UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Análises fisiológicas e bioquímicas da forrageira tropical
Panicum maximum Jacq. (Poaceae) cultivada em
elevado CO₂ atmosférico e aquecimento**

ANDRESSA UEHARA APPROBATO

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da USP, como parte
das exigências para obtenção de
título de Doutor em Ciências,
Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO-SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Análises fisiológicas e bioquímicas da forrageira tropical
Panicum maximum Jacq. (Poaceae) cultivada em
elevado CO₂ atmosférico e aquecimento**

ANDRESSA UEHARA APPROBATO

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez y Huaman

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da USP, como parte
das exigências para obtenção de
título de Doutor em Ciências,
Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO-SP

2015

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

Approbato, Andressa Uehara.

Análises fisiológicas e bioquímicas de uma espécie forrageira tropical cultivada em elevado CO₂ atmosférico e aquecimento. Ribeirão Preto, 2015.

103 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Martinez y Huaman, Carlos Alberto

1. Biomassa. 2. Fotoproteção. 3. Eficiência fotoquímica. 4. Forrageira. 5. Mudanças climáticas.

Dedico este trabalho:
A toda minha família e a todos meus amigos de laboratório
que me apoiaram e me ajudaram com muito carinho e paciência.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se eu quiser conhecer as borboletas...”

Antonie de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto FAPESP-RPGCC *“Experimento miniFACE para analisar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento sobre a fotossíntese, expressão gênica, bioquímica, crescimento, dinâmica de nutrientes e produtividade de duas espécies forrageiras tropicais contrastantes”*

Ao Prof^o Dr. Carlos Alberto Martinez y Huaman pela grande oportunidade e confiança depositada para a realização deste projeto e pela orientação concedida durante estes quatro anos.

À pesquisadora Dra. Márcia Braga do Instituto de Botânica de São Paulo pela colaboração nas análises do metabolismo de carboidratos e pela coorientação que foi essencial para que este trabalho fosse realizado. Obrigada também pela amizade, a atenção, a paciência, o apoio e por estar sempre à disposição.

Ao Prof^o Dr. Sergi Munné Bosch da Universidade de Barcelona pela colaboração nas análises de estresse oxidativo e pela orientação, o apoio, a paciência e principalmente por ter acreditado e confiado no meu trabalho. Obrigado por ter me proporcionado esta oportunidade de trabalhar junto com sua equipe que foi uma experiência que me fez crescer não só profissionalmente, mas também pessoalmente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada e à secretária Vera de Lucca pela atenção e ajuda durante todos esses anos.

Em especial aos meus companheiros de laboratório:

À Tetê por sua amizade tão querida e pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Às companheiras de trabalho Tathy e Juliana que estavam sempre dispostas a ajudar.

Aos “grandes” homens do laboratório: Sapão obrigado pelos conselhos e ajuda na elaboração desta tese. Ao Lucas, Vitor e Eduardo que continuam na empreitada e que além da ajuda proporcionaram momentos de descontração no laboratório e durante o trabalho árduo de campo.

Agradeço também aos que já se foram em busca de novos caminhos, mas que estiveram também presentes ajudando direta ou indiretamente neste trabalho. À minha querida amiga Laís que foi companheira em todos os momentos dentro e fora do laboratório, à Letícia e ao André. Em especial ao meu querido amigo Matheus pela

paciência e pela ajuda essencial não só neste trabalho, mas em todo o projeto temático.

Às amigas e ex-companheiras de trabalho, que me ajudaram e me apoiaram sempre, mesmo depois de estarem muito e muito longe. À Hildinha que me ensinou e tem me ensinado muito. À Dani pelo companheirismo, contribuição e ajuda não só no laboratório da USP, mas também Universidade de Barcelona (obrigado por tudo). À Daia pela amizade e pela ajuda nas análises experimentais.

Aos novos amigos e companheiros de laboratório que além da ajuda e companheirismo agradeço também pelos momentos agradáveis e divertidos que proporcionamos juntos. A todos do Laboratório de Biologia Vegetal da Universidade de Barcelona: Às amigas Vero, Laura, Bárbara e Eva que espero encontrá-las em breve aqui no Brasil ou na Espanha, e também à Marta, à Jana e ao Xavier.

A todos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo e em especial à Daia e ao Evandro, e aos amigos que conquistei no alojamento do Instituto pelos momentos difíceis e divertidos que passamos juntos.

Aos professores e técnicos de outros laboratórios, pela ajuda e a disponibilização e utilização de aparelhos:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Pesquisadora Dra. Márcia Braga e ao técnico Pedro. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Prof^a. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley e ao técnico José Orestes. Laboratório de Biofísica e Bioquímica de proteínas do Prof^o. Dr. Richard John Ward. Laboratório de Ecologia Química e Restauração Florestal da Prof^a. Dra. Elenice Mouro Varanda e ao técnico José Ricardo Barosela. Laboratório de Farmacognosia do Prof^o Dr.

Fernando Batista Costa e ao técnico Mário Sadaiti Ogasawara

A todos os amigos e técnicos da Botânica pelo convívio e a amizade, e em especial ao jardineiro Joel que nos ajudou muito durante todos estes quatro anos de projeto.

A todos os meus velhos e novos amigos da pós-graduação que desde o mestrado tem me acompanhado e me apoiado sempre. À Liah e Aninha, duas amigas especiais que mesmo longe continuam aqui pertinho de mim sempre me ajudando e apoiando. À Juzinha minha pequena grande amiga que além do apoio é meu

maior exemplo profissional. À Gisele, Juca, Ronai, Antônio, Mari, Daia, Mio, Lumi,
Marco e Levi.

E a todos os meus eternos amigos, que não foram citados, agradeço por estarem
sempre do meu lado nos momentos de tristezas e alegrias.

A toda minha família e em especial
aos meus amados pais Carlos e Emiko, e aos meus queridos irmãos Aline e Davi. O meu
eterno agradecimento pelo o apoio, à ajuda, a paciência, o amor e ao
carinho que tem me dado sempre!

Em memória aos meus avós que hoje estão junto ao pai eterno e que deixam
muitas saudades. À vó Luzia, vô Carlito, vó Sakae e vô Hisashi.

Por fim, a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para que este trabalho
fosse realizado.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS DE SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO GERAL.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
JUSTIFICATIVA.....	5
OBJETIVOS.....	5
Objetivo geral.....	5
Objetivos específicos.....	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Área experimental e descrição do sistema Trop-T-FACE.....	6
Material vegetal e condições de cultivo.....	10
Delineamento experimental e análise estatística.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
 CAPÍTULO I: Crescimento e produtividade da forrageira tropical <i>Panicum maximum</i> Jacq. (Poaceae) em resposta ao aquecimento e ao elevado CO₂.....	 15
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. HIPÓTESE.....	20
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Coleta das plantas.....	21
4.2. Avaliações.....	21
4.2.1. Análise de crescimento.....	21
4.2.2. Extração de açúcares solúveis.....	22
4.2.3. Análise quantitativa de açúcares.....	22
4.2.4. Análise de amido.....	23
4.2.5. Extração de parede celular.....	23
4.2.6. Determinação de celulose.....	24
4.2.7. Qualidade da forragem.....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Dados microclimáticos.....	25
5.2. Biomassa e parâmetros de crescimento.....	27
5.3. Metabolismo de carboidratos.....	30
5.3.1. Açúcares solúveis totais.....	30
5.3.2. Açúcares redutores.....	34
5.3.3. Amido.....	34
5.3.4. Celulose.....	34
5.4. Qualidade da forragem.....	35
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPÍTULO II: Ajustes no sistema fotoquímico e de fotoproteção do PSII em resposta ao aquecimento e elevado CO₂ na planta C₄, <i>Panicum maximum</i> Jacq. (Poaceae).....	51
RESUMO.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. HIPÓTESE.....	57
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1. Coleta das plantas.....	57
4.2. Avaliações.....	58
4.2.1. Monitoramento da fluorescência.....	58
4.2.2. Avaliação de peroxidação de lipídios (MDA).....	58
4.2.3. Determinação de hidróxido lipídico (LOOH).....	59
4.2.4. Concentração de pigmentos fotossintéticos.....	59
4.2.5. Determinação de tocoferol.....	60
4.2.6. Determinação de ascorbato oxidado e reduzido.....	61
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	61
5.2. Peroxidação de lipídios e hidroperóxido lipídico.....	63
5.3. Pigmentos fotossintéticos.....	64
5.4. Carotenóides e ciclo das xantofilas.....	66
5.5. Tocoferóis.....	70
5.6. Ascorbato.....	71
6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÃO.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
CONSIDERAÇÃO FINAL.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Anteraxantina
A ₄₈₀	Absorbância a 480 nm
A ₆₄₅	Absorbância a 645 nm
A ₆₆₃	Absorbância a 663 nm
AA	Ácido ascórbico
AFE	Área foliar específica
AO	Ascorbato oxidase
BHT	Hidroxitolueno butilado
Car	Carotenóides ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	Razão clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i>
Chl <i>a+b</i>	Clorofila total ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
ct	Controle
C _i	Concentração intercelular de CO ₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
DHA	Dehidroascorbato
DPS	Estado de-epoxidação do ciclo da xantofila
DTPA	Dietilentriamina penta acético
DTT	Ditiotreitol
eC	Tratamento de elevada concentração atmosférica de CO ₂ (600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$)
eC+eT	Tratamento de elevada concentração atmosférica de CO ₂ (600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e elevada temperatura (+2°C)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
eT	Tratamento de elevada temperatura (+2°C)
FACE	<i>Free Air CO₂ Enrichment</i> (Enriquecimento de CO ₂ ao ar livre)
FDA	Fibra em detergente ácido
FFFA	Fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
F _m	Fluorescência máxima
F _o	Fluorescência inicial
F _v	Fluorescência variável ($F_m - F_o$)
F _v /F _m	Eficiência quântica máxima do fotossistema II
HPLC	<i>High Performance Liquide Chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
L ₀	Primeira leitura no espectrofotômetro
Lf ₁	Segunda leitura no espectrofotômetro após aplicação de DTT
Lf ₂	Segunda leitura no espectrofotômetro após aplicação de AO
LOOH	Hidroperóxido lipídico ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$)
Lx	Luteína epóxido
MDA	Malondialdeído (nmol g^{-1} massa seca)

meOH	Metanol
MS	Massa seca
NPK	Nitrogênio-Fósforo-Potássio
OTC	<i>Open Top Chambers</i> (Câmaras de topo abeto)
POPFACE	<i>Poplars under Free Air CO₂ Enrichment</i> (Álamo sob enriquecimento de CO ₂ ao ar livre)
PRNT	Poder Relativo de Neutralização Total
PSII	Fotossistema II
PVPP	Polivinilpirrolidona
Rubisco	Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase
T _b	Temperatura base
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
T-FACE	<i>Temperature-Free Air Controlled Enhancement</i> (Aumento controlado da temperatura ao ar livre)
TPP	Trifenilfosfina
UR	Umidade relativa do ar (%)
V	Violaxantina
VAZ	Ciclo da xantofila
Z	Zeaxantina
[CO ₂]	Concentração de CO ₂ atmosférico

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.	Foto satélite (Foto: <i>Google Earth</i>) e vista geral da área experimental na USP de Ribeirão Preto (Foto: Matheus Bianconi).....	8
Figura 2.	Esquema geral do sistema mini Trop-T-FACE, mostrando as 16 unidades experimentais com 4 repetições para cada tratamento: controle, elevada [CO ₂] e temperatura ambiente (eC), [CO ₂] ambiente e aquecimento (eT), e elevada [CO ₂] e aquecimento (eC+eT).....	9
Figura 3.	Foto da unidade experimental com as plantas de <i>Panicum maximum</i> e o sistema Trop-T-FACE (Foto: Andressa Approbato).....	9

CAPÍTULO I

Figura 1.	Temperatura do ar na área experimental (°C) durante todo o experimento.....	25
Figura 2.	Precipitação (mm) durante o experimento.....	25
Figura 3.	Densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$) durante o experimento.....	26
Figura 4.	Massa seca de folha (g), massa seca de colmo (g), massa seca da parte aérea (g) e razão folha/colmo de <i>Panicum maximum</i> ao final do experimento, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) (P<0,05; Teste de Tukey). P_C = CO ₂ ; P_T = aquecimento; P_{CXT} = CO ₂ e aquecimento.....	27
Figura 5.	AFE ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) de folhas de <i>Panicum maximum</i> após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) (P<0,05; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.....	29
Figura 6.	Açúcares solúveis totais (mg g^{-1} MF), açúcares redutores (mg g^{-1} MF) e amido (mg g^{-1} MS) em folhas de <i>Panicum maximum</i> após 30 e 80 dias de tratamento em um curso diurno, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) (P<0,05; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.....	31
Figura 7.	Celulose (mg g^{-1} MS) em folhas de <i>Panicum maximum</i> após 30 e 80 dias de tratamento em um curso diurno, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) (P<0,05; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.....	35
Figura 8.	Lignina (%), proteína bruta (%) e fibra detergente ácido (FDA %) em <i>Panicum maximum</i> após 86 dias de experimento crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) (P<0,05; Teste de Tukey). P_C = CO ₂ ; P_T = aquecimento; P_{CXT} = CO ₂ e aquecimento.....	36

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Eficiência fotoquímica (F_w/F_m) em folhas de *Panicum maximum* após de 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey)..... 63
- Figura 2.** Malondialdeído (MDA nmol g⁻¹ MS) e hidroperóxido lipídico (LOOH μ mol g⁻¹ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento..... 64
- Figura 3.** Concentração de clorofila *a* (Chl *a* μ mol g⁻¹ MS), clorofila *b* (Chl *b* μ mol g⁻¹ MS), clorofila total (Chl *a+b* μ mol g⁻¹ MS) e razão clorofila *a* por clorofila *b* (Chl *a*/ Chl *b*) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey).). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento..... 65
- Figura 4.** Concentração de β -caroteno (μ mol g⁻¹ MS) e luteína (μ mol g⁻¹ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento..... 67
- Figura 5.** Conteúdo de violaxantina (μ mol g⁻¹ MS), anteraxantina (μ mol g⁻¹ MS) e zeaxantina (μ mol g⁻¹ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento..... 68
- Figura 6.** Xantofilas (VAZ μ mol g⁻¹ MS) e estado de-epoxidação do ciclo das xantofilas (DPS=(Z+0,5A/V+Z+A)) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento. A, anteraxantina; V, violaxantina; Z, zeaxantina.. 69
- Figura 7.** Conteúdo de α -tocoferol (μ mol g⁻¹ MS) e γ -tocoferol (μ mol g⁻¹ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento..... 70
- Figura 8.** Ascorbato (μ mol g⁻¹ MS) e estado redox (%) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento..... 71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Efeitos dos tratamentos de CO ₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais na biomassa de <i>Panicum maximum</i> crescendo em sistema Trop-T-FACE. Massa seca das folhas (g), massa seca do colmo (g), massa seca da parte aérea (g) e razão folha/colmo. Tratamentos: controle (ct), elevado CO ₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO ₂ e aquecimento (eC+eT).....	28
Tabela 2.	Efeitos dos tratamentos de CO ₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais na AFE (cm ² g ⁻¹) de <i>Panicum maximum</i> durante um curso diurno aos 30 e 60 dias de experimentos crescendo em sistema Trop-T-FACE. Tratamentos: controle (ct), elevado CO ₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO ₂ e aquecimento (eC+eT).....	29
Tabela 3.	Efeitos dos tratamentos de CO ₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais de carboidratos em folhas de <i>Panicum maximum</i> durante um curso diurno aos 30 dias de experimentos crescendo em sistema Trop-T-FACE. Açúcares solúveis (mg g ⁻¹ MF), açúcares redutores (mg g ⁻¹ MF), amido (mg g ⁻¹ MS) e celulose (mg g ⁻¹ MS). Tratamentos: controle (ct), elevado CO ₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO ₂ e aquecimento (eC+eT).....	32
Tabela 4.	Efeitos dos tratamentos de CO ₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais de carboidratos em folhas de <i>Panicum maximum</i> durante um curso diurno aos 80 dias de experimentos crescendo em sistema Trop-T-FACE. Açúcares solúveis (mg g ⁻¹ MF), açúcares redutores (mg g ⁻¹ MF), amido (mg g ⁻¹ MS) e celulose (mg g ⁻¹ MS). Tratamentos: controle (ct), elevado CO ₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO ₂ e aquecimento (eC+eT).....	33
Tabela 5.	Efeitos dos tratamentos de CO ₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais na qualidade nutricional de <i>Panicum maximum</i> crescendo em sistema Trop-T-FACE. Lignina (%), proteína bruta (%) e fibra em detergente ácido (FDA %). Tratamentos: controle (ct), elevado CO ₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO ₂ e aquecimento (eC+eT).....	37

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Condições ambientais durante as medições de fluorescência da clorofila <i>a</i> e coleta de amostras para análise bioquímica.....	62
------------------	---	----

RESUMO GERAL

As mudanças climáticas globais, sem dúvida, vêm impactando muitas culturas de plantas agrícolas e pastagens, afetando potencialmente o crescimento e a produtividade das plantas. Os efeitos significativos podem ser causados pelo aumento das concentrações de CO₂ e temperatura no quadro da mudança global. As plantas C₃ em termos de fotossíntese e produção de biomassa geralmente respondem positivamente em elevado CO₂ atmosférico do que as plantas C₄. No entanto, os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento podem ser mais complexos do que previsto anteriormente, devido às interações desses fatores. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do elevado CO₂ (600 ppm) e aquecimento (2 °C de aumento sobre a temperatura ambiente) sobre a fisiologia e bioquímica da forrageira tropical C₄ *Panicum maximum* Jacq. cultivada em um Trop-T-Face (*Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment*) sem limitação de água e nutrientes. Foi estimado que o elevado CO₂ quando combinado com o aquecimento (eC+eT) aumentou a massa seca do colmo (93%), a biomassa seca total (52%), a área foliar específica (AFE) (12%) e reduziu a razão folha/colmo (30%). Aos 30 dias de experimento, os açúcares solúveis totais das folhas aumentaram com o elevado CO₂ (eC) e aquecimento (eT) e depois de 80 dias os açúcares redutores e amido reduziram em eC+eT. Em relação aos carboidratos estruturais, o teor de celulose nas folhas não sofreu variação significativa entre os tratamentos, no entanto, o teor de lignina aumentou em 100% sob eC. Além do incremento em biomassa as plantas foram capazes de evitar fotoinibição do aparato fotossintético e peroxidação lipídica. No tratamento eT os níveis de clorofila aumentaram em 12% e os níveis de α-tocoferol reduziram em média de 55%. Os níveis de zeaxantina e luteína, o ciclo de xantofila (VAZ) e o estado de-epoxidação (DPS) do ciclo da xantofila foram alterados pelo elevado CO₂ e aquecimento somente depois de 60 dias. Conclui-se que o elevado CO₂ e o aquecimento apesar de promoverem uma redução no mecanismo de fotoproteção, a eficiência fotoquímica do fotossistema (PSII) não é danificada se as plantas são cultivadas em condições de disponibilidade hídrica e sem limitação nutricional. No entanto, apesar do aumento em biomassa com elevado CO₂ combinado com aquecimento, o elevado CO₂ parece resultar em diminuição da qualidade da forragem.

Palavras-chave: biomassa, fotoproteção, eficiência fotoquímica, forrageira, mudanças climáticas.

ABSTRACT

Global climate change undoubtedly impact many agricultural plant crops and grasslands, potentially affecting plant growth and yield. Significant effects may be caused by increased temperature and CO₂ concentrations in the frame of global change. It is generally thought that C₃ plants may respond positively to atmospheric CO₂ enrichment than C₄ plants in terms of photosynthesis and biomass accumulation. However, the effects of elevated CO₂ and warming may be more complex than previously anticipated due to interactions between these factors. The aim of this study was to evaluate the effects of elevated CO₂ (600 ppm) and warming (2 °C increase above ambient temperature) over physiology and biochemistry of the tropical C₄ forage *Panicum maximum* Jacq. grown in a Trop-T-FACE (Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment) facility under well-watered conditions without nutrient limitation. The combination of elevated CO₂ and warming (eC+eT) increased stem dry weight (93%), total dry biomass (52%), specific leaf area (SLA) and decreased the ratio leaves/stem (30%). After 30 days of experiment, total soluble sugar of leaves increased under elevated CO₂ (eC) and warming (eT) and carbohydrate sugars and starch decreased in elevated CO₂ combined with warming, after 80 days. Regarding structural carbohydrates, cellulose content in leaves had no significant variation between treatments, however, lignin content increased 100% under eC. Furthermore, beyond increase in biomass, plants were able to avoid photoinhibition of the photosynthetic apparatus and lipid peroxidation in response to elevated CO₂ and warming. In treatment eT chlorophyll levels increased by 12% and α -tocopherol levels decreased by 55%. The de-epoxidation state (DPS) of the xanthophyll cycle, an indicator of excess energy dissipation as heat, xanthophyll cycle pool (VAZ) and both zeaxanthin and lutein levels were changed by elevated CO₂ and warming only after 60 days. We conclude that the elevated CO₂ and warming while promoting a reduction in photoprotection mechanism, the photochemical efficiency of photosystem (PSII) is not damaged if plants are grown under well-watered and adequate nutritional conditions. However, despite growth increase with elevated CO₂ combined warming, elevated CO₂ appears to result in decreased quality of forage.

