atividade. O tamanho compreende a biomassa total do tecido e a atividade é a taxa de absorção de fotossintatos por unidade de biomassa do tecido dreno. Alterações no tamanho ou na atividade resultam em mudanças no padrão de translocação (Taiz & Zeiger, 2009).

Sinalização por açúcares

Além de seu papel essencial como substratos no metabolismo de carbono e energia e na biossíntese de polímeros, os açúcares têm funções importantes como primeiro mensageiros na transdução de sinais (Rolland *et al.*, 2006). Em plantas, a produção de açúcares pela fotossíntese é um processo vital e a percepção/sinalização

de açúcares modula, coordena e integra a síntese de carboidratos nos diferentes tecidos e órgãos em resposta a sinais ambientais que governam o crescimento e desenvolvimento durante todo o ciclo de vida da planta (Rolland *et al.*, 2006; Baier *et al.*, 2004). Muitos genes de plantas, que codificam enzimas e outras proteínas envolvidas na assimilação, acúmulo e mobilização de reservas têm demonstrado respostas em nível de transcrição tanto para o acúmulo como para a diminuição nos níveis de carboidratos (Lloyd & Zakhleniuk, 2004).

Atualmente descritos na literatura existem mais de um mecanismo de sinalização por açúcares (Smith & Stitt, 2007). Estudos com abordagens genéticas (Moore *et al.*, 2003) apontam a enzima hexoquinase (HXK) como um sensor de glicose. Açúcares que são substratos para essa enzima causam a repressão da expressão de genes fotossintéticos em baixos níveis fisiológicos e a repressão é bloqueada quando são utilizados inibidores específicos para a HXK (Rolland *et al.*, 2002). Em estudos com leveduras, genes da família SNF1 ("sucrose non-fermenting") codificam componentes das vias metabólicas que ligam os níveis de açúcares a expressão de genes relacionados ao metabolismo primário (Lemaire *et al.*, 2004, Smith & Stitt, 2007). De maneira análoga as proteínas quinases SNRK1 encontradas em plantas são envolvidas na expressão gênica e atividade enzimática do metabolismo primário, como parte da via de sinalização de açúcares juntamente com a ação da HXK (Francis & Halford, 2006). Existem pelo menos outros dois outros sistemas capazes de perceber os níveis deste açúcar independentemente da HXK, porém tais sensores ainda não foram descritos a níveis moleculares (Moore *et al.*, 2003). Adicionalmente, as células também possuem mecanismos que atuam como sensores dos níveis de sacarose (Wiese *et al.*, 2004).

Sensores de açúcares sinalizam para uma rede complexa e interligada de vias metabólicas (Smith & Stitt, 2007) revelando fortes interações entre os níveis de açúcares e a sinalização hormonal (Rolland *et al.*, 2006). Estes mecanismos regulam muitos processos celulares importantes em plantas, como acúmulo de fotossintatos, mobilização e reserva. Por exemplo, em condições de alta demanda por carboidratos e baixa disponibilidade de luz, o sistema de regulação aumenta a produção e mobilização de fotossintatos através do aumento da expressão dos genes envolvidos na fotossíntese (Baier *et al.*, 2004). Por outro lado, quando os fotossintatos não são prontamente necessários, genes envolvidos na síntese de amido são ativados para manter um balanço entre o suprimento de C, demanda e reserva. A expressão de genes relacionados ao transporte de sacarose e aos níveis de proteínas também são

responsivos a disponibilidade de fotossintatos a fim de integrar a demanda dos drenos com as fontes produtoras e exportadoras de carboidratos (Baier *et al.*, 2004).

Para ativar vias de transdução de sinais, os açúcares primeiramente necessitam ser percebidos e a dupla função como nutriente e molécula sinalizadora pode complicar a análise dos mecanismos envolvidos. Estudos bioquímicos evidenciam a participação de diversas proteínas quinases, proteínas fosfatases e Ca^{2+} como segundos mensageiros. Embora muitos fatores de transcrição e elementos reguladores *cis* pareçam mediar o controle de açúcar na expressão gênica, seus papéis precisos nas vias de transdução de sinais necessitam de mais investigações (Rolland *et al.*, 2002).

1.2 Elevada concentração de gás carbônico atmosférico e o metabolismo de carboidratos

Atualmente já se apresentam de forma indubitável as evidências a respeito do rápido aumento de gás carbônico atmosférico que vem ocorrendo no último século (IPCC, 2007). Ironicamente, são as florestas do período Carbonífero (360-280 milhões de anos atrás) que alimentam esse aumento de CO_2 atmosférico (Retallack, 1997). O carbono fóssil estocado nestas florestas vem sendo liberado na atmosfera a partir de atividades humanas que foram intensificadas nos últimos 150 anos. Keeling e colaboradores (1995) mostraram que o aumento de CO_2 proveniente da queima de combustíveis fósseis vem aumentando de 1 a 3 ppm por ano. Se tais emissões não forem controladas, previsões indicam aumento de 380 ppm atuais para 600 a 750 ppm até o ano de 2100 (Taiz & Zeiger, 2009).

A vegetação que recobre a superfície terrestre não é imune as mudanças na concentração de CO_2 atmosférico (Grime, 2007) e a resposta imediata que plantas C_3 apresentam diante desta condição é o aumento da taxa fotossintética. Esse aumento se deve ao fato da molécula de CO_2 ser substrato da enzima Rubisco e pela elevada concentração de gás carbônico ser responsável pelo aumento da razão $\text{CO}_2:\text{O}_2$ levando a uma diminuição da função oxigenase dessa enzima (Saxe *et al.*, 1998).

Potencialmente este aumento observado na taxa fotossintética culminaria em maior disponibilidade de carboidratos para o crescimento, porém em diversos casos a planta se mostra incapaz de utilizar ou estocar esses açúcares (Stitt, 1991, Luo *et al.*, 1997). Esta alteração promove o aumento do conteúdo de carboidratos não estruturais

(principalmente glicose, frutose, sacarose e amido) em folhas de plantas C_3 , sendo considerada uma das poucas respostas universais ao alto CO_2 (Körner *et al.*, 1995). Esse efeito é observado independentemente das plantas em estudo serem selvagens ou cultivadas, limitadas ou não por nutrientes, cultivadas em condições de campo ou casas de vegetação e se apresentam a taxa de crescimento estimulada pelo CO_2 ou não (p.ex. Havelka *et al.*, 1984; Acock *et al.*, 1990; Wong, 1990; Körner & Arnone 1992; Wullschlegel *et al.*, 1992; Körner & Miglietta 1994).

As plantas podem responder a este aumento no nível de carboidratos foliares de três maneiras não mutuamente exclusivas: diminuindo a taxa fotossintética, aumentando a capacidade de estoque temporário em folhas, caule e drenos já existentes ou ainda pela formação de novos drenos (Stitt, 1991).

Freqüentemente em experimentos realizados por períodos mais prolongados (de dias a semanas), o aumento de carboidratos não estruturais (TNC) nas folhas é associado à diminuição da fotossíntese (Krapp *et al.*, 1991; Krapp & Stitt, 1995, Jeannette *et al.*, 2000). O mecanismo pelo qual esse processo ocorre é explicado de diversas maneiras (Araya *et al.*, 2006). Uma delas diz respeito à inibição da enzima sacarose sintase pela alta concentração de carboidratos. A redução na atividade desta enzima promove o acúmulo de açúcares fosfatados no citosol diminuindo a disponibilidade de P_i , o que por sua vez suprime o antiporte P_i /triose-P através da membrana do cloroplasto (Stitt & Quick, 1989). A disponibilidade de P_i está diretamente relacionada a regeneração de RuBP, uma vez que a redução de 3-PGA demanda moléculas de ATP que são sintetizadas a partir do fosfato inorgânico. A redução nos níveis de P_i também está associada à diminuição do estado de ativação da enzima Rubisco (Stitt, 1986; Sawada *et al.*, 1992).

O papel das hexoses glicose e frutose sobre a inibição do processo fotossintético ocorrem através da repressão de genes envolvidos na fotossíntese (via hexoquinase), ao mesmo tempo em que promovem a expressão de genes de estoque e utilização de carboidratos (van Oosten e Besford, 1996; Drake *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1998; Pego *et al.*, 2000).

O acúmulo de amido nos cloroplastos também afeta diretamente a fotossíntese por promover uma deformação nas membranas dessa organela. Esta desestruturação é responsável por alterar a condutância do CO_2 dos espaços intercelulares até os sítios catalíticos da Rubisco (Nafziger and Koller, 1976), além de

se saber que grandes grânulos de amido promovem a ruptura da estrutura do cloroplasto (Stitt, 1991). Partindo das evidências de que a maior parte da degradação do amido transitório nas folhas é realizada através da via hidrolítica, onde glicose e maltose são transportadas para o citosol e sofrem ação da enzima hexoquinase, Sharkey e colaboradores (2004) propuseram que a degradação noturna do amido é intimamente relacionada com a sensibilidade da planta aos altos níveis de açúcares, indicando que quanto maior a razão amido:sacarose na planta, maior será a inibição da fotossíntese em elevado CO₂.

Outras respostas relativas à força dos drenos (preexistentes ou novos) dependem principalmente de fatores genéticos (crescimento determinado ou indeterminado, restrição a taxa de crescimento do dreno) e ambientais (disponibilidade de nitrogênio) (Stitt, 1991). Körner e colaboradores (1995) demonstraram que a força do dreno é insuficiente para explicar o acúmulo de carboidratos nas folhas, pois mesmo plantas de crescimento rápido (caracterizadas por possuírem um dreno forte) e sem restrição nutricional apresentam essa resposta. Neste mesmo trabalho os autores descrevem a existência de diferentes respostas ao alto CO₂ conforme o tipo de carregamento do floema (apoplástico ou simplástico), sendo que espécies herbáceas com carregamento apoplástico apresentaram menor quantidade de TNC quando comparadas as espécies herbáceas de carregamento simplástico sob qualquer condição de CO₂. Estes resultados denotam a importância do modo de carregamento do floema sobre a alocação de fotoassimilados em alto CO₂.

São poucos os trabalhos que contemplam dados a respeito do conteúdo de carboidratos estruturais e lignina quando comparados a grande quantidade de estudos que analisam o efeito do alto CO₂ sobre o total de carboidratos não estruturais (Teng *et al.*, 2006, Poorter *et al.*, 1997) e os poucos resultados encontrados não apresentam um padrão típico de respostas como é encontrado para os TNC.

Algumas espécies como *Quercus ilex* (Staudt *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana* (Teng *et al.*, 2006) e *Hymanaea courbaril* (Buckeridge & Gaspar, dados não publicados) apresentam aumento significativo da concentração de celulose na folha quando cultivadas em elevado CO₂. Gibeaut e colaboradores (2001) especulam que esse aumento é decorrente de uma maior alocação de carboidratos para a parede celular e/ou ao aumento da atividade da enzima celulose sintase que já foi observada em alta concentração atmosférica de gás carbônico. Entretanto, em outras espécies arbóreas como *Betula pendula* o conteúdo de celulose, ácidos urônicos e lignina

apresentam diminuição em alto CO₂, indicando que árvores tendem a investir mais carboidratos no crescimento (respiração e divisão celular) em detrimento dos componentes da parede celular quando cultivadas sob elevada concentração de gás carbônico (Oksanen *et al.*, 2005, Poorter *et al.*, 1997).

1.3 A espécie *Senna reticulata* (Willd.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae)

Senna reticulata é uma espécie de hábito arbustivo-arbóreo típica de planícies alagáveis da região de várzea que se estende por todo o curso do Rio Amazonas e seus tributários (Estados do Amazonas e Pará) (Prance, 1979). Segundo De Menezes (1978) sua ocorrência é reportada também para os estados do Amapá, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro e São Paulo, estando sempre associada a locais úmidos e bem supridos de nutrientes.

S. reticulata, conhecida popularmente como matapasto, é considerada uma espécie pioneira e altamente eficiente na colonização de áreas abertas das planícies inundáveis, ocupando áreas próximas aos canais dos rios onde muitas vezes encontram-se pastos abandonados. Possui altas taxas fotossintéticas e crescimento muito rápido, atingindo até 4m nos primeiros meses de sua primeira fase terrestre após o estabelecimento da plântula (Parolin, 2001).

A variação no nível de água dos rios e seus afluentes é ocasionada por alterações sazonais que ocorrem no padrão anual de chuvas podendo ser dividido em estação chuvosa (Dezembro a Abril) e seca (Junho a Outubro) (Ribeiro & Adis, 1989). Plantas que margeiam estes rios estão sujeitas ao regime periódico de alagamento, submetendo-as diretamente a condições deficientes de oxigênio (Ferreira *et al.*, 2009). A privação de oxigênio interfere na respiração da raiz induzindo a respiração anaeróbica. O aumento da fermentação anaeróbica resulta em uma diminuição dos carboidratos de reserva. Muitas espécies de plantas acumulam carboidratos em seus tecidos durante o período seco apresentando uma adaptação metabólica importante para as condições de anóxia durante o período de cheia (Albrecht, 2004, Piedade, 2009). Diversos autores consideram a tolerância das plantas à anoxia, proporcional ao nível e disponibilidade de açúcares que as mesmas apresentam (Su *et al.*, 1998, Crawford, 1992, Schlüter & Crawford, 2001). Em plântulas de *Himatanthus suluensis*, o principal açúcar encontrado na raiz foi o amido, indicando que esse carboidrato constitui a principal reserva para a fase inicial de estabelecimento dessa espécie. Quando submetida ao tratamento de alagamento acoplado ao escuro, o teor de amido

diminuiu concomitantemente com o aumento de açúcares solúveis, indicando uma rápida mobilização dos açúcares para provável uso na respiração anaeróbica. Esses dados mostram que tais reservas são importantes não somente para a sobrevivência a maiores períodos de alagamento como também para reposição de parte da biomassa de raiz normalmente perdida sob tais condições. (Ferreira *et al.*, 2009).

Scarano e colaboradores (1994) quantificaram o conteúdo de glicose e amido nas raízes jovens de 18 espécies arbóreas típicas de região de várzea. O estudo foi feito durante o pico do período de seca onde se esperava encontrar altas concentrações destes açúcares, pois os mesmos estariam sendo armazenados para posterior utilização durante a estação de cheia. Este alto teor foi observado somente em parte das espécies, indicando que o acúmulo de carboidratos também pode ocorrer durante a estação cheia para posterior utilização na estação seca, dependendo da estratégia de cada espécie.

Na espécie *Senna reticulata* não existem referências a respeito das características de seu metabolismo de carboidratos, seja durante o seu estabelecimento e desenvolvimento em fase terrestre ou em condições de alagamento. Esta espécie representa a fase inicial de um processo sucessional que leva a formação de uma floresta com estrutura e diversidade similar a uma área não perturbada (Parolin, 2005). Portanto, podemos considerar que o estudo de seu metabolismo de carboidratos durante a fase terrestre auxiliará no entendimento de suas diferentes estratégias de estabelecimento e crescimento antes de sofrer o alagamento. Para este estudo considerou-se que o crescimento da espécie sob elevada concentração de gás carbônico promoveria alterações diretas em seu metabolismo de carboidratos, facilitando assim o entendimento a respeito das relações fonte-dreno que essa espécie apresenta.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da elevada concentração de gás carbônico sobre o metabolismo de carboidratos da espécie *Senna reticulata*, em duas escalas temporais (ao longo do crescimento e ao longo de 24 horas)

Objetivos específicos

- Caracterizar a estrutura da parede assim como as reservas quanto ao tipo de açúcar presente em cada um dos órgãos e relacioná-los com suas possíveis estratégias de sobrevivência no ambiente natural.
- Descrever o padrão de variação temporal dos carboidratos considerando a escala de 24 horas para observação de possíveis alterações mediadas pelo ciclo claro/escuro.
- Descrever o padrão de variação temporal dos carboidratos considerando a escala de 90 dias para observação de possíveis alterações mediadas pelos processos de crescimento e desenvolvimento da planta.
- Avaliar o efeito da elevada concentração de gás carbônico sobre o conteúdo de reservas (aumento, diminuição ou manutenção) e níveis de açúcares livres dessa espécie considerando os dois intervalos temporais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Material Vegetal

As sementes de *Senna reticulata* foram coletadas a partir de matrizes localizadas na sede da Eletronorte (Belém-PA) em outubro de 2008. O material foi colocado em frasco âmbar e armazenado em geladeira (5 °C) por aproximadamente quatro meses. Em janeiro de 2009 as sementes foram escarificadas mecanicamente com o auxílio de uma lixa a fim de proporcionar maior homogeneidade para os tempos de embebição e germinação entre as sementes. O processo de embebição foi definido como o início de vida das plantas. As sementes foram colocadas em bandejas com vermiculita e germinadas em câmaras de germinação do tipo B.O.D, com temperatura constante de 30 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As plântulas foram mantidas nestas câmaras de germinação por um período de sete dias após o qual foram transferidas para a casa de vegetação, onde foram regadas semanalmente com 100 mL de solução nutritiva modificada (Epstein, 1972) (Tabela 1).

Tabela 1. Solução nutritiva modificada a partir de Epstein (1972).

Solução	Volume (por Litro de solução)
Fosfato de Potássio (0,2M)	5 mL
Cloreto de Potássio (1M)	5 mL
Cloreto de Cálcio (1M)	5 mL
Sulfato de Magnésio (0,4M)	5 mL
Nitrato de Amônio (2M)	5 mL
Micronutrientes	5 mL
FeEDTA	10 mL

3.2 Dados microclimáticos

Os dados microclimáticos foram obtidos no Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO) do Departamento de Botânica do IB-USP através de um sistema de sensores acoplados ao software RICS (RICS® -*Remote Integrated Control System*), que monitorou aproximadamente a cada 10 minutos, parâmetros de umidade e temperatura do sistema de câmaras de topo aberto, onde foi realizado o cultivo das plantas. Para as análises ao longo do crescimento foram realizadas médias diárias das quatro câmaras para esses dois parâmetros (temperatura e umidade) e para a análise ao longo de 24 horas, a média foi feita a cada quatro horas do dia correspondente a coleta.

3.3 Delineamento experimental

Após quatro dias de aclimação às condições luminosas da casa de vegetação (aproximadamente 500 μmol de PAR), as plântulas foram transferidas para vasos de PVC (10 L - 120 cm de altura – 9 cm de diâmetro), contendo terra vegetal (Plantmax® – vermiculita, turfa e lascas de *Pinus*) e mantidas sob luz solar, fora da casa de vegetação. Foi colocado um indivíduo por vaso, com exceção das plantas destinadas as duas primeiras coletas (0 e 15 dias), onde foram plantados dois indivíduos por vaso para que o número de plantas desejado fosse atingido, já que o espaço dentro das câmaras era limitado. Foram escolhidos os vasos das primeiras coletas para esta modificação (duas plantas por vaso) para que as plantas das últimas coletas não entrassem em competição, pois por serem maiores (maior tempo de crescimento) teriam maior probabilidade de sofrer limitação do crescimento radicular.

Quando as plantas completaram 10 dias de vida, 220 vasos foram distribuídos aleatoriamente em quatro câmaras de topo aberto (OTC's, do inglês *Open Top Chambers*) de 1.50 metros de diâmetro e 3.00 metros de altura, providas de um sistema de circulação de ar (Figuras 1 e 2). Em duas das câmaras foi acoplado um cilindro de dióxido de carbono (CO_2) para que a atmosfera interna da câmara se mantivesse a uma concentração próxima a 760 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ desse gás. Nas outras duas foi injetado somente ar atmosférico (380 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2). As concentrações do gás

no interior das câmaras foram monitoradas três vezes por semana com um medidor portátil de CO₂ (Testo®, modelo 435). Metade das plantas (cerca de 110 vasos) foi cultivada em atmosfera com concentração atual de CO₂ (~380 µmol.mol⁻¹) como controle do experimento e a outra metade foi submetida à atmosfera com concentração elevada de CO₂ (~760 µmol.mol⁻¹).

Figura 1. Esquema do funcionamento das câmaras de topo aberto: 1 – Cilindro de CO₂; 2 – Microválvula de CO₂; 3 – Bico injetor de CO₂; 4 – Entrada de ar; 5 - Ventilador, 6 - Plantas, 7 - Sensor de temperatura e 8 - Sensor de umidade. Setas indicam a saída do ar para o topo da câmara (modificado de Souza, 2007).

Figura 2. Câmaras de topo aberto do LAFIECO utilizadas para cultivo das plantas de *Senna reticulata* por 90 dias. Duas câmaras foram mantidas em concentração próxima a encontrada na atmosfera atual ($\sim 380 \mu\text{mol.mol}^{-1}$) e duas em atmosfera enriquecida ($\sim 760 \mu\text{mol.mol}^{-1}$).

3.3.1 Experimento ao longo do crescimento

O experimento teve duração total de 90 dias. Durante este período foram realizadas coletas destrutivas a cada duas semanas, onde foram coletados folhas, caule e raízes para a análise de conteúdo de açúcares solúveis e amido. Na última coleta (90 dias) foi amostrado também material para a análise de conteúdo de lignina e fracionamento da parede celular.

