UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Mecanismo de descarboxilação da fotossíntese C_4 e discriminação isotópica para seleção de genótipos do complexo *Saccharum*spp. tolerantes à seca

MARIANA BELLOTI

Piracicaba

2012

MARIANA BELLOTI

Mecanismo de descarboxilação da fotossíntese C_4 e discriminação isotópica para seleção de genótipos do complexo *Saccharum*spp. tolerantes à seca

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e Ambiente

Piracicaba

2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Belloti, Mariana
Mecanismo de descarboxilação da fotossíntese C_4 e discriminação isotópica para seleção de genótipos do complexo *Saccharum*spp. tolerantes à seca / Mariana Belloti; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2012.
89 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bioquímica 2. Cana-de-açúcar 3. Estresse abiótico 4. Expressão gênica 5. Fisiologia vegetal 6. Fotoquímica 7. Interação genótipo-ambiente 8. Isótopos estáveis I. Título

CDU 581.132 : 633.61

Dedico este trabalho
aos meus queridos pais,
família e amor
pelo apoio, amor, ajuda e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo maravilhoso dom da vida, por nunca se esquecer de mim e pela oportunidade de realizar meus sonhos;

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pela orientação, pelo apoio e pela paciência;

Ao Centro de Energia Nuclear naAgricultura pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação;

Ao CNPq pela bolsa de estudo de mestrado concedida;

Ao Instituto Agronômico de Campinas pelo material vegetal fornecido e pela contribuição na montagem e condução dos experimentos de déficit hídrico;

À Usina Jalles de Machado/GO pela disponibilização da área para montagem e execução do experimento de campo;

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Eduardo Fonseca, Raquel Orsi e Wlamir Godoy pela ajuda constante;

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas, em especial ao Joni, Nebó e Renato pelo apoio, pela paciência e por sugestões durante todo o meu trabalho;

Aos meus pais Álvaro e Denise, meus irmãos Beatriz e Henrique e que me apoiaram em todos os momentos de minha vida e nunca me deixaram desistir;

Ao Roberto, pela felicidade, inspiração, incentivo, paciência, compreensão, e apoio incondicional em todos os momentos;

Aos meus amigosque mesmo indiretamente me ajudaram nesse período, em especial a Ilse Ferrari que me apoiou durante todo o mestrado;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho,

OBRIGADA.

Cada problema é uma oportunidade disfarçada.
Waine W. Dyer

RESUMO

BELLOTI, M. **Mecanismo de descarboxilação da fotossíntese C_4 e discriminação isotópica para seleção de genótipos do complexo *Saccharum*spp. tolerantes à seca**. 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), a deficiência hídrica é um dos estresses ambientais mais danosos, e a seleção de genótipos com maior adaptação aos ambientes com tendência ao déficit hídrico seria de grande valor para a expansão da cultura para áreas consideradas marginais. O objetivo dessa dissertação foi investigar o mecanismo de resposta a seca presente em duas cultivares de cana-de-açúcar contrastantes, avaliando características fisiológicas juntamente com a discriminação isotópica de carbono ($\Delta^{13}C$) e o "escape" do CO_2 (φ). Além disso, o efeito da seca na fotossíntese C_4 foi analisado a fim de investigar a rota enzimática envolvida no transporte de ácidos de quatro carbonos entre as células do mesofilo e as células da bainha. Para tanto foram utilizados os genótipos contrastantes para a resposta à deficiência hídrica 'IACSP94-2094' (tolerante) e 'IACSP97-7065' (suscetível), cultivados em casa de vegetação, os quais foram selecionados entre 10 genótipos avaliados em experimentos fisiológicos em campo. As análises de $\Delta^{13}C$ e φ mostraram variações significativas entre os genótipos, sendo observados maiores valores de $\Delta^{13}C$ eφ na cultivar 'IACSP94-2094' durante a seca. Além disso, foram conduzidas análises de expressão gênica e atividade enzimática referente as três variações da via fotossintética C_4,que diferiram quanto ao ácido de quatro carbonos transportado entre o mesofilo e as células da bainha e quanto a enzima de descarboxilação presente nas células da bainha, incluindo a enzima málica dependente de NADP (NADP:ME), enzima málica dependente de NAD (NAD:ME) ou fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK). Admite-se que o mecanismo de transporte de compostos de quatro carbonos presente na cana-de-açúcar seja aquele referente à NADP:ME, entretanto,o maior acúmulo do número de transcritos e maior atividade enzimática para PCK observadas na cultivar considerada tolerante ('IACSP94 2094') quando sob estresse, indicam que a via de descarboxilação do tipo PCK aparentemente poderia ser ativada em condições de déficit hídrico. Por outro lado, a ausência da indução da via PCKna cultivar considerada sensível ('IACSP97 7065'), sugere que esse mecanismo alternativo de descarboxilação poderia estar relacionadoà tolerância à seca. Essa hipótese pode ser reforçada pelos maiores valores de φ na'IACSP94 2094' quando em déficit hídrico, uma vez que o φ em plantas que possuem o tipo PCK foi maior que os valores encontrados em plantas do tipo NADP:ME. Dessa forma,nossos dados sugerem que o mecanismo alternativo de descarboxilação dependente de PCK, é induzido pelo déficit hídrico, e poderia ser adotado para a seleção de genótipos tolerantes à seca.