Keywords: biomass, photoprotection, photochemical efficiency, grassland, climate change.

INTRODUÇÃO GERAL

A concentração atmosférica dos gases do efeito estufa vem aumentando de forma alarmante desde o início da Revolução Industrial (IPCC, 2013). No caso do dióxido de carbono (CO_2), o aumento da concentração atingiu 400 ppm em 2015 (CO_2 now, 2015). Projeções estimam a concentração atmosférica de CO_2 acima de 600 ppm para o ano de 2050, podendo ultrapassar 800 ppm até o final deste século (Long et al., 2004; IPCC, 2014). No Brasil o aumento na emissão de CO_2 se deve principalmente ao uso de combustíveis fósseis e à mudança no uso da terra (IPCC, 2007).

O incremento na concentração de gases do efeito estufa resulta no aquecimento global e em mudanças substanciais nos padrões de precipitação (Bazzaz, 1990), contribuindo assim para a ocorrência de eventos extremos como secas ou alagamentos. Secas mais intensas e mais longas foram observadas sobre áreas mais amplas desde 1970, especialmente nos trópicos e subtropicais. O aumento adicional previsto para a temperatura da superfície global é de 1,3 °C a 1,8 °C até 2050 e um aumento entre 1,8 °C a 4,0 °C até 2100. Este aquecimento do sistema climático é inequívoco e está cada vez mais evidente nas observações do aumento na temperatura média global do ar e dos oceanos, bem como pelo derretimento generalizado das geleiras e calotas de gelo, e da elevação do nível médio global dos oceanos (IPCC, 2007).

Este aumento na emissão de CO_2 atmosférico pode ser contrabalanceado pelas plantas, as quais, através do processo fotossintético assimilam e sequestram o carbono da atmosfera (Graaff et al., 2006). Contudo, a estocagem de carbono pelas plantas está relacionada a diversos fatores que precisam ser mapeados, entre eles: condições abióticas (temperatura, água e nutrientes do solo), diversidade de espécies, manejo da produção, dimensão da área, idade das plantas e povoamentos. A complexidade da dinâmica dos ecossistemas exerce uma pressão sobre o sequestro de carbono como medida mitigadora, o que dificulta a tão almejada eficácia nas medições.

As respostas das plantas ao elevado CO_2 variam entre as espécies e pela interação destas com os outros fatores ambientais (Norby et al., 1999). Além dos nutrientes, luminosidade e disponibilidade de água alteram as respostas das plantas

sob CO₂ elevado e também são influenciadas por fatores como elevada temperatura (Brassirirad et al., 2001) e a interação destes fatores, tem demonstrado efeitos significativos e variáveis em plantas com diferentes padrões fotossintéticos (Wang et al., 2012).

Nas plantas de metabolismo C₃ a eficiência da conversão da energia luminosa em carboidrato geralmente aumenta com o elevado CO₂ e diminui com a temperatura. Contudo, nas plantas de metabolismo C₄ a eficiência fotossintética nem sempre é afetada pelo incremento de CO₂, mas pode aumentar com o incremento da temperatura (Collatz et al., 1998; Howden et al., 1999, Ge et al., 2011; Wang et al., 2012). Se o ganho de carbono pela fotossíntese desempenha um papel importante na determinação do sucesso competitivo, o aquecimento poderá favorecer a expansão de espécies C₄ e o aumento do CO₂ poderá favorecer as espécies C₃ e as diferenças fisiológicas entre C₃ e C₄ poderão ser refletidas em suas distribuições geográficas (Collatz et al., 1998).

As plantas C₄ por apresentarem maior eficiência na utilização de CO₂ e água permite com que estas plantas tenham uma ampla distribuição sendo maior em regiões que apresentam temperaturas elevadas e baixa disponibilidade de água e nitrogênio (Buckeridge e Aidar, 2002; Bräutigam et al., 2014). No entanto, diante deste cenário de mudanças climáticas esta distribuição pode ser modificada. O elevado CO₂ pode aumentar o rendimento das plantas C₄ em regiões onde a temperatura é ótima para o seu crescimento, mas em regiões onde as altas temperaturas já estão no seu limite, novos aumentos irão reduzir o rendimento independentemente das mudanças na concentração de CO₂ (Polley, 2002). Com o maior aquecimento da superfície terrestre, há ainda um sério risco de desaparecimento de zonas ecológicas, com perdas de habitats e extinção de espécies (Silva e Machado, 2000).

Este aumento do CO₂ juntamente com o potencial de aquecimento global e mudanças na precipitação, porporcionará um impacto econômico e ecológico significativo em muitas plantas de culturas agrícolas, de pastagens e florestas (Morison e Morecroft, 2006), e podendo ser diferente entre diversas regiões (Matthews e Wassmann, 2003). Estas mudanças climáticas influenciam diretamente na qualidade e quantidade da produção agrícola, podendo em muitos casos afetá-la adversamente (Cerri et al., 2007), pois o desempenho da fotossíntese (eficiência fotoquímica do

fotossistema II) é influenciado negativamente pelas altas temperaturas do ar, baixo conteúdo de água no solo e alta radiação (Albert et al., 2011).

Para ajudar a mitigar o aquecimento global, a preservação de florestas é frequentemente citado como uma forma eficaz para atenuar os aumentos nas concentrações de CO₂ na atmosfera. No entanto, pastagens que cobrem 26% da superfície terrestre, equivalendo acerca de 70% das áreas agrícolas mundiais são tão importantes quanto as florestas em termos de sequestro potencial de carbono (Mannetje, 2007; Dias-Filho e Ferreira, 2013). Terras de pastagens oferecem oportunidades para mitigar parcialmente o aumento do CO₂ atmosférico, pela incorporação desse carbono adicional na biomassa e acúmulo de matéria orgânica no solo (Derner e Schuman, 2007).

No Brasil, grande parte das áreas com pastagens cultivadas utilizam forrageiras do gênero *Panicum* e *Brachiaria*, importantes plantas C₄ (Ghannoum et al., 2001). A utilização de gramíneas do gênero *Panicum* se dá por apresentarem elevada capacidade de produção de forragem por unidade de área, elevada taxa de crescimento, boa qualidade da forragem produzida e capacidade de suportar períodos de secas (Broch et al., 1997).

Contudo, em algumas áreas de pastagem é altamente recomendável o consórcio entre *Panicum maximum* com diversos gêneros de leguminosas como *Stylosanthes* (Andrade et al., 2003). Forrageiras do gênero *Panicum*, por causa do seu sistema radicular, tem a capacidade de reestruturar o solo fornecendo condições favoráveis à percolação e retenção de água e ao arejamento. Além disso, a parte aérea das plantas protege o solo, evitando perdas por erosão, possibilitando também a diminuição das temperaturas diárias e menores perdas de água por evaporação (Broch et al., 1997). Enquanto leguminosas do gênero *Stylosanthes* além de apresentarem o potencial para a fixação biológica de nitrogênio e ser uma excelente fonte de proteínas para animais durante o período seco (em que as gramíneas senescidas não são consumidas) (Ayarza et al., 1997), apresentam grande capacidade adaptativa as diversas condições ambientais.

Apesar da vasta pesquisa realizada sobre os efeitos do dióxido do carbono em plantas em outras latitudes, principalmente em espécies temperadas, ainda existem muitas incertezas em relação ao possível impacto dos ecossistemas tropicais sobre o

balanço global de carbono agindo como sumidouros para o CO₂ atmosférico. As previsões são difíceis, pois são poucos os trabalhos voltados para as respostas das florestas, culturas e pastagens tropicais sobre elevado CO₂ e temperatura.

Em vista disso, torna-se imperativo conhecer como as plantas tropicais respondem a diferentes fatores abióticos e a diferentes concentrações de CO₂, para assim estabelecer qual o potencial dessas espécies como sequestradoras desse gás. Assim as informações geradas sobre a fisiologia, produtividade e o papel das plantas nativas tropicais como potenciais sequestradoras de carbono servirão, ao final, para incrementar a efetividade dos modelos de previsão dos efeitos da mudança global sobre os ecossistemas nos países da região tropical como o Brasil.

No Brasil foram realizados algumas pesquisas usando o sistema tradicional de câmaras de topo aberto (OTC, *open top chambers*) como ferramenta para estudos de impactos das mudanças climáticas sobre as plantas (Martinez et al., 2008; Souza et al., 2008) e somente no ano de 2011 é que se deu início a primeira pesquisa com plantas em campo com sistema de enriquecimento do ar livre com CO₂ (FACE, *Free Air Carbon Dioxide Enrichment*), realizada na Embrapa Meio Ambiente dentro do Projeto Climapest - projeto de pesquisa do impacto das mudanças climáticas sobre problemas fitossanitários (Embrapa, 2011).

Assim, em virtude da necessidade de se conhecer como espécies C₄ respondem as diversas condições ambientais como incremento do CO₂ atmosférico e aumento da temperatura, o presente trabalho vinculado ao Projeto temático FAPESP-RPGCC “*Experimento miniFACE para analisar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento sobre a fotossíntese, expressão gênica, bioquímica, crescimento, dinâmica de nutrientes e produtividade de duas espécies forrageiras tropicais contrastantes*”, propõe determinar os efeitos das mudanças climáticas (elevada concentração de CO₂ de 600ppm e aquecimento de 2 °C) no desempenho da gramínea forrageira C₄ (*Panicum maximum* Jacq.) usando sistema combinado FACE e T-FACE (*Temperature Free-air Controlled Enhancement*). Os resultados da pesquisa permitirão melhor compreensão do impacto das mudanças climáticas sobre a agricultura no Brasil.

JUSTIFICATIVA

Existe uma preocupação global de como as plantas e os ecossistemas irão responder e se adaptar as elevadas concentrações de CO₂ e subsequente elevadas temperaturas, pois em resposta a estas mudanças climáticas tem sido observado tanto efeitos positivos, como negativos, dependendo da interação com outros fatores ambientais essenciais para o crescimento das plantas. Portanto, estudos das interações entre espécies e tais fatores ambientais poderão contribuir para a compreensão das diferentes respostas das plantas sob as condições previstas e os possíveis impactos na vegetação.

Apesar da vasta pesquisa realizada em *Panicum maximum* não se sabe ainda o efeito combinado de estresses abióticos sobre estas plantas em condições de campo. Os estudos de são importantes para entender a ecologia dessas espécies quando submetidas a condições de elevado CO₂ e temperatura, simulando uma situação climática futura. Estes estudos são importantes não só para estabelecer qual o potencial dessas espécies como sequestradoras desse gás, mas também para gerar importantes informações que podem ser utilizadas em modelos de previsão futura da mudança climática global sobre as espécies cultivadas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto das mudanças climáticas (elevado CO₂ associado com aquecimento de 2 °C) sobre a fisiologia e bioquímica da forrageira tropical C₄ *Panicum maximum* Jacq. (Poaceae) cultivada em um Trop-T-Face (*Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment*).

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento (2 °C) sobre a biomassa, metabolismo de carboidratos e qualidade nutricional de *Panicum maximum*.

- Avaliar o impacto das mudanças climáticas (elevado CO₂ associado com aquecimento de 2 °C) sobre a eficiência fotoquímica do fotossistema (PSII) e o sistema de defesa antioxidante de *P. maximum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Área experimental e descrição do sistema Trop-T-FACE

O experimento foi conduzido em sistema Trop-T-FACE (*Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment*), localizado em uma área de 50 m x 50 m do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil (Figura 1) à (21°17'83" S, 47°80'67" W) e altitude média de 620m. A área total de plantio foi dividida em 16 unidades experimentais de 10 m x 10 m, sendo 4 controle com [CO₂] e temperatura ambiente, 4 com [CO₂] elevada a 600 µmol mol⁻¹ e temperatura ambiente (eC), 4 com temperatura elevada em 2 °C e [CO₂] ambiente (eT) e 4 com [CO₂] elevada a 600 µmol mol⁻¹ e temperatura elevada em 2 °C (eC+eT). As condições microclimáticas da radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar, tão bem como o conteúdo de água no solo e a temperatura na camada superior do solo (0-10 cm) foram monitoradas usando sensores específicos conectados a uma estação meteorológica (Modelo WS-HP1, delta-T Devices) e armazenadas em um *datalogger* (Modelo DL2e, Delta-T Devices, UK).

O tratamento de elevadas [CO₂] foi realizado por um sistema FACE (*Free Air CO₂ Enrichment*), que é uma modificação do sistema de injeção sônica de CO₂ puro denominado POPFACE (Miglietta et al., 2001). O sistema FACE foi desenhado por Franco Miglietta do Instituto de Biometeorologia, National Research Council (CNR), Firenze, Itália e a montagem do sistema no campo foi realizada pelos engenheiros Alessandro Zaldei e Damiano Gianelle do mesmo Instituto.

O aumento em 2 °C da temperatura do dossel foi realizado por um sistema T-FACE (*Temperature Free Air Controlled Enhancement*) com aquecedores infravermelhos suspensos em um arranjo hexagonal (Kimball, 2005). A fumigação de CO₂ foi feita apenas durante o dia das 6:00 às 18:00 h, enquanto que o aquecimento foi aplicado durante 24 horas. O sistema T-FACE foi desenhado e a instalação

assessorada pelo Professor Bruce Kimball do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA (Arizona, USA) (Figura 2).

Sistema FACE

Os anéis do sistema FACE de 2 m de diâmetro foram colocados a uma distância de 12 m um do outro para minimizar a contaminação cruzada. Os anéis de fumigação de CO₂ foram construídos de PVC, com microfuros feitos a laser e presos em tubos de alumínio de tal modo que permitisse o ajuste da altura em função do crescimento das plantas (Figura 3).

No sistema FACE, a concentração de CO₂ é amostrada no centro de cada anel miniFACE e monitorado pelos sensores de CO₂ (IRGA) modelo GTM220 (Vaisala, Finlândia). Cada IRGA está conectado via cabo à unidade de controle e envia a informação da concentração de CO₂ a essa unidade, que por sua vez repassa via cabo ethernet para um computador instalado no container do campo experimental.

Com essa informação o sistema controla a abertura de válvulas solenóides para regular o fornecimento de CO₂ gasoso puro para cada anel, mudando a pressão dentro dos canos de liberação de gás por meio de um regulador de pressão automatizado (SMC Corporation, Japan). Quando o sistema está em operação, o CO₂ que sai pelos microfuros do anel de fumigação é liberado em uma velocidade sônica causando um *sonic wave-effect* ou “efeito de onda de choque” e se mistura com o ar próximo permitindo a sua homogeneização rapidamente (Miglietta et al., 2001).

Sistema T-FACE

Para o aquecimento das parcelas com elevada temperatura foram instalados em cada tratamento de aquecimento 6 aquecedores infravermelhos de cerâmica modelo FTE-750-240 *Salamander Ceramic Infrared Heating Element* (Mor Electric, USA) de 750W cada, dentro de refletores de alumínio modelo *Salamander ALEX* (Mor Electric, USA) (Figura 3).

O suporte dos refletores é uma estrutura de alumínio que permite o ajuste do ângulo dos refletores na posição horizontal, vertical e oblíqua. Há também em todos os lotes controle estruturas de alumínio simulando refletores. Para o monitoramento e controle da temperatura do dossel das plantas, há um termômetro infravermelho

modelo SI-1H1-L20 (*Apogee Instruments, USA*) em um poste da estrutura de alumínio orientado na posição norte.

O sistema T-FACE é monitorado por um computador localizado no container, através do Software *LoggerNet* que estabelece a comunicação com a unidade de controle e armazenamento de dados. O programa permite a visualização *on line* da temperatura das parcelas controle, parcelas aquecidas e a diferença da temperatura entre a parcela aquecida e controle para alcançar o *set point*.

Figura 1. Foto satélite (Foto: *Google Earth*) e vista geral da área experimental na USP de Ribeirão Preto (Foto: Matheus Bianconi).

Figura 2. Esquema geral do sistema mini Trop-T-FACE, mostrando as 16 unidades experimentais com 4 repetições para cada tratamento: controle, elevada $[CO_2]$ e temperatura ambiente (eC), $[CO_2]$ ambiente e aquecimento (eT), e elevada $[CO_2]$ e aquecimento (eC+eT).

Figura 3. Foto da unidade experimental com as plantas de *Panicum maximum* e o sistema Trop-T-FACE (Foto: Andressa Approbato).

Material vegetal e condições de cultivo

O presente trabalho foi realizado com uma espécie C₄ forrageira tropical nativa da África, *Panicum maximum* Jacq. syn. *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs cv. “Mombaça” da família Poaceae. A espécie foi introduzida no Brasil em 1982 com 426 acessos apomíticos recebidos pelo “*Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération*” (ORSTOM) (Jank et al., 1994) e o cultivar Mombaça foi lançado comercialmente em 1993, pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) da EMBRAPA (Santos et al., 1999).

As plantas foram cultivadas no sistema Trop-T-FACE nos meses de abril a julho de 2014 (totalizando 86 dias de experimento). Antes do plantio, o solo (classificado como Latossolo Vermelho distrófico) foi fertilizado com adição de NPK 4-14-8 (na dose de 40-140-80 Kg ha⁻¹) e a correção do pH foi feita por meio de calcário dolomítico (PRNT = 73%) (2,5 t ha⁻¹). As sementes foram lançadas diretamente no solo e experimento foi iniciado quando as plantas tinham 75 dias. Antes do início do experimento foi realizado o primeiro corte a 30 cm da altura do solo para uniformização e o segundo corte aos 33 dias para simular o pastejo do gado. A área foi irrigada ao longo de todo o experimento por meio de aspersores instalados em cada lote do campo experimental mantendo a capacidade de campo em 80%.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi de blocos casualizados sendo: duas concentrações atmosféricas de CO₂ (ambiente e 600 ppm) e dois níveis de temperatura (ambiente e +2 °C) totalizando 4 tratamentos.

Os efeitos da elevada concentração de CO₂, do aquecimento e as suas interações foram avaliados por análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Sisvar 5.3 (Build 77) (P<0,05 foi adotado como o nível de significância). Para ANOVA, foram considerados como fatores para análise: os tratamentos, o horário de coleta, e as interações: tratamento x horário e CO₂ x temperatura. Quando a diferença foi significativa, os efeitos do tratamento foram analisados através do teste de Tukey e o teste *t* de Student foi usado para as comparações individuais entre os tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, K.R., MIKKELSEN, T.N., MICHELSEN, A., RO-POULSEN, H., VAN DER LINDEN, L. 2011. Interactive effects of drought, elevated CO₂ and warming on photosynthetic capacity and photosystem performance in temperate heath plants. *Journal of Plant Physiology* 168, 1550-1561.
- ANDRADE, C.M.S.de, GARCIA, R., COUTO, L., PEREIRA, O.G., SOUZA, A.L.de 2003. Desempenho de seis gramíneas solteiras ou consorciadas com o *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e eucalipto em sistema silvipastoril. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32, 1845-1850.
- AYARZA, M., VILELA, L., ALVES, B.J.R., DE OLIVEIRA, O.C., URQUIAGA, S., BODDEY, R.M. 1997. *Introdução de Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão em pastagem de *Brachiaria ruziziensis*: Influência na produção animal e vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 16 p.
- BAZZAZ, F.A. 1990. The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. *Annual Review of ecology and Systematics* 21, 167-196.
- BRASSIRIRAD, H., GUSTSCHICK, V.P., LUSSENHOP, J. 2001. Root system adjustments: regulation of plant nutrient uptake and growth responses to elevated CO₂. *Oecologia* 126, 305-320.
- BRÄUTIGAM, A., SCHLIESKY, S., KÜLAHOGLU, C., OSBORNE, C.P., WEBER, A.P.M. 2014. Towards an integrative model of C₄ photosynthetic subtypes: insights from comparative transcriptome analysis of NAD-ME, NADP-ME, and PEP-CK C₄ species. *Journal of Experimental Botany* 65, 3579-3593.
- BROCH, D.L., PITOL, C., BORGES, E.P. 1997. *Interação agricultura-pecuária: plantio direto de soja na integração agropecuária*. Maracajú-MS: Fundação MS, 24p. (Informativo Técnico).
- BUCKERIDGE, M.S., AIDAR, M.P.M. 2002. Carbon sequestration in the rain forest: Alternatives using environmentally friendly biotechnology. *Biota Neotropica* 2, 1-5.
- CERRI, C.E.P., SPAROVEKI, G., BERMOUX, M., EASTERLINGS, W.E., MELILLO, M., CERRI, C.C. 2007. Tropical agriculture and global warming: impacts and mitigation options. *Scientia Agricola* 64, 83-99.
- CO₂now. 2015. [http://CO₂now.org/](http://CO2now.org/) (acessado em agosto de 2015).