Em cada coleta (realizada sempre entre nove e dez horas da manhã) foram retiradas de duas a três plantas por câmara, perfazendo um total de dez plantas (cinco de cada tratamento). A planta foi retirada do tubo através da inversão do mesmo sobre uma tela de metal onde a terra foi cuidadosamente eliminada das raízes para que houvesse a menor perda possível de material vegetal. As raízes foram lavadas em bandejas contendo água de torneira e posteriormente secas com auxílio de papel toalha para eliminação do excesso de água. Com a utilização de uma tesoura de poda

e estiletes, o material coletado foi separado em folhas, caule e raiz. Os diferentes órgãos foram empacotados em sacos de alumínio ou plásticos e imediatamente imersos em nitrogênio líquido. O material foi seco em liofilizador, pulverizado em moinho de bola e armazenado em temperatura ambiente para posteriores análises bioquímicas.

3.3.2 Experimento ao longo de 24 horas

Este experimento foi realizado após 60 dias de cultivo em alto CO₂. As coletas foram realizadas as 2, 6, 10, 12, 14, 18 e 22 horas, totalizando sete coletas destrutivas ao longo de 24 horas.

Em cada horário de coleta foram retiradas de duas a três plantas por câmara, perfazendo um total de 10 plantas (cinco de cada tratamento). Os procedimentos de coleta foram os mesmos descritos no item 3.3.1.

Para cada horário, foram quantificados os conteúdos de açúcares solúveis e amido.

3.4 Análises bioquímicas

3.4.1 Análise de Açúcares Solúveis

Para a extração de açúcares solúveis totais, 10mg do pó obtido de cada uma das amostras foram submetidos a quatro extrações consecutivas com 1,5mL de etanol 80% (v:v) durante 20 minutos a 80°C. Para a certificação de que todo o conteúdo de açúcar solúvel foi extraído da amostra, no sobrenadante da quarta extração de cada amostra foi utilizado o método colorimétrico para a determinação de açúcares (fenol 5% e H₂SO₄ 95-97% como descrito em Dubois *et al.*, 1956). O sobrenadante obtido a partir das extrações foi reunido e armazenado a -20°C. O precipitado foi colocado em estufa 60°C até completa evaporação do etanol (aproximadamente 2 horas) e armazenado em temperatura ambiente para posterior análise de amido (item 3.4.2). O volume total da extração etanólica (6 mL) foi evaporado em um concentrador de amostras e posteriormente ressuscitado em 1 mL de água ultrapurificada. Em amostras de folha foi necessário adicionar 0,5 mL de clorofórmio 99% para o arraste de pigmentos lipossolúveis como a clorofila. Após separação das duas fases (hidrossolúvel contendo os açúcares e lipossolúvel com pigmentos), o sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos a -20°C. O material foi centrifugado a 15.700 g e uma alíquota de 500 µL foi colocado em vial para separação e quantificação dos açúcares (glicose, frutose e sacarose) por cromatografia líquida de troca aniônica de alta performance (HPAEC/PAD) em sistema Dionex-DX500. A coluna utilizada foi CARBOPAC PA1, eluída com NaOH 200mM e água. O tempo de corrida para cada amostra foi de 25 minutos com fluxo de 1mL/min, sendo que a proporção aplicada foi de 50% de cada eluente durante os primeiros 15 minutos (tempo médio para a separação de todos os picos de interesse), 100% de NaOH 200mM por 5 minutos para a limpeza da coluna e finalizando com 5 minutos com 100% de água para a regeneração. Para a curva padrão foram utilizados os açúcares glicose, frutose e sacarose (nas concentrações de 50, 100 e 200 µM). A curva padrão foi inserida na sequência de corrida a cada 10 amostras a fim de evitar erros de detecção devido a variações temporais do aparelho na determinação nos tempos de retenção, bem como para detectar possíveis variações nas concentrações dos açúcares devido a degradação dos mesmos.

3.4.2 Análise de Amido

A extração e dosagem de amido foi feita a partir do protocolo descrito por Amaral *et al.* (2007). Após remoção dos açúcares solúveis (descrito no item 3.4.1) foram adicionados ao precipitado, 0,5 mL (120 U mL^{-1}) de α -amilase (EC 3.2.1.1) termoestável de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, MEGAZYME), diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez totalizando 120 unidades de enzima. As amostras foram resfriadas até 50°C , e então foi adicionado 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL^{-1} de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. As amostras foram incubadas a 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Após as incubações descritas acima, foram acrescentados 100 mL de ácido perclórico 0,8M para parar a reação enzimática e precipitar proteínas. Após uma rápida centrifugação (2 min a 9.300 g), procedeu-se à dosagem de amido nos extratos, através de quantificação da glicose liberada no processo de hidrólise do amido. Para tal foram retiradas alíquotas do extrato ($5 \mu\text{L}$ - folha, $25 \mu\text{L}$ - caule e $50 \mu\text{L}$ - raiz), às quais foram adicionados $300 \mu\text{L}$ do reagente Glicose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil), contendo as enzimas glicose-oxidase ($\sim 11000 \text{ U mL}^{-1}$) e peroxidase ($\sim 700 \text{ U mL}^{-1}$), $290 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Neste sistema, a glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado na reação reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. Após incubação por 15 min a 37°C , o teor de glicose foi determinado em espectrofotômetro acoplado a leitor de ELISA em comprimento de onda de 490 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada solução de glicose (SIGMA), nas concentrações de 0;1;2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/mL.

3.4.3 Análise de Lignina

A análise de lignina foi realizada somente no material da última coleta do experimento (90 dias). Foram utilizadas cinco amostras de cada tratamento para cada um dos três órgãos (folha, caule e raiz). A metodologia utilizada foi modificada a partir de Dos Santos *et al.* (2008).

Para cada 30 mg de massa seca de cada órgão foi adicionado 500 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0. O material foi macerado em almofariz com o auxílio de um pistilo e após repetição desse procedimento por mais duas vezes (volume total de tampão fosfato de potássio: 1.5 mL), o macerado foi transferido para microtubos de 2 mL. O material foi centrifugado por cinco minutos a 15.700 g e o sobrenadante foi descartado. A partir deste ponto o precipitado sofreu 11 lavagens com diferentes soluções (Tabela 2) seguindo sempre o mesmo procedimento: a solução foi adicionada, o material foi agitado em vórtex por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado.

Tabela 2 – Lista de soluções utilizadas na seqüência de lavagens para extração de lignina.

Número de lavagens	Volume (mL)	Soluções
2	1	Tampão Fosfato 50mM - pH 7,0
3	1	Triton® x – 100 (v/v) 1% - pH 7,0 (SIGMA)
2	1	Tampão NaCl – pH 7,0
2	1	Água destilada
2	1	Acetona 100%

Após a 11ª lavagem, o precipitado foi seco por 12 horas a temperatura ambiente. Esse material resultante é o que compreende a fração de parede celular livre de proteínas. Foram então pesados 15 mg desta fração em microtubos e adicionado 120mL de ácido tioglicólico 98% e 600 mL de solução de HCl 2 M.

Os microtubos foram colocados em banho-maria 95 °C durante quatro horas. Após este período o material foi resfriado a temperatura ambiente, centrifugado e o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de água destilada e teve o sobrenadante descartado. Após este procedimento foi adicionado 1 mL de NaOH 0,5 M e o material foi levado ao banho-maria 30 °C com agitação por 18 horas.

O material foi centrifugado e dessa vez teve o sobrenadante guardado. O precipitado foi lavado com 0,5 mL de NaOH 0,5 M e o sobrenadante foi adicionado ao anterior. Ao sobrenadante foi adicionado 180 µL de HCl P.A.. O extrato foi mantido 4°C por quatro horas para precipitação do ácido lignotiolglicólico (LTGA). Após este período o material foi centrifugado e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de água destilada , seco em estufa a 60 °C e ressuspenso em 1 mL de NaOH 0,5 M. Este extrato foi diluído (folha - 20x; caule – 20x; raiz – 200x) e posteriormente foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada solução de lignina, nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 100; 150 e 200 mg/mL.

3.4.4 Fracionamento da parede celular

A metodologia de fracionamento de parede celular foi adaptado a partir do procedimento descrito em Gorshkova *et al.* (1996) e Silva (2005). O fracionamento foi feito a partir de 500 mg de material vegetal (folha, caule e raiz) seco em liofilizador e pulverizado em moinho de bola, coletado aos 90 dias de tratamento.

1º passo- Extração de açúcares solúveis

Primeiramente foram pesados os tubos vazios e depois colocado o pó dos respectivos órgãos. Foram feitas quatro extrações de açúcares solúveis com etanol 80% por 20 minutos agitando a cada 20 minutos. O material foi centrifugado por 20 minutos a 3220 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi colocado em estufa 60 °C para evaporação do etanol remanescente.

2° passo- Extração de amido

Foram adicionados ao material vegetal 35 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) 90%. A solução foi mantida em agitação por 24 horas a temperatura ambiente, centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado três vezes com água destilada até o pH ficar entre 6,0 e 7,0. O precipitado foi seco em liofilizador e pesado.

3° passo- Extração de pectinas

Essa extração foi feita adicionando 40 mL de oxalato de amônio 0,5% (p/v). O material foi incubado por uma hora com agitação constante a 80 °C por quatro vezes consecutivas. A cada extração o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O precipitado final foi lavado três vezes com água destilada, seco em liofilizador e pesado.

4° passo- Extração de lignina

A amostra foi transferida para erlenmeyer (125 mL) onde foi adicionado 40 mL de água deionizada, 1.25 g de NaClO (clorito de sódio) e 150 µL de ácido acético glacial. O material foi deixado em banho-maria 75 °C por uma hora com agitação a cada dez minutos. Foi adicionado 0.4 g de NaClO e 150 µL de ácido acético glacial e colocado em banho-maria novamente por mais uma hora. O material foi centrifugado por dez minutos a 1811 g. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi lavado exaustivamente com água destilada, congelado, liofilizado e pesado.

5° passo- Fracionamento da parede com NaOH para retirada de pectinas esterificadas e hemiceluloses

Foram adicionados aos tubos 20 mL de solução NaOH 8M com NaBH₄ (3mg/ml). As amostras permaneceram em agitação por uma hora a temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Terminada a extração, o material foi centrifugado e o sobrenadante recolhido, dialisado e seco em liofilizador para posterior análise de hemiceluloses. O precipitado foi neutralizado com ácido acético glacial, lavado de três a quatro vezes em água destilada, seco no liofilizador e pesado.

6º passo- Análise de celulose

Foi adicionado ao material remanescente o reagente de Updegraff (5% ácido nítrico e 15% ácido acético em água) para retirada de qualquer material não celulósico ainda persistente. As amostras foram levadas ao banho-maria a 100 °C por 90 minutos, com agitação a cada 15 minutos. Após resfriamento para a temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante descartado; o precipitado foi lavado três vezes em água destilada, seco em liofilizador e pesado para a determinação da porcentagem de celulose encontrada na matéria seca de cada órgão.

3.4.5 Análise de dados

Os dados obtidos a partir das análises bioquímicas realizadas nos dois experimentos geraram as variáveis descritas na Tabela 3. Estas foram divididas em quatro grupos distintos. O primeiro conjunto consiste em variáveis diretas não transformadas (Tabela 3A), que foram utilizadas em sua forma original. O segundo grupo inclui as variáveis que tiveram seus valores transformados para logaritmo de base 10 por motivo de ausência de simetria e/ou normalidade em suas distribuições (Tabela 3B), sendo que a verificação da normalidade de todas as variáveis se deu pela aplicação do teste de Anderson-Darling (Zar, 1999) por meio do uso do aplicativo Minitab® 14 (Statistical Software © 1972 – 2004. Minitab Inc. USA)

As variáveis calculadas (Tabela 3C) foram elaboradas a partir das variáveis diretas. A razão S:M (sacarose:monossacarídeo) foi calculada com o objetivo de determinar as forças de dreno e fonte de cada órgão (Costa, 2004). A concentração de monossacarídeos totais foi obtida a partir da soma das concentrações dos açúcares mensurados: glicose e frutose. O cálculo da razão A:S (amido:sacarose) foi determinado para a realização de inferências a respeito da percepção de açúcares pela planta (Sharkey, 2004) .

O quarto grupo são as variáveis externas que compreende o grupo de dados cedidos pela aluna de mestrado Adriana Grandis. Tais dados compreendem medidas de crescimento e trocas gasosas que foram realizadas em plantas pertencentes aos dois experimentos apresentados neste trabalho (Tabela 4C).

Análise Univariada

Com o objetivo de testar a significância da diferença entre as médias obtidas em cada tratamento, separadamente para cada coleta (horários no experimento 24 horas ou dias no experimento ao longo do crescimento), foi aplicado o teste t para amostras independentes (não pareadas) para as seguintes variáveis: GlcF, FruF, SacF, AmiF, GlcC, FruC, SacC, AmiC, GlcR, FruR, SacR, AmiR, S:MF, S:MC, S:MR, A:SF, A:SC e A:SR. Para os conjuntos de dados que não apresentaram homogeneidade de variância para os testes de Bartlett e Levene, o teste t foi executado em sua versão ajustada para a presença de heterocedasticidade. Foi considerado significativo o efeito do tratamento quando $P < 0.05$. Todos os cálculos foram realizados de acordo com Zar (1999) através do uso do ambiente computacional Minitab® 14.

Análise bivariada

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento sobre as relações entre as concentrações dos açúcares mensurados foi realizado o cálculo de correlações de Pearson para todos os pares existentes, separadamente para as matrizes de dados relativas a cada tratamento (ambiente e elevado). Em cada matriz foram consideradas significativas as correlações que apresentaram valor de $P < 0.05$. Este procedimento foi realizado para os conjuntos de dados derivados dos dois experimentos (crescimento e 24 horas).

Análise multivariada

Com o objetivo de observar os principais padrões de variação simultânea dos açúcares entre as coletas (dias ou horários) e ainda o efeito do tratamento sobre a posição dos objetos (amostras) ao longo destes gradientes de variação foi realizada uma análise de ordenação. Considerando a natureza contínua das variáveis envolvidas optou-se pela realização de uma análise de componentes principais (PCA) a partir de uma matriz de correlações de Pearson. Dentre os 12 componentes gerados foram escolhidos para análise somente os cinco primeiros, uma vez que estes representaram conjuntamente quase a totalidade da variação observada.

Tabela 3 – Siglas, descrições e unidades das variáveis: **A.** diretas não transformadas, **B.** diretas transformadas e **C.** calculadas. **D.** Variáveis externas gentilmente cedidas pela aluna de mestrado Adriana Grandis.

Variáveis diretas					
A. Não transformadas			B. Transformadas		
Sigla	Descrição	Unidade	Sigla	Descrição	Unidade
AmiC	Concentração de amido no caule	mg.g ⁻¹	GlcFT	log (10) da concentração de glicose na folha	µg.g ⁻¹
AmiF	Concentração de amido na folha	mg.g ⁻¹	FruRT	log (10) da concentração de frutose na raiz	µg.g ⁻¹
AmiR	Concentração de amido na raiz	mg.g ⁻¹	AmiRT	log (10) da concentração de amido na raiz	mg.g ⁻¹
FruC	Concentração de frutose no caule	µg.g ⁻¹	AmiCT	log (10) da concentração de amido no caule	mg.g ⁻¹
FruF	Concentração de frutose na folha	µg.g ⁻¹			
FruR	Concentração de frutose na raiz	µg.g ⁻¹			
GlcC	Concentração de glicose no caule	µg.g ⁻¹			
GlcF	Concentração de glicose na folha	µg.g ⁻¹			
GlcR	Concentração de glicose na raiz	µg.g ⁻¹			
SacC	Concentração de sacarose no caule	µg.g ⁻¹			
SacF	Concentração de sacarose na folha	µg.g ⁻¹			
SacR	Concentração de sacarose na raiz	µg.g ⁻¹			
C. Variáveis calculadas			D. Variáveis externas		
Sigla	Descrição	Unidade	Sigla	Descrição	Unidade
S:MF	Razão entre a concentração de sacarose e a de monossacarídeos totais na folha	-	MSFolha	Massa seca foliar total	g
S:MC	Razão entre a concentração de sacarose e a de monossacarídeos totais no caule	-	MSCaule	Massa seca do caule	g
S:MR	Razão entre a concentração de sacarose e a de monossacarídeos totais na raiz	-	MSRaiz	Massa seca da raiz	g
A:MF	Razão entre a concentração de amido e a de sacarose na folha	-	MSTotal	Massa seca total	g
A:MC	Razão entre a concentração de amido e a de sacarose no caule	-	Asat	Assimilação máxima	µmol CO ₂ m ² s ⁻¹
A:MR	Razão entre a concentração de amido e a de sacarose na raiz	-	Re	Respiração no escuro	µmol CO ₂ m ² s ⁻¹
			PAR	Fluxo de fótons fotossinteticamente ativos	µmol fótons m ² s ⁻¹
			T	Temperatura interna das OTC's	°C
			RH%	Umidade relativa do ar no interior das OTC's	-

O uso da análise de variância para dois fatores (ANOVA *Two-Way*) permitiu verificar quanto da variação representada por cada eixo (PC1 ao PC5) pode ser atribuída: 1. ao efeito da elevada concentração de gás carbônico; 2. ao efeito das diferentes datas e horários de coleta; e 3. ao efeito da interação entre estes dois fatores.

Para explorar a relação entre os eixos principais e os centróides (média dos postos) de cada coleta, bem como entre ambos e as variáveis originais, foram confeccionados gráficos “biplots de distância” no espaço reduzido daqueles componentes que mostraram, na análise de variância, resposta significativa ao tratamento. Este procedimento foi realizado tanto para matriz gerada a partir dos dados do experimento ao longo do crescimento quanto para os dados da coleta 24 horas.

Os valores dos escores dos objetos (amostras) para os cinco primeiros componentes principais (em ambos os experimentos) foram utilizados para a confecção do cálculo de correlação de Pearson entre estes e as variáveis externas. No experimento ao longo do crescimento foram utilizadas as seguintes variáveis: MSFolha, MSCaule, MSRaiz, MSTotal, Asat e Re. Para as correlações relativas ao experimento de curso diário (Asat, T e RH) foram geradas as médias de cada ponto e, com estas, calculadas correlações de Spearman devido ao baixo número amostral, uma vez que a assimilação (Asat) não foi mensurada nos mesmos indivíduos que foram amostrados para as análises de açúcares. Foram consideradas significativas as correlações que apresentaram valor de $p < 0.05$.

Os procedimentos para realização da análise de componentes principais (PCA) se encontram descritos em Legendre & Legendre (1998). , bem como aqueles relativos à confecção dos biplots de distância. Tanto a análise de variância para dois fatores quanto as correlações de Pearson e Spearman foram executadas de acordo com as técnicas descritas em Zar (1999) e Sokal & Rohlf (1995). Os cálculos e os gráficos mostrados foram realizados por meio dos aplicativos Minitab® 14 e SPSS® 13 (Statistical Package for Social Sciences 1989-2004. Inc. USA).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento ao longo do crescimento

4.1.1 Dados microclimáticos

A Figura 3 apresenta a flutuação da temperatura e da umidade relativa do ar no interior das OTCs ao longo dos três meses (90 dias) de realização do experimento. Na Figura 3A pode ser observado que as sete coletas de dados (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de tratamento) foram realizadas dentro de uma faixa de temperatura que variou da mínima de 21°C (coleta aos 15 dias) até 28°C (coleta aos 30 dias), se mantendo bem próxima de 25°C no restante das coletas (0, 45, 60, 75 e 90 dias). Na Figura 3B pode ser observado que os valores de umidade relativa mantiveram-se em uma faixa de variação maior do que os valores de temperatura, onde a máxima umidade relativa do ar atingiu 85% (aos 45 dias) e a mínima foi de 68% (aos 90 dias).

Figura 3. Média da temperatura (A) e da umidade relativa (B) do ar do interior das câmaras de topo aberto ao longo do crescimento das plantas. Os símbolos (□) indicam os pontos de coleta (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias).

4.1.2 Carboidratos não estruturais

Teores de glicose, frutose, sacarose e amido

Na folha (Figura 4), teores de glicose e frutose variaram temporalmente de forma similar nos dois tratamentos. A concentração de ambos os açúcares aumentou aos 30 dias e diminuíram até os 75, seguido de novo aumento aos 90 dias. Nos dois tratamentos, a glicose das folhas apresentou teor máximo aos 90 dias (amb - 18.11; elev - 9.24 (mg g⁻¹)) e mínimo aos 15 dias (amb - 1.01; elev - 0.94 (mg g⁻¹)). Diferenças significativas entre os dois tratamentos ocorreram aos 45 e 90 dias, onde as plantas crescidas em alta concentração de CO₂ apresentaram redução desses açúcares de 29% e 96% respectivamente (Tabela 4).

A frutose na folha apresentou teor máximo aos 30 dias (amb - 12,25; elev. - 8,19 (mg g⁻¹)) e mínimo aos 15 dias (amb - 0.58; elev - 0.43 (mg g⁻¹)). Nas plantas do tratamento elevado foi observada uma redução significativa da concentração deste açúcar aos 30 (49%) e 45 dias (51%) (Tabela 4).