Palavras-chave: Fisiologia.Escape. NADP:ME.NAD:ME.PCK.

ABSTRACT

BELLOTI, M. **Decarboxylation mechanism of the C_4 photosynthesis and isotope discrimination for selection of *Saccharum*sppdrought tolerant genotypes**.2012. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Drought stress in sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the most harmful environmental stresses causing yield losses. To develop drought tolerant cultivars, the selection of genotypes with improved adaptation to this adverse environmental condition are highly required for sugarcane breeding programs. The objective of this dissertation was to investigate drought responses mechanism present in sugarcane by evaluation of physiological measurements, carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) and leakage of CO_2 (φ) between two contrasting sugarcane cultivars to drought stress. Further, the effect of drough on C_4 photosynthetic mechanism was analized to inquire the enzymatic pathway involved in the transport of the C_4 acids from mesophyll cells to the bundle sheath cells. Through physiological experiments, two contrasting cultivars, 'IACSP94 2094' (tolerant) and 'IACSP97 7065' (sensitive) to water deficit were screened among 10 cultivars submmited to drought prone field conditions. The $\Delta^{13}C$ and φ analysis showed significant variation between the two cultivars during drought growth condictions wherein 'IACSP94-2094' cultivar displayed high $\Delta^{13}C$ and φ rates. A quantitative expression profile and enzymatic activity were analyzed considering the three alternative pathways of C_4 decarboxylation, NADP-dependent malic enzyme (NADP:ME), NAD dependent malic enzyme (NAD:ME) or phosphoenolpyruvatecarboxykinase (PCK) during drought stress. Despite the NADP-ME C_4 mechanism present in Sugarcane, the increased expression and activity levels of PCK decarboxylation pathway was shown in the tolerant cultivar ('IACSP94 2094') during drought. However, the drought sensitive cultivar lacks the ability to triggers such a decarboxylation mechanism which suggest that this alternative mechanism might be associated with drought tolerance. The increased φ in PCK-type C_4 plants was detected over the NADP:ME-type C_4 plants which supports the presence of this alternative decarboxylation process. Altogether, the data presented here suggest that the PCK mechanism of decarboxylation is induced by drought stress and can be used to select drought tolerant genotypes.

Keywords: Physiology.Leakage. NADP:ME.NAD:ME. PCK.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1 Déficit Hídrico 16
2.2 Discriminação Isotópica de ^{13}C 21
2.3 Fotossíntese C_4 23
3 MATERIAL E MÉTODOS 28
3.1 Material Vegetal 28
3.2 Ensaio de Seca em Campo 28
3.3 Ensaio de Seca em Casa de Vegetação 30
3.4 Avaliações Fisiológicas 30
3.5 Discriminação Isotópica de ^{13}C 31
3.6 Extração de RNA 32
3.7 Análise de Amplificação Quantitativa de Transcritos Reversos (RT-QPCR) 33
3.8 Extração de Proteínas 34
3.9 Quantificação de Proteínas e Atividade Enzimática Específica 35
3.10 Análises Multivariadas 35
4 RESULTADOS 37
4.1 Parâmetros Fisiológicos em Experimento de Campo 37
4.2 Parâmetros Fisiológicos em Experimento de Casa de Vegetação 43
4.3 Discriminação Isotópica do ^{13}C 49
4.4 Expressão de Genes e Atividade das Enzimas da Via de Descarboxilação da Fotossíntese C_4 54
5 DISCUSSÃO 60
6 CONCLUSÕES 69
REFERÊNCIAS 70
ANEXOS 79