- COLLATZ, G.J., BERRY, J.A., CLARK, J.S. 1998. Effects of climate and atmospheric CO₂ partial pressure on the global distribution of C₄ grasses: present, past, and future. *Oecologia* 114, 441-454.
- DERNER, J.D., SCHUMAN, G.E. 2007. Carbon sequestration and rangelands: A synthesis of land management and precipitation effects. *Journal of Soil and Water Conservation* 62, 77-85.
- DIAS-FILHO, M.B., FERREIRA, J.N. 2013. As pastagens e o meio ambiente. In: REIS, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. (Ed.). *Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros*. Jaboticabal: M. de L. Brandel-ME, p. 93-105.
- EMBRAPA 2011. <http://www.macroprograma1.cnptia.embrapa.br/climapest> acessado em 01/08/2011.
- GE, Z.M., ZHOU, X., KELLOMÄKI, S., WANG, K.Y., PELTOLA, H., MARTIKAINEN, P.J. 2011. Responses of leaf photosynthesis, pigments and chlorophyll fluorescence within canopy position in a boreal grass (*Phalaris arundinacea* L.) to elevated temperature and CO₂ under varying water regimes. *Photosynthetica* 49, 172-184.
- GHANNOUM, O., VON CAEMMERER, S., ZISKA, L.H., CONROY, J.P. 2001. The growth response of C₄ plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant, Cell and Environment* 23, 931-942.
- GRAAFF, M.A., VAN GROENIGEN, K.J., SIX, J., HUNGATE, B., VAN KESSEL, C. 2006. Interactions between plant growth and soil nutrient cycling under elevated CO₂: a meta-analysis. *Global Change Biology* 12, 2077-2091.
- HOWDEN, S.M., MCKEON, G.M., WALKER, L., CARTER, J.O., CONROY, J.P., HALL, W.B., ASH, A.J., GHANNOUM, O. 1999. Global change impacts on native pasture in south-east Queensland, Australia. *Environmental Modelling & Software* 14, 307-316.
- IPCC 2007. *Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change. Working Group III contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Fourth Assessment Report, Geneva.
- IPCC 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC WGI 5th Assessment Report.

- IPCC 2014. Climate Change 2014: *Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- JANK, L., SAVIDAN, Y., SOUZA, M.T., COSTA, J.C.G. 1994. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzida da África. 1. Produção forrageira. *Revista Brasileira de Zootecnia* 23, 433-440.
- KIMBALL, B.A. 2005. Theory and performance of an infrared heater for ecosystem warming. *Global Change Biology* 11, 2041-2056.
- LONG, S.P., AINSWORTH, E.A., ROGERS, A., ORT, D.R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology* 55, 591-628.
- MANNETJE, L't. 2007. The role of grasslands and forests as carbon stores. *Tropical Grasslands* 41, 50-54.
- MARTINEZ, C.A., OLIVEIRA, E.A.D., LEGRACIE JUNIOR, J.R., APPROBATO, A.U. 2008. The effects of elevated CO₂ on tropical trees are related to successional status and soil nutritional conditions. In: J.F. Allen; E. Gantt; J.H. Golbeck; B. Osmond. (Org.). *Photosynthesis. Energy from the Sun*. Munich: Springer, v. 1, p.1383-1386.
- MATTHEWS, R., WASSMANN, R. 2003. Modelling the impacts of climate change and methane emission reductions on rice production: a review. *European Journal of Agronomy* 19, 573-598.
- MIGLIETTA, F., PERESSOTTI, A., VACCARI, F.P., ZALDEI, A., DEANGELIS, P., SCARASCIA-MUGNOZZA, G. 2001. Free-air CO₂ enrichment (FACE) of a poplar plantation: the POPFACE fumigation system. *New Phytologist* 150, 465-476.
- MORISON, J., MORECROFT, M. 2006. *Plant Growth and Climate Change*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 213 p.
- NORBY, R.J., WULLSCHLEGER, S.D., GUNDERSON, C.A., JOHNSON, D.W., CEULEMANS, R. 1999. Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant, Cell and Environment* 22, 683-714.
- POLLEY, H.W. 2002. Implications of atmospheric and climate change for crop yield. *Crop Science* 42, 131-140.
- SANTOS, P.M., CORSI, M., BALSALOBRE, M.A.A. 1999. Efeito da frequência de pastejo e da época do ano sobre a produção e a qualidade em *Panicum maximum* cvs. Tanzânia e Mombaça. *Revista Brasileira de Zootecnia* 28, 244-249.

- SILVA, C.A., MACHADO, P.L.O.A. 2000. Sequestro e emissão de carbono em ecossistemas agrícolas: estratégias para o aumento dos estoques de matéria orgânica em solos tropicais. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 23 p.
- SOUZA, A. P., GASPAR, M., SILVA, E.A., ULIAN, E.C., WACLAWOVSKY, A.J., NISHIYAMA-JR, M.Y., DOS SANTOS, R.V., TEIXEIRA, M. M., SOUZA, G.M., BUCKERIDGE, M. S. 2008. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell and Environment* 31, 1116-1127.
- WANG, D., HECKATHORN, S., WANG, X., PHILPOTT, S. 2012. A meta-analysis of plant physiological and growth responses to temperature and elevated CO₂. *Oecologia*, 169, 1-13.

CAPÍTULO I

Crescimento e produtividade da forrageira tropical *Panicum maximum* Jacq. (Poaceae) em resposta ao aquecimento e ao elevado CO₂

RESUMO

Alterações previstas nas concentrações atmosféricas de CO₂ e o aquecimento global são alguns fatores que interagem fortemente alterando a resposta das plantas e influenciando diretamente seu crescimento. As áreas de pastagem no Brasil representam cerca de 20% de todo o território nacional, constituindo uma das fontes de alimentos mais importantes para a atividade pecuária. Assim, entender o impacto das mudanças do CO₂ atmosférico em conjunto com outras mudanças climáticas é de grande importância para a mitigação e adaptação da produção agrícola e de pastagem futura. O presente capítulo teve como objetivo avaliar os efeitos do elevado CO₂ (600 ppm) e do aquecimento (aumento de 2 °C acima da temperatura ambiente) sobre o crescimento e o metabolismo de carboidratos da forrageira tropical C₄ *Panicum maximum* Jacq. cultivada em um Trop-T-Face (*Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment*), em condições de disponibilidade hídrica e sem limitação de nutrientes. As plantas do tratamento eC+eT apresentaram incremento de massa seca do colmo em 93%, massa seca total em 52%, área foliar específica (AFE) em 12% e redução da razão folha/colmo (30%). Aos 30 dias de experimento os carboidratos solúveis totais das folhas aumentaram com o eC e eT e após 80 dias foi observada redução no teor dos açúcares redutores e amido em eC+eT. Em relação aos carboidratos estruturais, o teor de celulose nas folhas não sofreu variação significativa entre os tratamentos, no entanto, com a elevação do CO₂ o teor de lignina aumentou 100% em relação as plantas controle. Alterações na qualidade da forragem foram observadas com a redução do teor de proteína bruta com elevado CO₂. Com base nos resultados obtidos, concluímos que um aumento na temperatura promoverá efeitos positivos sobre o crescimento de *P. maximum*, mas que um aumento nas concentrações de CO₂ parece resultar em forragem de baixa qualidade.

Palavras-chave: crescimento, biomassa, carboidratos, forragem, mudanças climáticas.

1. INTRODUÇÃO

As pastagens abrangem cerca de 70% da área agrícola do mundo (Soussana e Lüscher, 2007) e constituem uma das fontes de alimentos mais importantes para a atividade pecuária (Santos et al., 2013). No Brasil, as áreas de pastagens ocupavam, até 2006, 172 milhões de hectares, o que representa 20% de todo o território nacional (IBGE, 2006) e *Panicum maximum* Jacq. é uma das forrageiras mais utilizadas por ter bom potencial de rendimento, além de produzir forragem de alta qualidade (Jank et al., 1994; Santos et al., 1999).

A produção de biomassa de forragem, principal componente que define a capacidade de suporte das pastagens, é influenciada por alguns fatores ambientais, como radiação solar, temperatura e disponibilidade de água (Alexandrino et al., 2005), assim, alterações no clima poderão alterar o crescimento e por sua vez, o rendimento destas plantas (Kadam et al., 2013). Por esta razão, a análise de crescimento de espécies forrageiras em um ambiente climático futuro é de fundamental importância, a fim de melhorar a compreensão das adaptações morfofisiológicas às condições do meio, definindo seu crescimento e desenvolvimento (Alexandrino et al., 2005).

O CO₂ é um gás que ocorre naturalmente na atmosfera, no entanto, sua concentração vem aumentando principalmente pela ação antrópica, como a queima de combustíveis fósseis e as mudanças no uso da terra (IPCC, 2013). O aumento de gases do efeito estufa resulta em aquecimento global e projeções futuras estimam um aumento da temperatura de até 4 °C para o final deste século, contribuindo com uma maior frequência de secas em algumas regiões e aumento da precipitação em outras (IPCC, 2014).

Alterações previstas no padrão de precipitação e aquecimento global são alguns fatores que interagem fortemente influenciando a resposta de plantas C₄ ao aumento da concentração de CO₂. Isso ocorre por duas principais razões: em primeiro lugar, esses fatores irão influenciar a competição entre plantas C₃ e C₄, entre arbustos e gramíneas (Howden et al., 1999); em segundo lugar, porque a água e a temperatura interagem diretamente influenciando o crescimento das plantas C₄ sob elevada concentração de CO₂ (Read e Morgan, 1996).

Com o aumento da disponibilidade de substrato para a fotossíntese, o elevado CO₂ tem levado a aumento da produtividade de muitas espécies vegetais (Ainsworth e Long, 2005; Yang et al., 2007), uma vez que cerca de 90% da massa seca vegetal são constituídas por compostos oriundos da assimilação fotossintética do carbono (Alexandrino et al., 2005; Teixeira et al., 2005). As plantas cultivadas sob esta condição, normalmente, apresentam aumento nas taxas fotossintéticas, o que leva ao incremento na biomassa (Ainsworth et al., 2003; Arenque et al., 2014).

Estudos realizados com espécies C₄ crescidas sob elevado CO₂ revelam resposta positiva sobre a biomassa, embora em menor proporção quando comparadas às plantas C₃ (Poorter, 1993; Ziska et al., 1999; Kimball et al., 2008; Farfan-Vignolo e Asard, 2012). Este aumento da biomassa em plantas C₄, tem sido explicado por aumento indireto na eficiência intrínseca do uso da água (Long et al., 2006; Vu e Allen, 2009; Wang et al., 2013), sendo esta resposta o principal fator na maioria das plantas (Souza et al., 2008).

Outras respostas como o aumento de carboidratos não estruturais também podem ocorrer. O incremento da produção de carboidratos nas folhas, decorrente do elevado CO₂, tem estimulado a respiração e a síntese de ácidos orgânicos (Aljazairi e Nogués, 2015). Este aumento na taxa respiratória proporciona um aumento da oferta de energia, promovendo uma maior capacidade de exportação de fotoassimilados dos órgãos fontes para os tecidos drenos, o que por sua vez, implica em maior produtividade (DaMatta et al., 2010; Bianconi, 2013). Assim, o teor de carboidratos não estruturais pode representar uma estimativa da energia disponível para a planta e está correlacionado com o rendimento de gramíneas forrageiras (Moraes et al., 2012).

A manutenção da fotossíntese, estimulada pelo aumento do CO₂, está diretamente relacionada com a capacidade dos drenos de utilizar ou armazenar o carboidrato adicional disponível (Ainsworth e Bush, 2011). Se a taxa de assimilação de carbono exceder a capacidade dos drenos de utilizarem os fotoassimilados, ocorrerá acúmulo de carboidratos nas folhas na forma de sacarose e amido (Barbehenn et al., 2004; Wang et al., 2013), o que por sua vez, pode desencadear uma inibição da expressão de genes que codificam proteínas do aparelho fotossintético, principalmente a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), levando à aclimação fotossintética. Com isso, plantas com grande capacidade de dreno têm

melhores condições de evitar a aclimação fotossintética sob elevado CO₂ (Wang et al., 2013).

O carbono assimilado pelas folhas pode também ser acumulado como celulose, um dos principais componentes da parede celular, sendo considerada uma das principais formas de sequestro de carbono pelas plantas (Buckeridge e Aidar, 2002). Plantas C₃ crescidas sob elevado CO₂, usualmente, apresentam aumento no teor de celulose em folhas, como ocorrido em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) com aumento de cerca de 20% (Teng et al., 2006). Enquanto, em experimento anterior com *Panicum maximum*, o conteúdo de celulose foliar foi incrementado em cerca de 19%, quando o aumento do CO₂ foi combinado com temperatura elevada (Bianconi, 2013). Pode ocorrer também que estas condições climáticas não causem efeito significativo no teor de celulose foliar, conforme recentemente observado em algumas gramíneas forrageiras tropicais (Faria, 2015) ou que o maior acúmulo de celulose seja maior no colmo do que em folhas, como em cana-de-açúcar (Souza et al., 2008).

A ação benéfica do elevado CO₂ sobre as plantas pode ser limitada ou compensada por temperatura elevada e alteração nos padrões de precipitação (DaMatta et al., 2010; Ge et al., 2012). Estudos recentes têm demonstrado que aumento da biomassa sob elevado CO₂ pode ser contrabalanceado por aumento da temperatura (Ko et al., 2010; Ge et al., 2012; Cai et al., 2015; Faria, 2015). Todavia, estes efeitos interativos significativos têm sido encontrados em um número de plantas que possuem fisiologia e crescimento distintos (Wang et al., 2012). Há ainda estudos que mostram um efeito negativo destas condições como redução no rendimento do milho (Ruiz-Vera et al., 2015), do trigo e do arroz (Cai et al., 2015).

Em um estudo de meta-análise, com espécies de plantas agrupadas de acordo as vias fotossintéticas (C₃, C₄), tipos funcionais (legumes, não leguminosas), formas de crescimento (herbáceo, arbóreo), e fins econômicos (cultivar, não cultivar), Wang et al. (2012) observaram que a biomassa total responderam positivamente ao elevado CO₂ em todos os grupos de espécies em todas as temperaturas, exceto em espécies C₄. No entanto, este efeito negativo do elevado CO₂ combinado com temperatura elevada sobre a fotossíntese de espécies C₄, pode ser aliviado pela maior eficiência no uso da água e da área foliar, especialmente sob estresse hídrico.

Pouco se sabe sobre o efeito combinado dos fatores abióticos sobre espécies tropicais e o seu efeito depende da fase de desenvolvimento da planta e da intensidade e duração destes fatores (Vítolo et al., 2012; Kadam et al., 2013). Assim, é de grande importância melhorar a nossa compreensão da resposta das plantas aos efeitos combinados de elevado CO₂ e outros fatores abióticos, particularmente temperatura elevada, aumento da deposição de nitrogênio, e padrões alterados de precipitação, todos os quais são esperados no futuro (Wang et al., 2012). Neste capítulo são descritos os efeitos do elevado CO₂ (600 ppm) e do aquecimento (aumento de 2 °C acima da temperatura ambiente) sobre o crescimento e metabolismo de carboidratos da forrageira tropical C₄ *Panicum maximum* Jacq. cultivada em um Trop-T-Face (*Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment*), em condições de disponibilidade hídrica e sem limitação de nutrientes.

2. HIPÓTESE

As plantas por serem susceptíveis às mudanças climáticas podem apresentar alterações no padrão de crescimento e desenvolvimento, assim, para a gramínea forrageira C₄ cultivada em ambiente com elevado CO₂ e temperatura em sistema T-FACE hipotetizamos: (I) o aumento na concentração de CO₂ promove efeito positivo sobre a assimilação de carbono e por consequência maior crescimento e produção de biomassa; e (II) o aumento na concentração de CO₂ quando combinado com temperatura elevada poderá incrementar ainda mais estas respostas, uma vez que plantas C₄ fotossintetizam mais eficientemente em temperatura elevada.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento (2 °C) sobre o crescimento de *Panicum maximum* através das análises de área foliar específica (AFE) e biomassa.
- Avaliar os efeitos do elevado CO₂ e da elevada temperatura (2 °C) sobre os teores de carboidratos estruturais e não estruturais em folhas de *P. maximum*.
- Avaliar os efeitos do elevado CO₂ e da elevada temperatura (2 °C) sobre a qualidade nutricional de *P. maximum*.
- Avaliar a variação temporal em uma escala de 24 horas do metabolismo de carboidratos de *P. maximum* sob elevado CO₂ e aquecimento (2 °C).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das plantas

Para a determinação de massa seca e qualidade da forragem a coleta da parte aérea das plantas foi realizada apenas no final do experimento (aos 86 dias). Durante o período experimental foram realizadas 2 coletas para as análises de carboidratos sendo, 30 e 80 dias após o início do experimento em um curso diurno das 6:00, 12:00, 18:00 e 24:00 h. Durante as coletadas foram selecionadas folhas maduras, completamente expandidas e expostas ao sol, que foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas em congelador até a realização da extração. Para a extração foi utilizada sempre a região mediana do limbo foliar.

4.2. Avaliações

4.2.1. Análise de crescimento

Para a determinação da massa seca as plantas foram coletadas e separadas em folhas e colmo (caule de gramíneas). Todas as partes das plantas foram acondicionadas separadamente em sacos de papel, colocadas para secar em estufa a 70 °C até massa constante e logo pesada para a obtenção da massa seca. Para o cálculo da área foliar

específica ($AFE\text{ cm}^2\text{ g}^{-1}$), com um furador de área conhecida, foram retirados 4 discos foliares de cada folha, totalizando 32 discos por tratamento, e posteriormente pesados após secos em estufa a 70 °C (Beadle, 1993).

$$AFE = AF/MS$$

Onde: **MS**= massa seca do disco foliar (g)

AF= área foliar do disco (cm^2)

4.2.2. Extração de açúcares solúveis

Amostras frescas de folhas foram previamente congeladas em nitrogênio líquido, mantidas em congelador e posteriormente pulverizadas em almofariz. Para a extração 100 mg do pó foram colocados em tubos eppendorf e suspensos em 1 mL de etanol a 80%. Os tubos foram incubados a 80 °C, com agitação ocasional, por 15 min, e posteriormente centrifugados a 10.000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante recolhido e transferido para um outro frasco. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e os sobrenadantes resultantes combinados. Após a extração etanólica, o resíduo foi lavado com 1 mL de água destilada a 5 °C, centrifugado e o sobrenadante aquoso reunido aos extratos etanólicos. O volume dos extratos foi completado com água destilada para 5 mL e estes congelados para posterior análise.

O resíduo foi lavado com 1 mL de água destilada à temperatura ambiente por 2 vezes, centrifugado, sendo o sobrenadante descartado e o resíduo congelado, liofilizado e utilizado para as análise de amido e parede celular. Dos extratos etanólicos, 3 mL foram concentrados em evaporador rotatório a 42 °C até a secura. As amostras foram dissolvidas em 2 mL de água deionizada morna e centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min, para posterior quantificação de carboidratos totais no sobrenadante.

4.2.3. Análise quantitativa de açúcares

A quantificação de açúcares totais nas frações foi efetuada pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) e a de açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945), utilizando glucose (Sigma) como padrão (100 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.4. Análise de amido

A extração e dosagem de amido foi realizada segundo o método de Amaral et al. (2007). Do resíduo liofilizado resultante da extração etanólica, 10 mg foram incubados em 0,5 mL (120 U mL^{-1}) de α -amilase (EC 3.2.1.1) termoestável de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, MEGAZYME), Irlanda) diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5, a 75 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez totalizando 120 U de enzima. As amostras foram resfriadas até 50 °C e adicionado 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL^{-1} de amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME, Irlanda) em tampão acetato de sódio 100mM pH 4,5. Após incubação a 50 °C por 30 min foram acrescentados 100 μL de ácido perclórico 0,8 M para cessar a reação e precipitar as proteínas. Após rápida centrifugação, foi realizada a dosagem de amido nos extratos, através de quantificação da glucose liberada. As alíquotas de 20 μL de extrato foram adicionados 300 μL do reagente Glucose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil), contendo as enzimas glucose-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 glucose oxidase catalisa a oxidação da glucose. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação de acoplamento oxidativo, formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glucose na amostra. Após incubação por 15 min a 37 °C, o teor de glucose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA em comprimento de onda 490 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada solução de glucose (Sigma), nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.5. Extração de parede celular

A extração da parede celular foi realizada com base na metodologia de resíduo insolúvel em álcool (AIR) segundo Fry (1988), com algumas modificações. A 30 mg de amostras frescas foi adicionado 1,5 mL de etanol 70% e a suspensão mantida sob agitação (150 rpm) por no mínimo 12 horas. Após centrifugação a 10.000 rpm por 5 min a 7 °C, o resíduo foi recolhido e lavado, sequencialmente, três vezes com 1 mL de etanol 70%, duas vezes com clorofórmio:metanol (1:1 v/v), três vezes com acetona e três vezes com éter etílico. Após as lavagens, o resíduo do material foi seco em

temperatura ambiente por 24 horas, e considerado como o rendimento bruto em parede celular.

4.2.6. Determinação de celulose

Para a análise de celulose foi utilizada a metodologia de Updegraff (1969), com algumas modificações. A 30 mg do resíduo foram adicionados 3 mL de uma mistura de ácido acético 80% e ácido nítrico (10:1 v/v) para retirada de material não celulósico. Os tubos contendo o material foram cobertos com bolas de gude e mantidos em banho-maria a 100 °C por 30 min, com a água do banho no mesmo nível do líquido dos tubos. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o resíduo lavado com 3 mL de água destilada. Foram adicionados 2 mL de H₂SO₄ (v/v) 67% ao resíduo, que foi deixado em repouso por no mínimo 1 hora. Após o repouso, 100 µL do extrato foram diluídos em 1900 µL de água destilada. A alíquotas de 1 mL foram adicionados 2 mL de antrona e o material aquecido em banho-maria a 100 °C por 16 min e resfriado em gelo por 3 minutos. A leitura em espectrofotômetro foi a 490 nm e para a confecção da curva padrão foi utilizada celulose 100 µg/mL (Sigma).