A sacarose na folha teve seus valores aumentados entre os dias 15 e 45, seguida de queda a partir dos 75 dias (Figura 4C). Os teores máximos foram aos 60 dias para o tratamento em ambiente (23.08 mg g MS⁻¹) e no tratamento elevado ocorreram aos 45 dias (18.06 mg g MS⁻¹). A menor concentração de sacarose foi observada aos 15 dias em ambos os tratamentos (amb - 11.99; elev - 10.41 (mg g MS⁻¹)). As plantas do tratamento com elevado CO₂ apresentaram uma tendência, ao longo do experimento, de diminuir a concentração de sacarose nas folhas, porém estas diferenças só foram significativas aos 45 (19%), 60 (29%) e 75 (29%) dias, quando comparadas com as plantas do tratamento controle.

Figura 4. Teores de glicose, frutose, sacarose e amido (mg g massa seca⁻¹) em folhas de *Senna reticulata* coletadas ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0.05$).

Os teores de amido na folha apresentaram aumento desde o início do experimento até o máximo de 45 dias no tratamento ambiente (163.60 mg g MS⁻¹) e até os 75 dias no elevado (258.90 mg g MS⁻¹), onde a partir destes pontos, valores menores foram observados (Figura 4D). No tratamento elevado a concentração de amido aumentou significativamente em todas as coletas (com exceção da coleta aos 45 dias), atingindo a diferença de até 97% após 75 dias.

Tabela 4 – Valores médios dos teores de açúcares (glicose, frutose, sacarose e amido) determinados em cada órgão (folha, caule e raiz) de *Senna reticulata*. Coletas realizadas **ao longo do crescimento** com intervalo de 15 dias. Valores de *P* obtidos a partir de teste t não pareado. (*) teste t não assumindo homogeneidade de variância. Desvio padrão da média (n=5).

		Folha				Caule				Raiz			
Coleta	Tratam.	Glc	Fru	Sac	Amido	Glc	Fru	Sac	Amido	Glc	Fru	Sac	Amido
0	Amb	2.21±0.28	1.25±0.17	1.22±0.6	14.54±2.23	0.86±0.20	0.35±0.08	0.81±0.35	1.78±0.51	0.94±0.31	0.44±0.17	4.96±0.73	1.69±0.20
15	Amb	1.01±0.43	0.58±0.27	11.99±3.41	37.72±7.82	1.39±0.69	0.98±0.54	16.07±6.38	2.38±0.72	0.99±0.31	0.39±0.12	14.87±4.76	1.21±0.19
	Elev	0.94±0.44	0.43±0.23	10.41±3.75	115.90±42.50	1.05±0.39	0.62±0.31	13.09±6.17	1.83±0.21	0.86±0.44	0.391±0.22	14.19±7.41	1.40±0.47
	<i>p</i>	0.795	0.384	0.504	0.016*	0.376	0.247	0.474	0.177*	0.618	0.979	0.866	0.431
30	Amb	10.14±0.79	12.25±0.95	13.10±3.72	71.90±10.55	13.38±6.70	20.95±5.66	13.98±8.40	5.73±3.37	10.69±3.44	5.83±2.70	16.56±5.30	1.71±0.75
	Elev	10.18±4.82	8.19±0.82	11.37±4.10	162.80±55.10	10.15±3.80	18.96±2.48	13.33±6.28	13.54±2.45	9.31±4.84	6.33±1.62	15.79±8.25	2.20±0.94
	<i>p</i>	0.986*	<0.001	0.504	0.022*	0.376	0.492	0.893	0.003	0.618	0.731	0.866	0.390
45	Amb	11.80±1.15	8.69±1.29	21.53±2.52	163.60±39.90	33.25±6.80	27.84±5.61	31.49±4.17	14.08±2.35	3.44±0.67	1.52±0.40	15.53±4.21	2.48±2.01
	Elev	9.15±0.81	5.73±0.80	18.06±1.45	145.20±29.40	31.57±4.01	26.63±3.56	31.11±2.69	13.63±5.54	4.28±2.19	1.58±0.89	15.39±6.06	7.87±3.68
	<i>p</i>	0.003	0.002	0.029	0.429	0.648	0.695	0.868	0.872	0.456*	0.896	0.966	0.020
60	Amb	7.98±1.84	6.47±1.49	23.08±1.93	141.30±20.88	22.65±4.40	19.46±3.20	26.52±4.95	15.87±10.64	3.97±1.42	1.98±0.95	21.33±5.67	8.07±2.61
	Elev	7.04±0.70	5.59±0.57	17.87±0.78	209.80±42.80	22.46±3.12	18.32±3.09	23.16±1.26	20.80±9.63	3.36±2.05	1.55±1.24	18.00±8.63	5.55±2.16
	<i>p</i>	0.317	0.254	0.001	0.012	0.939	0.583	0.217*	0.464	0.600	0.551	0.492	0.130
75	Amb	7.40±1.40	5.08±1.10	15.37±1.54	141.00±23.60	14.16±2.35	15.49±1.67	17.59±2.39	41.61±14.37	3.10±0.72	0.78±0.21	18.45±2.32	5.68±1.68
	Elev	6.85±1.80	5.21±1.08	11.86±0.93	258.90±28.60	15.61±3.06	15.81±2.20	15.37±1.63	88.47±11.95	2.31±0.76	0.58±0.34	16.18±0.84	7.84±4.58
	<i>p</i>	0.603	0.861	0.003	<0.001	0.427	0.801	0.126	0.001	0.131	0.299	0.095*	0.369*
90	Amb	18.11±5.04	9.53±3.11	12.34±4.51	50.3±22.4	14.57±3.36	14.60±1.99	13.53±3.66	104.90±25.10	5.51±1.66	1.04±0.64	20.35±4.19	9.82±2.75
	Elev	9.24±6.26	6.22±3.99	14.57±3.62	124.00±41.9	10.79±4.40	10.85±3.95	15.33±2.94	82.3±37.3	3.87±0.51	0.53±0.09	21.27±3.67	5.56±2.14
	<i>p</i>	0.039	0.182	0.414	0.008	0.166	0.095	0.417	0.293	0.103*	0.154*	0.072	0.026

No caule, o perfil de variação dos açúcares solúveis mostrou um padrão bem marcado ao longo do crescimento (Figura 5A, B e C). Aos 45 dias de tratamento foram observados os teores máximos de glicose (amb - 13.38; elev - 10.15 (mg g MS⁻¹)), frutose (amb - 20.95; elev - 18.96 (mg g MS⁻¹)) e sacarose (amb - 5.73; elev - 13.54 (mg g MS⁻¹)). A partir deste ponto, estes três açúcares começaram a decair até a última coleta (90 dias de tratamento). Não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos para nenhum dos açúcares solúveis neste órgão (Tabela 4).

Figura 5 - Teores de glicose, frutose, sacarose e amido (mg g massa seca⁻¹) em caules de *Senna reticulata* coletados ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética e a barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

O teor de amido no caule aumentou de forma exponencial nos dois tratamentos (Figura 5D), iniciando com valores baixos aos 15 dias (amb - 2.38; elev - 1.83 (mg g MS⁻¹)). Aos 90 dias foi observada a maior concentração no tratamento ambiente (104.90 mg g MS⁻¹) e aos 75 dias no tratamento elevado (88.47 mg g MS⁻¹). Nas coletas dos 30 e 75 dias foram observados aumentos significativos (136 e 112%

respectivamente), para o conteúdo desse carboidrato no caule em tratamento elevado (Tabela 4).

Assim como no caule, os dados mostram que na raiz (Figura 6) também existe uma variação temporal bem marcada para glicose e frutose onde os teores máximos ocorreram aos 30 dias nos dois tratamentos (glicose – ca. 10 mg g MS⁻¹ e frutose – ca. 6 mg g MS⁻¹), se mantendo constantes no restante das coletas (glicose – ca. 4 mg g MS⁻¹ e frutose – ca. 1.5 mg g MS⁻¹). O teor de sacarose na raiz mostrou uma tendência de aumento ao longo das coletas sem variações de grande magnitude para os dois tratamentos. Os menores valores de sacarose foram observados aos 15 dias (amb – 14.87 ; elev – 14.19 (mg g MS⁻¹)) e os maiores aos 90 dias (amb – 20.35 ; elev – 21.27 (mg g MS⁻¹)). Não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos para glicose, frutose e sacarose (Figuras 6A, 6B e 6C e Tabela 4). O teor de amido na raiz (Figura 6D) aumentou significativamente nas plantas do tratamento elevado aos 45 dias (217%) e diminuiu aos 90 dias (43%) quando comparados ao tratamento ambiente.

Aos 90 dias os teores de amido nas raízes das plantas submetidas ao tratamento elevado diminuíram em relação aos 75 dias (de 7.83 para 5.56 mg g MS⁻¹) enquanto para o tratamento ambiente ocorreu um aumento nos teores de amido na raiz neste mesmo intervalo (de 5.68 para 9.82 mg g MS⁻¹). Houve diferença significativa entre os dois tratamentos, sendo que o tratamento elevado apresentou maior conteúdo de amido aos 45 dias (217%) e menor aos 90 (43%) (Tabela 4).

Figura 6. Teores de glicose, frutose, sacarose e amido (mg g massa seca⁻¹) em raízes de *Senna reticulata* coletadas ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética $\pm$ e as barras o erro padrão da média (n = 5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0.05$).

Razão Sacarose:Monossacarídeos

Na folha (Figura 7) os dados mostram um tênue aumento da razão sacarose:monossacarídeos dos 30 aos 60 dias, enquanto no caule (Figura 8) e na raiz (Figura 9) os valores se mantiveram constantes durante todas as coletas com exceção dos 15 dias que apresentou valores bem maiores quando comparados ao restante das coletas. Na folha este valor foi cerca de 1271% maior aos 15 dias em relação a média das outras coletas. No caule este aumento foi de 1900% e na raiz de 1012%.

As plantas do tratamento com elevado CO₂ apresentaram aumento nesta razão de forma significativa em relação às plantas do tratamento ambiente, somente na coleta aos 90 dias para folha (135%) e caule (58%).

Na folha os dados mostram um tnue aumento desta razo dos 30 aos 60 dias, enquanto no caule os valores se mantiveram constantes.

Figura 7. Razo sacarose:monossacardeos em **folhas** de *Senna reticulata* coletadas ao longo do crescimento. Pontos representam a mdia aritmtica e as barras o erro padro da mdia (n=5). Asteriscos representam diferena significativa entre os dois tratamentos ($P<0,05$).

A raiz foi o rgo que apresentou maior razo sacarose:monossacardeos, com valor mdio geral de 4.8 quando comparado as mdias de 1.7 no caule e 2.1 na folha. Na raiz no foi observada diferena entre tratamentos, porm foi o nico rgo que apresentou aumento linear na razo ao longo das coletas 30 a 75, seguido de queda aos 90 dias de tratamento.

Figura 8. Razão sacarose:monossacarídeos em **caule** de *Senna reticulata* coletadas ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

Figura 9. Razão sacarose:monossacarídeos em **raízes** de *Senna reticulata* coletadas ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

A razão amido:sacarose referente a folha, mostrou aumento significativo nas plantas do tratamento de elevado CO₂ em relação as plantas do ambiente nas coletas após 15 (233%), 30 (161%), 60 (91%) e 75 dias (135%) (Figura 10). Este mesmo órgão apresentou os maiores valores desta razão (média de 10.13) quando comparado aos valores de caule (média de 2.25) (Figura 11) e raiz (média 0.30) (Figura 12) em todas as coletas e em ambos os tratamentos.

Figura 10. Razão amido:sacarose em **folhas** de *Senna reticulata* coletadas ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

No caule, esta razão apresentou valores baixos na coleta dos 15 dias (média de 0.16), aumentando de forma exponencial até os 90 dias (média de 7.11). Nas plantas do tratamento de elevado CO₂ ocorreu aumento significativo dos valores em relação às plantas do ambiente nas coletas aos 30 (127%) e 75 dias (139%).

A razão amido:sacarose na raiz mostrou valores máximos aos 90 dias para o tratamento ambiente (0.49) e aos 45 dias para o tratamento elevado (0.56). Valores mínimos foram encontrados na coleta aos 15 dias para os dois tratamentos (média de 0.09). Ocorreram mudanças significativas aos 45 dias onde as plantas do tratamento elevado apresentaram aumento de 252% em relação ao ambiente. Na coleta aos 90 dias houve diminuição significativa (-46%) da razão para as plantas do tratamento elevado em relação ao ambiente.

Figura 11. Razão amido:sacarose em **caules** de *Senna reticulata* coletados ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0.05$).

Figura 12. Razão amido:sacarose em **raízes** de *Senna reticulata* coletadas ao longo do crescimento. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0.05$).

Correlações

Na Tabela 5 são mostradas as correlações entre as variáveis mensuradas, tendo sido estas calculadas separadamente para cada grupo experimental. Todas as correlações significativas encontradas foram positivas.

Os dois açúcares que apresentaram maior força de correlação foram os monossacarídeos glicose e frutose, independentemente do órgão analisado. A correlação entre esses açúcares, em cada órgão, não se apresentou diferente em função do tratamento experimental.

Nas duas condições experimentais, os monossacarídeos da folha se apresentaram significativamente correlacionadas com os monossacarídeos do caule e da raiz, exceto para o par FruRT e GlcF em condição de CO₂ ambiente.

A concentração de monossacarídeos na raiz se mostrou correlacionada com os teores de glicose no caule, porém em relação à frutose no caule essa correlação foi significativa somente no tratamento ambiente.

A análise da relação dos monossacarídeos com os outros açúcares (amido e sacarose) mostrou a presença de forte correlação entre GlcF e SacF somente em tratamento elevado. Entre GlcF e AmiC, a correlação foi significativa para ambos os tratamentos, porém, o tratamento em elevado CO₂ enfraqueceu essa correlação. Entre GlcF e AmiR a correlação foi significativa somente em tratamento ambiente.

A variável FruF se mostrou significativamente correlacionada com AmiCT apenas em tratamento ambiente.

A concentração de FruC apresentou forte correlação com SacC e SacF nos dois tratamentos. Na condição de CO₂ ambiente FruC mostrou correlação significativa com AmiF enquanto com AmiR a correlação foi significativa somente em tratamento elevado.

GlcC apresentou correlação com AmiR somente em tratamento elevado. GlcC e SacF apresentaram correlação significativa entre si nos dois tratamentos, já GlcC e AmiF somente em tratamento ambiente.

Entre amido e sacarose, as correlações significativas ocorreram entre AmiF e SacF somente em ambiente; SacC e SacF se mostraram significativamente correlacionadas entre si em ambos os tratamentos; SacC e AmiF somente em condição ambiente; AmiC e AmiF somente em elevado; SacR com SacC somente em ambiente; AmiRT e SacC em elevado e AmiRT e SacR somente em ambiente.

Tabela 5 - Valores das correlações de Pearson entre as 12 variáveis obtidas ao longo do crescimento, calculados separadamente para cada um dos tratamentos (ambiente e elevado) e o seu respectivo valor de *P*. GlcF - Glicose na folha, FruF - Frutose na folha, SacF - sacarose na folha, AmiF - Amido na folha, GlcC - Glicose no caule, FruC - Frutose no caule, SacC - sacarose no caule, AmiCT - Amido no caule, GlcRT - Glicose na raiz, FruRT - Frutose na raiz, SacR - sacarose na raiz, AmiRT - Amido na raiz. (n=30 para cada tratamento).

		Frut_F	Glc_F	Sac_F	Ami_F	Fru_C	Glc_C	Sac_C	AmiCT	FruRT	GlcRT	Sac_R
Glc_F	amb	0.791(<0.001)										
	elev	0.878(<0.001)										
Sac_F	amb	0.033(0.862)										
	elev	0.278(0.136)	0.410(0.024)									
Ami_F	amb	0.079(0.680)	0.032(0.868)	0.695(<0.001)								
	elev	0.132(0.487)	0.129(0.497)	0.133(0.483)								
Fru_C	amb	0.653(<0.001)	0.490(0.006)	0.495(0.005)	0.638(<0.001)							
	elev	0.625(<0.001)	0.583(0.001)	0.533(0.002)	0.309(0.096)							
Glc_C	amb	0.406(0.026)	0.404(0.027)	0.639(<0.001)	0.704(<0.001)	0.908(<0.001)						
	elev	0.381(0.038)	0.395(0.031)	0.681(<0.001)	0.229(0.223)	0.874(<0.001)						
Sac_C	amb	-0.005(0.979)	0.020(0.918)	0.668(<0.001)	0.650(<0.001)	0.566(0.001)	0.735(<0.001)					
	elev	0.176(0.352)	0.287(0.124)	0.675(<0.001)	0.051(0.788)	0.644(<0.001)	0.856(<0.001)					
AmiCT	amb	0.287(0.125)	0.680(<0.001)	0.011(0.955)	0.233(0.216)	0.315(0.090)	0.336(0.069)	0.013(0.944)				
	elev	0.447(0.013)	0.385(0.036)	0.181(0.340)	0.425(0.019)	0.340(0.066)	0.281(0.133)	0.003(0.989)				
FruRT	amb	0.686(<0.001)	0.256(0.171)	0.233(0.215)	0.195(0.301)	0.677(<0.001)	0.439(0.015)	0.170(0.368)	-0.020(0.915)			
	elev	0.555(0.001)	0.448(0.013)	0.090(0.638)	0.067(0.727)	0.526(0.003)	0.244(0.194)	0.155(0.412)	-0.074(0.699)			
GlcRT	amb	0.825(<0.001)	0.577(0.001)	0.053(0.782)	0.124(0.515)	0.642(<0.001)	0.371(0.044)	0.011(0.955)	0.355(0.055)	0.860(<0.001)		
	elev	0.695(<0.001)	0.549(0.002)	0.089(0.641)	0.111(0.559)	0.555(0.001)	0.301(0.106)	0.151(0.425)	0.319(0.086)	0.817(<0.001)		
Sac_R	amb	0.169(0.373)	0.283(0.130)	0.156(0.410)	0.148(0.437)	0.127(0.505)	0.144(0.447)	0.360(0.051)	0.368(0.045)	0.142(0.455)	0.343(0.064)	
	elev	0.201(0.287)	0.053(0.780)	-0.191(0.313)	-0.051(0.789)	-0.055(0.772)	0.021(0.913)	0.063(0.740)	0.176(0.353)	0.198(0.295)	0.533(0.002)	
AmiRT	amb	0.111(0.560)	0.419(0.021)	0.147(0.439)	0.204(0.279)	0.146(0.440)	0.185(0.329)	0.058(0.760)	0.728(<0.001)	-0.022(0.907)	0.237(0.208)	0.485(0.007)
	elev	0.272(0.146)	0.340(0.066)	0.400(0.029)	0.282(0.132)	0.514(0.004)	0.585(0.001)	0.450(0.013)	0.588(0.001)	0.025(0.896)	0.293(0.117)	0.245(0.192)

Análise de Componentes Principais (PCA)

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da análise de componentes principais realizada a partir dos dados coletados ao longo do crescimento. Os cinco componentes principais que são detalhados neste trabalho representam 88.6% da variação presente na matriz original. As proporções associadas a cada um dos eixos, calculadas a partir dos autovalores, mostram que 39.9% da variação original pode ser atribuída ao primeiro componente (PC1), 18% ao segundo (PC2), 14.3% ao terceiro (PC3), 8.9% ao quarto (PC4) e 7.5% ao quinto eixo (PC5).

Os coeficientes que correspondem a contribuição das variáveis para a formação de cada um dos eixos são mostrados na Tabela 6B. No primeiro eixo (PC1) as variáveis de maior contribuição foram quatro monossacarídeos: FrutC (-0.414), GlcC (-0.373), GlcRT (-0.343) e FrutF (-0.342). No PC2 as maiores contribuições foram dadas principalmente por SacC (0.441) e SacF (0.400), as quais se opuseram GlcRT (-0.367) e FrutF (-0.340). No terceiro eixo (PC3) as principais contribuições foram AmiCT (0.589), AmiR (0.545), FruRT (-0.382) e AmiF (0.216). O quarto eixo (PC4) se mostrou composto principalmente por SacR (-0.791), SacC (-0.299), GlcF (0.266) e FruF (0.210). O quinto componente (PC5) apresentou AmiF (-0.724), GlcF (0.387), FruRT (-0.355) e GlcRT (-0.250) como principais contribuições.

Em relação ao primeiro e segundo eixos principais (PC1 e PC2), que juntos respondem por 57.9% da variação original, pode ser observado na Figura 13 que os centróides que representam as coletas para tratamento elevado apresentaram maiores valores de PC1 em relação aos pontos que representam os centróides para o tratamento ambiente. Este padrão indica que em todas as coletas as plantas do tratamento elevado tiveram os atributos que mais contribuem para o primeiro eixo diminuídos (frutose na folha e caule; glicose no caule e na raiz), já que os vetores dessas variáveis diminuem conforme o valor de PC1 aumenta. Isso ocorre devido ao fato destas variáveis contribuírem de forma negativa para este eixo (Tabela 6B). Quando observamos estes mesmos pontos, porém em relação ao eixo do PC2, os centróides do tratamento elevado apresentaram valores de PC2 maiores em relação ao tratamento ambiente. Este padrão mostra que principalmente nas coletas 30, 45, 60 e 90 dias ocorreu uma diminuição em dois dos quatro descritores que mais contribuem para este eixo (frutose na folha e glicose na raiz). As outras duas variáveis de maior contribuição foram SacC e SacF que apresentaram diferença entre tratamentos somente nas coletas 45 e 60 dias. Entre coletas, foi observado que a maior variação no primeiro eixo ocorreu entre os dias 15 e 30, quando houve um forte aumento

da concentração de todos os açúcares solúveis, principalmente de frutose no caule em ambos os tratamentos.