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de extrema importância nas regiões tropicais e subtropicais,apresentando elevada participação econômica e social na agroindústria de São Paulo e do Brasil (WHEALS et al., 1999). Trata-se de uma cultura robusta e eficiente na produção de biomassa, cultivada para obtenção de colmos, os quais acumulam elevados níveis de sacarose utilizados tanto para a produção de açúcar como de etanol. O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar com safra estimada de 509 milhões de ton para 2012/2013 (UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2012). No entanto, para atender a crescente demanda é necessário que ocorra expansão do cultivo de cana-de-açúcar para as áreas predominantemente caracterizadas por inverno seco e períodos de severa deficiência hídrica, localizadas no oeste de São Paulo, cerrado de Goiás, Triângulo Mineiro e Mato Grosso do Sul. A expansão do cultivo da cana-de-açúcar para tais regiões sub-ótimas requer o direcionamento dos programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a ambientes com tendência a ocorrer déficit hídrico (CATIVELLI et al., 2008).

O déficit hídrico é um importante fator limitante do crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas cultivadas, levando a modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas nas plantas (CHAVES, 1991; BRAY, 1997; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003;FLEXAS et al., 2006). Em cana-de-açúcar, a deficiência hídrica é um dos estresses ambientais mais danosos, e a seleção de genótipos com maior adaptação aos ambientes com tendência ao déficit hídrico seria de grande valor para o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca, estando estritamente relacionado à sustentabilidade e a viabilidade econômica dessa cultura em tais áreas, e a competitividade do etanol como biocombustível. Genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico também poderiam contribuir para a redução do uso de irrigação, e o consequente melhor uso da água (ROCHA et al., 2007).

Adiscriminação isotópica de carbono ($\Delta^{13}C$) consisteem uma importante ferramenta na seleção de genótipos contrastantes para uma melhor eficiência do uso da água em condições de déficit hídrico para plantas com metabolismo C_3(FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK,1989; SALIENDRA et al., 1996). No entanto, em plantas C_4 há poucos estudos publicados sobre associações entre a discriminação isotópica de carbono e a variabilidade genotípica referente à seca (MEINZER; SALIENDRA, 1997), através dos quais foi possível determinar que a variação na $\Delta^{13}C$ocorre devido às mudanças no p_i/p_a, querepresenta a relação

entre a pressão interna de CO_2 na câmara estomática e a pressão externa da atmosfera, e pelo "vazamento" (*leakage*) ou "escape" do CO_2 das células da bainha do feixe (φ), que representa a fração de CO_2 fixada pela fosfoenolpiruvato-carboxilase (PCK) no mesofilo e que ocasionalmente acaba "escapando" da bainha e retornando ao mesofilo sem ser refixada pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco)(FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989). Alguns fatores ambientais e genéticos podem influenciar os valores de φ, sendo um deles o tipo de mecanismo de descarboxilaçãoda fotossíntese C_4 presente (HATCH et al., 1995; FURUMOTO et al., 1999).

Atualmente são reconhecidas três variações da via fotossintética C_4de transporte, diferindo quanto ao ácido de quatro (4) carbonos transportado entre o mesofilo e as células da bainha,e o tipo de ácido com três (3) carbonos que retorna para as células do mesofilo completando o ciclo, diferindo também quanto à enzima de descarboxilação presente nas células da bainha, que pode ser: enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato (NADP:ME), enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD:ME) oufosfoenolpiruvato carboxiquinase dependente de adenosina trifosfato (PCK)(TAIZ; ZEIGER, 2004) sendo encontradas em*Sorgum bicolor*,*Panicum miliaceum*e *Panicum texanum*(HATTERSLEY; WATSON, 1976),respectivamente.Admite-se que o mecanismo de transporte de compostos de quatro carbonos presente na cana-de-açúcar seja aquele referente à enzima málica $NADP^+$ (NADP:ME). Porém,estudos recentes observaram que transcritos da enzima PCKavaliados por contagem de etiquetas(*tags*)a partir de análise serial de expressão gênica (*serial analysis of gene expression*– SAGE)foram aparentemente mais abundante que aqueles de NADP:ME em folhas maduras de cana-de-açúcar, sugerindo a possibilidade de ocorrência de mais de um tipo de transporte de C_4entre o mesofilo e as células da bainha, que pode ser influenciado pelas condições ambientais(CALSA JUNIOR; FIGUEIRA, 2007).