4.2.7. Qualidade da forragem

As amostras para análises de qualidade de forragem as plantas foram coletadas no final do experimento. O material foi acondicionado em sacos de papel e seco em estufa a 70 °C até massa constante e posteriormente triturada em moinho. A análise da fibra em detergente ácido (FDA) foi realizada utilizando o método sequencial de analisador de fibra ANKOM (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY), descrito por Holden (1999). A concentração de lignina foi determinada pelo método descrito por Soest et al. (1991) e a concentração de proteína bruta (PB) foi determinada utilizando o método de combustão Dumas, com um analisador automático de nitrogênio (N) LECO FP-528 (Wiles et al., 1998).

5. RESULTADOS

5.1. Dados microclimáticos

As flutuações na temperatura do ar (Figura 1), da precipitação (Figura 2) e da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (Figura 3) foram monitoradas de hora em hora durante todo o período experimental, ao longo de 86 dias. Pode-se observar que a média de temperatura do ar diurna foi de 24 °C, com máxima de 31 °C no dia 48 e no dia 74 do experimento. Durante o período noturno, a média de temperatura foi de 15 °C, com mínima chegando a 5 °C no dia 44º dia de experimento. A precipitação foi baixa, somente ultrapassando os 5 mm uma vez nos poucos dias em que houve alguma precipitação e a radiação decresceu ao longo do experimento, atingindo valores máximos de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na metade do experimento.

Figura 1. Temperatura do ar na área experimental (°C) durante todo o experimento.

Figura 2. Precipitação (mm) durante o experimento.

Figura 3. Densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$) durante o experimento.

5.2. Biomassa e parâmetros de crescimento

A biomassa das plantas foi estimada no último dia de experimento, ou seja, 86 dias após o início do experimento. A massa seca de folhas de *Panicum maximum* não apresentou mudanças significativas nos tratamentos de elevado CO₂ e aquecimento (Figura 4), no entanto, a massa seca do colmo e a massa seca total apresentaram incremento no tratamento eC+eT. O incremento em biomassa no colmo foi de 93%, enquanto o aumento de massa seca da parte aérea foi de 52% em relação as plantas controles. A razão massa seca de folha/ massa seca de colmo decresceu com o aquecimento e o com o efeito combinado de CO₂ e aquecimento, apresentando maior redução sob eC+eT, que foi de 30% em relação as plantas controle (Tabela 1).

Figura 4. Massa seca de folha (g), massa seca de colmo (g), massa seca da parte aérea (g) e razão folha/colmo de *Panicum maximum* ao final do experimento, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P < 0,05$; Teste de Tukey). P_C = CO₂; P_T = aquecimento; P_{CXT} = CO₂ e aquecimento.

Tabela 1. Efeitos dos tratamentos de CO₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais na biomassa de *Panicum maximum* crescendo em sistema Trop-T-FACE. Massa seca das folhas (g), massa seca do colmo (g), massa seca da parte aérea (g) e razão folha/colmo. Tratamentos: controle (ct), elevado CO₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO₂ e aquecimento (eC+eT).

Parâmetro	% Biomassa					ANOVA		
	ct x eC	ct x eT	ct x eCeT	eC x eCeT	eT x eCeT	CO ₂	T	CO ₂ x T
MS da folha	0,94	0,98	1,28	1,46	1,31	ns	ns	ns
MS do colmo	1,15	1,27	1,93*	1,71**	1,52	ns	<0,05	ns
MS da parte aérea	1,01	1,09	1,52*	1,56**	1,40	ns	<0,05	ns
Folha/Colmo	0,90	0,78	0,71*	0,81	0,90	ns	<0,05	ns

Os valores acima de 1 significam porcentagem de aumento e abaixo de 1 porcentagem de redução. Para comparação dos pares foi usado o teste t de Student e para detectar os efeitos independentes e suas interações ANOVA. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; ns, não significante.

A área foliar específica (AFE) foi estimada aos 30 e 60 dias de experimentos (Figura 5). Aos 30 dias, houve tendência de aumento (P=0,062) em eC em relação as plantas controle, enquanto aos 60 dias houve um aumento significativo de 12% às 6:00 h e 9% às 12:00 h em eC e de 12% em eC+eT às 12:00 h. A análise estatística mostrou interação de CO₂ e aquecimento na AFE aos 30 e 60 dias de experimento (Tabela 2).

Em relação à variação temporal, aos 30 dias foi observada redução significativa de AFE no horário das 12:00 h, com aumento no final da tarde em eT e eC+eT. Apenas aos 60 dias de experimento, foi possível observar interação entre os horários do curso diurno e os tratamentos na AFE (Figura 5).

Figura 5. AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) de folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão ($n=4$) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

Tabela 2. Efeitos dos tratamentos de CO_2 e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais na AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) de *Panicum maximum* durante um curso diurno aos 30 e 60 dias de experimentos crescendo em sistema Trop-T- FACE. Tratamentos: controle (ct), elevado CO_2 (eC), aquecimento (eT) e elevado CO_2 e aquecimento (eC+eT).

Parâmetro	Hora	% Crescimento					ANOVA		
		ct x eC	ct x eT	ct x eCeT	eC x eCeT	eT x eCeT	CO ₂	T	CO ₂ x T
30 dias									
AFE	6:00	1,00	0,98	0,98	0,98	1,00	ns	ns	ns
	12:00	1,11	0,99	1,00	0,91	1,01	ns	ns	=0,01
	18:00	1,04	1,02	0,98	0,95	0,96	ns	ns	ns
60 dias									
AFE	6:00	1,12*	1,03	1,02	0,92*	1,00	=0,05	ns	<0,05
	12:00	1,09**	1,01	1,12*	1,03	1,12	<0,01	ns	ns
	18:00	0,97	1,03	0,99	1,03	0,96	ns	ns	ns

Os valores acima de 1 significam porcentagem de aumento e abaixo de 1 porcentagem de redução. Para comparação dos pares foi usado o teste t de Student e para detectar os efeitos independentes e suas interações ANOVA. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; ns, não significativa.

5.3. Metabolismo de carboidratos

5.3.1. Açúcares solúveis totais

Os carboidratos estruturais e não estruturais das folhas de *Panicum maximum* foram quantificados durante curso diurno de 24 horas e aos 30 e 80 dias após o início do experimento (Tabela 3 e 4). Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos no conteúdo de açúcares solúveis totais aos 30 dias de experimento, no entanto, aos 80 dias ocorreram alterações significativas. As plantas às 12:00 h apresentaram aumento no teor de açúcares solúveis de 29% em eC e 37% em eT, em relação as plantas controles. No horário das 12 horas, aos 80 dias, foi possível observar interação entre CO₂ e aquecimento sobre os teores de açúcares solúveis totais (Tabela 4).

Em relação ao curso diurno, os açúcares solúveis totais apresentaram uma variação significativa. As concentrações aumentaram conforme o aumento da intensidade luminosa ao longo do dia, com concentração máxima às 12:00 h, seguido por redução no final da tarde até o horário das 24:00 h. O aumento médio às 12:00 h foi de 31% aos 30 dias e 42% aos 80 dias. Interação entre os horários do curso diurno e os tratamentos foi observada somente aos 80 dias de experimento (Figura 6).

Figura 6. Açúcares solúveis totais (mg g⁻¹ MF), açúcares redutores (mg g⁻¹ MF) e amido (mg g⁻¹ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 80 dias de tratamento em um curso diurno, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) (P<0,05; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

Tabela 3. Efeitos dos tratamentos de CO₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais de carboidratos em folhas de *Panicum maximum* durante um curso diurno aos 30 dias de experimentos crescendo em sistema Trop-T-FACE. Açúcares solúveis (mg g⁻¹ MF), açúcares redutores (mg g⁻¹ MF), amido (mg g⁻¹ MS) e celulose (mg g⁻¹ MS). Tratamentos: controle (ct), elevado CO₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO₂ e aquecimento (eC+eT).

30 DIAS									
Parâmetro	Hora	% Carboidratos					ANOVA		
		ct x eC	ct x eT	ct x eCeT	eC x eCeT	eT x eCeT	CO ₂	T	CO ₂ x T
Açúcares solúveis									
	6:00	1,03	1,03	0,97	0,96	0,97	ns	ns	ns
	12:00	0,92	1,04	1,02	1,15	0,97	ns	ns	ns
	18:00	1,10	1,10	1,05	0,97	0,96	ns	ns	ns
	24:00	1,01	1,01	0,93	0,94	0,93	ns	ns	ns
Açúcares redutores									
	6:00	1,01	1,22	1,01	1,04	0,90	ns	ns	ns
	12:00	0,90	1,22	0,94	1,06	0,80	ns	ns	ns
	18:00	0,94	1,04	1,01	1,09	0,99	ns	ns	ns
	24:00	1,10	0,76	0,74*	0,69*	1,01	ns	<0,01	ns
Amido									
	6:00	-	-	-	-	-	-	-	-
	12:00	0,82	1,14	1,19	3,27	1,11	ns	ns	ns
	18:00	1,64	1,22	0,82	0,52*	0,81	ns	<0,05	ns
	24:00	1,10	0,88	0,81	0,74	1,07	ns	ns	ns
Celulose									
	6:00	1,34	1,40	1,45	1,17	1,03	ns	ns	ns
	12:00	1,12	1,08	1,07	0,98	1,00	ns	ns	ns
	18:00	0,96	1,26	1,06	1,11	0,86	ns	ns	=0,05
	24:00	0,91	1,02	0,98	1,11	0,96	ns	ns	ns

Os valores acima de 1 significam porcentagem de aumento e abaixo de 1 porcentagem de redução. Para comparação dos pares foi usado o teste t de Student e para detectar os efeitos independentes e suas interações ANOVA. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; ns, não significante.

Tabela 4. Efeitos dos tratamentos de CO₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais de carboidratos em folhas de *Panicum maximum* durante um curso diurno aos 80 dias de experimentos crescendo em sistema Trop-T-FACE. Açúcares solúveis (mg g⁻¹ MF), açúcares redutores (mg g⁻¹ MF), amido (mg g⁻¹ MS), e celulose (mg g⁻¹ MS), Tratamentos: controle (ct), elevado CO₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO₂ e aquecimento (eC+eT).

80 DIAS									
Parâmetro	Hora	% Carboidratos					ANOVA		
		ct x eC	ct x eT	ct x eCeT	eC x eCeT	eT x eCeT	CO ₂	T	CO ₂ x T
Açúcares solúveis	6:00	0,91	1,16	1,06	1,17*	0,93	ns	<0,05	ns
	12:00	1,29**	1,37**	1,15	0,89	0,83	ns	ns	<0,01
	18:00	0,99	1,01	1,14	1,16	1,13	ns	ns	ns
	24:00	0,98	1,05	0,99	1,01	0,94	ns	ns	ns
Açúcares redutores	6:00	0,91	1,09	0,99	1,08	0,93	ns	ns	ns
	12:00	1,18	1,24	1,01	0,86	0,82	ns	ns	<0,05
	18:00	1,01	1,08	1,16	1,18	1,11	ns	ns	ns
	24:00	0,90	1,05	0,95	1,11	0,91	ns	ns	ns
Amido	6:00	-	-	-	-	-	-	-	-
	12:00	1,15	1,16	0,90	0,80	0,82	ns	ns	ns
	18:00	0,83	0,69	0,94	1,18	1,53	ns	ns	ns
	24:00	1,00	1,09	0,95	0,97	1,24	ns	ns	ns
Celulose	6:00	0,93	1,15	1,13	1,27	0,99	ns	<0,05	ns
	12:00	0,96	0,90	0,93	0,96	1,04	ns	ns	ns
	18:00	1,13	0,95	0,95	0,85	1,01	ns	<0,05	ns
	24:00	1,12	1,07	1,19	1,07	1,12	<0,05	ns	ns

Os valores acima de 1 significam porcentagem de aumento e abaixo de 1 porcentagem de redução. Para comparação dos pares foi usado o teste t de Student e para detectar os efeitos independentes e suas interações ANOVA. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; ns, não significante.

5.3.2. Açúcares redutores

Aos 30 dias de experimento, os teores de açúcares redutores nas folhas apresentaram uma redução de 26% em eC+eT em relação as plantas controles, no horário das 24:00 h (Tabela 3). Contudo, aos 80 dias de experimento não foram observadas diferenças significativas nos teores desses açúcares (Tabela 4).

Assim como observado para os carboidratos solúveis totais, o conteúdo de açúcares redutores nas folhas diminuiu aos 80 dias de experimento, apresentando teores médios de 3,19 mg g⁻¹ MF aos 30 dias e 2,0 mg g⁻¹ MF aos 80 dias. Em ambos os dias de coleta, a concentração de açúcares redutores aumentou às 12:00 h, sendo reduzido às 18:00 h, como ocorrido também para os açúcares solúveis totais. Aos 30 dias de experimento, o aumento médio dos açúcares redutores às 12:00 h foi de 41% e aos 80 dias foi de 54% em relação às 6:00 h (Figura 6).

5.3.3. Amido

Acúmulo de amido não foi encontrado nas folhas de *Panicum maximum* no horário das 6:00 h (Figura 6). As concentrações de amido às 18:00 h diminuíram em 48% em eC+eT em relação as plantas em eC aos 30 dias de experimento (Tabela 3), enquanto aos 80 dias não foi possível observar efeitos significativos, mas tendência na redução de amido com o aumento da temperatura (P=0,077) em relação as plantas controles, no mesmo horário (Tabela 4).

Durante o curso diurno, o amido também sofreu variações significativas, com maior acúmulo nas folhas no horário das 18:00 h, seguido de queda às 24:00 h, nos dois pontos de coleta. Aos 30 dias de experimento, as plantas do tratamento de eC foram as que apresentaram maior acúmulo de amido às 18:00 h com 53% (Figura 6).

5.3.4. Celulose

O teor de celulose nas folhas não apresentou variação significativa entre os tratamentos nos dois dias de coleta (Tabela 3 e 4). No entanto, aos 80 dias foi observada tendência de aumento em eC+eT (P=0,062) em relação as plantas controle às 24:00 h. A interação entre CO₂ e aquecimento só foi observada aos 30 dias às 18:00 h.

Quanto a variação temporal em ambos os dias de coleta, a celulose aumentou significativamente no horário das 12:00 h em relação às 6:00 h, nas plantas controles e em eC. Somente aos 80 dias de experimento, foi observada interação entre os horários do curso diurno e os tratamentos (Figura 7).

Figura 7. Celulose ($\text{mg g}^{-1} \text{MS}$) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 80 dias de tratamento em um curso diurno, crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão ($n=4$) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

5.4. Qualidade da Forragem

A qualidade da forragem foi avaliada através dos teores de lignina, proteína bruta e fibras ao final do experimento (Figura 8). As fibras foram estimadas pelo teor de fibra detergente ácido (FDA), composta principalmente por celulose e lignina sem hemicelulose, e não mostrou alterações no seu conteúdo com o aumento do CO_2 e temperatura. Por outro lado, o teor de lignina apresentou um aumento de 100% em eC e a proteína bruta decresceu 17% em eC e 6% em eT e eC+eT, em relação as plantas controle. A interação entre CO_2 e aquecimento foi observada nos teores de lignina e proteína bruta (Tabela 5).

Figura 8. Lignina (%), proteína bruta (%) e fibra detergente ácido (FDA %) em *Panicum maximum* após 86 dias de experimento crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P < 0,05$; Teste de Tukey). P_C = CO₂; P_T = aquecimento; P_{CXT} = CO₂ e aquecimento.

Tabela 5. Efeitos dos tratamentos de CO₂ e temperatura e comparações em pares dos tratamentos individuais na qualidade nutricional de *Panicum maximum* crescendo em sistema Trop-T-FACE. Lignina (%), proteína bruta (%) e fibra em detergente ácido (FDA %). Tratamentos: controle (ct), elevado CO₂ (eC), aquecimento (eT) e elevado CO₂ e aquecimento (eC+eT).

Parâmetro	% Qualidade Nutricional					ANOVA		
	ct x eC	ct x eT	ct x eCeT	eC x eCeT	eT x eCeT	CO ₂	T	CO ₂ x T
Lignina	2,00**	1,00	0,98	0,52**	1,01	<0,01	<0,01	<0,01
Proteína bruta	0,87***	0,94*	0,94*	1,08*	1,00	<0,01	ns	<0,01
FDA	1,01	1,03	1,00	1,00	0,97	ns	ns	ns

Os valores acima de 1 significam porcentagem de aumento e abaixo de 1 porcentagem de redução. Para comparação dos pares foi usado o teste t de Student e para detectar os efeitos independentes e suas interações ANOVA. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; ns, não significante.

6. DISCUSSÃO

O CO₂ e a temperatura são as principais variáveis das mudanças climáticas que alteram a fisiologia e bioquímica das plantas, podendo afetar a qualidade e a produtividade da forragem. Estudos que investigaram a interação destes fatores em plantas C₄ têm mostrado efeitos variados sobre a biomassa total e o padrão de alocação, fatores esses determinantes para o crescimento das plantas (Morison e Lawlor, 1999; Soussana e Lüscher, 2007; Kadam et al., 2013; AbdElgawad et al., 2015). De um modo geral, em *Panicum maximum* a produção de biomassa foi maior sob elevado CO₂ quando combinado com o aquecimento, no entanto, o elevado CO₂ isolado teve efeito negativo sobre a qualidade da forragem, mesmo crescendo em condições de disponibilidade hídrica e sem limitação de nutrientes.

Foi demonstrado em estudos com plantas C₄ que o aumento da concentração de CO₂ promoveu incremento de taxas fotossintéticas e incremento de biomassa (Wand et al., 1999; Souza et al., 2008). Entretanto, no presente estudo não foi observada alteração significativa no acúmulo de biomassa nas plantas crescendo sob eC, como anteriormente observado por Leakey et al. (2006) em estudo realizado com milho cultivado em sistema FACE. Os dados obtidos no presente trabalho refutam parcialmente nossa hipótese, uma vez que o efeito do elevado CO₂ no crescimento das plantas variou somente quando associado com o aquecimento.

Morrison e Lawlor (1999) enfatizam que a ausência de efeito do CO₂ sobre o crescimento pode ser relacionada com alterações na temperatura. As temperaturas noturnas amenas registradas durante o nosso período experimental (Figura 4) foram inferiores à temperatura base (11 °C) para o crescimento de *Panicum maximum* (Moreno et al. 2014). Pressupõe-se então que a redução na temperatura tenha promovido redução da respiração (Kirschbaum e Lambie, 2015), da atividade do meristema apical, da expansão de folhas e do perfilhamento das plantas crescendo nos tratamentos de temperatura ambiente (Teixeira et al., 2005).

O elevado CO₂ quando combinado com o aquecimento levou a efeitos positivos, incrementando a massa seca de colmo em 93% e massa seca da parte aérea em 52%, aos 86 dias de experimento. Isto é consistente com trabalhos anteriores com forrageiras C₃ e C₄, *Panicum maximum* (Bianconi, 2013), *Lolium perene* (Naudts et al., 2013) e alfafa (Aranjuelo et al., 2005; Aranjuelo et al., 2008; Sanz-Sáez et al., 2012), nos quais o crescimento em elevado CO₂ foi maior em temperatura elevada.

O tratamento eC+eT incrementou a produção de biomassa, provavelmente, por incremento na assimilação do carbono. Neste caso, a interação positiva entre CO₂ e o aquecimento seria explicada por aumento da temperatura ótima para a fotossíntese (Aranjuelo et al., 2005). O elevado CO₂ pode ter proporcionado efeito indireto sobre o incremento das taxas fotossintéticas, por aumento da temperatura foliar e da eficiência do uso da água, resultante da redução da condutância estomática (Wand et al., 1999; Ainsworth et al., 2003; Leakey et al., 2006; Bianconi, 2013). Por outro lado, o aumento da temperatura pode ter efeito direto sobre as taxas fotossintéticas, por estímulo da taxa de regeneração da Rubisco (Sage e Kubien, 2007) e por aumento do ponto de saturação de CO₂, uma vez que o C_i (concentração intercelular de CO₂) é reduzido, a fotossíntese das plantas C₄ torna-se sensível a pequenos aumentos do CO₂ atmosférico (Sage e Kubien, 2003).

Embora tenha ocorrido incremento de biomassa sob eC+eT, a biomassa da folha diminuiu progressivamente à medida que se intensificou o alongamento do colmo, resultando nos decréscimos da razão folha/colmo. Em gramíneas, o alongamento do colmo incrementa a produção da forragem, porém interfere na estrutura da pastagem, comprometendo a eficiência do pasto, pois altera o valor nutritivo da forragem consumida, devido à altura da pastagem e elevado teor de

proteína (Wilson, 1982 citado por Pinto et al., 1994; Rodrigues et al., 2008). Considerando que a relação crítica para razão folha/colmo é (1,0), como relatado por Pinto et al. (1994), embora a razão folha/colmo tenha sido reduzida não foram detectados valores inferiores ao limite crítico, não impactando assim a nutrição animal e o manejo da forragem.