Figura 13. Biplots de distância mostrando a relação entre as variáveis mensuradas ao longo do crescimento e os centróides para cada coleta (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias) e cada tratamento (ambiente - ○, elevado - ●) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são

Dos 30 aos 45 dias a maior variação ocorreu no segundo eixo, decorrente do aumento da concentração de sacarose no caule e na folha para ambos os tratamentos. Dos 45 aos 75 dias todos os açúcares solúveis que compõem os dois primeiros componentes, principalmente glicose e frutose no caule, tornam a diminuir nos dois tratamentos. Dos 75 aos 90 dias a maior variação ocorreu no tratamento ambiente e para variáveis do segundo componente (diminuição de frutose na folha e de glicose na raiz), variação esta que não foi acompanhada para o tratamento elevado na mesma proporção.

Tabela 6 – A. Autovalores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC12) gerados pela análise de componentes principais (PCA – Principal Components Analyses). **B.** Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis mensuradas ao longo do crescimento: GlcF - Glicose na folha, FruF - Frutose na folha, SacF - sacarose na folha, AmiF - Amido na folha, GlcC - Glicose no caule, FruC - Frutose no caule, SacC - sacarose no caule, AmiCT - Amido no caule, GlcRT - Glicose na raiz, FruRT - Frutose na raiz, SacR - sacarose na raiz, AmiRT - Amido na raiz. Em negrito estão assinaladas as variáveis de maior contribuição para cada eixo (n=60).

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
Auto valor	4.791	2.165	1.714	1.065	0.905	0.444	0.399	0.245	0.137	0.067	0.044	0.024
Proporção	0.399	0.180	0.143	0.089	0.075	0.037	0.033	0.020	0.011	0.006	0.004	0.002
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
Frut_F	-0.342	-0.340	-0.121	0.210	0.154	-0.222	0.207	-0.145	0.465	0.456	0.323	-0.206
Glc_F	-0.328	-0.262	0.108	0.266	0.387	-0.250	0.133	-0.396	-0.403	-0.384	-0.185	0.105
Sac_F	-0.242	0.400	-0.153	-0.073	0.239	0.338	0.735	0.170	0.034	-0.046	-0.061	0.069
Ami_F	-0.138	0.319	0.216	0.196	-0.724	-0.281	0.285	-0.318	-0.004	-0.019	-0.044	-0.073
Fru_C	-0.414	0.124	-0.154	0.178	-0.094	-0.021	-0.300	0.125	0.275	0.034	-0.180	0.731
Glc_C	-0.373	0.323	-0.080	0.042	0.083	-0.108	-0.322	0.199	0.252	-0.515	0.118	-0.494
Sac_C	-0.257	0.441	-0.153	-0.299	0.181	-0.240	-0.238	-0.154	-0.434	0.509	0.010	-0.092
AmiCT	-0.225	-0.061	0.589	0.207	-0.009	-0.051	0.029	0.610	-0.305	0.155	0.250	0.031
FruRT	-0.287	-0.254	-0.382	-0.101	-0.355	0.356	-0.034	-0.065	-0.363	-0.150	0.530	0.060
GlcRT	-0.343	-0.367	-0.089	-0.161	-0.250	0.158	0.000	0.207	-0.068	0.147	-0.674	-0.322
Sac_R	-0.147	-0.177	0.230	-0.791	-0.035	-0.344	0.151	0.022	0.178	-0.204	0.112	0.201
AmiRT	-0.221	0.070	0.545	-0.119	0.084	0.594	-0.205	-0.440	0.176	0.086	0.023	-0.039

O resultado da análise de variância que se encontra na Tabela 7 mostra significância para o efeito do tratamento e da coleta tanto no primeiro quanto no segundo componente. O valor de R^2 do primeiro componente (86.47%) foi maior quando comparado ao segundo (81.29%).

Em relação ao terceiro componente (Figura 14) foi observado que os dois principais descritores deste eixo (amido no caule e na raiz) apresentaram valores aumentados em todas as coletas do tratamento elevado quando comparados com os valores dos mesmos descritores no tratamento ambiente. A coleta 30 apresentou maiores valores no PC3 quando comparada a coleta 15 nos dois tratamentos. Esta tendência exponencial se manteve até a coleta dos 90 dias nos dois tratamentos. A análise de variância para este componente foi significativa para o efeito do tratamento, coleta e interação com R^2 de 88.22% (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de F, significância (P) e coeficiente de determinação (R^2 ajustado) derivados da análise de variância (ANOVA) para dois fatores (coleta e tratamento) utilizando-se modelo com interação. PC1 a PC5 se referem às variáveis sintéticas derivadas da PCA (GL – Tratamento: 1; Coleta: 5; Interação: 5) (n=60).

Variável		coleta	tratamento	interação	R^2 ajustado
PC1	F	6.830	75.370	0.880	86.47%
	P	0.012	<0.001	0.504	
PC2	F	8.730	50.100	1.610	81.29%
	P	0.005	<0.001	0.176	
PC3	F	31.230	81.450	2.890	88.22%
	P	<0.001	<0.001	0.023	
PC4	F	0.980	1.730	1.240	7.57%
	P	0.327	0.146	0.305	
PC5	F	37.490	12.090	1.180	61.15%
	P	<0.001	<0.001	0.332	

No gráfico que explora as relações entre os descritores e centróides no plano reduzido do primeiro e quinto componentes (Figura 15), que são responsáveis por 47.4% da variação dos dados, foi observado que em todas as coletas, principalmente após 15 e 75 dias de tratamento, o valor de PC5 foi maior no tratamento elevado quando comparadas ao tratamento ambiente. Este padrão indica que houve um aumento de amido na folha em todas as coletas, pois este é o descritor que mais contribui para este componente (-0.724). A análise de variância para este componente foi significativa para o efeito do tratamento e da coleta, apresentando um R^2 de 61.15% (Tabela 7). A variação da posição das coletas ao longo deste componente se deu principalmente pelo aumento da variável AmiF dos 15 para os 30 dias, onde se manteve constante até os 90 dias. Em tratamento elevado o aumento foi maior dos 15 para os 30 dias, ocorrendo queda aos 45 dias, novo aumento até os 75 dias e queda até os 90 dias de tratamento.

Figura 14. Biplots de distância mostrando a relação entre as variáveis mensuradas ao longo do crescimento e os centróides para cada coleta (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias) e cada tratamento (ambiente - ○, elevado - ●) no plano definido pelo primeiro e terceiro componentes principais (PC1 e PC3). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não são mostrados.

Na Tabela 8 são mostradas as correlações entre os eixos principais e as variáveis externas. Todas as variáveis se mostraram significativamente correlacionadas com o primeiro e o terceiro componente, exceto a variável Re. Para o primeiro componente, a correlação positiva mais forte foi com a assimilação (0.660). As correlações negativas entre PC1 e as massas dos diferentes órgãos também foram significativas, porém com menor força de correlação: MSFolha (-0.422); MSCaule (-0.262); MSRaiz (-0.358).

Para o terceiro componente principal foram observadas relações inversas as do primeiro. As variáveis que apresentaram maior força de correlação positiva foram as massas dos órgãos: MSFolha (0.757); MSCaule (0.808); MSRaiz (0.713). Em relação a variável assimilação, a correlação foi significativamente negativa (-0.356), porém com menor força quando comparada as variáveis de massa.

O quinto componente (PC5) se apresentou significativamente correlacionado somente com a variável Re (0.426) enquanto o segundo e o quarto componentes não apresentaram correlação significativa com nenhuma das variáveis externas.

Figura 15. Biplots de distância mostrando a relação entre as variáveis mensuradas ao longo do crescimento e os centróides para cada coleta (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias) e cada tratamento (ambiente - ○, elevado - ●) no plano definido pelo primeiro e quinto componentes principais (PC1 e PC5). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo. Vetores de descritores pouco representativos não foram

Tabela 8. Valores de *r* e *P* das correlações de Pearson calculadas entre as variáveis externas (MS Folha – massa seca da folha, MS Caule – massa seca do caule, MS Raiz – massa seca da raiz, A – Assimilação de CO₂, Re – Respiração no escuro) e as variáveis sintéticas geradas na PCA (n=60).

		MS Folha	MS Caule	MS Raiz	A	Re	MassaTotal
PC1	<i>r</i>	-0.422	-0.262	-0.358	0.660	-0.111	-0.344
	<i>p</i>	0.001	0.043	0.005	<0.001	0.399	0.007
PC2	<i>r</i>	-0.004	-0.098	0.052	-0.075	-0.117	-0.016
	<i>p</i>	0.975	0.456	0.696	0.571	0.373	0.905
PC3	<i>r</i>	0.757	0.808	0.713	-0.356	-0.152	0.776
	<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.247	<0.001
PC4	<i>r</i>	0.074	0.070	0.126	0.010	0.105	0.097
	<i>p</i>	0.572	0.596	0.336	0.942	0.425	0.460
PC5	<i>r</i>	0.097	0.172	0.144	-0.022	0.426	0.148
	<i>p</i>	0.460	0.189	0.273	0.867	<0.001	0.258

4.1.3 Carboidratos estruturais

O fracionamento de parede apresentou diferenças significativas entre os tratamentos em folha e raiz (Tabela 9). Nas plantas cultivadas em elevado CO₂ a folha apresentou diminuição de 57% no conteúdo de celulose, de 20% em hemicelulose e de 74% no teor de amido. Na raiz foi observada uma diminuição de 59% no conteúdo de pectinas em tratamento com elevado CO₂. No caule não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos.

Tabela 9. Rendimento em porcentagem das amostras pesadas após cada etapa de extração do fracionamento da parede celular. Os dados são apresentados em % do total de massa seca utilizada no início da extração (500mg) exceto a variável Parede/Carb Total onde foi utilizada a massa total de carboidratos. Média e desvio padrão. Valores de *P* obtidos a partir de teste-t não pareado, considerando homogeneidade de variância e significância quando *P*<0.05 (n=3).

		AST	Amido	Pectina	Lignina	Hemicelulose	Celulose	Parede/massa	Parede/CarbTotal
Folha	amb	27.79 ± 2.4	24.59 ± 1.0	9.64 ± 1.2	14.65 ± 1.2	17.73 ± 0.8	5.60 ± 0.2	47.62 ± 1.8	36.87 ± 0.7
	elev	21.36 ± 0.6	41.88 ± 3.1	8.93 ± 1.0	11.88 ± 2.7	13.63 ± 0.4	2.31 ± 0.2	36.76 ± 2.8	28.97 ± 1.6
	<i>P</i>	0.059	0.006*	0.681	0.401	0.012*	0.001*	0.030*	0.012*
Caule	amb	18.49 ± 1.4	24.28 ± 3.6	3.82 ± 1.2	15.03 ± 0.7	31.56 ± 1.6	6.80 ± 0.5	57.22 ± 2.6	49.70 ± 2.7
	elev	16.15 ± 2.3	28.78 ± 3.6	4.78 ± 1.2	14.73 ± 2.5	29.76 ± 0.8	5.79 ± 0.2	55.07 ± 1.8	47.31 ± 1.5
	<i>P</i>	0.430	0.429	0.600	0.912	0.377	0.137	0.538	0.478
Raiz	amb	25.25 ± 2.4	15.80 ± 2.4	7.02 ± 0.5	29.97 ± 2.6	15.67 ± 1.7	6.29 ± 0.3	58.95 ± 2.8	39.22 ± 4.8
	elev	26.10 ± 1.5	13.34 ± 1.9	2.99 ± 0.3	36.25 ± 2.1	14.12 ± 1.1	7.19 ± 0.5	60.56 ± 2.9	39.81 ± 3.8
	<i>P</i>	0.780	0.473	0.004*	0.135	0.479	0.221	0.213	0.929

4.1.4 Lignina

Aos 90 dias de experimento o conteúdo de lignina foi maior na raiz quando comparada aos outros órgãos (aumento de 221% em relação à folha e de 360% em relação ao caule) (Figura 16). As plantas cultivadas sob o tratamento de CO₂ elevado mostraram diminuição significativa deste composto de 20% na raiz e de 50% nas folhas.

Figura 16. Conteúdo de LTGA nos diferentes órgãos de *Senna reticulata*. Coleta realizada após 90 dias de tratamento. Barras representam a média aritmética ± o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos (p<0,05).

4.2 Experimento ao longo de 24 horas

4.2.1 Dados microclimáticos

Conforme os dados de temperatura e umidade coletados nas câmaras de topo aberto ao longo de 24 horas, foi observado que houve um aumento de temperatura entre os horários das 10 e 14 horas, atingindo o valor máximo de 32°C às 12 horas. No restante dos horários as medidas apresentaram valores em torno de 23°C (Figura 17A). Para os dados de umidade, ocorreu uma queda nos valores a partir das 10 horas da manhã, perdurando até as 12 horas, atingindo valor mínimo de 54% às 12 horas e máximo de 87% às 2 horas da manhã (Figura 17B).

Figura 17. Média $\pm$ o erro padrão de temperatura (A) e umidade (B) das quatro câmaras de topo aberto utilizadas no experimento ao longo de 24 horas.

4.2.2 Carboidratos não estruturais

A Figura 18 apresenta os teores de glicose, frutose, sacarose e amido para o material de folha coletado ao longo do dia em sete horários distintos (6, 10, 12, 14, 18, 22 e 2 horas). Nesse órgão a dinâmica de flutuação diária destes quatro carboidratos (aumento e/ou diminuição) parece não ter sido modificado pelo tratamento submetido a elevada concentração de gás carbônico. Os dados apontam somente as variações na quantidade dos açúcares nos diferentes horários.

Os teores de glicose e frutose nas folhas foram constantes ao longo de todos os horários analisados (glicose – em torno de 6 mg g MS^{-1} ; frutose – em torno de 5 mg g MS^{-1}) para ambos os tratamentos. Para os teores de sacarose, os dois tratamentos também variaram de forma similar, aumentando a concentração deste açúcar a partir das 12hs (amb – 23.08 ; elev – $17.87 \text{ mg g MS}^{-1}$), mantendo constante até as 14 hs, diminuindo às 18 hs (amb – 11.39 ; elev – $7.37 \text{ mg g MS}^{-1}$) e aumentando novamente às 22 hs (amb – 19.62 ; elev – $14.18 \text{ mg g MS}^{-1}$).

Os teores de amido ao longo do dia apresentaram aumento a partir das 12 até o pico máximo às 2 horas da manhã (amb – 256.6 ; elev – $305.53 \text{ (mg g MS}^{-1})$) com uma subsequente diminuição às 6 horas da manhã (amb – 112.30 ; elev – $257.67 \text{ (mg g MS}^{-1})$). No entanto, foi observado que as plantas do tratamento elevado diminuíram de maneira menos proeminente o conteúdo de amido neste mesmo intervalo (entre 2 e 6 horas).

Os resultados mostram também uma tendência de diminuição de glicose, frutose e sacarose nas folhas das plantas submetidas ao tratamento de elevada concentração de gás carbônico. Para sacarose foi observada uma diminuição significativa do seu teor no tratamento elevado em quatro horários analisados (12hs – 22%, 14hs – 21%, 18hs – 35% e 22hs – 27%). Para o teor de frutose, foi observada diferença significativa somente no horário das 18 horas (- 48%) sendo que para glicose não foi observada diferença entre os dois tratamentos.

Figura 18. Teores de glicose, frutose, sacarose e amido ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em **folhas** de *Senna reticulata* coletadas ao longo de 24 horas. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão ($n=5$). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0.05$).

Nas análises de determinação do conteúdo de amido foi observada, de forma bastante significativa (valores baixos de P mostrados na Tabela 10) a influência do tratamento de elevado CO_2 no aumento do conteúdo deste carboidrato ao longo dos horários analisados (6h – 129%; 10h – 90%; 12h – 48%; 14h – 65%; 18h – 53%; 22h – 79%), com exceção das 2 horas da manhã.

Tabela 10 – Valores médios dos teores de açúcares (glicose, frutose, sacarose e amido) determinados em cada órgão (folha, caule e raiz) de *Senna reticulata*. Coletas realizadas **ao longo de 24 horas** com intervalo de 2 ou 4 horas. Valores de *P* obtidos a partir de teste t não-pareado. (*) teste t não assumindo homogeneidade de variância. Desvio padrão da média (n=5).

Hor.	Tratam.	Folha				Caule				Raiz			
		Glicose	Frutose	Sacarose	Amido	Glicose	Frutose	Sacarose	Amido	Glicose	Frutose	Sacarose	Amido
2	Amb	8.49 ± 1.75	4.38 ± 1.20	16.88 ± 2.40	256.6 ± 54.7	25.81 ± 6.36	21,13 ± 3,32	21,62 ± 6,36	18.05 ± 7.25	3.49 ± 1.02	0.50 ± 0.23	15.27 ± 3.94	1.33 ± 1.12
	Elev	12.30 ± 4.52	4.72 ± 1.73	16.78 ± 2.88	305.53 ± 20.70	22.24 ± 4.22	16,96 ± 5,27	21,07 ± 1,83	17.94 ± 3.85	3.24 ± 0.67	0.47 ± 0.06	19.99 ± 3.12	1.49 ± 0.78
	<i>p</i>	0.110	0.727	0.956	0.099	0.326	0.173	0.863*	0.975	0.658	0.798*	0.069	0.796
6	Amb	6.21 ± 2.32	4.78 ± 1.95	11.87 ± 2.05	112.30 ± 37.80	26.82 ± 9.29	21.47 ± 6.58	21.65 ± 7.14	9.05 ± 5.92	4.57 ± 1.44	0.79 ± 0.39	18.21 ± 4.91	0.91 ± 0.19
	Elev	6.67 ± 3.42	3.77 ± 1.16	10.77 ± 0.88	257.67 ± 10.12	30.47 ± 10.95	20.73 ± 2.17	25.17 ± 3.96	20.23 ± 10.82	4.43 ± 1.49	0.76 ± 0.28	24.65 ± 5.00	1.49 ± 0.32
	<i>p</i>	0.810	0.350	0.303	0.001*	0.585	0.824*	0.364	0.077	0.883	0.878	0.074	0.010
10	Amb	6.37 ± 1.07	6.81 ± 1,84	14.18 ± 4.04	126.10 ± 16.49	26.54 ± 5.54	23.36 ± 4.05	19.95 ± 2.31	11.02 ± 5.15	6.11 ± 1.89	0.68 ± 0.47	22.33 ± 5.76	2.37 ± 0.96
	Elev	8.40 ± 2.98	4.07 ± 2.77	13.46 ± 1.50	240.10 ± 74.70	26.39 ± 5.57	20.79 ± 5.03	22.46 ± 1.78	28,39 ± 3,27	4.75 ± 1.50	0.30 ± 0.02	16.57 ± 4.26	1.92 ± 0.70
	<i>p</i>	0.190	0.102	0.722	0.029*	0.967	0.400	0.089	<0.001	0.244	0.144*	0.110	0.425
12	Amb	7.98 ± 1.84	6.47 ± 1.49	23.08 ± 1.93	141.30 ± 20.88	22.65 ± 4.40	19.46 ± 3.20	26.52 ± 4.95	11.27 ± 2.73	3.95 ± 1.41	1.98 ± 0.95	21.33 ± 5.67	15.49 ± 3.76
	Elev	7.04 ± 0.70	5.59 ± 0.57	17.87 ± 0.78	209.80 ± 42.80	22.46 ± 3.12	18.32 ± 3.09	23.16 ± 1.26	20.80 ± 9.63	3.34 ± 2.04	1.55 ± 1.24	20.26 ± 7.01	14.50 ± 3.19
	<i>p</i>	0.310	0.254	0.001	0.012	0.939	0.583	0.217*	0.100*	0.600	0.551	0.798	0.666
14	Amb	8.15 ± 1.79	6.14 ± 1.22	22.68 ± 2.93	182.30 ± 50.20	26.34 ± 7.23	20.53 ± 5.77	17.86 ± 4.98	13.85 ± 6.00	4.21 ± 1.80	0.40 ± 0.19	13.39 ± 4.11	1.00 ± 0.69
	Elev	8.37 ± 2.74	4.74 ± 1.40	17.78 ± 1.30	301.30 ± 79.50	18.46 ± 3.95	15.16 ± 3.06	18.69 ± 5.37	22.02 ± 8.66	3.39 ± 2.32	0.20 ± 0.10	11.82 ± 3.53	0.78 ± 0.31
	<i>p</i>	0.880	0.131	0.009	0.022	0.065	0.103	0.806	0.121	0.546	0.078	0.534	0.542
18	Amb	7.08 ± 2.27	5.77 ± 1.16	11.39 ± 1.45	202.20 ± 38.90	27.19 ± 9.34	19.22 ± 5.55	24.75 ± 4.49	18.15 ± 8.25	4.70 ± 2.36	0.45 ± 0.42	17.78 ± 6.46	1.97 ± 1.97
	Elev	6.13 ± 2.81	2.98 ± 1.49	7.37 ± 0.74	310.10 ± 98.40	35.59 ± 6.86	22.13 ± 5.40	28.79 ± 3.50	18,36 ± 5,64	4.38 ± 1.78	0.33 ± 0.23	16.04 ± 5.41	1.12 ± 0.07
	<i>p</i>	0.570	0.011	0.001	0.052	0.144	0.426	0.151	0.963	0.818	0.587	0.656	0.391*
22	Amb	5.79 ± 1.22	4.44 ± 0.70	19.62 ± 3.35	169.00 ± 44.40	22.30 ± 3.71	21.55 ± 4.01	19.25 ± 4,01	8.65 ± 1.55	4.67 ± 0.97	0.37 ± 0.08	19.41 ± 378	1.09 ± 0.22
	Elev	4.19 ± 1.80	4.30 ± 1.80	14.18 ± 3.85	302.60 ± 86.80	24.97 ± 4.43	21.73 ± 3.08	22.17 ± 4,64	21.28 ± 7.55	4.94 ± 2.37	0.50 ± 0.20	19.78 ± 5.18	4.07 ± 2.97
	<i>p</i>	0.130	0.870	0.045	0.015	0.331	0.939	0.319	0.022*	0.827	0.214	0.899	0.090*

No caule, o padrão de variação ao longo das horas é alterado entre os dois tratamentos principalmente para os açúcares glicose e frutose que em tratamento ambiente apresentam valores constantes ao longo do dia (glicose – 25; frutose – 20 (mg g MS⁻¹)) e no tratamento elevado mostram uma tendência a diminuição entre os horários das 6 e 14 horas (glicose – 18.46; frutose– 15.16 (mg g MS⁻¹), seguido de um aumento entre 14 e 18 horas (glicose – 35.59; frutose – 22.13 (mg g MS⁻¹)) (Figura 19).