Determinar $\Delta^{13}C$e φem genótipos contrastantes para a seca poderia auxiliar na compreensão de como a disponibilidade de água no solo e a variação genética podem influenciar no desempenho das variedades em relação á tolerância ao déficit hídrico, sendo que a caracterização da discriminação isotópica em cana-de-açúcar poderia ser uma eficiente ferramenta para seleção de genótipos tolerantes à seca, auxiliandona condução de programas de melhoramento tradicionais. Tais estudos poderiam também ser úteis na elucidação do tipo de via de transporte de compostos de quatro carbonos na passagem do CO_2 entre as células do mesofilo e da bainha, e aprofundar o conhecimento sobre a fisiologia de tolerância ao déficit hídrico. Diante desta hipótese, nesse trabalho foram avaliadas características fisiológicas

juntamente com a discriminação isotópica de carbono em genótipos de cana-de-açúcarcontrastantes para resposta à seca, além do “vazamento” do CO_2 e do mecanismo de transporte de compostos de quatrocarbonos, a fim de investigar a rota enzimática envolvida em tal transporte entre as células do mesofilo e da bainha do feixe vascular, com o objetivo de entender os mecanismos de resposta a seca presentes em cana-de-açúcar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estresse Hídrico

No contexto atual das mudanças climáticas, a deficiência hídrica tem se tornando cada vez mais relevante, sendo limitante para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas cultivadas em todo o mundo, principalmente em regiões áridas e semi-áridas(CHAVES, 1991; BRAY, 1997; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; FLEXAS et al., 2006). O estresse hídrico afeta as plantas em diversos níveis, levando a modificações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e genéticas, incluindo ativação transcricional de genes metabólicos e produção e acúmulo de osmólitos para auxiliar na retenção de água (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004; SHANKHDHAR; SHANKHDHAR; PANT, 2004; SEKI et al., 2007; MILLER et al., 2010;CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003), além de reduzir os componentes de crescimento expansivo, como extensão da folha e área das folhas maduras, senescência foliar e restrição do surgimento de folhas novas(INMAN-BAMBER, 1991). Dessa forma a disponibilidade hídrica condiciona a produtividade, uma vez que afeta todos os processos fisiológicos (ANGELOCCI, 2002), sendo que o grau dessas alterações é decorrente da intensidade e momento (estágio) do déficit hídrico e do genótipo (SMIT; SINGELS, 2006).

As plantas apresentam diferentes estratégias de adaptação ao déficit hídrico, podendo escapar, evitar ou tolerar o estresse. Entretanto essas estratégias não são exclusivas, podendo ser encontrada uma combinação desses tipos de resposta (TURNER, 1986, LUDLOW, 1989). O mecanismo de escape se refere a capacidade da planta completar o ciclo de vida antes do déficit hídrico fisiológico ocorrer e confere a planta alto grau de plasticidade no desenvolvimento. No mecanismo de evitar (*avoidance*) a seca, as plantas mantém alto potencial hídrico nos tecidos por meio de mudanças morfológicas, como redução de condutância estomática (gS) e da área foliar e expansão do sistema radicular com aumento da razão raiz/parte aérea (EHLERINGER; COOPER, 1992). Por outro lado, no mecanismo de tolerância, a planta é capaz de manter as funções normais, mesmo com baixo potencial hídrico nos tecidos, sendo alcançada por mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em células e tecidos específicos (FARIA et al., 1998;SHINOZAKI;YAMAGUCHI-SHINOZAKI,1999).