A redução na partição de massa seca para folha é associada com aumento encontrado na área foliar específica (AFE) sob eC+eT, indicando maior formação de folhas delgadas (Gomide e Gomide, 1999) e maior eficiência na captura de energia luminosa e assimilação de carbono (Zhong et al., 2014). Todavia, em plantas C_3 arbóreas e cultivadas é observado menor AFE quando elas crescem sob elevado CO_2 , como resultado do aumento de acúmulo de amido nas folhas (Wand et al., 1999; Aidar et al., 2002; Olivo et al., 2002), porém, há uma grande variação entre espécies e diferentes grupos funcionais (Wand et al., 1999; Ainsworth e Long, 2005).

Mudanças no conteúdo de carboidratos não estruturais induzidas pelo elevado CO_2 e/ou temperatura são frequentemente observadas em espécies forrageiras (Fischer et al., 1997; Turunen et al., 2009; AbdElgawad et al., 2014). As respostas positivas ao aumento na disponibilidade de carbono levam a incrementos no conteúdo de açúcares em folhas de plantas C_4 (Souza et al., 2008). Por outro lado, o conteúdo de açúcares pode diminuir com temperaturas elevadas (Song et al., 2014) ou não ser afetado por eC+eT (Souza et al., 2013; Faria, 2015). Em *Panicum maximum* houve variação no conteúdo de carboidratos não estruturais entre os tratamentos e ao longo do experimento. O tratamento eC+eT reduziu o conteúdo de açúcares redutores e o acúmulo transitório de amido, enquanto os tratamentos eC e eT aumentaram o conteúdo de açúcares solúveis totais.

O maior crescimento e a redução no acúmulo transitório de amido em eC+eT não foram compensados por aumento dos açúcares solúveis totais. A redução no teor de açúcares redutores, juntamente com redução no acúmulo de amido sob eC+eT, sugerem que parte do carbono extra esteja sendo dirigido para órgãos reserva, no caso das forrageiras tropicais, para a base do colmo (Souza et al., 2005). Além disso, o colmo como forte dreno, pode desempenhar papel importante na regulação da fotossíntese mantendo-a elevada (Souza, 2011). Segundo Pritchard et al. (2000),

menor alocação de carbono para as folhas é atribuída aos valores de taxas de iniciação foliar menor em relação ao crescimento do colmo e da raiz.

Na gramínea forrageira *Lolium perene*, a resposta à concentração elevada de CO₂ foi restrita por uma limitação de drenos para o carbono (Fischer et al., 1997). Em *Panicum maximum*, o aumento no conteúdo de açúcares solúveis totais sob eC pode ser explicado pela atividade limitada de órgãos drenos. Quando as plantas tornam-se incapazes de utilizar o carbono extra resultante da fotossíntese para o crescimento, a atividade de dreno e o transporte de açúcares são inibidos ou os carboidratos são acumulados nos tecidos e no floema (Ainsworth e Bush, 2011; Moraes et al., 2012; Wang et al., 2013; Arenque et al., 2014). Assim, a força do dreno de carbono torna-se um fator chave que limita a produtividade da planta, pois o acúmulo de biomassa e sua partição entre diferentes órgãos dependem tanto do balanço de carbono, quanto da expansão e iniciação ordenada dos órgãos (Morison e Lawlor, 1999).

A concentração dos carboidratos não estruturais além de variar entre espécies, órgãos, tecidos e células, apresenta também alteração ao longo do dia e nas diferentes estações do ano (Souza et al., 2005). Em *Panicum maximum*, o acúmulo de carboidratos durante o dia e a redução durante a noite não foram afetados significativamente pelos tratamentos, no entanto, foi observada redução na concentração de açúcares solúveis totais e redutores nas plantas ao longo do período experimental. A redução do conteúdo de açúcares foi acompanhada pela redução da radiação (DFFF $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$) ao longo do experimento (Figura 6), devido à mudança de estação, fim do outono e início do inverno. Tais condições ambientais podem, provavelmente, ter comprometido a eficiência fotossintética das folhas e assim reduzido a produção de fotoassimilados.

Em relação aos carboidratos estruturais, a síntese de celulose é extremamente sensível às mudanças ambientais (Delmer, 1999). O aumento de CO₂ ocasionou aumento no teor de celulose em folhas de *Arabidopsis thaliana* (Teng et al., 2006), em colmo de cana-de-açúcar (Souza et al., 2008) e em rizóforos de *Vernonia herbacea* (Oliveira et al., 2010). Contudo, no presente estudo não foram observadas alterações significativas no teor de celulose foliar com o elevado CO₂ e aquecimento, como reportado também por Faria (2015) na mesma espécie crescendo em câmaras de topo aberto (OTC).

Para o teor de lignina vários estudos relatam também respostas variadas, com reduções do teor de lignina sob eC (Blaschke et al., 2004; Souza et al., 2008), e aumento quando combinado com temperatura elevada em condições de estresse hídrico ou não (AbdElgawad et al., 2014; Salazar-Parra et al., 2015). Em *Panicum maximum*, o teor de lignina aumentou cerca de 100% sob eC e AbdElgawad et al. (2014) atribuem aumentos como este, ao incremento do metabolismo chiquimato devido a alta disponibilidade de carbono. Nas plantas, a lignina é depositada em paredes de células secundárias proporcionando rigidez e apoio estrutural, determinando a qualidade dos tecidos e sua biodegradabilidade (Blaschke et al., 2002). Assim, maior acúmulo de lignina poderá resultar em decréscimo da aceitabilidade da gramínea pelo gado (Abreu, 2004).

Além da lignina, outros componentes importantes que caracterizam a qualidade das forragens foram analisados, como o teor de fibra detergente ácido (FDA) e proteína bruta (PB). Em *Panicum maximum*, a FDA não apresentou alteração com os tratamentos, contudo, eC reduziu a quantidade de proteína bruta (PB) presente nos tecidos vegetais. Esta redução tem sido atribuída à redução na concentração de nitrogênio nas folhas (Gifford et al., 2000; DaMatta et al., 2010).

O acúmulo de carboidratos não estruturais em eC contribui para a redução na proporção de nitrogênio e consequentemente redução nos teores de PB, uma vez que estas contêm quantidades substanciais deste elemento (Taub et al., 2008). Por outro lado, mesmo que não haja estímulo da fotossíntese sob eC, a condutância estomática pode ser reduzida, o que por sua vez, aumenta a eficiência do uso da água promovendo a redução da absorção de nitrato por fluxo de massa e assim redução nos teores de nitrogênio nas folhas (Ghannoum et al., 2000; Leahey et al., 2006). Desta maneira, a redução no teor de PB na planta por aumento do CO₂ pode ter implicações importantes para o crescimento e nutrição dos animais que consomem este material vegetal (Taub et al., 2008).

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi demonstrado que *Panicum maximum* crescendo em elevado CO₂ e aumento da temperatura em 2 °C acima da temperatura ambiente é capaz de alterar a produção de biomassa, o metabolismo de carboidratos e a qualidade da forragem sob disponibilidade hídrica e sem limitação de nutrientes. O efeito do elevado CO₂ no crescimento das plantas interagiu positivamente com o aquecimento, no entanto, parte do carbono assimilado foi acumulada no colmo destas plantas. Considerando que a quantidade de fotoassimilados desviados para a produção de lignina parece ser maior em condições de elevado CO₂, alterações no crescimento das plantas podem ser esperadas. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o aumento na temperatura poderá ter efeitos positivos sobre o crescimento de *P. maximum*, mas que aumento nas concentrações de CO₂ resultará em uma forragem de baixa qualidade, o que poderá comprometer o desempenho do gado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGAWAD, H., FARFAN-VIGNOLO, E.R., DE VOS, D., ASARD, H. 2015. Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Science* 231, 1-10.
- ABREU, J.B.R., CÓSER, A.C., DEMINICIS, B.B., BRUM, R.P., SANT'ANA, N.F., TEIXEIRA, M.C., SANTOS, A.M. 2004. Avaliação da produção de matéria seca, relação folha/colmo e composição química de *Brachiaria humidicola* (Rendle), submetida à diferentes idades de rebrota e doses de nitrogênio e potássio. *Revista Universidade Rural* 24, 135-141.
- AIDAR, M.P.M., MARTINEZ, C.A., COSTA, A.C., COSTA, P.M.E., DIETRICH, S.M.C., BUCKERIDGE, M.S., 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinoideae). *Biotaneotropica* 2, 1-10.

- AINSWORTH, E.A., BUSH, D.R. 2011. Carbohydrate export from the leaf: A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology* 155, 64-69.
- AINSWORTH, E.A., DAVEY, P.A., HYMUS, G.J., OSBORNE, C.P., ROGERS, A., BLUM, H., NÖSBERGER, J., LONG, S.P. 2003. Is stimulation of leaf photosynthesis by elevated carbon dioxide concentration maintained in the long term? A test with *Lolium perenne* grown for 10 years at two nitrogen fertilization levels under Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant, Cell and Environment* 26, 705-714.
- AINSWORTH, E.A., LONG, S.P. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A Meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165, 351-372.
- ALEXANDRINO, E., GOMIDE, J.A., GOMIDE, C.A.M. 2005. Crescimento e desenvolvimento do dossel de *Panicum maximum* cv. Mombaça. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 2164-2173.
- ALJAZAIRI, S., NOGUÉS, S. 2015. The effects of depleted, current and elevated growth [CO₂] in wheat are modulated by water availability. *Environmental and Experimental Botany* 112, 55-66.
- 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, 425-431.
- ARANJUELO, I., ERICE, G., NOGUÉS, S., MORALES, F., IRIGOYEN, J.J., SÁNCHEZ-DÍAZ, M. 2008. The mechanism(s) involved in the photoprotection of PSII at elevated CO₂ in nodulated alfalfa plants. *Environmental and Experimental Botany* 64, 295-306.
- ARANJUELO, I., IRIGOYEN, J.J., PEREZ, P., MARTINEZ-CARRASCO, R., SANCHEZ-DÍAZ, M. 2005. The use of temperature gradient tunnels for studying the combined effect of CO₂, temperature and water availability in N₂ fixing alfalfa plants. *Annals of Applied Biology* 146, 51-60.
- ARENQUE, B.C., GRANDIS, A., POCIUS, O., SOUZA, A.P., BUCKERIDGE, M.S. 2014. Responses of *Senna reticulata*, a legume tree from the Amazonian floodplains, to elevated atmospheric CO₂ concentration and waterlogging. *Trees* 28, 102-1034.

- BARBEHENN, R.V., CHEN, Z., KAROWE, D.N., SPICKARD, A. 2004. C₃ grasses have higher nutritional quality than C₄ grasses under ambient and elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology* 10, 1565-1575.
- BEADLE, C.L. 1993. Growth analysis. In: HALL, D.O., SCURLOCK, J.M.O., BOLHÀRNORDENKAMPF, H.R., LEEGOOD, R.C., LONG, S.P. (eds.). *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. London: Chapman & Hall. p. 36-46.
- BIANCONI, M.E. 2013. *Trocas gasosas foliares e crescimento de uma forrageira C₄ tropical no contexto das mudanças climáticas: respostas ao elevado CO₂ e ao aquecimento*. Dissertação de Mestrado em Biologia Comparada. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 110 p.
- BLASCHKE, L., FORSTREUTER, M., SHEPPARD, L.J., LEITH, I.K., MURRAY, M.B., POLLE, A. 2002. Lignification in beech (*Fagus sylvatica*) grown at elevated CO₂ concentrations: interaction with nutrient availability and leaf maturation. *Tree Physiology* 22, 469-477.
- BLASCHKE, L., LEGRAND, M., MAI, C., POLLE, A. 2004. Lignification and structural biomass production in tobacco with suppressed caffeic/5-hydroxy ferulic acid-O-methyl transferase activity under ambient and elevated CO₂ concentrations. *Physiologia Plantarum* 121, 75-83.
- BUCKERIDGE, M.S., AIDAR, M.P.M. 2002. Carbon sequestration in the rain forest: Alternatives using environmentally friendly biotechnology. *Biota Neotropica* 2, 1-5.
- CAI, C., YIN, X., HE, S., JIANG, W., SI, C., STRUIK, P.C., LUO, W., LI, G., XIE, Y., XIONG, Y., PAN, G. 2015. Responses of wheat and rice to factorial combinations of ambient and elevated CO₂ and temperature in FACE experiments. *Global Change Biology*, in Press.
- DAMATTA, F.M., GRANDIS, A., ARENQUE, B.C., BUCKERIDGE, M.S. 2010. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International* 43, 1814-1823.
- DELMER, D.P. 1999. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 245-76.

- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, P., REBERS, A., SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- FARFAN-VIGNOLO, E.R., ASARD, H. 2012. Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 59, 55-62.
- FARIA, A.P. 2015. *Ecophysiological responses of Brazilian cerrado invasive grasses to increases of CO₂ concentration and temperature*. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 110 p.
- FISCHER, B.U., FREHNER, M., HEBEISEN, T., ZANETTI, S., STADELMANN, F., LÜSCHER, A., HARTWIG, U.A., HENDREY, G.R., BLUM, H., NÖSBERGER, J. 1997. Source-sink relations in *Lolium perenne* L. as reflected by carbohydrate concentrations in leaves and pseudo-stems during regrowth in a free air carbon dioxide enrichment (FACE) experiment. *Plant, Cell and Environment* 20, 945-952.
- FRY, S.C. 1988. *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. Longman, London, 333 p.
- GE, Z.M., ZHOU, X., KELLOMÄKI, S., PELTOLA, H., BIASI, C., SHURPALI, N., MARTIKAINEN, P.J., WANG, K.Y. 2012. Measured and modeled biomass growth in relation to photosynthesis acclimation of a bioenergy crop (Reed canary grass) under elevated temperature, CO₂ enrichment and different water regimes. *Biomass and bioenergy* 46, 251-262.
- GHANNOUM, O., CAEMMERER, S.VON, ZISKA, L.H., CONROY, J.P., 2000. The growth response of C₄ plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant, Cell and Environment* 23, 931-942.
- GIFFORD, R.M., BARRETT, D.J., LUTZE, J.L. 2000. The effects of elevated [CO₂] on the C:N and C:P mass ratios of plant Tissues. *Plant and Soil* 224, 1-14.
- GOMIDE, C.A.M., GOMIDE, J.A. 1999. Análise de Crescimento de Cultivares de *Panicum maximum* Jacq. *Revista Brasileira de Zootecnia* 28, 675-680.
- HOLDEN, L.A., 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal Dairy Science* 82, 1791-1794.

- HOWDEN, S.M., MCKEON, G.M., WALKER, L., CARTER, J.O., CONROY, J.P., HALL, W.B., ASH, A.J., GHANNOUM, O. 1999. Global change impacts on native pasture in south-east Queensland, Australia. *Environmental Modelling & Software* 14, 307-316.
- IBGE 2006. *Censo Agropecuário*. Rio de Janeiro, p.1-777.
- IPCC 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC WGI 5th Assessment Report.
- IPCC 2014. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- JANK, L., SAVIDAN, Y., SOUZA, M.T., COSTA, J.C.G. 1994. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzida da África. 1. Produção forrageira. *Revista Brasileira de Zootecnia* 23, 433-440.
- KADAM, N.N., XIAO, G., MELGAR, R.J., BAHUGUNA, R.N., QUINONES, C., TAMILSELVAN, A., PRASAD, P.V.V., JAGADISH, K.S.V. 2014. Agronomic and physiological responses to high temperature, drought, and elevated CO₂ interactions in cereals. *Advances in Agronomy* 127, 111-156.
- KIMBALL, B.A., CONLEY, M.M., WANG, S., LIN, X., LUO, C., MORGAN, J., SMITH, D. 2008. Infrared heater arrays for warming ecosystem field plots. *Global Change Biology* 14, 309-320.
- KIRSCHBAUM, M.U.F., LAMBIE, S.M. 2015. Re-analysis of plant CO₂ responses during the exponential growth phase: interactions with light, temperature, nutrients and water availability. *Functional Plant Biology* 42, 989-1000.
- KO, J., AHUJA, L., KIMBALL, B., ANAPALLI, S., MA, L., GREEN, T.R., RUANE, A.C., WALL, G.W., PINTER, P., BADER, D.A. 2010. Simulation of free air CO₂ enriched wheat growth and interactions with water, nitrogen, and temperature. *Agricultural and Forest Meteorology* 150, 1331-1346.
- LEAKEY, A.D.B., URIBELARREA, M., AINSWORTH, E.A., NAIDU, S.L., ROGERS, A., ORT, D.R., LONG, S.P. 2006. Photosynthesis, productivity, and yield of maize are not affected by open-air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought. *Plant Physiology* 140, 779-790.

- LONG, S.P., AINSWORTH, E.A, LEAKEY, A.D.B., NOSBERGER, J., ORT, D.R. 2006. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science* 312, 1918-21.
- MORAES, M.G., CHATTERTON, N.J., HARRISON, P.A., FILGUEIRAS, T.S., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2012. Diversity of non-structural carbohydrates in grasses (Poaceae) from Brazil. *Grass and Forage Science* 68, 165-177.
- MORENO, L.S.B., PEDREIRA, C.G.S., BOOTEC, K.J., ALVES, R.R. 2014. Base temperature determination of tropical *Panicum* spp. grasses and its effects on degree-day-based models. *Agricultural and Forest Meteorology* 186, 26-33.
- MORISON, J.I.L., LAWLOR, D.W. 1999. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell and Environment* 22, 659-682.
- NAUDTS, K., DEN BERGE, J.V., JANSSENS, I.A., NIJS, I., CEULEMANS, R. 2013. Combined effects of warming and elevated CO₂ on the impact of drought in grassland species. *Plant Soil* 369, 497-507.
- OLIVEIRA, V.F., ZAIDAN, L.B.P., BRAGA, M.R., AIDAR, M.P.M., CARVALHO, M.A.M. 2010. Elevated CO₂ atmosphere promotes plant growth and inulin production in the cerrado species *Vernonia herbacea*. *Functional Plant Biology* 37, 223-231.
- OLIVO, M.N., MARTINEZ, C.A., OLIVA, M.A. 2002. The photosynthetic response to elevated CO₂ in high altitude potato species (*Solanum curtilobum*). *Photosynthetica* 40, 309-313.
- PINTO, J.C., GOMIDE, J.A., MAESTRI, M., 1994. Produção de matéria seca e relação folha/caule de gramíneas forrageiras tropicais, cultivadas em vasos, com duas doses de nitrogênio. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 23, 313-326.
- POORTER, H. 1993. Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio* 104, 77-97.
- PRITCHARD, S.G., JU, Z., VAN SANTEN, E., QIU, J., WEAVER, D.B., PRIOR, S.A., ROGERS, H.H. 2000. The influence of elevated CO₂ on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 1061-1068.
- READ, J.J., MORGAN, J.A. 1996. Growth and Partitioning in *Pascopyrum smithii* (C3) and *Bouteloua gracilis* (C4) as Influenced by Carbon Dioxide and Temperature. *Annals of Botany* 77, 487-496.

- RODRIGUES, R.C., MOURÃO, G.B., BRENNECKE, K., LUZ, P.H.C., HERLING, V.R. 2008. Produção de massa seca, relação folha/colmo e alguns índices de crescimento do *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés cultivado com a combinação de doses de nitrogênio e potássio. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37, 394-400.
- RUIZ-VERA, U.M., SIEBERS, M., GRAY, S.B., DRAG, D.W., ROSENTHAL, D.M., KIMBALL, B.A., ORT, D.R., BERNACCHI, C.J. 2013. Global warming can negate the expected CO₂ stimulation in photosynthesis and productivity for soybean grown in the Midwestern United States. *Plant Physiology* 162, 410-423.
- SAGE, R.F., KUBIEN, D.S. 2003. Quo vadis C₄? An ecophysiological perspective on global change and the future of C₄ plants. *Photosynthesis Research* 77, 209-225.
- SAGE, R.F., KUBIEN, D.S. 2007. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 30, 1086-1106.
- SALAZAR-PARRA, C., ARANJUELO, I., PASCUAL, I., ERICE, G., SANZ-SÁEZ, A., AGUIRREOLEA, J., SÁNCHEZ-DÍAZ, M., IRIGOYEN, J.J., ARAUS, J.L., MORALES, F. 2015. Carbon balance, partitioning and photosynthetic acclimation in fruit-bearing grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo) grown under simulated climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) scenarios in temperature gradient greenhouses. *Journal of Plant Physiology* 174, 97-109.
- SANTOS, J.H.S., BONA, F.D., MONTEIRO, F.A. 2013. Growth and productive responses of tropical grass *Panicum maximum* to nitrate and ammonium supply. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42, 622-628.
- SANTOS, P.M., CORSI, M., BALSALOBRE, M.A.A. 1999. Efeito da frequência de pastejo e da época do ano sobre a produção e a qualidade em *Panicum maximum* cvs. Tanzânia e Mombaça. *Revista Brasileira de Zootecnia* 28, 244-249.
- SANZ-SÁEZ, A., ERICE, G., AGUIRREOLEA, J., MUÑOZ, F., SÁNCHEZ-DÍAZ, M., IRIGOYEN, J.J. 2012. Alfalfa forage digestibility, quality and yield under future climate change scenarios vary with *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of Plant Physiology* 169, 782-788.
- SOEST, P.J. van, ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.