Figura 19. Teores de glicose, frutose, sacarose e amido (mg g massa seca⁻¹) em **caules** de *Senna reticulata* coletados ao longo de 24 horas. Pontos representam a média e as barras o erro padrão (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos (P<0.05).

A variação do conteúdo de sacarose, glicose e frutose ao longo do dia se comportou de modo similar nos dois tratamentos, apresentando em ambos os casos, diminuição às 14 horas (amb – 17.86; elev – 18.69 (mg g MS⁻¹)) e aumento às 18 horas (amb – 24.75; elev – 28.79 (mg g MS⁻¹)).

Alteração significativa entre os dois tratamentos na quantidade de carboidratos no caule só foi observada para o amido, que apresentou maiores valores em alto CO₂ nos horários das 10 (157%) e 22 horas (146%).

Na raiz não foram observadas alterações em função do tratamento no que diz respeito ao padrão de variação ao longo do dia dos quatro carboidratos analisados (Figura 20). O padrão observado para folha e caule, onde alguns dos açúcares solúveis têm seus teores diminuídos às 14 horas e aumentados às 18 horas, ocorreu também na raiz para os valores encontrados de glicose e sacarose. Embora não significativa, foi observada uma tendência de redução dos teores de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) na raiz, assim como observado anteriormente para folha e caule.

Figura 20. Teores de glicose, frutose, sacarose e amido ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em **raízes** de *Senna reticulata* coletadas ao longo de 24 horas. Pontos representam a média e as barras o erro padrão (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0.05$).

Para amido e frutose a variação ao longo do dia compreendeu um aumento no horário das 12 horas (amido – 15 mg g MS⁻¹; frutose – 2 mg g MS⁻¹) em ambos os tratamentos., diminuindo em seguida e se mantendo constante no restante dos horários (amido – 1.23 mg g MS⁻¹; frutose – 3.15 mg g MS⁻¹).

Razão Sacarose:Monossacarídeos

A razão sacarose:monossacarídeos apresentou maiores valores na raiz (média de 3.98), quando comparada aos valores obtidos no caule (média de 0.5) e na folha (média de 1.34) em todos os horários analisados.

Apesar dessa razão não ter se mostrado significativamente diferente em função do tratamento experimental em nenhum dos órgãos, foi possível observar uma tendência de aumento na folha (Figura 21) nos horários 12, 14 e 22 em ambos os tratamentos, porém com maior expressão para o tratamento ambiente.

Figura 21. Razão sacarose:monossacarídeos em **folha** de *Senna reticulata* coletadas ao longo de 24 horas. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

No caule (Figura 22) foi observada uma tendência de aumento dessa razão em tratamento elevado quando comparada com o tratamento ambiente no horário das 14 horas. Na raiz (Figura 23), essa mesma tendência ocorreu no horário das 6 horas da manhã.

Figura 22. Razão sacarose:monossacarídeos em **caules** de *Senna reticulata* coletados ao longo de 24 horas. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

Figura 23. Razão sacarose:monossacarídeos em **raízes** de *Senna reticulata* coletadas ao longo de 24 horas. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

Razões Amido:sacarose

O órgão que apresentou maior valor da razão amido:sacarose para todos os horários analisados foi a folha (média de 16.49) em relação ao observado no caule (média de 0.77) e na raiz (média de 0.21).

Na folha (Figura 24), a razão amido:sacarose foi significativamente maior no tratamento elevado em todos os horários analisados, exceto as 2 horas da manhã onde não houve alteração. A maior diferença entre tratamentos ocorreu às 22 horas (176%) e o horário que a razão atingiu os maiores valores foi às 18 horas tanto para o tratamento ambiente (18.24), quanto para o elevado (42.40).

Figura 24. Razão amido:sacarose em **folhas** de *Senna reticulata* coletadas ao longo de 24 horas. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0.05$).

A razão amido:sacarose no caule (Figura 25) apresentou aumento no tratamento elevado em 5 dos 7 horários analisados (6, 10, 12, 14 e 22 horas), porém este aumento só foi significativo às 6, 10 e 22 horas. A maior diferença encontrada entre tratamentos ocorreu às 10 horas (122%).

Figura 25. Razão amido:sacarose em **caules** de *Senna reticulata* coletados ao longo de 24 horas. Pontos representam a média aritmética e as barras o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

Na raiz (Figura 26) houve aumento de 257% da razão amido:sacarose no tratamento elevado em relação ao tratamento ambiente às 22 horas. O horário onde esta razão atingiu os maiores valores foi às 12 horas tanto para tratamento ambiente (0.81), quanto para tratamento elevado (0.83).

Figura 26. Razão amido:sacarose em **raízes** de *Senna reticulata* coletadas ao longo de 24 horas. Pontos representam a média aritmética $\pm$ o erro padrão da média (n=5). Asteriscos representam diferença significativa entre os dois tratamentos ($P<0.05$).

Correlações

Na Tabela 11 são mostradas as correlações entre as variáveis mensuradas ao longo de 24 horas, sendo estas calculadas separadamente para cada grupo experimental.

A concentração de frutose na folha se mostrou positivamente correlacionada com GlcF, FruC, GlcC e FruRT somente em tratamento ambiente. Entre FruF e SacF a significância da correlação positiva foi observada somente em tratamento elevado.

GlcF mostrou correlação positiva com SacF em ambos os tratamentos. Entre GlcF e AmiF houve correlação positiva no tratamento ambiente e correlação negativa em tratamento elevado. Somente em tratamento ambiente as concentrações de GlcF se mostraram positivamente correlacionadas com as concentrações de FruC, GlcC e AmiC.

A concentração de sacarose na folha (SacF) apresentou significativa correlação negativa com a concentração de três açúcares no caule (frutose, glicose e sacarose) em tratamento elevado, não apresentando correlações significativas em tratamento ambiente.

Entre os pares AmiF e AmiC foi observada correlação positiva apenas em tratamento ambiente. Entre AmiF e SacR a correlação negativa também só ocorreu em tratamento ambiente. A concentração de AmiF também se mostrou negativamente correlacionada com a concentração de AmiRT.

A concentração de FruC apresentou correlação positiva com GlcC e SacC nos dois tratamentos analisados. GlcC mostrou correlação positiva com SacC também em ambos os tratamentos.

A concentração de sacarose no caule (SacC) se apresentou positivamente correlacionada com FruRT, SacR e AmiRT apenas em tratamento ambiente.

A concentração de frutose na raiz mostrou correlações positivas com as concentrações de GlcR, SacR e AmiRT em ambos os tratamentos. GlcR e SacR apresentou correlação positiva independente do tratamento. SacR e AmiRT se mostraram positivamente correlacionados somente em tratamento ambiente.

Tabela 11 - Valores para as correlações de Pearson entre as 12 variáveis mensuradas ao longo de 24 horas para cada um dos tratamentos (ambiente e elevado) e o seu respectivo valor de *P*. GlcFT - Glicose na folha, FruF - Frutose na folha, SacF - sacarose na folha, AmiF - Amido na folha, GlcC - Glicose no caule, FruC - Frutose no caule, SacC - sacarose no caule, AmiC - Amido no caule, GlcR - Glicose na raiz, FruRT - Frutose na raiz, SacR - sacarose na raiz, AmiRT - Amido na raiz. As seguintes variáveis foram transformadas para log10: GlcFT, FruRT, AmiRT (n=30).

		Fru_F	Glc_FT	Sac_F	Ami_F	Fru_C	Glc_C	Sac_C	Ami_C	Fru_RT	Glc_R	Sac_R
Glc_FT	amb	0.516(0.001)										
	elev	0.065(0.711)										
Sac_F	amb	0.197(0.256)	0.381(0.024)									
	elev	0.443(0.008)	0.382(0.024)									
Ami_F	amb	0.019(0.914)	0.340(0.046)	0.138(0.431)								
	elev	0.042(0.811)	-0.340(0.046)	0.294(0.086)								
Fru_C	amb	0.426(0.011)	0.308(0.072)	-0.073(0.677)	0.146(0.401)							
	elev	-0.225(0.193)	-0.061(0.728)	-0.483(0.003)	-0.085(0.626)							
Glc_C	amb	0.351(0.039)	0.398(0.018)	-0.204(0.241)	0.220(0.205)	0.824(>0.001)						
	elev	-0.262(0.129)	-0.045(0.798)	-0.680(>0.001)	0.001(0.995)	0.788(>0.001)						
Sac_C	amb	0.272(0.114)	0.325(0.057)	0.012(0.946)	0.088(0.617)	0.428(0.010)	0.561(>0.001)					
	elev	-0.227(0.190)	-0.248(0.150)	-0.654(>0.001)	0.085(0.627)	0.538(0.001)	0.747(>0.001)					
Ami_C	amb	0.191(0.271)	0.399(0.018)	-0.193(0.267)	0.524(0.001)	0.095(0.587)	0.203(0.242)	0.147(0.401)				
	elev	0.093(0.596)	-0.097(0.577)	0.118(0.498)	-0.024(0.892)	0.106(0.544)	-0.066(0.707)	-0.170(0.329)				
Fru_RT	amb	0.340(0.046)	0.317(0.064)	0.329(0.053)	-0.296(0.084)	0.123(0.482)	0.000(0.999)	0.391(0.020)	-0.281(0.102)			
	elev	0.172(0.324)	-0.156(0.370)	0.071(0.683)	-0.311(0.069)	0.082(0.641)	0.007(0.968)	0.125(0.476)	-0.293(0.087)			
Glc_R	amb	0.304(0.076)	0.057(0.744)	-0.020(0.911)	-0.291(0.090)	0.273(0.113)	0.091(0.605)	0.150(0.388)	-0.212(0.221)	0.429(0.010)		
	elev	-0.033(0.851)	-0.308(0.072)	-0.291(0.090)	-0.091(0.603)	0.143(0.414)	0.157(0.369)	0.076(0.665)	-0.171(0.326)	0.401(0.017)		
Sac_R	amb	0.133(0.445)	0.033(0.849)	-0.028(0.873)	-0.364(0.031)	0.187(0.283)	0.093(0.596)	0.405(0.016)	-0.174(0.319)	0.440(0.008)	0.623(>0.001)	
	elev	0.098(0.576)	-0.167(0.337)	-0.165(0.342)	-0.198(0.254)	0.186(0.285)	0.25(0.148)	0.267(0.120)	-0.236(0.172)	0.627(>0.001)	0.432(0.010)	
Ami_RT	amb	0.329(0.054)	0.206(0.235)	0.318(0.063)	-0.317(0.063)	-0.059(0.735)	-0.099(0.571)	0.415(0.013)	-0.044(0.801)	0.611(>0.001)	0.132(0.450)	0.458(0.006)
	elev	0.167(0.337)	-0.174(0.317)	0.249(0.149)	-0.343(0.043)	0.156(0.371)	-0.054(0.758)	0.075(0.669)	0.146(0.402)	0.565(>0.001)	0.026(0.883)	0.269(0.118)

Análise de Componentes Principais (PCA)

Na Tabela 12 são apresentados os resultados da análise de componentes principais realizada a partir dos dados coletados ao longo de 24 horas. Os cinco componentes principais que foram analisados neste estudo representam 76.5% da variação presente na matriz original. As proporções associadas a cada um dos eixos, calculadas a partir de seus autovalores, mostram que 24.6% da variação original é explicada pelo conjunto de descritores do primeiro componente (PC1), 21% pelo segundo (PC2), 12.8% pelo terceiro (PC3), 11.1% pelo quarto (PC4) e 7% pelo quinto eixo (PC5) (Tabela 12A).

Os coeficientes que correspondem às contribuições das variáveis mensuradas para cada um dos eixos são mostrados na Tabela 12B. No primeiro eixo (PC1) as variáveis de maior contribuição foram: FruRT (0.451), SacR (0.426), GlucR (0.354) e FrutC (0.308). Para o PC2 as maiores contribuições foram dadas principalmente por GlcC (-0.488), SacF (0.466), SacC (-0.371) e FrutC (-0.343). No terceiro eixo (PC3) a principal contribuição foi da variável GlcFT (-0.614) seguida de FruF (-0.371), SacF (-0.346) e GlcR (0.328). O quarto eixo (PC4) foi composto principalmente por AmiRT (0.588) e AmiC (0.521), seguido de AmiF (0.357) e SacC (0.233). O quinto componente (PC5) apresenta FruF (-0.569), GlcR (-0.524) e AmiC (-0.421) como principais contribuições, seguido de SacC (0.281).

Em relação ao primeiro e segundo eixos principais (PC1 e PC2) foi ser observado (Figura 27) que os centróides que representam as coletas para tratamento elevado apresentaram menores valores para o PC1 em relação aos pontos que representam os centróides para o tratamento ambiente. Este padrão indica que em todos os horários as plantas do tratamento elevado tiveram os atributos que mais contribuem para o primeiro eixo diminuídos (frutose no caule e raiz; glicose e sacarose na raiz). Quando observamos estes mesmos pontos, porém em relação ao segundo eixo principal, os centróides do tratamento ambiente apresentaram valores para o PC2 maiores em relação ao tratamento elevado em todos os horários analisados, com exceção das 2 horas da manhã. Este padrão mostra que em tratamento elevado, ocorreu uma diminuição de sacarose na folha concomitante a um aumento de glicose, frutose e sacarose no caule em relação ao tratamento ambiente.

O padrão de variação temporal se mostrou nitidamente diferente entre os tratamentos. Para o tratamento ambiente foi observado que entre 6 e 10 horas da manhã ocorreu um aumento dos valores para o PC1 (principalmente aumento de frutose na raiz), enquanto em tratamento elevado os valores do primeiro componente diminuiram neste mesmo intervalo. Das 10 às 12 horas foi observado aumento ao longo do PC1 e PC2 para

os dois tratamentos. Das 12 as 14 horas o principal aumento foi ao longo do primeiro componente também para ambos os tratamentos. Entre os horários 14 e 18 horas houve diminuição ao longo do primeiro e segundo componentes, significando diminuição de sacarose na folha e aumento de todos os outros açúcares solúveis para o tratamento elevado e, com menor amplitude, para o tratamento ambiente. Entre 18 e 22 horas a variação ocorreu ao longo do segundo componente independente do tratamento, aumentando principalmente a concentração de sacarose. Das 22 até as 2 horas da manhã os centróides tornam a variar nos dois componentes, com o tratamento ambiente mostrando aumento das concentrações de amido na folha e no caule, enquanto o tratamento elevado mostrou diminuição das concentrações de glicose, sacarose e frutose neste mesmo órgão.

O resultado da análise de variância, que se encontra na Tabela 13, mostra significância para o efeito do tratamento e do horário tanto no primeiro quanto no segundo componente. O valor de R^2 relativo a análise do primeiro componente (33.69%) apresentou menor valor quando comparado ao gerado para o segundo (51.72%).

Figura 27. Biplots de distância mostrando a relação entre as variáveis mensuradas ao longo dia e os centróides para cada horário (6,10,12,14,18,22 e 2 horas) e cada tratamento (ambiente - ○, elevado - ●) no plano definido pelos dois primeiros componentes. Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo.

Tabela 12 – A. Autovalores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC12) gerados pela análise de componentes principais (PCA – Principal Components Analyses). **B.** Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis mensuradas ao longo de 24 horas: GlcF - Glicose na folha, FruF - Frutose na folha, SacF - sacarose na folha, AmiF - Amido na folha, GlcC - Glicose no caule, FruC - Frutose no caule, SacC - sacarose no caule, AmiCT - Amido no caule, GlcRT - Glicose na raiz, FruRT - Frutose na raiz, SacR - sacarose na raiz, AmiRT - Amido na raiz (n=60).

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
Autovalor	2.9549	2.52	1.5322	1.3271	0.8434	0.7157	0.6102	0.4737	0.3649	0.3147	0.2205	0.1227
Proporção	0.246	0.21	0.128	0.111	0.07	0.06	0.051	0.039	0.03	0.026	0.018	0.01

B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
Frut_F	0.218	0.229	-0.371	-0.026	-0.569	0.347	0.242	-0.497	0.036	0.078	0.066	0.017
Glc_FT	0.007	0.100	-0.614	-0.092	0.082	-0.676	-0.191	-0.091	0.212	0.069	0.182	0.117
Sac_F	0.032	0.466	-0.346	0.060	0.025	-0.010	0.269	0.465	-0.426	-0.346	-0.181	-0.191
Am_F	-0.252	-0.311	0.007	0.357	-0.259	-0.250	0.620	0.222	-0.045	0.283	0.255	0.036
Frut_C	0.308	-0.343	-0.280	-0.252	-0.062	0.267	-0.130	0.434	-0.205	0.228	0.020	0.520
Glc_C	0.248	-0.488	-0.241	-0.191	0.070	0.055	0.008	0.023	-0.036	0.054	0.055	-0.768
Sac_C	0.303	-0.371	-0.114	0.233	0.281	-0.030	0.331	-0.243	0.130	-0.570	-0.198	0.271
Am_C	-0.196	-0.236	-0.182	0.521	-0.421	0.001	-0.479	0.090	0.013	-0.108	-0.414	-0.064
Frut_RT	0.451	0.219	0.073	0.175	0.097	-0.080	0.164	0.183	0.422	0.457	-0.495	-0.073
Glc_R	0.354	0.019	0.328	-0.192	-0.524	-0.255	-0.055	0.309	0.284	-0.404	0.218	-0.036
Sac_R	0.426	-0.012	0.258	0.144	-0.079	-0.394	-0.110	-0.288	-0.668	0.160	-0.050	0.023
Am_RT	0.303	0.162	-0.051	0.588	0.219	0.242	-0.224	0.108	0.074	0.008	0.597	-0.057

A análise gráfica das relações entre os centróides e os vetores de descritores no espaço reduzido do primeiro e quarto componentes (Figura 28) mostrou os pontos do tratamento elevado com valores para o PC4 sempre maiores quando comparados aos pontos do tratamento ambiente. Este padrão encontrado é devido principalmente ao aumento nas concentrações de amido da folha, caule e raiz no tratamento elevado em todos os horários analisados.

As maiores variações entre coletas que ocorreram ao longo dos vetores descritores do PC4 foram entre os pontos do tratamento ambiente das 14 e 18 horas (aumento) e entre 18 e 22 horas (diminuição). No tratamento elevado ocorreram aumentos principalmente entre 10 e 12 horas e entre 18 e 22 horas. A análise de variância (Tabela 13) apresenta significância para o efeito do tratamento, do horário e da interação no quarto componente. O valor de R^2 relativo a análise do PC4 foi de 65.88%.

Figura 28. Biplots de distância mostrando a relação entre as variáveis mensuradas ao longo do dia e os centróides para cada horário (6, 10, 12, 14, 18, 22 e 2 horas) e cada tratamento (ambiente - ○, elevado - ●) no plano definido pelos primeiro e quarto componentes. Valores de % entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo.

Tabela 13. Valores de F, significância (P) e coeficiente de determinação (R^2 ajustado) derivados da análise de variância (ANOVA) para dois fatores (horários e tratamento) utilizando-se modelo com interação. PC1 a PC5 se referem às variáveis sintéticas derivadas do PCA (GL – Tratamento: 1: Coleta: 6: Interação: 6) (n=60).