- SOMOGYI, M. 1945. A new for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160, 61-63.
- SONG, Y., YU, J., HUANG, B. 2014. Elevated CO₂-mitigation of high temperature stress associated with maintenance of positive carbon balance and carbohydrate accumulation in Kentucky Bluegrass. *PLoS One* 9, e89725.
- SOUSSANA, J.F., LÜSCHER, A. 2007. Temperate grasslands and global atmospheric change. *Grassland Science in Europe* 11, 127-134.
- SOUZA, A., MORAES, M.G., RIBEIRO, R.C.L.F. 2005. Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. *Acta Botanica Brasilica* 19, 81-90.
- SOUZA, A.P. 2011. *Mecanismos fotossintéticos e relação fonte-dreno em cana-de-açúcar cultivada em atmosfera enriquecida em CO₂*. Tese de Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 228 p.
- SOUZA, A.P., ARUNDALE, R.A., DOHLEMAN, F.G., LONG, S.P., BUCKERIDGE, M.S. 2013. Will the exceptional productivity of *Miscanthus x giganteus* increase further under rising atmospheric CO₂? *Agricultural and Forest Meteorology* 171-172, 82-92.
- SOUZA, A.P., GASPAR, M., SILVA, E.A., ULIAN, E.C., WACLAWOVSKY, A.J., NISHIYAMA-JR, M.Y., DOS SANTOS, R.V., TEIXEIRA, M.M., SOUZA, G.M., BUCKERIDGE, M.S. 2008. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell and Environment* 31, 1116-1127.
- TAUB, D.R., MILLER, B., ALLEN, H. 2008. Effects of elevated CO₂ on the protein concentration of food crops: a meta-analysis. *Global Change Biology* 14, 565-575.
- TEIXEIRA, A.C.B., GOMIDE, J.A., OLIVEIRA, J.A., ALEXANDRINO, E., LANZA, D.C. 2005. Distribuição de fotoassimilados de folhas do topo e da base do capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq.) em dois estádios de desenvolvimento. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 479-488.
- TENG, N., WANG, J., CHEN, T., WU, X., WANG, Y., LIN, J. 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 172, 92-103.

- TURUNEN, M., SOPPELA, P., KINNUNEN, H., SUTINEN, M.L., MARTZ, F. 2009. Does climate change influence the availability and quality of reindeer forage plants? *Polar Biology* 32, 813-832.
- UPDEGRAFF, D.M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry* 32, 420-424.
- VÍTOLO, H.F., SOUZA, G.M., SILVEIRA, J.A.G. 2012. Cross-scale multivariate analysis of physiological responses to high temperature in two tropical crops with C₃ and C₄ metabolism. *Environmental and Experimental Botany* 80, 54-62.
- VU, J.C.V., ALLEN, L. 2009. Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C₄ sugarcane. *Journal of Plant Physiology* 166, 107-116.
- WAND, S.J.E., MIDGLEY, G.F., JONES, M. 1999. Responses of wild C₄ and C₃ grass (Poaceae) species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a meta-analytic test of current theories and perceptions. *Global Change Biology* 5, 723-741.
- WANG, D., HECKATHORN, S., WANG, X., PHILPOTT, S. 2012. A meta-analysis of plant physiological and growth responses to temperature and elevated CO₂. *Oecologia* 169, 1-13.
- WANG, L., FENG, Z., SCHJOERRING, J.K. 2013. Effects of elevated atmospheric CO₂ on physiology and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.): A meta-analytic test of current hypotheses. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 178, 57-63.
- WILES, P.G., GRAY, I.K., KISSLING, R.C. 1998. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. *Journal of AOAC International* 81, 620-632.
- YANG, L., WANG, Y., DONG, G., GU, H., HUANG, J., ZHU, J., YANG, H., LIU, G., HAN, Y. 2007. The impact of free-air CO₂ enrichment (FACE) and nitrogen supply on grain quality of rice. *Field Crops Research* 102, 128-140.
- ZHONG, Q., GONG, J., WANG, K., ZHANG, C. 2014. Effects of 3-year air warming on growth of two perennial grasses (*Phragmites australis* and *Imperata cylindrica*) in a coastal salt marsh reclaimed for agriculture. *Aquatic Botany* 117, 18-26.
- ZISKA, L.H., SICHER, R.C., BUNCE, J.A. 1999. The impact of elevated carbon dioxide on the growth and gas exchange of three C₄ species differing in CO₂ leak rates. *Physiologia Plantarum* 105, 74-80.

CAPÍTULO II

**Ajustes no sistema fotoquímico e de fotoproteção do PSII em
resposta ao aquecimento e elevado CO₂ na planta C₄, *Panicum
maximum* Jacq. (Poaceae)**

RESUMO

O aumento das concentrações de CO₂ e da temperatura no quadro da mudança climática global poderão alterar o crescimento e a produtividade de muitas culturas de plantas agrícolas e pastagens. Estes efeitos significativos dependerão do tempo, intensidade e sua combinação com outros fatores ambientais. Assim, entender o impacto do incremento do CO₂ atmosférico em conjunto com outras alterações climáticas é de grande importância para a previsão da mitigação e adaptação da produção agrícola e das pastagens no futuro. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do elevado CO₂ (600 ppm) e do aquecimento (2 °C de aumento sobre a temperatura ambiente) na fotoquímica do fotossistema II e na fotoproteção da forrageira tropical C₄ *Panicum maximum* Jacq., cultivada em um Trop-T-Face (*Tropical Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment*) em condições adequadas de disponibilidade hídrica e sem limitação de nutrientes. Os resultados mostraram que as plantas foram capazes de evitar fotoinibição do aparato fotossintético e peroxidação lipídica em resposta ao aquecimento e elevado CO₂, conforme indicado por valores constantes de F_v/F_m e conteúdo de malondialdeído (MDA) e hidroperóxido lipídicos (LOOH). O aquecimento aumentou os teores de clorofila em 12% e reduziu os teores de α -tocoferol em média de 55%. O aumento do CO₂ reduziu em 58% o conteúdo de ascorbato em 30 dias de experimento. Os níveis de zeaxantina e luteína, o ciclo de xantofila (VZA) e o estado de epoxidação do ciclo da xantofila foram afetados pelo elevado CO₂ e o aquecimento somente depois 60 dias. Os resultados obtidos demonstraram que o aquecimento em 2 °C provocou ajustes no conteúdo de clorofila e tocoferol, mas não causou danos na eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII). Conclui-se que o crescimento das plantas de *P. maximum* quando cultivadas em condições de disponibilidade hídrica e nutrição mineral não será afetada pelo aquecimento e CO₂ elevado, em decorrência da ausência de dano fotooxidativo evidente, por manutenção dos mecanismos de fotoproteção.

Palavras-chave: eficiência fotoquímica, pigmentos, tocoferol, forrageira, mudanças climáticas.

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas globais irão trazer um impacto sobre muitas culturas de plantas agrícolas e pastagens, podendo afetar o crescimento e a produtividade das plantas. Estes efeitos significativos podem ser causados pelo aumento das concentrações do CO₂ e da temperatura no quadro da mudança climática global (Morison e Morecroft, 2006). No entanto, podem ser mais complexos do que o previsto anteriormente, com interações entre o aumento de CO₂, temperaturas elevadas, déficit hídrico e disponibilidade de nutrientes.

O aumento do CO₂ atmosférico na maioria dos casos tem proporcionado uma estimulação direta da fotossíntese e do crescimento das plantas, sendo até três vezes maiores em espécies C₃ do que C₄ (Ziska e Bunce, 1997; Sage e Kubien, 2003; Ainsworth e Long, 2005). Este efeito positivo do aumento do CO₂ tem se intensificado quando combinado com temperaturas mais altas, tanto em plantas C₃ (Aranjuelo et al., 2006; Erice et al., 2007) quanto em plantas C₄ (Sage e Kubien, 2003) e se reduzido quando há limitação de nutrientes no solo (Hymus et al., 2001; Woodward, 2002; Sage e Kubien, 2003; Ainsworth e Long, 2005).

As mudanças climáticas podem também afetar a capacidade de proteção da planta e como consequência, suas respostas a outros tipos de estresses (Naudts et al., 2014; AbdElgawad et al., 2015). O aumento do CO₂ pode aumentar a dissipação térmica do excesso de energia resultando numa melhoria da fotoproteção e na diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o aquecimento moderado pode contribuir para aliviar o estresse oxidativo por meio de um aumento das reações metabólicas (Naudts et al., 2014).

O elevado CO₂ tem proporcionado um efeito positivo na eficiência quântica máxima do fotossistema II (PS II) (F_v/F_m), em gramíneas (Hymus et al., 2001; Tausz-Posch et al., 2013) e em espécies arbóreas (Oliveira et al., 2012), crescendo sem limitação de nutrientes. O aumento do CO₂ atmosférico proporciona um maior consumo de elétrons durante a fixação do CO₂, reduzindo o fluxo de elétrons para outras vias e evitando a formação de EROs (Asada, 1999), que por sua vez, propiciam uma redução na dissipação de energia via fluorescência (Tausz-Posch et al., 2013).

Assim, o elevado CO₂ atua com um papel fotoprotetor amenizando os efeitos de outros estresses (Oliveira et al., 2012; Tausz-Posch et al., 2013).

Contudo, esta resposta ainda é um pouco inconsistente, pois o efeito do elevado CO₂ pode levar tanto a nenhuma alteração da eficiência fotoquímica do transporte de elétron, como também pode provocar um aumento da fotoinibição, como no caso de gramíneas como a *Dactylis glomerata* (Hymus et al., 2001). Este aumento estaria associado com a retro-inibição do transporte de elétrons associada com a acumulação de carboidratos, fazendo com que ocorra um aumento na dissipação da energia via fluorescência (Roden e Ball, 1996).

Em condições de alta radiação, a produção de EROs é aumentada uma vez que a intensidade de fótons é superior ao necessário para a assimilação de CO₂ e assim por consequência causar um estresse oxidativo (Asada, 2006). Durante a ocorrência de uma fotoinibição há um comprometimento da função fotossintética que pode levar a uma energia excessiva de excitação no PSII, que uma vez não dissipada propicia a formação de EROs (Aranjuelo et al., 2008).

As EROs, radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH[•]) e oxigênio singleto (¹O₂) (Steffen, 1991) são produzidas nos cloroplastos (sítios da fotossíntese), mitocôndrias e peroxissomos, e são altamente reativas e tóxicas para as células. As primeiras alterações decorrentes do acúmulo de EROs são danos à proteína D1 do centro de reação do PSII causada pelo oxigênio singleto, fazendo com que o transporte de elétrons do processo fotossintético seja interrompido e assim levando a uma redução da eficiência do PSII (Larcher, 2006).

Posteriormente há a destruição dos carotenóides, branqueamento dos cloroplastos devido à destruição dos pigmentos, oxidação de proteínas, inibição de enzimas e danos no DNA e RNA (Mittler, 2002; Jubany-Marí et al., 2009). O aumento na produção de EROs propicia também um aumento da peroxidação de lipídios (Choudhury e Behera, 2001), que além de diminuir a fluidez da membrana, provoca a perda de eletrólitos, rápida dessecação e morte celular. Os radicais peroxilipídicos e hidroperoxilipídicos produzidos também são altamente reativos (Halliwell, 2006).

Diante da ação destrutiva das EROs sobre o aparelho fotossintético, a eliminação imediata das mesmas antes da sua difusão a partir do local de geração é indispensável para proteger as moléculas alvo do estroma e do tilacóide (Asada, 2006).

As plantas desenvolveram uma série de estratégias e mecanismos de defesa incluindo várias moléculas e enzimas, que permitem uma redução da formação de EROs ou a desintoxicação de EROs já formadas (Jahns e Holzwarth, 2012).

O sistema enzimático de defesa antioxidante das plantas ocorre a partir da atividade da catalase (CAT), da ascorbato peroxidase (APX), da superóxido dismutase (SOD) e da glutatona redutase (GR) (Foyer et al., 1994; Mittler, 2002). Os antioxidantes não enzimáticos compreendem a hidroquinona, manitol e flavonóides (Demmig-Adams e Adams, 1992), e entre os principais metabólitos antioxidantes, encontram-se o α -tocoferol, o ascorbato, a glutatona e os carotenóides (Barbosa et al., 2014).

O tocoferol, conhecido também como vitamina E, é associado à membrana e é encontrado em organismos fotossintéticos, incluindo todas as plantas (Munné-Bosch, 2005). Tocoferóis são moléculas lipossolúveis que residem em plastídios e especificamente nos cloroplastos, com exceção notável em sementes, onde se encontram no retículo-endoplasmático. Os tocoferóis têm como função proteger a membrana fotossintética contra o estresse oxidativo. Dentre os quatro tipos diferentes de tocoferol (α , β , γ e δ), o α -tocoferol é a forma mais comum encontrada em tecidos fotossintetizantes (Maeda e DellaPenna, 2007; Hasanuzzaman et al., 2014).

O α -tocoferol atua também em conjunto com outros antioxidantes através da redução do radical peroxilipídico, formando o radical tocoferoxil, que pode ser reciclado de volta em α -tocoferol pelo ascorbato. Assim, tocoferol e ascorbato são interdependentes no controle de níveis de EROs nos cloroplastos. Uma deficiência em α -tocoferol resulta em um aumento em ascorbato e glutatona, enquanto uma acumulação de α -tocoferol propicia uma redução dos mesmos (Munné-Bosch, 2005). O ascorbato, juntamente com a glutatona, também participa da inativação de várias EROs através do ciclo da ascorbato-glutatona, onde o peróxido de hidrogênio é eliminado pela ascorbato peroxidase e sua regeneração ocorre por meio da oxidação da glutatona que torna a ser reduzida pela glutatona redutase (Barbosa et al., 2014).

Outro mecanismo de proteção presente na membrana do tilacóide é o ciclo das xantofilas (Larcher, 2006). A diminuição do pH do lúmen do tilacóide promove uma sequência cíclica de deepoxidação da violaxantina diopoxida através da anteraxantina monoepoxida para a zeaxantina e assim uma sequência de epoxidação reconverte zeaxantina à violaxantina. Estas duas sequências de reações são catalisadas por duas

enzimas diferentes (violaxantina de-epoxidase e zeaxantina epoxidase) com a participação da ascobarto e NADPH₂, e podem ocorrer simultaneamente na presença de luz (Demming-Adams e Adams, 1992; Müller et al., 2001).

As principais gramíneas utilizadas como forragens para o gado em áreas tropicais pertencem aos gêneros *Brachiaria* ou *Panicum* (Batistoti et al., 2012) e no Brasil as espécie *Panicum maximum* tem sido amplamente utilizada por apresentar boa produtividade e alto valor nutritivo (Santos et al., 1999). Estas gramíneas além de forrageiras estão sendo expandidas para novas funções e importância, tanto como fonte de matéria-prima para a produção de energia como também um promotor de sequestro de carbono (Moreno et al., 2014). Por conta de sua ampla utilização é de grande importância o conhecimento das diversas características da planta sob diferentes condições ambientais (Brâncio et al., 2003).

Além disso, apesar de existirem estudos sobre fotoinibição da fotossíntese e estresse oxidativo em elevado CO₂ e temperatura, pouco se conhecem sobre o efeito combinado destes fatores sobre espécies forrageiras tropicais em condições de campo e como elas influenciam o grau de fotoinibição e, conseqüentemente, a assimilação de carbono. Assim, entender o impacto da mudança do CO₂ atmosférico em conjunto com outras alterações climáticas é de grande importância para prever a mitigação e adaptação da produção agrícola e das pastagens em ambiente futuro. O trabalho apresentado neste capítulo teve como objetivo avaliar os efeitos do elevado CO₂ (600 ppm) e do aquecimento (aumento de 2 °C acima da temperatura ambiente) sobre a fotoquímica do PSII e fotoproteção na forrageira tropical C₄ (*Panicum maximum* Jacq.) cultivada no sistema Trop-T-Face (*Tropical-Temperature free-air controlled enhancement and free-air carbon dioxide enrichment*), em condições de disponibilidade hídrica e sem limitação de nutrientes.

2. HIPÓTESE

As respostas das plantas às mudanças climáticas são bem variadas em diversos grupos vegetais, no entanto, para uma gramínea forrageira C_4 crescidas em sistema T-FACE hipotetizamos: (I) o aumento da concentração de CO_2 promove um efeito positivo no desempenho fotossintético das plantas; (II) a elevada temperatura tem efeitos prejudiciais na fotoquímica do PSII e aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio; e (III) a elevada concentração de CO_2 combinada com temperatura elevada vai contrabalancear os efeitos negativos da temperatura.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a ocorrência de estresse oxidativo através da avaliação da fotoquímica do PSII por meio de parâmetros de fluorescência.
- Analisar a ocorrência de estresse oxidativo através da avaliação bioquímica dos indicadores de estresse como alteração nos níveis de clorofila e a ocorrência de peroxidação de lipídios
- Avaliar os efeitos do elevado CO_2 e do aquecimento ($2\text{ }^{\circ}C$) na fotoproteção em folhas de *Panicum maximum* através de análises do sistema não enzimático de defesa antioxidante como carotenoides, tocoferol e ascorbato.
- Avaliar os efeitos do elevado CO_2 e do aquecimento ($2\text{ }^{\circ}C$) sobre a fotoquímica e fotoproteção de *P. maximum* em um curso diurno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das plantas

Durante o período experimental as coletas para as análises bioquímicas foram realizadas em dois dias (30 e 60 dias após o início do experimento) e em três períodos do dia (antemanhã, ao meio-dia e ao anoitecer). Durante as coletadas foram

selecionadas folhas maduras, completamente expandidas e expostas ao sol. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em congelador até a liofilização. Para a extração foi utilizada a região mediana do limbo foliar.

4.2. Avaliações

4.2.1. Monitoramento da fluorescência

A avaliação da fluorescência da clorofila *a*: fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e a razão (F_v/F_m) foi realizada com um fluorômetro portátil modelo OS-3 (ADC BioScientific, UK) nos três períodos do dia (antemanhã, meio-dia e anoitecer), juntamente com as coletas de folhas para as análises bioquímicas. A medição de fluorescência foi realizada em folhas completamente expandidas e expostas ao sol. Foram amostradas uma folha por indivíduo, sendo 6 indivíduos por unidade experimental, totalizando quatro amostras por tratamento. Antes das medições, a área de folha a ser medida permaneceu no escuro por 30 minutos. A indução da fluorescência foi realizada pela incidência de um pulso de luz de $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ao mesmo tempo em que se procedia as medições de fluorescência, foram monitoradas as condições micro-meteorológicas como temperatura ambiente e umidade relativa do ar com um higrotermômetro e radiação ambiente (FFFA - Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos) com um sensor quântico conectado a um medidor de radiação modelo LI-250A (LI-COR, USA).

4.2.2. Avaliação de peroxidação de lipídios (MDA)

A alteração na estabilidade de membrana causada pela peroxidação de lipídios em folhas de *Panicum maximum* foi determinada e expressa em termos de conteúdo de malondialdeído (MDA), segundo método descrito por Hodges et al. (1999). Amostras de folhas liofilizadas (30 mg) foram extraídas três vezes em 1 mL de etanol 80% contendo 0,01% (m/v) hidroxitolueno butilado (BHT). O homogenato foi agitado em vórtex, colocado no sonicador por 30 min e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e colocado em tubo Falcon de 5 mL no escuro a 4 °C. Posteriormente foi colocado 1 mL de amostra em 2 tubos de vidro com tampa sendo: 1 tubo com 1 mL reagente TBA⁺ (ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v), BHT 0,01% e TBA

0,65% (m/v)) e 1 tubo com o TBA⁻ (TCA 20% e BHT 0,01%). Para o branco, 1 tubo com 2 mL de etanol 80% + BHT (0,01%) + TBA⁺ e 1 tubo com 2 mL de etanol (80%) + BHT (0,01%) + TBA⁻. Os tubos tampados foram incubados por 25 minutos a 95 °C e em seguida resfriados por aproximadamente 10 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 440, 532 e 600 nm e a unidade do MDA foi nmol g⁻¹ de massa fresca.

4.2.3. Determinação de hidroperóxido lipídico (LOOH)

O conteúdo de hidroperóxido lipídico (LOOH), produto de oxidação primária de lipídios e que possibilita a indicação mais precisa do estado oxidativo na planta, foi determinado por espectrofotômetro de acordo com Bou et al. (2008) com algumas modificações. Folhas liofilizadas (50 mg) foram extraídas três vezes com metanol 80% (m/v) contendo 0,01% BHT (w/m) usando um ultrasonicador (Branson, Danbury, CT, USA) por 30 min. O extrato foi agitado em vórtex e centrifugado por 10 min a 4 °C a 13.000 rpm. Foi adicionado polivinilpolipirrolidona (PVPP) para retenção das clorofilas e então agitado em vórtex e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. Foram preparadas duas alíquotas do extrato sendo: o controle positivo com 50 µL de meOH + 50 µL de amostra e o controle negativo com 10 mM trifetilfosfina (TEPP) em meOH + 50 µL de amostra e incubado no escuro por 30 min. Depois foram colocados 200 µL do reagente FOX-2 em 50 µL do controle positivo, 50 µL do controle negativo e no padrão da curva (0-20 µM H₂O₂ em meOH). As amostras foram incubadas durante 45 min no escuro e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 560 nm. Absorbância máxima utilizada contra H₂O₂ curva padrão para determinar o conteúdo LOOH (como equivalentes de H₂O₂).

4.2.4. Concentração de pigmentos fotossintéticos

Para extração e análise do conteúdo de pigmentos fotossintéticos foram realizados como descrito por Munné-Bosch e Alegre (2000). Amostras de folhas liofilizadas (50 mg) foram submetidas a duas extrações em acetona 85% e duas extrações com acetona 100% usando um ultrasonicador (Branson, Danbury, CT, USA) por 15 min. O extrato então foi agitado em vórtex e centrifugado por 10 min a 4 °C a 13.000 rpm a cada extração. Os sobrenadantes foram combinados e o volume dos

extratos foi determinado de tal modo que a concentração final fosse de acetona 82,5%. Posteriormente, os extratos foram filtrados em filtro de 0,22 µm para posterior análise em HPLC. Os pigmentos foram separados em coluna Zorbax ODS-5µm (250 × 4.6mm; 20% Carbon, Teknokroma, St. Cugat, Spain) a 30 °C por 38 min em um fluxo de 1 mL min⁻¹. O solvente foi (A) acetonitrila: metanol (85:15, v:v) e (B) metanol: acetato de etila (68:32, v:v). O gradiente usado foi 0-14 min 100 % A; 0% B; 14-16 min decrescendo a 0% A; 100% B; 16-28 min 0 % A; 100% B; 28-30 min aumentando a 100 % A; 0% B; e 30-38 min 100 % A, 0% B. A detecção foi feita em 445 nm usando um detector “Diode array” (HP1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Padrões purificados de clorofila *a* e *b* foram comprados da Fluka (Buchs, Switzerland). Os fatores de conversão de unidades de área de pico por pmol por injeção foram: Chl *a* (167), Chl *b* (163), luteína (359), zeaxantina (359), β-caroteno (283), neoxantina (344), violaxantina (400) e anteraxantina (372). O pool do ciclo da xantofila (VAZ) é a soma de violaxantina (V), zeaxantina (Z) e anteraxantina (A), e o estado de-epoxidação do ciclo da xantofila (DPS) foi calculado como: $(Z + A)/(V + A + Z)$.

4.2.5. Determinação de tocoferol

Para a extração de tocoferol, 50 mg de folhas liofilizadas foram extraídas três vezes com metanol (4 °C) usando um ultrasonicador (Bransonic, Danbury, CT, USA) por 15 min. O extrato foi agitado em vórtex e centrifugado por 10 min a 4 °C e 13.000 rpm. Os sobrenadantes foram combinados e filtrados em filtro de 0,22 µm e transferidos para frascos de HPLC, como descrito por Morales et al. (2014). A análise foi realizada num sistema de HPLC acoplado a um detector de fluorescência (FP-1520; Jasco). Tocoferol foi separado em uma coluna Inertsil 100A (5 mm, 30 x 250 mm, GL Sciences Inc.) de fase normal operando à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (95,5: 4,5 v/v) a uma taxa de fluxo de 0,7 mL min⁻¹, e o volume de injeção foi de 10 µL. A detecção foi realizada a uma excitação de 295 nm e emissão a 330 nm. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência e comparada com a de uma curva de calibração feita com padrões autênticos de cada composto (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

4.2.6. Determinação de ascorbato oxidado e reduzido

Ascorbato oxidado e reduzido em folhas foi determinado por uma adaptação dos métodos descritos por Takahana e Oniki (1992) e por Queval e Noctor (2007). Folhas liofilizadas (40mg) foram trituradas e extraídas com 1 mL de tampão de extração (ácido meta fosfórico 6% (m/v) com 0,2 mM de ácido dietilentríamina penta acético (DTPA)) a 4 °C, usando um ultrasonicador (Branson, Danbury, CT, USA) por 15 min. O extrato foi agitado em vórtex e centrifugado por 10 min a 4 °C e 13.000 rpm. O pellet foi reextraído mais duas vezes com 450 µL cada com o mesmo solvente, totalizando 1900 µL de extrato. Para detecção de dehidroascorbato (DHA) 10 µL de extrato foi misturado com 185 µL de tampão de diluição (tampão fosfato de potássio 100mM, pH 6,5) e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 265 nm. Em seguida foi adicionado 5 µL de ditionitrito (DTT) 5 mM, misturado e incubado por 10 min no escuro e em temperatura ambiente. A absorbância foi determinada a 265 nm ($DHA = (L_{f1} - L_0) / 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para determinação de ácido ascórbico (AA) misturou-se 10 µL de extrato com 185 µL de tampão de diluição e a absorbância determinada a 265 nm. Posteriormente, foi adicionado 5 µL de ascorbato oxidase (AO) 50 U mL⁻¹, misturado vagarosamente e incubado por 1 min e a absorbância determinada a 265 nm ($AA = (L_{f2} - L_0) / 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O estado redox (%) foi calculado como $100 \times (AA / (AA + DHA))$.

5. RESULTADOS

5.1. Fluorescência da clorofila *a*

O dano na taxa transporte de elétrons da etapa fotoquímica pode ser estimado através da avaliação da eficiência quântica máxima do PSII (razão F_v/F_m), que quando abaixo de 0,725 indica a probabilidade de ocorrência de fotoinibição (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993). As medições da eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) de *Panicum maximum* foram realizadas durante dois dias e em um curso diurno e em conjunto com as medições de fluorescência foram realizadas as medições de radiação e temperatura. Como observado na tabela 1, o fluxo de fótons

fotossinteticamente ativos (FFFA $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) apresentou ao meio-dia uma média de $1136 \mu\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura média de 34°C .

Tabela 1. Condições ambientais durante as medições de fluorescência da clorofila a e coleta de amostras para análise bioquímica.

Parâmetro Ambiental	Horário	30 Dias	60 Dias
FFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Antemanhã	0	0
	Meio-dia	$1135 \pm 18,39$	$1138 \pm 6,06$
	Anoitecer	0	0
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Antemanhã	$16 \pm 1,29$	$11 \pm 0,40$
	Meio-dia	$34 \pm 0,82$	$33 \pm 1,92$
	Anoitecer	$22 \pm 0,29$	$17 \pm 0,50$

Valores médios $\pm$ erro padrão (n=3).

Na figura 1, pode-se observar uma redução dos níveis eficiência quântica máxima do PSII ao meio-dia nos dois dias de coletas, contudo, os valores de F_v/F_m não foram menores que 0,725 em nenhum tratamento, indicando assim a não ocorrência de fotoinibição aparente. A redução de F_v/F_m foi em média de 10 e 9% para todos os tratamentos, aos 30 e 60 dias, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas entre nenhum tratamento de elevado CO_2 e aquecimento. Ao final do dia (anoitecer), houve uma recuperação da razão F_v/F_m em todos os tratamentos com média de 13% em 30 dias e 9% em 60 dias de tratamento, mostrando uma recuperação total da eficiência quântica máxima do PSII (Figura 1).

Figura 1. Eficiência fotoquímica (F_v/F_m) em folhas de *Panicum maximum* após de 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemãhã, meio-dia e anoteecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão ($n=4$) ($P<0,05$; Teste de Tukey).

5.2. Peroxidação de lipídios e hidroperóxido lipídico

Alterações na membrana celulares indicam que a planta pode estar sofrendo estresse oxidativo, o qual pode ser avaliado através dos produtos resultantes da peroxidação de lipídios como MDA e LOOH. A tendência das plantas sob estresse é apresentar um aumento no nível de MDA, contudo, não foram observadas variações significantes em resposta ao aquecimento e o elevado CO_2 . As plantas do tratamento eC+eT coletadas aos 30 dias apresentaram uma queda de 23% ao meio-dia em relação a antemãhã, enquanto no mesmo tratamento aos 60 dias de experimento este decréscimo foi maior, cerca de 34% (Figura 2).

Os níveis de hidroperóxido lipídicos (LOOH) também não sofreram alterações significativas com o aumento do CO_2 e aquecimento. No entanto, pode se observar uma redução decrescente (antemãhã ao anoteecer) aos 30 dias de experimento, com queda de 15 e 21% em eC e eC+eT, respectivamente. Depois de 60 dias, os níveis de LOOH apresentaram a mesmas reduções nos mesmos tratamentos só que da antemãhã ao meio-dia, com uma tendência de aumento ao anoteecer (Figura 2).

Figura 2. Malondialdeído (MDA nmol g⁻¹ MS) e hidroperóxido lipídico (LOOH μmol g⁻¹ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios ± erro padrão (n=4) (P<0,05; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

5.3. Pigmentos fotossintéticos

Houve um efeito significante na concentração de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e clorofila total (Chl *a+b*) em resposta ao aumento do CO₂ e aquecimento somente aos 60 dias de experimento. Na antemanhã, as plantas apresentaram um aumento da concentração de Chl *a* de 11%, Chl *b* de 17% e Chl *a+b* de 12% em eT em relação as plantas controle. No anoitecer, o aumento da Chl *b* ocorreu no tratamento de eC+eT, com cerca de 14 % em relação as plantas controles (Figura 3).

Figura 3. Concentração de clorofila *a* (Chl *a* $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$), clorofila *b* (Chl *b* $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$), clorofila total (Chl *a+b* $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$) e razão clorofila *a* por clorofila *b* (Chl *a* / Chl *b*) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão ($n=4$) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

Aos 30 dias de experimento, não houve efeito significativo do elevado CO₂ e aquecimento sobre a concentração de clorofilas. Observaram-se somente variações significantes durante o curso diurno. No tratamento eC, no período da antemanhã ao meio-dia, a concentração de Chl *a*, Chl *b* e Chl total aumentou em 30, 34 e 32%, respectivamente. Enquanto aos 60 dias da antemanhã ao anoitecer as concentrações das clorofilas reduziram cerca de 12% em eC+eT (Chl *a* e Chl total) e eT (Chl *b*) (Figura 3).

A razão entre a concentração de Chl *a* e Chl *b* (Chl *a*/Chl *b*) apresentou alteração significativa entre os tratamentos e horários do dia somente aos 60 dias de experimento. No tratamento eC+eT, houve uma redução de cerca de 9% da razão Chl *a*/Chl *b* ao anoitecer. Nos tratamentos eC e eC+eT, houve uma redução de 8% na razão Chl *a*/Chl *b* da antemanhã ao anoitecer, como observado na figura 3.

5.4. Carotenóides e ciclo das xantofilas

Dentre os antioxidantes não enzimáticos analisados estão os carotenóides: β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina e anteraxantina (Figura 4). Podem-se observar variações durante o curso diurno destes carotenóides, mas pouco efeito significativo do elevado CO₂ e aquecimento. A concentração de β -caroteno em folhas não sofreu variação sob eC ou eT em nenhuma coleta. No entanto, durante o curso diurno a concentração de β -caroteno em eC aumentou 55% ao meio-dia e reduziu 36% ao anoitecer, aos 30 dias de experimento. Aos 60 dias a concentração de β -caroteno reduziu em todos os tratamentos do meio-dia ao anoitecer.

Quanto à concentração de luteína a resposta aos tratamentos e aos horários do dia foi significativa somente aos 60 dias de experimentos. O tratamento eC+eT proporcionou um aumento de luteína em relação ao controle de 14, 10 e 13% na antemanhã, ao meio-dia e ao anoitecer, respectivamente. Durante o curso diurno, no tratamento eT houve uma redução 17% da antemanhã ao anoitecer.

Figura 4. Concentração de β -caroteno ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) e luteína ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão ($n=4$) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

Os tratamentos eC e eT afetaram apenas as concentrações de violaxantina aos 60 dias de experimentos. A violaxantina aumentou 13% em eC+eT ao meio-dia e 15% em eC no anoitecer. Por outro lado, a anteraxantina apresentou uma tendência de aumento em eC+eT ($P=0,055$) em relação as plantas controles ao meio-dia. Durante o curso diurno a formação de anteraxantina e zeaxantina aumentou ao meio-dia em uma média de 254% e reduziu no anoitecer em uma média de 358% (Figura 5).

Figura 5. Conteúdo de violaxantina ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$), anteraxantina ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$) e zeaxantina ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão ($n=4$) ($P < 0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

Apenas aos 60 dias de experimento a concentração de xantofilas totais (VAZ) e o estado de-epoxidação do ciclo das xantofilas (DPS) mostraram alterações com o aumento de CO₂ e o aquecimento. A formação de VAZ aumentou 8% ao meio-dia em eC+eT e 15% ao anoitecer sob eC, enquanto o aquecimento reduziu o DPS em 19 e 39% ao meio-dia e ao anoitecer, respectivamente. A figura 6 mostra que o DPS apresentou variação similar aos de anteraxantina e zeaxantina com o aumento da radiação ao meio-dia, com um aumento médio de 226% aos 30 dias e 160% aos 60 dias de experimento.

Figura 6. Xantofilas (VAZ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$) e estado de-epoxidação do ciclo das xantofilas (DPS=(Z+0,5A/V+Z+A)) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P < 0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento. A, anteraxantina; V, violaxantina; Z, zeaxantina.

5.5. Tocoferóis

Análises de vitamina E das folhas de *Panicum maximum* revelaram a presença de duas formas de tocoferóis: α -tocoferol e γ -tocoferol. Neste experimento, as mudanças climáticas alteraram as concentrações dos tocoferóis em folhas de *P. maximum*, com redução nos níveis de α -tocoferol sob eC e eT. Aos 30 dias, a redução nos níveis de α -tocoferol foi de 64% sob eC, seguida de 46% sob eT. Após 60 dias, a maior redução em α -tocoferol ocorreu sob eT com uma média de 55% (Figura 7).

O γ -tocoferol, apesar de apresentar baixas concentrações em comparação com α -tocoferol, apresentou uma maior redução no tratamento combinado (eC+eT). A maior concentração de γ -tocoferol foi encontrada no tratamento eC (0,050 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS), que foi reduzida para 0,038 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS em eC+eT (Figura 7).

Figura 7. Conteúdo de α -tocoferol ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) e γ -tocoferol ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia e anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão (n=4) ($P < 0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

5.6. Ascorbato

Assim como nos outros compostos de combate a EROs, poucos foram os efeitos significativos dos tratamentos na concentração de ascorbato em folhas de *Panicum maximum*. Apenas o elevado CO₂ reduziu em 58% ao anoitecer, aos 30 dias de experimento. Nenhum outro efeito significativo das mudanças climáticas foi observado no estado redox, somente uma redução progressiva da antemanhã ao anoitecer em eC e eC+eT (Figura 8).

Figura 8. Ascorbato ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$) e estado redox (%) em folhas de *Panicum maximum* após 30 e 60 dias de tratamento em um curso diurno (antemanhã, meio-dia, anoitecer), crescendo sob os tratamentos (controle, eC, eT e eC+eT). Valores médios $\pm$ erro padrão ($n=4$) ($P<0,05$; Teste de Tukey). P_h = horário; P_t = tratamento; P_{hxt} = horário e tratamento.

6. DISCUSSÃO

O tratamento de elevada concentração de CO₂ e aquecimento imposto em *Panicum maximum*, durante 86 dias, não promoveu fotoinibição ou estresse oxidativo por efeito da temperatura, refutando a nossa hipótese. Logo, presume-se que o aumento da temperatura a 2 °C acima do ambiente não foi suficiente para causar estresse térmico acima dos níveis críticos por um período suficiente para provocar danos irreversíveis para o crescimento e desenvolvimento da planta (Shanmugam et al., 2013).

O maior crescimento e produção de *Panicum maximum* costuma ocorrer no período de maior precipitação e maiores temperaturas, em geral de outubro até maio (Brâncio et al., 2003; Aganga e Tshwenyane, 2004; Santos et al., 2004; Alexandrino et al., 2005). Durante o período experimental (meses de abril a julho) a precipitação foi baixa e a temperatura noturna chegou abaixo da temperatura base (11 °C) (Figura 4 - capítulo I) para *P. maximum* (Moreno et al., 2014). Assim, o aumento da temperatura em 2 °C influenciou nas respostas das plantas nos tratamentos com temperatura ambiente. Ressaltando também que a baixa precipitação (Figura 2 do capítulo I) não foi prejudicial, pois o campo experimental foi irrigado para manter as plantas em condição hídrica ótima durante todo experimento. O que foi importante, dado que esperávamos temperaturas mais elevadas e maior evapotranspiração.

Temperaturas elevadas em conjunto com alta radiação luminosa podem induzir um desequilíbrio entre a absorção de energia luminosa e utilização de elétrons na etapa fotoquímica, podendo levar a fotoinibição da fotossíntese e um dano no fotossistema II (PSII) (Wang et al., 2009). No presente estudo, a análise de fluorescência demonstrou que o aumento da temperatura e do CO₂ não proporcionou fotoinibição do PSII e nem alterou a eficiência fotoquímica, como observado também em *Panicum coloratum* por Dwyer et al. (2007). O aumento observado no teor de pigmentos fotossintéticos provavelmente promoveu uma maior eficiência na captação de energia luminosa resultando em uma melhor eficiência fotoquímica. A redução da radiação (Figura 3 - capítulo I) ao longo do experimento e no dia da amostragem (Tabela 1) também pode ter evitado uma provável ocorrência de fotoinibição crônica nas plantas sob aquecimento.

Por outro lado, as plantas de *Panicum maximum* apresentaram redução da fluorescência (razão F_v/F_m) ao meio-dia e recuperação ao final da tarde. Tal resposta nos mostra a ocorrência de flutuação diária da fluorescência caracterizada por fotoinibição dinâmica, no qual é um processo natural de dissipação de excesso de energia necessário para prevenir a ocorrência de dano fotooxidativo (Müller et al., 2001).

Ao contrário do que foi encontrado em nosso estudo, Bianconi (2013) em experimento anterior com *Panicum maximum* durante os meses de agosto e setembro, observou que o elevado CO₂ mitigou a redução diurna da eficiência fotoquímica do PSII sob aquecimento. Neste caso, o elevado CO₂ aumentou a disponibilidade de substrato (CO₂) para o ciclo fotossintético, fazendo com que a maior parte da energia luminosa seja utilizada para a produção ATP e NADPH, utilizados posteriormente no ciclo de redução fotossintética do carbono, evitando dano aos fotossistemas (Aranjuelo et al., 2008; Oliveira et al., 2012; Bianconi, 2013; Tausz-Posch et al., 2013).

A ausência de fotoinibição nas folhas de *Panicum maximum* sob elevado CO₂ e aquecimento foi acompanhada também pela ausência de peroxidação de lipídios, indicado pelos níveis de malondialdeído (MDA) e hidroperóxido lipídicos (LOOH). O excesso de energia luminosa provavelmente não gerou aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) o que levaria a um dano de membrana celular (Mittler et al., 2012). Respostas similares também foram encontradas em *Medicago sativa* (Fabaceae) sob elevado CO₂ e temperatura (Erice et al., 2007) e *Stylosanthes capitata* (Fabaceae) sob aquecimento (Martinez et al., 2014).

Esta capacidade da planta em manter a estabilidade da membrana e sua função sugere uma termotolerância ao aumento da temperatura (Faria et al., 2015). Há vários componentes na planta que podem ser modificados como: alteração da composição e do grau de saturação de ácidos graxo, a alteração na composição da membrana, a produção de ácido abscísico (ABA) e antioxidantes, e a ativação de proteínas de choque térmico chamado HSPs, que servem como “*chaperonas*” moleculares protegendo as funções e as conformações das proteínas (Jha et al., 2014; Bitá e Gerats, 2013; Mathur et al., 2014).

A peroxidação de lipídios de membrana não é o único evento que reflete danos oxidativos, pois outras moléculas como os pigmentos também podem ser alterados

(Smirnoff, 1993). Estudos realizados com braquiária (Faria et al., 2015), alfafa (Erice et al., 2007), trigo (Aljazairi e Nogués, 2015; Shanmugam et al., 2015) e uva (Salazar-Parra et al., 2015) apresentaram redução no conteúdo de clorofila com CO₂ elevado, acompanhado por redução da razão F_v/F_m .

Em contraste, o aumento da temperatura teve um efeito positivo sobre a biossíntese dos pigmentos fotossintéticos, com aumento no conteúdo de Chl *a*, Chl *b* e Chl total na antemanhã e de Chl *b* no anoitecer sob eC+eT. Este aumento possibilita um incremento na taxa de transporte de elétrons do PSII (Martinez et al., 2014) e que pode ser refletido em aumento das taxas fotossintéticas (Ormrod et al., 1999). No entanto, Faria et al. (2015) atribuem ao aumento observado em *Urochloa decubens* (Poaceae) que os efeitos do estresse térmico estariam sendo mitigados através da dissipação do excesso de energia para caminhos alternativos, não promovendo assim a degradação dos pigmentos.

Além do incremento no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em *Panicum maximum* houve descréscimo da razão Chl *a*/Chl *b*, assim como em *Urochloa decumbens* (Faria et al., 2015) e trigo (Shanmugam et al., 2015) sob tratamento combinado de CO₂ e temperatura elevados. Este descréscimo sugere um aumento no complexo antena do centro de reação do PSII o que poderia explicar um reforço na fotoquímica do PSII (Gutiérrez et al., 2009). Soriani (2011) correlaciona o descréscimo da razão Chl *a*/Chl *b* com a fotoproteção do PSII, pois um aumento no conteúdo de Chl *b* em relação à Chl *a*, seria uma forma eficaz de diminuir a energia que chega ao PSII através da destruição parcial destes pigmentos. Essa seria uma forma de proteção antioxidante, enquanto outros processos bioquímicos também podem ser utilizados.