Variável		Horário	Tratamento	Interação	R^2 ajustado
PC1	F	5.54	7.04	1.30	33.69%
	P	<0.001	0.010	0.272	
PC2	F	9.40	19.54	1.83	51.72%
	P	<0.001	<0.001	0.110	
PC3	F	3.36	0.83	0.42	13.21%
	P	0.007	0.367	0.864	
PC4	F	12.15	55.17	3.03	65.88%
	P	<0.001	<0.001	0.012	
PC5	F	3.03	0.45	0.92	13.94%
	P	0.012	0.505	0.485	

As correlações entre as variáveis sintéticas (PC1 até PC5) e as variáveis externas (Tabela 14) apresentaram significância somente para o segundo componente principal que se mostrou correlacionado positivamente com a taxa de assimilação (0.574), sendo que em relação ao índice de radiação fotossinteticamente ativa (0.524) o teste tangeu a significância.

Tabela 14. Valores de r e P das correlações de Spearman calculadas entre as variáveis externas (PAR– Radiação fotossinteticamente ativa, A - Assimilação, RH% e T – Umidade relativa e temperatura do ar do interior das OTC's) e as variáveis sintéticas geradas no PCA derivado do experimento ao longo de 24 horas (n=14).

		PAR	A	RH%	T
PC1	r	-0.348	-0.165	0.328	-0.461
	p	0.223	0.573	0.253	0.097
PC2	r	0.524	0.574	-0.337	0.399
	p	0.055	0.032	0.239	0.158
PC3	r	-0.396	-0.393	0.221	-0.284
	p	0.161	0.164	0.447	0.326
PC4	r	0.196	0.367	-0.204	0.275
	p	0.502	0.197	0.485	0.342
PC5	r	0.097	-0.204	0.257	0.000
	p	0.742	0.483	0.375	1.000

5. DISCUSSÃO

Caracterização do metabolismo de carboidratos de Senna reticulata

Espécies de árvores de regiões tropicais podem apresentar uma grande variação no conteúdo de amido encontrado nas folhas. Enquanto folhas de árvores adultas de *Cupania cinerea* (Sapindaceae) possuem 5% de amido por grama (g) de massa seca, espécies de *Ocotea* sp. (Lauraceae) podem apresentar até 17% deste polímero por grama de massa seca (Poorter & Kitajima, 2007). Contudo, valores altos como o de *Ocotea* sp. são encontrados com menor frequência nas espécies já estudadas. O trabalho de (Poorter & Kitajima (2007) mostra que dentre 87 espécies tropicais analisadas quanto ao conteúdo de amido, somente duas apresentaram valores acima de 10%.

Plântulas de espécies arbóreas tropicais tendem a apresentar maiores valores de amido nas folhas quando comparadas a maioria dos indivíduos adultos. No trabalho de Costa (2004) a espécie *Hymenaea courbaril* (Leguminosae) apresentou 14% de amido nas folhas após aproximadamente 90 dias de desenvolvimento. Como pode ser observado a partir das Figuras 4 e 18, *Senna reticulata* apresentou, em tratamento ambiente de CO₂, valores de até 16% de amido nas folhas aos 45 dias de desenvolvimento. Este resultado corrobora os dados encontrados para as espécies amazônicas *Dypterix odorata* (Leguminosae) e *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) que apresentam respectivamente 12 e 20% de concentração de amido nas folhas de indivíduos jovens quando cultivados sob altos índices de irradiância (Marenco *et al.*, 2001).

As diferentes concentrações de amido encontradas em folhas de diferentes espécies podem ser atribuídas a diferentes estratégias. *Senna reticulata* possui características fenológicas que consistem em constante queda de folhas e contínua reposição das mesmas (Parolin, 2005). Como já observado em espécies semidecíduas de regiões temperadas (Magel *et al.*, 2000), o alto teor de amido nas folhas permite que este carboidrato possa ser mobilizado após o inverno rigoroso, auxiliando na formação de novas folhas. Neste sentido, este mesmo processo pode ser o responsável pelo suprimento de carbono que é requerido na contínua produção de novas folhas em *S. reticulata*.

No caso de *S. reticulata* o alto teor de amido encontrado nas folhas pode estar relacionado também ao estoque de energia durante sua fase terrestre para posterior utilização sob condições de alagamento, pois as principais respostas metabólicas a privação de oxigênio são orquestradas pela disponibilidade e mobilização de carboidratos (Drew, 1997). Em algumas plantas, a baixa concentração de oxigênio no tecido é capaz de induzir a atividade de amilases, promovendo a conversão do amido em glicose, que é utilizada nos processos metabólicos da planta (Bayley-Serres & Voesenek, 2008).

Contudo, na maioria das espécies estudadas até o momento, esse acúmulo de amido não é observado em folhas, mas sim em raízes de espécies tolerantes ao alagamento como é o caso de *Acorus calamus* (Araceae), planta típica de marismas do hemisfério norte que acumula amido em seu rizoma e raízes (Arpagaus & Braendle, 2000). Em espécies que ocorrem em planícies alagáveis da Amazônia brasileira, esse padrão também é observado em *Himathantus succuba* (Apocynaceae) que possui cerca de 12% de amido na raiz (Ferreira et al., 2009) e em outras cinco espécies de leguminosas típicas destas regiões que apresentam de 10 a 15% de amido neste órgão (Scarano et al, 1994). Diferentemente disso, as raízes de *S. reticulata* apresentaram teor máximo de amido de 1% (Figuras 6 e 20) aos 90 dias de experimento, indicando que essa espécie não utiliza este órgão como um tecido armazenador de amido. Esta observação indica que para *S. reticulata*, provavelmente a manutenção de reserva de amido foliar para a constante produção da parte aérea signifique maiores vantagens adaptativas.

Nas raízes de *S. reticulata*, o carboidrato encontrado em maior quantidade foi a sacarose. Quando se observa a concentração deste açúcar ao longo do crescimento (Figura 6), verifica-se valores variando entre 1 e 2% da massa seca. Sewa (2000) propõe que a tolerância ao alagamento pode não estar diretamente relacionada à quantidade de carboidratos acumulados na raiz, mas sim vinculado a capacidade da planta de apresentar alta atividade da enzima sacarose sintase sob condições de hipóxia, indicando a grande capacidade de utilizar a sacarose na raiz que pode estar sendo importada de outros órgãos. Neste caso, é possível que na raiz de *S. reticulata* haja uma alta atividade da enzima sacarose sintase neste órgão durante o período de alagamento.

S. reticulata apresenta na raiz uma razão sacarose:monossacarídeo (S:M) de 3,27 em média ao longo do crescimento (excluindo o ponto dos 15 dias (Figura 9 e 23). Esta razão ultrapassa a encontrada até mesmo em colmos de cana-de-açúcar que, aos 30 dias de crescimento, fica em torno de 1,6 (de Souza, 2007). Na Figura 9 ainda pode ser observado um padrão de aumento de sacarose ao longo do crescimento, indicando que esse órgão tende a acumular este açúcar de maneira lenta e linear.

Um dos principais papéis que a sacarose desempenha no tecido radicular é a influência sobre o desenvolvimento de raízes adventícias. O trabalho de Hyndman e colaboradores (1982) mostra que o crescimento de raízes adventícias em beterraba é correlacionado positivamente com o aumento da concentração de sacarose aplicada ao meio de cultura. Este fenômeno ocorre devido ao fato da sacarose ser responsável por aumentar a síntese de etileno (Warren Wilson *et al.*, 1994) que por sua vez promove a formação das raízes adventícias (Drew *et al.*, 1979).

Sabe-se que uma das principais alterações morfológicas que as plantas apresentam sob condição de hipóxia/anóxia imposta pelo alagamento é a formação de raízes adventícias (Parolin *et al.*, 2004) e *S. reticulata* apresenta esta adaptação com destaque para o tamanho destas raízes que se apresentam muito longas (cerca de 150 cm) quando comparadas as de outras espécies já estudadas (Parolin, 2001). Este alto investimento em raízes adventícias aliada ao fato da sacarose ser o principal açúcar de reserva nos tecidos radiculares desta espécie poderia indicar que a sacarose é utilizada como fonte de reserva para a formação dessa estrutura em condições de alagamento.

Nos outros órgãos analisados a concentração de sacarose é maior quando comparada ao teor da raiz. Na folha foi encontrado cerca de 2 % (Figura 4 e 18) e no caule em torno de 3 % (Figura 5 e 19) da massa seca correspondente a esse açúcar. Em folhas de jatobá (Costa, 2004) o conteúdo de sacarose encontrado em é de aproximadamente 1.5 % associado a uma baixa razão S:M (0.47). Em folhas de cana-de-açúcar após sete meses de desenvolvimento, o conteúdo de sacarose é em torno de 2.5 % também associada a uma baixa razão S:M (0.58) (Souza, 2007). Quando relacionada à concentração de monossacarídeos, *S. reticulata* apresentou na folha média de 1.01 ao longo do crescimento para esta razão (excluindo o ponto dos 15 dias onde essa razão foi bem maior) e de 0.52 no caule (Figuras 7 e 8). Esses dados

mostram que *Senna reticulata* apresenta elevada razão S:M nos tecidos quando comparada a outras espécies. Este aspecto do metabolismo pode estar relacionado ao estresse de seca ao qual esta espécie é sujeita quando os níveis de água começam a baixar nas planícies de inundação. Devido à baixa disponibilidade hídrica do solo que se estabelece a partir das altas taxas de evaporação e diminuição na frequência de chuvas inerentes a este período (Sombroek, 2001; Parolin *et al.*, 2009), as espécies que ocorrem nestes locais desenvolveram conjuntos de adaptações para enfrentar ciclos anuais tanto de seca quanto de alagamento (Chaves *et al.*, 2003; Junk *et al.*, 1989).

Senna reticulata apresenta traços de xeromorfismo na folha devido a seu parênquima lacunar possuir pouquíssimos espaços intercelulares e também por apresentar a superfície abaxial da folha coberta por papilas que auxiliam na refletância de altos índices de irradiância (Parolin, 2004). A manutenção de altos níveis de sacarose observados ao longo dos três órgãos e principalmente as altas concentrações de solutos osmoticamente ativos no tecido radicular poderiam funcionar como auxiliar na absorção e redistribuição de água em condições hídricas menos favoráveis. Durante secas não severas, o potencial hídrico total da planta pode ser mantido através do ajuste osmótico (Ingram, 1996) pelo aumento na síntese de sacarose e na atividade da enzima sacarose fosfato sintase (Quick *et al.*, 1989). Adicionalmente, *Senna reticulata* apresenta durante a estação seca um dos maiores potenciais hídricos foliares dentre as espécies estudadas na floresta amazônica (em torno de -8 bar). (Parolin, 2001) indicando ser uma das espécies que apresenta maiores condições de se desenvolver sob este estresse e deve apresentar diversas fontes de adaptações morfológicas e fisiológicas para apresentar tamanha eficiência na colonização de áreas sujeitas ou não ao regime de inundação (Parolin, 2005).

Em relação aos carboidratos estruturais e conteúdo de lignina, podemos observar que *S. reticulata* possui a fração que corresponde à parede celular representando entre 47 a 60% da massa seca da planta (Tabela 9). Estes dados indicam uma tendência de maior investimento nesta estrutura quando comparado a dados da literatura que geralmente apresentam valores entre 20 e 50% correspondentes à parede celular (Penning de Vries *et al.*, 1974). No entanto, quando analisamos a proporção de parede celular em relação ao total de carboidratos da planta (estruturais e não estruturais) são observados valores entre 28 e 50% quando o esperado fica em torno de 70 a 80% (Penning de Vries *et al.* 1974, Gibeaut *et al.*,

2001). A partir disso podemos inferir que esta espécie particiona grande parte de seu carbono para a síntese de parede celular, porém verifica-se que o principal componente desta estrutura é a lignina que se encontra em concentração relativamente elevada em todos os tecidos desta planta (Figura 16). Poorter *et al.* (1997), por exemplo, observaram valores em torno de 4% quando analisaram o conteúdo de lignina na folha de 27 espécies. Em *S. reticulata* o valor encontrado neste órgão foi de 10% indicando hipoteticamente a presença de maior conteúdo de lignina nas paredes dos vasos condutores ou ainda, a presença de um maior número de vasos nas folhas desta espécie.

O alto conteúdo de lignina encontrado na raiz (cerca de 30%) de *Senna reticulata* pode ser explicado pelo fato de que plantas típicas de regiões alagáveis possuem altas concentrações de lignina e/ou suberina na raiz para minimizar os danos causados pelas condições de hipóxia/anóxia as quais são submetidas. Alguns dos trabalhos sugerem que a deposição de lignina aumenta a resistência do tecido e promove uma barreira hidrofóbica que auxilia na proteção contra componentes tóxicos presentes em solos encharcados (Moog *et al.*, 1990). A deposição de suberina ou de lignina na raiz auxilia na redução da perda de oxigênio radial para a rizosfera, conservando-o na raiz para utilização no crescimento da mesma em solos anóxicos (Colmer *et al.*, 1998). Esta deposição normalmente ocorre radialmente (estrias de Caspary) ou tangencialmente nas paredes celulares das células endodérmicas da raiz (De Simone *et al.*, 2002).

Efeitos do alto CO₂ sobre o metabolismo de carboidratos

O tratamento de elevada concentração de CO₂ promoveu principalmente o aumento das concentrações de amido e a diminuição dos níveis de todos os açúcares solúveis em folhas, caule e raízes de *S. reticulata* (Figuras 4,5,6,13,18,19 e 20). Essa resposta corrobora a literatura no que concerne ao aumento da concentração de amido, o qual geralmente é o principal elemento responsável pelo aumento de carboidratos totais não estruturais em plantas cultivadas sob atmosfera enriquecida de CO₂ (Saxe *et al.*, 1998).

No entanto, a diminuição de açúcares solúveis totais é uma observação não comumente encontrada em estudos anteriores, pois na grande maioria dos trabalhos estes carboidratos não sofrem alterações (Lindroth *et al.*, 1993) ou mais

freqüentemente apresentam aumentos significativos em suas concentrações (Griffin *et al.*, 1996; Marek *et al.*, 1995; Nie *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1998; Teng *et al.*, 2006; Kaakinen *et al.*, 2004).

Em tratamento de elevado CO₂ a concentração de amido nas folhas de *S. reticulata* foi em média 113% maior ao longo de todas as coletas quando comparado ao tratamento ambiente (Figura 4). Diversos estudos mostram que o acúmulo de amido nas folhas de plantas cultivadas sob alta concentração de CO₂ pode estar associado ao acúmulo de sacarose e/ou seus intermediários no citosol (Stitt, 1990; Stitt, 1991; Huber & Huber, 1996). O acúmulo de amido na folha reduz a taxa de exportação de triose-P do cloroplasto, promovendo um aumento da razão 3-fosfoglicerato (3-PGA): fosfato inorgânico (Pi) no cloroplasto. O aumento nessa razão é responsável pela regulação alostérica positiva da atividade da ADP-glicose pirofosforilase (AGPase), principal enzima envolvida na síntese de amido (Smith *et al.*, 1997). Paralelamente, em *S. reticulata* não foram observados aumentos no conteúdo de sacarose e açúcares solúveis na folha em alto CO₂, indicando que o aumento da concentração de 3-PGA no cloroplasto pode ter sido promovido a partir das maiores taxas de assimilação líquida observadas ao longo de todo o experimento, com aumento significativo aos 30 (25%), 45 (20%) e 60 dias (17%) (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados).

Adicionalmente, podemos observar que a correlação (Tabela 8) entre respiração e conteúdo de amido foliar (descriptor negativo de maior contribuição para o quinto eixo do PCA – Tabela 4) foi significativa, indicando que quanto menor a taxa de respiração maior o acúmulo de amido nesta espécie independente do tratamento. No tratamento com elevado CO₂ foram observadas tendências de menores taxas de respiração foliar no escuro (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados), o que pode explicar as maiores concentrações de amido foliar em alto CO₂. Essa observação corrobora a literatura no sentido de que juntamente com a disponibilidade de ATP, a disponibilidade de carboidratos controla diretamente as taxas respiratórias (Williams e Farrar, 1990) que no caso dessa espécie esta intimamente ligada com a quantidade de amido estocado nas folhas.

No caule a concentração de amido nas plantas do tratamento elevado foi 130% maior aos 30 dias e 112% maior aos 75 dias de experimento (Figuras 5 e 19). Esses dados, assim como os descritos na literatura (Stitt, 1991) indicam que plantas

cultivadas sob atmosfera enriquecida de CO₂ podem responder às maiores taxas fotossintéticas e ao aumento da síntese de carboidratos através de um incremento na capacidade de estocagem em seus drenos já existentes como, por exemplo, o acúmulo de amido no caule e nas folhas desta espécie.

Sob tratamento de alto CO₂ *Senna reticulata* apresentou concentrações significativamente menores de açúcares solúveis totais (AST) somente no tecido foliar (Figuras 4 e 18). Dados de crescimento mostram que após os 60 dias de experimento *S. reticulata* apresentou aumento no conteúdo de biomassa em tratamento de elevado CO₂ (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados) o que pode estar relacionado à maior utilização de AST (principalmente glicose) no processo respiratório para a geração de energia (ATP) e poder redutor (NAD(P)H) que são utilizados tanto em processos de divisão celular quanto na síntese de novos compostos necessários ao crescimento do tecido (Cannel & Thornley, 2000).

Além disso, é possível que a redução de AST em folhas de *S. reticulata* esteja relacionada com a mudança da partição de carboidratos entre amido e açúcares solúveis através da alteração quantitativa da formação e/ou utilização de nucleotídeos açúcares, como por exemplo, o aumento de fluxo na via de utilização de ADP-glicose (precursor na síntese de amido no estroma) e diminuição da via de utilização de UDP-glicose (necessário para a síntese de sacarose no citosol). O primeiro indício para o exposto acima é a ocorrência de diminuição de açúcares solúveis mesmo em períodos onde não ocorreu aumento significativo no crescimento (anterior aos 60 dias) caracterizando ausência de dreno para os mesmos. O segundo é a observação da diminuição significativa de celulose e de hemicelulose nas folhas de plantas cultivadas sob tratamento de elevada concentração de CO₂ (Tabela 9), uma vez que os processos de síntese de celulose e hemicelulose necessitam de moléculas de UDP-açúcares em suas reações.

Em adição às alterações que o alto CO₂ promove no metabolismo primário, diversas mudanças podem ser encontradas no metabolismo secundário de plantas cultivadas sob estas condições (Saxe *et al.*, 1998). Comumente são observadas diminuição do conteúdo de compostos químicos de defesa e alterações nos teores de lignina. Em folhas de *Betula pendula* (Betulaceae) ocorreu diminuição significativa no conteúdo de lignina tal como foi observado para *S. reticulata* (Figura 16). Na raiz,

apesar do método de fracionamento de parede apresentar aumento de lignina em tratamento de alto CO₂ (Tabela 9), a metodologia específica para dosagem de ácido ligno-tioglicólico (LTGA) (Figura 16) apresentou diminuição deste composto neste mesmo tratamento. Este segundo dado se mostra mais coerente com o que foi observado até o momento (menor investimento em compostos estruturais), porém se fazem necessárias novas análises que compreendam um maior número de amostras no intuito de elucidar esta questão.

Altas concentrações de CO₂ promovem aumento no tamanho e número de células (Saxe *et al.*, 1998) e Gardner e colaboradores (1995) observaram maior elasticidade da parede decorrentes provavelmente da ausência de compostos que a enrijecem como a lignina, indicando que o menor teor observado no conteúdo de compostos estruturais pode estar relacionado principalmente com a diminuição da espessura da parede de cada célula. A diminuição de componentes da parede celular em plantas cultivadas em alto CO₂ é observada na literatura principalmente para espécies de crescimento rápido que particionam o carbono em excesso para o crescimento ao invés de alocá-los na parede celular (Oksanen *et al.*, 2005, Poorter *et al.*, 1997).

Variações temporais no metabolismo

Amido e sacarose representam respectivamente os principais açúcares de reserva e de transporte encontrados na maioria das plantas (Magel *et al.*, 2000). Ambos são responsáveis por grande parte das variações encontradas no conteúdo de açúcares durante o ciclo de 24 horas. Em *S. reticulata*, alterações na concentração destes dois açúcares podem ser observadas através das variações significativas que ocorreram para as razões amido:sacarose (A:S) (Figuras 24, 25 e 26) ao longo do dia. Nas folhas, o estoque e utilização de carboidratos podem ser controlados por fatores externos como luz, temperatura e comprimento do dia (Chatterton & Silviu, 1979). Verificou-se que neste órgão o horário de maior razão A:S foi as 18 horas (Figura 24). Neste horário observa-se que as menores concentrações de sacarose coincidem com as maiores taxas de amido (Figuras 18C e 18D), sugerindo mobilização de sacarose para a produção de amido logo após o término do período luminoso (Sicher *et al.*, 1984). A redução de sacarose nas folhas também coincide com um visível aumento na concentração deste açúcar no caule e de forma mais atenuada também na raiz

(Figuras 19C e 20C) indicando ser este o horário de principal partição dos carboidratos sintetizados na folha para o restante dos órgãos.

As plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO₂ apresentaram maiores valores para as razões A:S em todos os horários (Figuras 24, 25 e 26). Segundo Sharkey *et al.* (2004) elevadas razões A:S promovem a diminuição nas respostas das plantas às elevadas concentrações de CO₂. A sinalização para essa regulação negativa das respostas metabólicas ocorre a partir da degradação noturna do amido transitório. Diversas evidências mostram que a principal via para este processo acontece através da ação da enzima beta-amilase (via de degradação hidrolítica), responsável por produzir maltose e glicose dentro do cloroplasto. O transporte destes compostos para o citosol promoverá a ativação de uma das únicas vias onde a enzima hexoquinase (HXK) está envolvida com moléculas de glicose livres (não fosforiladas). Dessa forma a HXK age reprimindo genes relacionados à fotossíntese promovendo a regulação negativa.

Em *S. reticulata* as altas razões A:S não mostram indícios de influência negativa sobre a fotossíntese pois como já mencionado, essa espécie não apresentou menores taxas fotossintéticas em tratamento elevado. Essa contraposição ao observado por Sharkey *et al.* (2004) pode ter ocorrido devido ao padrão de degradação noturna de amido foliar. Nas Figuras 18 e 28 é notável que entre duas e seis horas a degradação do amido transitório acontece em menores proporções no tratamento elevado quando comparado ao ambiente. Este padrão se deve ao fato de que plantas do tratamento ambiente utilizam glicose e sacarose provenientes do caule além de degradar amido da folha para reposição nos níveis de sacarose foliar, enquanto plantas do elevado CO₂ utilizam somente açúcares do caule, mantendo o teor de amido na folha constante (Figura 27). Diante disto podemos inferir que a diminuição na degradação noturna do amido pode ter promovido uma menor sinalização por açúcares, auxiliando na manutenção de elevadas taxas fotossintéticas em alto CO₂ quando comparada ao ambiente. Além disso, no trabalho de Ludewig *et al.* (1998) é proposta a ocorrência de maiores taxas fotossintéticas em plantas com maior capacidade de síntese de amido transitório em detrimento de mutantes com menores taxas de síntese, indicando que a capacidade de reservar amido nas folhas pode ser considerada mais um dreno de carboidratos, atuando como auxiliar nas respostas positivas de crescimento sob condições de atmosfera enriquecida de CO₂ (Stitt, 1991). Em *Senna reticulata*, o tipo de carboidrato estocado mostrou ter relações

diretas com o crescimento da planta. Enquanto maiores quantidades de amido estocado no caule e na raiz foram correlacionadas positivamente com a biomassa total, o teor de monossacarídeos foi correlacionado de forma negativa (Tabela 8). Estes dados indicam que apesar de em folhas de *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) o conteúdo de amido não ser considerado um atributo que exerce influências diretas sobre o crescimento (Webb & Kilpatrick, 1993), Sulpice e colaboradores (2009) mostraram fortes correlações entre o conteúdo de amido, proteína e biomassa. Essa relação conservada mostra que a grande demanda energética requerida na síntese e manutenção de proteínas, estão diretamente relacionadas ao crescimento do vegetal (Gibon, 2009).

O padrão diário de síntese e degradação de amido acarretou efeitos que perduraram por todo o experimento, pois quando analisamos as correlações entre os açúcares considerando o período de 90 dias (Tabela 5 e Figura 29) observamos que em alto CO₂ a concentração de amido deixa de covariar junto com o teor de sacarose. Isto provavelmente se deve ao fato de que o maior fluxo de carboidratos está sendo particionado para os dois açúcares, porém o amido está sendo sintetizado e preservado no cloroplasto enquanto a sacarose está sendo mobilizada para os outros órgãos neste tratamento.

Contudo, apesar da concentração de amido em folhas de *S. reticulata* apresentar teores altos na maioria das coletas (Figuras 4, 10 e 15) foi observado que em pontos chave do desenvolvimento da planta esse amido é utilizado. Aos 45 dias de experimento, *S. reticulata* apresentou inversão em sua alocação de biomassa passando seu investimento para as raízes em detrimento das folhas (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados). Neste ponto podemos inferir que a diminuição do conteúdo de amido foliar ocorreu devido à mobilização do mesmo para o investimento na raiz em ambos os tratamentos. Foi observado que em tratamento de elevado CO₂ o primeiro pico de acúmulo de amido na folha ocorre aos 30 dias (Figura 4). A diminuição deste mesmo carboidrato aos 45 dias é concomitante com um aumento de amido na raiz (Figura 6), indicando a transferência de estoque de amido de folha para raiz. No entanto, em tratamento ambiente o primeiro ponto de acúmulo de amido nas folhas ocorreu somente aos 45 dias. A subsequente diminuição no teor foliar de amido aos 60 dias é concomitante com o aumento dessa reserva na raiz em CO₂ ambiente. Este desacoplamento temporal entre os dois tratamentos foi provavelmente responsável pelo aumento

significativo de biomassa de raiz encontrado aos 60 dias em plantas do tratamento elevado quando comparada as plantas do ambiente (Adriana Grandis & Marcos Buckeridge, comunic.pessoal). Enquanto plantas do tratamento elevado iniciaram a mobilização de seus açúcares para a raiz entre 30 e 45 dias, plantas do tratamento ambiente o fizeram somente entre 45 e 60 dias indicando efeito do alto CO₂ sobre a aceleração na ontogenia de crescimento dessa espécie (Donovan & Ehleringer, 1991; Gunderson & Wulschleger, 1994) mediante alterações em seu metabolismo de síntese e degradação de amido.

Nos período entre 45 e 75 dias a ocorrência de bruscas diminuições nos teores de monossacarídeos foi observada nos dois tratamentos, porém em alto CO₂ esse padrão foi observado juntamente com aumentos nos teores de amido de folha, caule e raiz. Estes resultados indicam que devido à maior disponibilidade de carbono em alto CO₂, açúcares solúveis que não foram utilizados para a respiração/crescimento, foram estocados em forma de amido.

A grande variação temporal na partição entre amido e sacarose presente nas folhas não foi observada em caules de *S. reticulata* ao longo de 24 horas (Figura 25) indicando que estes eventos são fortemente controlados pelas atividades de síntese e degradação destes compostos nas folhas. Contudo, plantas do tratamento elevado apresentaram aumentos significativos na razão A:S (Figura 25), no conteúdo absoluto de amido ao longo do dia (Figura 19D) e maior partição de sacarose da folha para o caule entre 14 e 18 horas (Figura 27). Possivelmente essas alterações foram responsáveis por promover o incremento de 112% de amido em caules de plantas de elevado CO₂ observado na coleta aos 75 dias (Figura 5D). Esses dados indicam que assim como descrito na literatura (Stitt, 1991), plantas cultivadas sob atmosfera enriquecida de CO₂ podem responder as maiores taxas fotossintéticas e ao aumento da síntese de carboidratos aumentando a sua capacidade de estoque em seus drenos já existentes como, por exemplo, o acúmulo de amido observado no caule e nas folhas desta espécie.

Figura 29. Principais correlações positivas e significativas entre os açúcares analisados em 24 horas e ao longo do crescimento. Setas vermelhas indicam significância de correlação existente somente em tratamento de elevado CO₂. As correlações marcadas com um x vermelho indicam perda de correlação significativa em tratamento elevado. Sinais negativos representam alteração de correlação positiva significativa para negativa significativa em tratamento de

De todo o carbono fixado pela fotossíntese considera-se que mais de 60% possa ser translocado para as raízes (Fitter *et al.*, 1996) promovendo conseqüências diretas sobre os processos de crescimento e desenvolvimento deste órgão (Crookshanks *et al.*, 1998). Em *Senna reticulata* foi observado que grande parte da variação nos dados de carboidratos ao longo de 24 horas é devida a flutuações nos conteúdos de sacarose e frutose na raiz (principais componentes do primeiro descritor – Tabela 12B) o que corrobora a importância da atividade de órgãos dreno na coordenação do metabolismo de carboidratos junto aos tecidos fonte (Foyer & Paul, 2001).

Os horários entre 6 e 10 horas da manhã compreendem o intervalo onde ocorre o maior aumento na taxa fotossintética de *Senna reticulata* ao longo de 24 horas em ambos os tratamentos (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados). Em tratamento ambiente esta mudança na fotossíntese é acompanhada pelo aumento do conteúdo de sacarose na raiz (Figura 26 e 27) indicando que boa parte do carbono fixado nesse horário está sendo particionado para este órgão. Mesmo considerando outros horários, este padrão não foi observado em alto CO₂, mostrando que a alta disponibilidade e partição de carbono encontrada em plantas deste tratamento podem estar relacionadas ao aumento da taxa respiratória da raiz, levando a uma diminuição no conteúdo de sacarose, como proposto por Rogers *et al.* (1994) e Norby *et al.* (1992).

As correlações entre sacarose do caule e os açúcares amido, sacarose e frutose da raiz deixaram de existir em alto CO₂ provavelmente devido ao fato deste órgão ter sido o tecido que mais aumentou sua biomassa neste tratamento (Tabela 11 e Figura 29). Este padrão foi intensificado ao longo do crescimento (Tabela 5 e Figura 29) onde a sacarose da raiz perdeu a correlação com o conteúdo de amido em alto CO₂ provavelmente devido ao maior direcionamento da sacarose para o crescimento em detrimento da síntese de amido. Adicionalmente, o aparecimento da correlação entre sacarose e frutose neste mesmo órgão indica que uma maior utilização destes açúcares no crescimento da raiz culminou na diminuição de ambos em tratamento elevado. Contudo, apesar das tendências, essas variações relacionadas à sacarose na raiz ao longo do crescimento (principal descritor do quarto componente – Tabela 6B) não foram afetadas de forma significativa (Tabela 7) indicando mais uma vez que altos fluxos de mobilização como a rápida utilização de sacarose pelo tecido da raiz pode confundir o entendimento do efeito do tratamento.

A taxa de assimilação (fotossíntese) apresentou correlação positiva e significativa (Tabela 14) com a sacarose foliar (principal descritor do segundo componente principal – Tabela 12B) confirmando a estrita relação que a fotossíntese possui com o conteúdo de sacarose produzido na folha (Dennis & Blakeley, 2000). Contudo, o aumento de assimilação observado às 12 horas em plantas do tratamento elevado (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados) não foi acompanhado de observação proporcional no aumento de sacarose foliar. Uma explicação para essa observação é que em alto CO₂ a concentração de sacarose na folha foi correlacionada positivamente com as concentrações de frutose, glicose e sacarose do caule, indicando intensa mobilização dos açúcares sintetizados na folha para este órgão em 24 horas (Tabela 11 e Figura 29). Estes dados indicam que neste tratamento as altas taxas de utilização e/ou transporte destes açúcares para outros órgãos podem confundir o entendimento dessa relação. Adicionalmente, o amido do caule passou a não apresentar mais correlação significativa com o amido e glicose da folha provavelmente por deixar de depender da degradação do amido foliar para estoque de carboidrato no caule em alto CO₂ e passando a depender das altas taxas de síntese de sacarose provenientes da maior assimilação. Ao longo do crescimento a correlação entre amido da folha e do caule passa a existir evidenciando essas reservas como drenos importantes em alto CO₂ onde quanto maior a quantidade de amido foliar mais foi aumentada a concentração de amido no caule.

Na Tabela 8 podemos observar que a taxa de assimilação apresentou correlação negativa e significativa com o conteúdo de monossacarídeos (principais descritores do primeiro componente – Tabela 6B). Entre 15 e 30 dias verificou-se o maior aumento destes açúcares (Figura 13), bem como o decréscimo de cerca de 30% na taxa de assimilação (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados). Estas observações são consistentes com a hipótese de que em *S. reticulata* a regulação da fotossíntese seria mediada por sinalização de açúcares (Stitt & Smith, 2007; Foyer & Paul, 2001).

Senna reticulata é uma espécie pioneira que apresenta padrão de crescimento extremamente acelerado (Parolin, 2005; Poorter & Bergkotte, 1992). Aos 15 dias de experimento foi observada a maior taxa fotossintética concomitante aos maiores valores de taxa de crescimento relativo (ganho de biomassa por unidade de tempo e

de biomassa já existente) (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados). Neste mesmo período, *S. reticulata* apresentou os maiores valores de razão S:M observados nos três órgãos analisados e em ambos os tratamentos (Figuras 7, 8 e 9). Considerando que a ocorrência e duração de atividades fisiológicas nos órgãos determina, em parte, a taxa de crescimento relativo de uma espécie (Aphalo, 2010), podemos inferir que esteja ocorrendo altas taxas de transporte de sacarose a fim de suprir a demanda energética inerente ao crescimento vegetal nesse período. Aos 90 dias, foi encontrada diminuição da razão S:M em folhas e caules do tratamento ambiente devido à diminuição nas concentrações de monossacarídeos (Figuras 4 e 5). Esta diminuição pode ser explicada por uma maior utilização de monossacarídeos em tratamento ambiente devido a maiores taxas respiratórias da folha observadas nesta condição aos 90 dias (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados). Neste mesmo período (entre 75 e 90 dias) o amido foliar foi intensamente degradado em ambos os tratamentos (Figuras 13 e 14) devido às maiores taxas respiratórias da folha terem ocorrido aos 90 dias (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados). Em tratamento ambiente, esse amido foi degradado e os produtos mobilizados, culminando com um aumento de reserva de amido em caule e raiz, enquanto em alto CO₂ o investimento de 26% a mais de biomassa (Adriana Grandis, Bruna Arenque & Marcos Buckeridge, resultados não publicados) fez com que a planta não apresentasse aumento de reserva em nenhum dos órgãos.

5. CONCLUSÕES

Diante do exposto, a espécie *Senna reticulata* apresenta:

- A folha como principal órgão armazenador de amido.
- A concentração de amido foliar diminuída em períodos específicos de seu crescimento (aos 45 e 90 dias).
- Baixo conteúdo de amido na raiz quando comparada a outras espécies típicas de regiões alagadas.
- Altos níveis de sacarose em relação ao conteúdo de monossacarídeos em folha, caule e raiz.
- Alta proporção de lignina na composição da parede celular de folhas, caules e de maneira muito mais evidente em raízes.
- Baixa concentração de celulose na parede celular quando comparada a outras espécies arbóreas.
- Aumento de até 160% no teor de amido na folha e em até 135% no caule quando cultivada sob atmosfera enriquecida de CO₂.
- Tendência de diminuição dos açúcares glicose, frutose e sacarose sob tratamento de elevada concentração de gás carbônico.
- Menor diminuição do conteúdo de amido foliar durante o período noturno em tratamento de elevado CO₂ quando comparada ao tratamento ambiente em 60 dias de experimento.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto de resultados permitiu a confecção de um modelo de funcionamento a respeito de como o metabolismo de carboidratos de *Senna reticulata* se apresenta quando cultivada sob atmosfera enriquecida de CO₂ e a influência do mesmo sobre o crescimento de indivíduos desta espécie (Figura 30).

Figura 30. Esquema de respostas do metabolismo de carboidratos da espécie *Senna reticulata* ao alto CO₂

O modelo apresenta que elevadas concentrações de gás carbônico atmosférico aumentam a taxa fotossintética que leva a um aumento nos níveis de triose-P dentro do cloroplasto. A partir desse maior fluxo de carbono, *S. reticulata* responde a este estímulo aumentando a utilização de carboidratos no processo de crescimento da raiz. Em adição ao incremento de biomassa esta espécie aumenta a sua capacidade de estoque, drenando o excesso de carboidrato assimilado principalmente para suas reservas de amido na folha e no caule. Verificou-se que apesar da raiz dessa espécie não ser caracterizada como um típico órgão armazenador de amido, em alto CO₂ esse órgão também mostrou uma tendência de aumento de suas reservas. O

estabelecimento de fortes drenos como o de crescimento e de aumento de reservas aliado ao padrão de degradação noturno de amido transitório indicam que essa espécie regula negativamente os seus níveis de carboidratos solúveis a fim de minimizar a sinalização por açúcares, impedindo assim regulação negativa de genes relacionados à fotossíntese.

Diante destas respostas obtidas podemos inferir possíveis alterações no comportamento de indivíduos desta espécie em um cenário de mudanças climáticas globais. Podemos sugerir que em uma atmosfera enriquecida com CO₂ *Senna reticulata* possa se favorecer através do aumento de suas reservas de amido na fase terrestre diminuindo dessa forma as chances de limitação por carboidratos sob condições de alagamento. Adicionalmente, o período de alagamento constitui-se de um forte dreno de fotossintatos já que sob condições hipóxicas/anóxicas, espécies deste ambiente gastam muita energia para manter as funções metabólicas vitais. Portanto, em uma atmosfera enriquecida com CO₂, plantas de *Senna reticulata* crescendo em um ambiente alagado provavelmente aumentariam sua capacidade de resposta ao alto CO₂ devido ao fato da potência destes drenos impedirem a regulação negativa das taxas fotossintéticas.

Ainda há poucos experimentos combinando altas concentrações de CO₂ e alagamento em plantas e nenhum experimento com dicotiledôneas tropicais. Um deles foi feito com a árvore *Taxodium distichum*, uma espécie de cipreste do sudeste do EUA (Megonigal *et al.* 2005) e teve como objetivo testar a hipótese de que devido a diversas características negativas inerentes ao alagamento (diminuição do crescimento e da biomassa da raiz), o efeito “fertilizante” do alto CO₂ seria anulado e as plantas não apresentariam diferenças. Porém, apesar da hipótese ter sido confirmada, é importante ressaltar que plantas de regiões alagáveis da Amazônia, ao contrário de espécies de outras regiões do mundo, raramente apresentam diminuição nas taxas fotossintéticas e no crescimento, devido ao fato da condição de alagamento ocorrer em um período de condições ótimas de luz e temperatura e pelas diferentes estratégias (anatômicas, bioquímicas e fisiológicas) apresentadas por estas plantas nestas condições (Parolin *et al.*, 2004). A partir disto pode ser esperado que a condição de alagamento acoplada a elevada concentração de CO₂ promovam variações nos comportamentos fisiológicos e metabólicos já observados em alto CO₂ neste presente estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amor, Y.; Haigler, C.H.; Johnson, S.; Wainscott, M.; Delmer, D.P. 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 9353-9357.
- Acock B., Acock M.C.; Pasternak D. 1990. Interactions of CO₂ enrichment and temperature on carbohydrate production and accumulation in muskmelon leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115: 525-529.
- Albrecht, G.; Mustroph, A.; Fox, T.C. 2004. Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. *Physiologia Plantarum* 120: 93-105.
- Amaral, L.I.V.; Gaspar, M.; Costa, P.M.F.; Aidar, M.P.M.; Buckeridge M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34(4): 425-431.
- Aphalo, P.J. 2010. On how to disentangle the contribution of different organs and processes to the growth of whole plants. *Journal of Experimental Botany* 61(3): 626-628.
- Araya, T.; Noguchi, K.; Terashima, I. 2006. Effects of carbohydrate accumulation on photosynthesis differ between sink and source leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiology* 47(5): 644-652.
- Arpagaus, S. & Braendle, R. 2000. The significance of alfa-amylase under anoxia stress in tolerant rhizomes (*Acorus calamus* L.) and nontolerant tubers (*Solanum tuberosum* L.) var. Désirée. *Journal of Experimental Botany* 51: 1475-1477.
- Baier, M.; Hemmann, G.; Holman, R.; Corke, F.; Card, R.; Smith, C.; Rook, F.; Bevan, M.W. 2004. Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increased sugar 68 specific gene expression, growth, and developmental responses. *Plant Physiology* 134: 81-91.
- Bayley-Serres, J. & Voesenek, L.A.C.J. 2008. Flooding stress: Acclimation and genetic diversity. *Annual Review Plant Biology* 59: 313-339.
- Bloom, A. J.; Chapin, F. S. & Mooney, H. A. 1985. Resource limitation in plants – An economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 363-392.

- Borland, A. & Farrar, J.F. 1988. Compartmentation and fluxes of carbon in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L. and *Poa x jemtlandica* (Almq.) Richt. *Plant Cell and Environment* 11: 535-543.
- Buckeridge, M.S; Silva, G.B.; Cavalari, A.A. 2008. Parede celular. In: Kerbauy, G.B. (ed.) *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan S.A . R.J. p. 165-181.
- Carpita, N; McCann, M. 2000. Cell wall. In: *Biochemistry & molecular biology of plants* (eds.) B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. American Society of Plant Physiologists. p. 52-108.
- Cannell, M.G.R; Thornley, J.H.M. 2000. Modelling the components of plant respiration: some guiding principles. *Annals of Botany* 85: 45-54.
- Chatterton, N.J. & Silviu, J.E. 1979. Photosynthate partitioning into starch in soybean leaves I. Effects of photoperiod versus photosynthetic period duration. *Plant Physiology* 64: 749-753.
- Chaves, M.M.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S. 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239–264.
- Cheng, S.; Moore, B. & Seeman, R. 1998. Effects of short-and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 116: 715-723.
- Colmer, T.; Gibberd, M.; Wiengweera, A.; Tinh, T. 1998. The barrier to radial oxygen loss from roots of rice (*Oryza sativa* L.) is induced by growth in stagnant solution *Journal of Experimental Botany* 49: 1431-1436.
- Costa, P.M.F. 2004. Efeitos da alta concentração de CO₂ sobre o crescimento e o estabelecimento de plântulas do jatobá de mata *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Heyne). Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, Unicamp, Campinas.
- Crawford, R.M.M., 1992. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. *Advances in Ecological Research* 23: 93-185.