As análises de moléculas antioxidantes não enzimáticas revelaram um efeito positivo de eC e eC+eT nos carotenóides, violaxantina e luteína. O aumento no conteúdo destes carotenóides nas folhas de *Panicum maximum* teve função essencial na fotoproteção das membranas do tilacóide, impedindo a destruição da clorofila e dissipando o excesso de energia de excitação (Demmig-Adams et al., 1996). A luteína, um dos carotenóides presente em maior abundância no PSII (Demmig-Adams et al., 1996), pode atuar na proteção da Chl *b* no tratamento combinado, dissipando o excesso de energia através do ciclo da luteína epóxido (Lx) contribuindo na captação

de luz através da transferência de energia de excitação a clorofilas (Jahns e Holzwarth, 2012).

Mesmo com aumento da violaxantina decorrente do elevado CO₂ e aquecimento, não foi observada nenhuma variação significativa no conteúdo de anteraxantina e zeaxantina em nenhum tratamento. A ausência da dissipação térmica de energia absorvida junto com a eficiência fotoquímica inalterada (redução na fluorescência inicial, F_0) reflete em uma maior eficiência de conversão de energia fotoquímica (Demmig-Adams et al., 2012). Por outro lado, a redução do estado de-epoxidação das xantofilas com o aumento da temperatura, nos mostrou que as plantas crescendo em ambiente aquecido estão consumindo grande parte da energia produzida, fazendo com que reduza a dissipação na forma de calor. Resultados similares foram observados também em espécie de *Eucalyptus* (Roden e Ball, 1996) sob elevado CO₂, tanto na quantificação total dos pigmentos dos ciclos das xantofilas quanto no estado de-epoxidação.

As plantas de *Panicum maximum* também apresentaram alterações acentuadas em anteraxantina e zeaxantina, VAZ e no estado de-epoxidação do ciclo de xantofila ao longo do dia. À medida que aumentou a radiação incidente (FFFA), ocorreu a de-epoxidação de violaxantina e conseqüentemente houve aumento nos níveis de zeaxantina. Quando houve declínio nos níveis de radiação na parte da tarde, a zeaxantina foi reconvertida em violaxantina (Figura 2). Esta é uma resposta que ocorre normalmente e tem sido observado em uma ampla gama de espécies (Demmig-Adams et al., 1996), onde as plantas apresentam uma alta flexibilidade metabólica de sistema de proteção ajustando-se as alterações diárias da radiação (Favaretto et al., 2011) e assim otimizar e preservar a função do aparato fotossintético.

O α -tocoferol e a ascorbato medidos neste trabalho são também importantes moléculas do mecanismo antioxidante não enzimático que desempenham papel na tolerância ao estresse das plantas, mantendo um adequado estado redox nos cloroplastos (Tausz-Posch et al., 2013). Os níveis reduzidos destas moléculas antioxidantes em *Panicum maximum* sob CO₂ elevado indicariam que as plantas seriam menos sensíveis ao estresse levando a danos oxidativos e destruição de células (Munné-Bosch, 2005; Hasanuzzaman et al., 2014), contudo, apesar de uma redução no sistema antioxidante a fotoquímica permaneceu inalterada, reforçando que o aumento

do CO₂ e da temperatura foram uma condição ambiental favorável para o desempenho destas plantas e não um fator estressante.

Pouco se conhece sobre o impacto das mudanças climáticas sobre os níveis de tocoferol em espécies forrageiras tropicais, no entanto, alguns trabalhos mostraram nenhuma variação dos níveis de tocoferóis com o aumento da temperatura e do CO₂ (Farfan-Vignolo e Asard, 2012; Naudts et al., 2014). Já *Panicum maximum* crescendo no tratamento de aquecimento apresentou redução, no entanto, não houve um efeito claro do CO₂ elevado sobre o conteúdo de α -tocopherol. Como não foi reportado um aumento na produção do radical peroxilipídico (quantificado pela peroxidação de lipídios), provavelmente, não houve um aumento na produção de EROs, sendo assim dispensável um aumento na biossíntese de tocoferóis (Munné-Bosch e Falk, 2004; Maeda e DellaPenna, 2007).

A redução de tocoferóis pode resultar em aumento nos níveis de peroxidação de lipídios e na ativação inapropriada das respostas de defesa da planta (Munné-Bosch e Falk, 2004; Maeda e DellaPenna, 2007), no entanto, esta redução foi compensada por aumento no conteúdo de clorofilas. Esta resposta em *Panicum maximum* confirma que a presença de outros mecanismos de proteção antioxidante determina a mudança do conteúdo de tocoferol em resposta às mudanças ambientais (Munné-Bosch, 2005).

O CO₂ elevado também pode aumentar os níveis de outros antioxidantes como ascorbato, polifenóis, alcalóides e atividade de algumas enzimas antioxidantes. O aumento na síntese de ascorbato se dá pela produção excessiva de carboidratos, devido ao CO₂ elevado que está estreitamente ligado ao metabolismo de carbono (Xu et al., 2015). Todavia, o ascorbato não apresentou redução em eC e nem o estado redox sofreu variações significantes entre os tratamentos. Como as concentrações de ascorbato não foram refletidas com o aumento de carboidratos em *Panicum maximum* sob CO₂ elevado (dados apresentados no capítulo I), sugere-se que esta redução seja atribuída pela ausência de danos fotooxidativo evidente, resultando em estímulo reduzido para a produção antioxidante (Tausz-Posch et al., 2013), como observado também em plantas de alfafa por Erice et al. (2007) e Aranjuelo et al. (2008).

Por fim, a regulação da utilização eficiente dos fótons da luz solar para a produção de energia através de compostos de carbono e da remoção dos excessos de fótons absorvidos e não utilizados impedindo um acúmulo de EROs, será essencial para

otimizar a produtividade e manutenção desta espécie em ambientes diversos e em contínua mudança (Demmig Addams e Cohu, 2012).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que os futuros aumentos na concentração de CO₂ e da temperatura em 2 °C podem ter um efeito positivo na eficiência fotoquímica do PSII, apesar de uma redução da capacidade fotoprotetora antioxidante em CO₂ elevado. O aumento no complexo antena do centro de reação do PSII resultante do aumento do conteúdo de pigmentos fotossintéticos foi refletida em um reforço na assimilação de energia na fotoquímica e ausência de aumento da fluorescência. A ausência de um estresse oxidativo promoveu uma redução nos níveis de α -tocoferol e ascorbato em CO₂ elevado. Conclui-se então que, quando as plantas de *Panicum maximum* são cultivadas em condições de disponibilidade hídrica e nutrição mineral, o crescimento das plantas não é afetado pelo elevado CO₂ e aquecimento, em decorrência da ausência de dano fotooxidativo evidente e por manutenção dos mecanismos de fotoproteção, além de favorecer o aumento na captura de energia luminosa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGAWAD, H., FARFAN-VIGNOLO, E.R., DE VOS, D., ASARD, H. 2015. Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Science* 231, 1-10.
- AGANGA, A.A., TSHWENYANE, S. 2004. Potentials of guinea grass (*Panicum maximum*) as forage crop in livestock production. *Pakistan Journal of Nutrition* 3, 1-4.
- AINSWORTH, E.A., LONG, S.P. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A Meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165, 351-372.

- ALEXANDRINO, E., GOMIDE, J.A., GOMIDE, C.A.M. 2005. Crescimento e desenvolvimento do dossel de *Panicum maximum* cv. Mombaça. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 2164-2173.
- ALJAZAIRI, S., NOGUÉS, S. 2015. The effects of depleted, current and elevated growth [CO₂] in wheat are modulated by water availability. *Environmental and Experimental Botany* 112, 55-66.
- AMARAL, J.S., CASAL, S., TORRES, D., SEABRA, R.M., OLIVEIRA, B.P.P. 2005. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Analytical Sciences* 21, 1545-1548.
- ARANJUELO, I., ERICE, G., NOGUÉS, S., MORALES, F., IRIGOYEN, J.J., SÁNCHEZ-DÍAZ, M. 2008. The mechanism(s) involved in the photoprotection of PSII at elevated CO₂ in nodulated alfalfa plants. *Environmental and Experimental Botany* 64, 295-306.
- ARANJUELO, I., IRIGOYEN, J.J., PEREZ, P., MARTINEZ-CARRASCO, R., SANCHEZ-DIAZ, M. 2006. Response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: productivity and water relations. *Environmental and Experimental Botany* 55, 130-141.
- ASADA, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 50, 601-39.
- ASADA, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391-396.
- BARBOSA, M.R., SILVA, M.A., WILLADINO, L., ULISSES, C., CAMARA, T.R. 2014. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* 44, 453-460.
- BATISTOTI, C., LEMPPA, B., JANK, L., MORAIS, M.G., CUBAS, A.C., GOMES, R.A., FERREIRA, M.V.B. 2012. Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum* genotypes. *Animal Feed Science and Technology* 171, 173-180.
- BIANCONI, M.E. 2013. *Trocas gasosas foliares e crescimento de uma forrageira C₄ tropical no contexto das mudanças climáticas: respostas ao elevado CO₂ e ao aquecimento*. Dissertação de Mestrado em Biologia Comparada. Faculdade de

Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 110 p.

- BITA, C.E., GERATS, T. 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Science* 273, 1-18.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., ÖQUIST, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O., SCURLOCK, J.M.O., BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., LEEGOOD, R.C., LONG, S.P. (Eds.). *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. London: Chapman and Hall. p.193-206.
- BOU, R., CODONY, R., TRES, A., DECKER, E.A., GUARDIOLA, F. 2008. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry* 377, 1-15.
- BRÂNCIO, P.A., EUCLIDES, V.P.B., JÚNIOR, D.N., FONSECA, D.M., ALMEIDA, R.G., MACEDO, M.C.M., BARBOSA, R.A. 2003. Avaliação de três cultivares de *Panicum maximum* Jacq. sob pastejo: Disponibilidade de forragem, altura do resíduo pós-pastejo e participação de folhas, colmos e material morto. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32, 55-63.
- CHOUDHURY, N.K., BEHERA, R.K. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica* 39, 481-488.
- DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS, W.W. 1992. Photoprotection and others responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 599-626.
- DEMMIG-ADAMS, B., COHU, C. M., MULLER, O., ADAMS III, W.W. 2012. Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons. *Photosynthesis Research* 113, 75-88.
- DEMMIG-ADAMS, B., GILMORE, A.M., ADAMS, W.W. 1996. Carotenoids 3: In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* 10, 403-412.

- DWYER, S.A., GHANNOUM, O., NICOTRA, A., CAEMMERER, S.V. 2007. High temperature acclimation of C₄ photosynthesis is linked to changes in photosynthetic biochemistry. *Plant, Cell and Environment* 30, 53-66.
- ERICE, G., ARANJUELO, I., IRIGOYEN, J.J., SANCHEZ-DIAZ, M. 2007. Effect of elevated CO₂, temperature and limited water supply on antioxidant status during regrowth of nodulated. *Physiologia Plantarum* 130, 33-45.
- FARFAN-VIGNOLO, E.R., ASARD, H. 2012. Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 59, 55-62.
- FARIA, A.P., FERNANDES, G.W., FRANÇA, M.G.C. 2015. Physiological approaches to determine the impact of climate changes on invasive African grasses in the savanna ecoregion of Brazil. *Environmental Earth Sciences* 74, 3077-3088.
- FAVARETTO, V.F., MARTINEZ, C.A., SORIANI, H.H., FURRIEL, R.P.M., 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70, 20-28.
- FOYER, C.H., DESCOURVIÈRES, P., KUNERT, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17, 507-523.
- GUTIÉRREZ, D., GUTIÉRREZ, E., PÉREZ, P., MORCUENDE, R., VERDEJO, A.L., MARTINEZ-CARRASCO, R. 2009. Acclimation to future atmospheric CO₂ levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiologia Plantarum* 137, 86-100.
- HALLIWELL, B. 2006. Reactive species and antioxidant. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141, 312-322.
- HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., FUJITA, M. 2014. Chapter 12 - Role of tocopherol (Vitamin E) in plants: abiotic stress tolerance and beyond. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*, 267-289.
- HODGES, D.M., DELONG, J.M., FORNEY, C.F., PRANGE, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604-611.

- HYMUS, G.J., BAKER, N.R., LONG, S.P. 2001. Growth in elevated CO₂ can both increase and decrease photochemistry and photoinhibition of photosynthesis in a predictable manner *Dactylis glomerata* grown in two levels of nitrogen nutrition. *Plant Physiology* 127, 1204-1211.
- JAHNS, P., HOLZWARTH, A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 182-193.
- JHA, U.C., BOHRA, A., SINGH, N.P. 2014. Review. Heat stress in crop plants: its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. *Plant Breeding* 133, 679-701.
- JUBANY-MARI, T., MUNNE-BOSCH, S., LÓPEZ-CARBONELL, ALEGRE, L. 2009. Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. *Journal of Experimental Botany* 60, 107-120.
- LARCHER, W. 2006. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RiMa. 531 p.
- MAEDA, H., DELLAPENNA, D. 2007. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 260-265.
- MARTINEZ, C.A., BIANCONI, M., SILVA, L., APPROBATO, A., LEMOS, M., SANTOS, L., CURTARELLI, L., RODRIGUES, A., MELLO, T., MANCHON, F. 2014. Moderate warming increases PSII performance, antioxidant scavenging systems and biomass production in *Stylosanthes capitata* Vogel. *Environmental and Experimental Botany* 102, 58-67.
- MATHUR, S., AGRAWAL, D., JAJOO, A. 2014. Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137, 116-126.
- MITTLER, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* 7, 405-410.
- MITTLER, R., FINKA, A., GOLOBINOUFF, P. 2012. How do plants feel the heat? *Trends Biochemical Science* 37, 118-125.
- MORALES, M., GARCIA, Q.S., SILQUEIRA-SILVA, A.I., SILVA, M.C., MUNNÉ-BOSCH, S. 2014. Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects. *Planta* 240, 437-446.

- MORENO, L.S.B., PEDREIRA, C.G.S., BOOTEC, K.J., ALVES, R.R. 2014. Base temperature determination of tropical *Panicum* spp. grasses and its effects on degree-day-based models. *Agricultural and Forest Meteorology* 186, 26-33.
- MORISON, J., MORECROFT, M. 2006. *Plant Growth and Climate Change*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 213 p.
- MÜLLER, P., LI, X.P., NIYOGI, K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125, 1558-1566.
- MUNNÉ-BOSCH, S. 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 162, 743-748.
- MUNNÉ-BOSCH, S., ALEGRE, L. 2000. Changes in carotenoids, tocopherol and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210, 925-931.
- MUNNÉ-BOSCH, S., FALK, J. 2004. New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta* 218, 323-326.
- NAUDTS, K., VAN DEN BERGE, J., FARFAN, E., ROSE, P., ABDELGAWAD, H., CEULEMANS, R., JANSSENS, I.A., ASARD, H., NIJS, I. 2014. Future climate alleviates stress impact on grassland productivity through altered antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany* 99, 150-158.
- OLIVEIRA, A.D., APPROBATO, A.U., LEGRACIE Jr., MARTINEZ, C.A. 2012. Soil-nutrient availability modifies the response of young pioneer and late successional trees to elevated carbon dioxide in a Brazilian tropical environment. *Environmental and Experimental Botany* 77, 53-62.
- ORMROD, D.P., LESSER, V.M., OLSZYK, D.M., TINGEY, D.T. 1999. Elevated temperature and carbon dioxide affect chlorophylls and carotenoids in douglas-fir seedlings. *International Journal of Plant Sciences* 160, 529-534.
- QUEVAL, G., NOCTOR, G. 2007. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry* 363, 58-69.
- RONDEN, J.S., BALL, M.C. 1996. The effect of elevated [CO₂] on growth and photosynthesis of two *Eucalyptus* species exposed to high temperatures and water deficits. *Plant Physiology* 111, 909-919.

- SAGE, R., KUBIEN, D. 2003. Quo vadis C₄? An ecophysiological perspective on global change and the future of C₄ plants. *Photosynthesis Research* 77, 209-225.
- SALAZAR-PARRA, C., ARANJUELO, I., PASCUAL, I., ERICE, G., SANZ-SÁEZ, A., AGUIRREOLEA, J., SÁNCHEZ-DÍAZ, M., IRIGOYEN, J.J., ARAUS, J.L., MORALES, F. 2015. Carbon balance, partitioning and photosynthetic acclimation in fruit-bearing grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo) grown under simulated climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) scenarios in temperature gradient greenhouses. *Journal of Plant Physiology* 174, 97-109.
- SANTOS, P.M., BALSALOBRE, M.A.A., CORSI, M. 2004. Características morfogénicas e taxa de acúmulo de forragem do capim-mombaça submetido a três intervalos de pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33, 843-851.
- SANTOS, P.M., CORSI, M., BALSALOBRE, M.A.A. 1999. Efeito da frequência de pastejo e da época do ano sobre a produção e a qualidade em *Panicum maximum* cvs. Tanzânia e Mombaça. *Revista Brasileira de Zootecnia* 28, 244-249.
- SHANMUGAM, S., KJAER, K.H., OTTOSEN, C.O., ROSENQVIST, E., KUMARI, S.D., WOLLENWEBER, B. 2013. The alleviating effect of elevated CO₂ on heat stress susceptibility of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal Agronomy Crop Science* 199, 340-350.
- SMIRNOFF, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125, 27-58.
- SORIANI, H.H. 2011. *Respostas fisiológicas e bioquímicas de três espécies de leguminosas arbóreas submetidas a déficit hídrico progressivo e alta radiação*. Tese de Doutorado em Biologia Comparada. Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 175 p.
- STEFFEN, K.L. 1991. Avoidance of photooxidative stress: Balancing energy flux within the chloroplast. In: "Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism" (Pell E., Steffen K. L. eds), Rockville. pp 119-130.
- TAKAHAMA, U., ONIKI, T. 1992. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* 33, 379-387.
- TAUSZ-POSCH, S., BOROWIAK, K., DEMPSEY, R.W., NORTON, R.M., SENEWEERA, S., FITZGERALD, G.J., TAUSZ, M. 2013. The effect of elevated CO₂ on photochemistry

- and antioxidative defence capacity in wheat depends on environmental growing conditions – A FACE study. *Environmental and Experimental Botany* 88, 81-92.
- WANG, L.J., LOESCHER, W., DUAN, W., LI, W.D., YANG, S.H., LI, S.H. 2009. Heat acclimation induced acquired heat tolerance and cross adaptation in different grape cultivars: relationships to photosynthetic energy partitioning. *Functional Plant Biology* 36, 516-526.
- WOODWARD, F.I. 2002. Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on plants. Current Opinion in *Plant Biology* 5, 207-211.
- XU., Z., JIANG, Y., ZHOU, G. 2015. Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Frontiers in Plant Science* 701, 1-17.
- ZISKA, L.H., BUNCE, J.A. 1997. Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C₄ crops and weeds. *Photosynthesis Research* 54, 199-208.

CONSIDERAÇÃO FINAL

As alterações previstas nas condições de CO₂ e temperatura estudada poderão influenciar no crescimento e na fotoproteção da forrageira C₄ *Panicum maximum* se crescidas com disponibilidade hídrica e sem limitação nutricional. O aumento da temperatura em 2 °C, presumivelmente, será favorável para o desenvolvimento dos processos bioquímicos e biofísicos envolvidos no crescimento de *P. maximum*. Ainda mais se considerado em um período do ano em que o rendimento das plantas tende a ser reduzido tanto pela temperatura (geralmente está abaixo da ótima para o crescimento), quanto pela precipitação reduzida. Estas respostas preveem uma grande vantagem potencial para as espécies C₄ em regiões onde as temperaturas são mais baixas.

Em relação ao acúmulo de biomassa, as respostas às variáveis climáticas serão refletidas na partição e alocação de carbono entre folhas, colmos e raízes, podendo limitar a oferta de folhas para realização de fotossíntese bem como para nutrição animal. Verificou-se que o acúmulo de biomassa em resposta ao elevado CO₂ foi restringido pela limitada presença de drenos de fotoassimilados, o que promoveu o acúmulo de açúcares solúveis. No entanto, quando o elevado CO₂ esteve combinado com o aquecimento, o carbono extra-assimilado foi alocado no colmo, que pode ser considerado assim o órgão reserva nesta espécie, diminuindo dessa forma a chance de aclimação por acúmulo de amido nas folhas. Além disso, o aumento do CO₂ e o aquecimento promoveram ajustes no mecanismo de defesa antioxidante sem danos na eficiência fotoquímica do PSII, mostrando que as alterações ambientais podem resultar em um impacto sobre os mecanismos de fotoproteção desta espécie de planta C₄ por meio de um aprimoramento das reações metabólicas.

Com base nos resultados obtidos, concluímos que tais respostas nos mostram implicações importantes dos potenciais efeitos das alterações climáticas na produtividade das pastagens no futuro, pois apesar de um melhor desempenho no crescimento sob elevado CO₂ e aquecimento, o aumento das concentrações de CO₂ pode resultar em redução da qualidade da forragem. Por fim, sugere-se a realização de experimento com plantas cultivadas em déficit hídrico, para investigar se este

aumento da concentração de CO_2 e da temperatura terá o mesmo efeito positivo sobre o crescimento e eficiência fotoquímica desta espécie nessas condições.