- Crookshanks, M.; Taylor, G.; Broadmeadow, M. 1998. Elevated CO₂ and tree root growth: contrasting responses in *Fraxinus excelsior*, *Quercus petraea* and *Pinus sylvestris*. *New Phytologist* 138: 241-250.
- Cruz, J. A.; Avenson, T. J., Kanazawa, A.; Takizawa, K.; Edwards, G. E. & Kramer, D.M. 2004. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56: 395-406.
- Davin, L.B.; Patten, A.M.; Jourdes, M.; Lewis, N.G. 2008. Lignins: A twenty-first century challenge. In: Himmel, M.E. *Biomass Recalcitrance. Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*. Blackwell Publishing. p. 213-287.
- De Menezes, E.M. 1978. Contribuição à morfologia comparativa de espécies daninhas do gênero *Cassia* L. (Leguminosae- Caesalpinoideae). I. Estudo das plantas jovens. *Revista Brasileira de Biologia* 38 (3): 537-548.
- De Simone, O.; Müller, E.; Junk, W.J. & Schmidt, W. 2002. Adaptations of central amazon tree species to prolonged flooding: root morphology and leaf longevity. *Plant Biology (Stuttg.)* 4(4): 515-522.
- de Souza, A.P. 2007. A cana de açúcar e as mudanças climáticas: Efeito de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Saccharum* ssp. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, Unicamp, Campinas.
- Dennis, D.T. & Blakeley, S.D. 2000. Carbohydrate Metabolism. *In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones R. (Eds) American Society of Plant Physiologists. p. 630-675.
- Donovan, L.A. & Ehleringer, J.R. 1991. Ecophysiological differences among juvenile and reproductive plants of several woody species. *Oecologia* 86: 594-597.
- Dos Santos, W.D.; Ferrarese, M.L.; Nakamura, C.V.; Mourão, K.S.M; Mangolin, C.A.; Ferrarese-Filho, O. 2008. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *Journal of Chemical Ecology* 34: 1230-1241.
- Drake, B.G.; Gonzalez-Meler, M.; Long, S.P. 1997. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 609-639.

- Drew, D.C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 223-250.
- Drew, M.C.; Jackson, M.B.; Giffard, S. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. *Planta* 147: 83-88.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Epstein, E. 1972. *Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, New York. 412 p.
- Penning de Vries, F.W.T.; Brunsting A.H.M. & van Laar, H.H. 1974. Products, requirements and efficiency of biosynthesis: a quantitative approach. *Journal Theoretical Biology* 45: 339–377.
- Farrar, J.F. & Williams, M.L. 1991. The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant Cell and Environment* 14: 819-830.
- Ferreira, C.S.; Piedade, M.T.F.; Tiné, M.A.S.; Rossato, D.R.; Parolin, P.; Buckeridge, M.S. 2009. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. *Annals of Botany* 104(6): 1111-1119.
- Fitter, A.H.; Self, G.K.; Wolfenden, J.; van Vuuren, M.M.I.; Brown, T.K.; Williamson, L.; Graves, J.D.; Robinson, D. 1996. Root production and mortality under elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant and Soil* 187: 299-306.
- Fondy, B.R. & Geiger, D.R. 1982. Diurnal pattern of translocation and carbohydrate metabolism in source leaves of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology* 70: 671-676.
- Fondy, B.R.; Geiger, D.R. & Servaites, J.C. 1989. Photosynthesis, carbohydrate metabolism and export in *Beta vulgaris* L. and *Phaseolus vulgaris* L. during square and sinuisodal light regimes. *Plant Physiology* 89: 396-402.

- Foyer, C.H. & Paul, M.J. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 360(52): 1383-1400.
- Francis D. & Halford N.G. 2006. Nutrient sensing in plant meristems. *Plant Molecular Biology* 60: 981–993.
- Gardner, S.D.L.; Taylor, G.; Bosac, C. 1995. Leaf growth of hybrid poplar following exposure to elevated CO₂. *New Phytologist* 131: 81-90.
- Gibeaut, D. M.; Cramer, G.R. & Seemann, J.R. 2001. Growth, cell walls, and UDP-Glc dehydrogenase activity of *Arabidopsis thaliana* grown in elevated carbon dioxide. *Journal of Plant Physiology*. 158(5): 569-576.
- Gibon, Y.; Pyl, E.T.; Sulpice, R.; Hohne. M. & Stitt, M. 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant Cell and Environment* 32(7): 859 – 874.
- Gorshkova, T.A.; Wyatt, S.E.; Salnikov, V.V.; Gibeaut, D.M.; Ibragimov, M.R.; Lozovaya V.V.; Carpita, N.C. 1996. Cell wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* 110: 721-729.
- Griffin, K.L.; Winner, W.E. & Strain, B.R. 1996. Construction cost of loblolly and ponderosa pine leaves grown with varying carbon and nitrogen availability. *Plant Cell and Environment* 19 (6): 729 – 738.
- Grime, J.P. 1997. Climate change and vegetation. In: *Plant Ecology*. Crawley, M.J. (ed.). 2nded. Blackwell Publishing. p. 582-594.
- Gunderson, C.A. & Wullschleger, S.D. 1994. Photosynthetic acclimation in trees to rising atmospheric CO₂: a broader perspective. *Photosynthesis Research* 39: 369-388.
- Havelka, U.D.; Wittenbach, V.A.; Boyle, M.G. 1984. CO₂ enrichment effects on wheat yield and physiology. *Crop Science* 24:1163-1168.
- Hewitt, J.D.; Casey, L.L.; Zobel, R.W. 1985. Effect of day length and night temperature on starch accumulation and degradation in soybean. *Annals of Botany* 56: 513:522.

- Huber, S.C. & Huber, J.L. 1996. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 431–444.
- Hyndman, S.E.; Hasegawa, P.M. & Bressa, R.A. 1981. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 1(1): 229-238.
- Ingram, J. & Bartels, D. 1996. The Molecular Basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 47: 377–403.
- IPCC. 2007. Intergovernmental Panel of Climatic Change WGII, fourth assessment report (<http://www.ipcc.ch>) Acesso: 01/12/2009.
- Jeannette, E.; Reyss, A.; Gregory, N.; Gantet, P.; Prioul, J.L. 2000. Carbohydrate metabolism in a heat-girdled maize source leaf. *Plant Cell and Environment* 23: 61–69.
- Junk, W.J. 1989. Flood tolerance and tree distribution in Central Amazonian floodplains. *In*: Nielsen, L.B.; Nielsen, I.C.; Balslev, H. (eds.) *Tropical forests: botanical dynamics, speciation and diversity*. London: Academic Press. p. 47-64.
- Kaakinen, S.; Kostianen, K.; Ek, F.; Saranpää, P.; Kubiske, M.E.; Sobers, J.; Karnosky, D.F. & Vapaavuori, E. 2004. Stem wood properties of *Populus tremuloides*, *Betula papyrifera* and *Acer saccharum* saplings after 3 years of treatments to elevated carbon dioxide and ozone. *Global Change Biology* 10: 1513–1525.
- Keeling, C.D.; Whorf, T.P.; Wahlen, M. & Van der Plicht, J. 1995. Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980. *Nature*. 375: 666-670.
- Körner C. & Arnone J.A. III. 1992. Responses to elevated carbon dioxide in artificial tropical ecosystems. *Science* 257: 1672-1675.
- Körner, C. & Miglietta, F. 1994. Long term effects of naturally elevated CO₂ on mediterranean grassland and forest trees. *Oecologia* 90: 343-351.
- Körner, C.; Pelaez-Riedl, S; Van Bel. A.J.E. 1995. CO₂ responsiveness of plants: a possible link to phloem loading. *Plant, Cell and Environment* 18: 595-600.

- Krapp, A., Quick, W.P. and Stitt, M. (1991) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta* 186: 58-69.
- Krapp, A. and Stitt, M. (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the 'sink-regulation' of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195: 313–323.
- Lambers, H.; Stuart Chapin III, F.; Pons, T. 2008. *Plant Physiological Ecology*. Second edition . Springer. 604p.
- Leegood, R. C.; Sharkey, T. & von Caemmerer, S. 2000. Introduction. *In*: Leegood, R. C.; Sharkey, T. & von Caemmerer, S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. pgs.1-8.
- Legendre, P. & Legendre, L. 1998. *Numerical Ecology*. 2 ed. Elsevier, 852p.
- Lemaire K., Van de Velde S., Van Dijck P., Thevelein J.M. 2004. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* 16: 293–299.
- Li, B.; Geiger, D. R.; Shien, W.J. 1992. Evidence for circadian regulation of starch and sucrose synthesis in sugar beet leaves. *Plant Physiology* 99: 1393-1399.
- Lindroth, R.L.; Kinney, K.K.; Platz, C.L.1993. Responses of deciduous trees to elevated atmospheric CO₂: productivity, phytochemistry, and insect performance. *Ecology* 74: 763-777.
- Lloyd, J. C. & Zakhleniuk, O. V. 2004. Responses of primary and second metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant pho3. *Journal of Experimental botany* 55: 1221-1230.
- Ludewig, F.; Sonnewald, U.; Kauder, F.; Heineke, D.; Geiger, M.; Stitt, M.; Muller-Rober, B.T.; Gillissen, B.; Kuhn, C. & Frommer, W.B. 1998. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS Letters* 429: 147–151.
- Luo, Y.; Chen, J.L.; Reynolds, J.F.; Field, C.B.; Mooney, H.A. 1997. Disproportional increases in photosynthesis and plant biomass in a Californian grassland exposed to elevated CO₂: a simulation analysis. *Functional Ecology* 11: 696-704.

- Magel, E.; Einig, W. & Hampp, R. 2000. Carbohydrates in trees. *In*: A.K. Gupta, N. Kaur (eds.) Carbohydrates reserves in plants – synthesis and regulation. Developments in Crop Science 26. p. 317-336.
- Marek, M.V.; Kalina, J. & Matouskoá, M. 1995. Response of photosynthetic carbon assimilation of Norway spruce exposed to long-term elevation of CO₂ concentration. *Photosynthetica* 31: 209-220.
- Marenco, R.A.; De C. Gonçalves, J.F; Vieira, G. 2001. Leaf gas exchange and carbohydrates in tropical trees differing in successional status in two light environments in central Amazonia. *Tree Physiology* 21: 1311-1318.
- Martin, C. & Smith, A. M. 1995. Starch biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 971-985.
- Martin, W.; Scheibe, R. & Schnarrenberger C. 2000. The Calvin Cycle and its regulation. *In*: Leegood, R. C.; Sharkey, T. & von Caemmerer. S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. p. 9-51.
- Paul, M.J; Foyer, C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 360 (52): 1383-1400.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell wall of plants. *Annual Review of Biochemistry* 53: 625-663.
- Melis, A. 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science* 4(4): 130-135.
- Megonigal, J.P.; Vann, C.D.; Wolf, A.A. 2005. Flooding constraints on tree (*Taxodium distichum*) and herb growth responses to elevated CO₂. *Wetlands* 25(2): 430-438.
- Moog, P. R. & Janiesch, P. 1990. Root growth and morphology of *Carex* species as influenced by oxygen deficiency. *Functional Ecology* 4: 201-208.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T.; Sheen J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signalling. *Science* 300: 332–336.
- Nafziger, E.D. & Koller, H.R. 1976. Influence of leaf starch concentration on CO₂ assimilation in soybean. *Plant Physiology* 57: 560-563.

- Nle, G.; Hendrix, D.L.; Weber, A.N.; Kimball, B.A.; Long, S.P. 1995. Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at elevated CO₂ concentration in the field. *Plant Physiology* 108: 975-983.
- Norby, R. J.; Gunderson, C. A.; Wullschlegel, S. D., O'Neill, E. G.; McCracken, M. K. 1992. Productivity and compensatory responses of yellow-poplar trees in elevated CO₂. *Nature* 357: 322-34.
- Oksanen, E.; Riikonen, J.; Kaakinen, S.; Holopainen, T.; Vapaavuori, E. 2005. Structural characteristics and chemical composition of birch (*Betula pendula*) leaves are modified by increasing CO₂ and ozone. *Global Change Biology* 11: 732–748.
- Parolin, P. 2001. *Senna reticulata*, a pioneer tree from amazonian várzea floodplains. *The Botanical Review* 67(2): 239-254.
- Parolin, P. 2005. *Senna reticulata* (Willd.) H. S. Irwin & Barneby (Fabaceae) as "pasture killer" ("matapasto") pioneer tree in amazonian floodplains. *Ecologia aplicada* 4(1-2): 41-46.
- Parolin, P.; De Simone, O.; Haase, K.; Waldhoff, D.; Rottenberger, S.; Kuhn, U.; Kesselmeier, J.; Kleiss, B.; Schmidt, W.; Piedade, M.T.F. & Junk, W.J. 2004. Central Amazonian Floodplain Forests: Tree adaptations in a Pulsing System. *The Botanical Review* 70(3): 357-380.
- Parolin, P.; Lucas, C.; Piedade, M.T.F. & Wittmann, F. 2009. Drought responses of flood-tolerant Amazonian trees. *Annals of Botany* 105: 129–139.
- Paul, M.J; Stitt, M. 1993. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant Cell and Environmental* 16: 1047-1057.
- Pego, J.V.; Kortstee, A.J.; Huijser, C. & Smeekens, S. 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany* 51: 407-416.
- Penning de Vries, F.W.T.; Brunsting, A.H.M.; van Laar, H.H. 1974. Products, requirements and efficiency of biosynthesis: a quantitative approach. *Journal Theoretical Biology* 45: 339–377.

- Piedade, M.T.F.; Ferreira, C.S.; Oliveira-Wittmann, A.; Buckeridge, M.S.; Parolin, P. 2009. Biochemistry of Amazonian floodplain vegetation. *In*: Junk, W.J.; Piedade, M.T.F.; Parolin, P.; Wittman, F. & Schöngart, J. (eds.) Central Amazonian floodplain forests: ecophysiology, biodiversity and sustainable management. Ecological studies Heidelberg: Springer (no prelo).
- Poorter, H. & Bergkotte, M. 1992. Chemical composition of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant, Cell and Environment* 15: 221-229
- Poorter, H.; Van Berkel, Y.; Baxter, R.; Den Hertog, J.; Dijkstra, P.; Gifford, R.M.; Griffin, K.L.; Roumet, C.; Roy, J. & Wong, S.C. 1997. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant, Cell and Environment* 20: 472-482.
- Poorter, L. & Kitajima, K. 2007. Carbohydrate storage and light requirements of tropical moist and dry forest tree species. *Ecology* 88(4): 1000-1011.
- Prance, G.T. 1979. Notes on the vegetation of Amazonia. III. Terminology of Amazonian Forest types subjected to inundation. *Brittonia*. 31(1): 26-38.
- Preiss, J. 1988. Biosynthesis of starch and its regulation. *In*: The Biochemistry of Plants. J. Preiss (ed.). Academic Press San Diego, CA. Vol 14. p. 181–254.
- Quick, P.; Siegl, G.; Neuhaus, E., Feil, R. & Stitt, M. 1989. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta* 177: 535–46.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 2001. *Biologia vegetal*. Guanabara Koogan S.A. 943p.
- Retallack, G.J. 1997. Early Forest soils and their role in devonian global change. *Science* 276: 583-585.
- Ribeiro, M.N.G. & Adis, J. 1989. Local Rainfall Variability – A potential bias for bioecological studies in the central amazon. *Acta Amazonica*. 14: 159-174.
- Rogers, H.H; Runion, G.B.; Krupa, S.V. 1994. Plant Responses to atmospheric enrichment with emphasis on roots and the rizosphere. *Environmental Pollution* 83: 155-189

- Sicher, R.C. & Kremer, D.F. 1984. Changes of Sucrose-Phosphate Synthase Activity in Barley Primary Leaves during Light/Dark Transition. *Plant Physiology* 76: 910-912.
- Rolland, F.; Moore, B. & Sheen, J. 2002. Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell*, S185–S205, Supplement.
- 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
- Ruffy, T.W.; Huber, S.C. & Volk, R.J. 1988. Alternations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiology* 88: 725-730.
- Salnikov, V.V.; Grimson, M.J.; Delmer, D.P.; Haigler, C.H. 2001. Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. *Phytochemistry* 57: 823-833.
- Sawada, S.; Usuda, H. & Tsukui, T. 1992. Participation of inorganic orthophosphate in regulation of the ribulose-1-5-bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the photosynthetic source:sink balance. *Plant Cell Physiology* 33: 943-949.
- Saxe, H.; Ellsworth, D.S. & Heath, J. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytologist*, 139(3): 395-436.
- Scarano, F.B.; Cattânio, J.H. & Crawford, R.M.M. 1994. Root carbohydrate storage in young saplings of Amazonian tidal várzea forest before the onset of the wet season. *Acta Bot Bras* 8(2): 129-139.
- Schlüter, U. & Crawford, R.M.M. 2001. Long-term anoxia tolerance in leaves of *Acorus calamus* L. and *Iris pseudacorus* L. *Journal of Experimental Botany* 52: 2213-2225.
- Sewa, Ram. 2000. Role of sucrose hydrolysing enzymes in flooding tolerance in *Brachiaria* species. *Indian Journal of Plant Physiology* 5(1). s/p.
- Sharkey, T. D. 1985. Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review*. 51: 53-105.

- Sharkey, T.D.; Laporte, M.; Lu, Y.; Weise, S. & Weber, A.P.M. 2004. Engineering plants for elevated CO₂: A relationship between starch degradation and sugar sensing. *Plant Biology* 6: 280-288.
- Silva, G.B. 2005. A parede celular na filogenia e evolução de Pteridophytae. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, Instituto de Botânica. São Paulo.
- Smith A. M.; Zeeman, S. C. & Smith, S. M. 2005. Starch degradation. *Annual Review Plant Biology* 56: 73-98.
- Smith, A. M. & Stitt, M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environmental* 30: 1126-1149.
- Smith, A.M.; Denyer, K. & Martin, C. 1997. The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 67–87.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F.J. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3 ed. W. H. Freeman and Co.: New York, 887p.
- Sombroek, W. 2001. Spatial and temporal patterns of Amazonian rainfall: consequences for the planning of agricultural occupation and the protection of primary forests. *Ambio: a journal of the human environment* 30: 388–396.
- Staudt, M.; Joffre, R.; Rambal, S. & Kesselmeier, J. 2001. Effect of elevated CO₂ on monoterpene emission of Young *Quercus ilex* trees and its relation to structural and ecophysiological parameters. *Tree Physiology* 21: 437-445.
- Stitt, M. 1986. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. *Physiology Plantarum* 81: 1115-1122
- Stitt M. 1990. Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 153–185.
- Stitt M. 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741–762.
- Stitt, M. & Quick, W.P. 1989. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. *Physiology Plantarum* 77: 633-641

- Stitt, M. 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant cell and environment*. 14(8): 741-762.
- Su, P.H.; Wu, T.H.; Lin, C.H. 1998. Root sugar level in luffa and bitter melon is not referential to their flooding tolerance. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 175-179
- Sulpice, R.; Pyl, E.T.; Ishihara, H.; Trenkamp, S.; Steinfath, M.; Witucka-Wall, H.; Gibon, Y.; Usadel, B.; Poree, F.; Piques, M.C. et al. 2009. Starch as a main integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 10348–10353.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2009. *Fisiologia Vegetal*. 4^a ed. Artmed. 819p.
- Teng, N.; Wang, J.; Chen, T.; Wu, X. & Lin, J. 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 172: 92-103.
- Trethaway, R. & Smith, A. M. 2000. Starch metabolism in leaves. In: Leegood, R. C.; Sharkey, T. & von Caemmerer, S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. p. 205-231.
- van Oosten, J.J. & Besford, R.T. 1996. Acclimation on photosynthesis to elevated CO₂ through feedback regulation of gene expression: climate of opinion. *Photosynthesis Research* 48: 353-365.
- Warren Wilson J., Roberts L.W., Warren Wilson P.M.; Gresshoff P.M. 1994. Stimulatory and inhibitory effects of sucrose concentration on xylogenesis in lettuce pith explants; possible mediation by ethylene biosynthesis. *Annals of Botany* 71: 65–73.
- Webb, W.L. & Kilpatrick, K.J. 1993. Starch Content in Douglas-Fir: Diurnal and seasonal dynamics. *Forest Science* 39 (2): 359-367.
- Wiese, A.; Elzinga, N.; Wobbes, B. & Smeekens, S. 2004. A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell* 16: 1717–1729.
- Williams, J.H.H & Farrar, J.F. 1990. Control of barley root respiration. *Physiologia Plantarum* 79: 259-266.

- Williams, M.L.; Farrar, J.F.; Pollock C.J. 1989. Cell specialization within the parenchymatous bundle sheath of barley. *Plant Cell and Environment* 12: 909-918.
- Wong, S. 1990. Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth. Non-structural carbohydrate content in cotton plants and its effect on growth parameters. *Photosynthesis Research* 23: 171-180
- Wullschlegel, S.D.; Norby, R.J. & Hendrix, D.L. 1992. Carbon exchange rates, chlorophyll content, and carbohydrate status of two forest tree species exposed to carbon dioxide. *Tree Physiology* 10 (1): 21-31.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4.ed. Prentice Hall, New Jersey, 929p.
- Zeeman, S.C.; Smith, S.M. & Smith, A.M. 2004. The breakdown of starch in leaves. *New Phytologist* 163(2): 247-261.