A tolerância a seca, de um modo geral, requer a manutenção das funções da planta sob condições de disponibilidade de água limitadas e/ou a rápida recuperação do status da água na planta depois do estresse, que é determinada pela capacidade de manter a absorção de CO_2 sob baixa condutância estomática (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003). Uma das primeiras respostas esperadas em plantas submetidas à deficiência hídrica, quando comparadas a expansão foliar, crescimento da raiz e expressão de genesé o fechamento estomático(JONES, 1992;YORDANOV; VELIKOVA; TSONEV, 2000),o qual é considerado uma das principais estratégias para impedir a desidratação excessiva das folhas ou diminuição do conteúdo relativo de água na folha por transpiração (CORNIC, 2000). O fechamento estomático é provavelmente mediado por sinais hidráulicos e químicos da raiz para o caule (COMSTOCK, 2002; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003) como resultado da perda de turgor das células-guarda (SILVA et al., 2007), podendo ocorrer mesmo antes de alterações significativas na hidratação das folhas (PIMENTEL, 2004). Dessa forma, o fechamento estomático permite a otimização dos recursos hídricos em longo prazo (INMAN-BAMBER; SMITH 2005; SALIENDRA et al., 1996), minimizando a perda de água e assim, conferindo proteção metabólica contra os efeitos dos danos da desidratação, sendo de extrema importância o tempo e a forma de imposição do estresse, podendo a resposta mudar drasticamente de acordo com o ambiente e o genótipo (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003).

O fechamento estomático tem importante papel no controle da perda de água e da absorção de CO_2, sendo extremamente sensível a mudanças ambientais e fisiológicas, tendo a sua intensidade amplamente influenciada pela umidade do ar, temperatura e status da água na planta. Portanto, o fechamento estomático representa uma importante resposta regulatória do controle de perda de água nos períodos mais quentes do dia, mesmo em condições de boa disponibilidade de água no solo, otimizando assim a absorção de carbono em relação a perda de água, um fator limitante da fotossíntese na deficiência hídrica (COWAN; FARQUHAR, 1977).

Independentemente das causas do fechamento estomático, a maioria das plantas tende a mostrar um aumento na eficiência do uso da água quando sob estresse por seca. Esse aumento resulta da relação não-linear entre a assimilação de CO_2 e a condutância estomática, onde a perda de água é reduzida antes e mais intensamente que a inibição da fotossíntese, levando a otimização da absorção de carbono por quantidade de água utilizada. (COWAN; FARQUHAR, 1977).Embora o estresse hídrico possa prejudicar as plantas alterando os

mecanismos de trocas gasosas e os processos dependentes, a capacidade de recuperação com a reidratação é enorme, de tal forma que as plantas podem imediatamente mostrar uma alta taxa de atividade biológica e aumento do crescimento e da capacidade fotossintética após a reidratação, o que pode, muitas vezes, compensar a limitação do crescimento vegetal e atividade metabólica durante o período de seca (EFEOGLU; EKMEKÇI; ÇIÇEK, 2009; FLEXAS; MEDRANO, 2002; MONTANARO; DICHIO; XILOYANNIS, 2007; XU; ZHOU; SHIMIZU, 2009). Diversos experimentos tem confirmado a capacidade de recuperação do crescimento vegetal, entretanto, algumas plantas quando submetidas à seca prolongada ou severa podem não alcançar o nível do tratamento controle com a reidratação (XU; ZHOU; SHIMIZU, 2009).

A inibição da fotossíntese se dá principalmente pela restrição da difusão do CO_2 como resultado do fechamento estomático, em condições de estresse hídrico moderado. Com o agravamento do déficit hídrico as reações bioquímicas da fotossíntese podem ser afetadas, levando a limitações estomáticas e não estomáticas em condição de seca severa, podendo assim, afetar os processos fotoquímicos (CORNIC, 2000). Quando a energia da luz é absorvida pelas moléculas de clorofila, esta é direcionada para a fotossíntese (ou processo fotoquímico), sendo o excesso dissipado na forma de calor ou re-emitido na forma de fluorescência da clorofila. Uma vez que esses processos ocorrem competitivamente, as análises de extinção da fluorescência da clorofila permitem obter informações a respeito das mudanças na eficiência fotoquímica e não fotoquímica (MAXWELL; JOHNSON, 2000). A extinção fotoquímica aumenta na medida em que o transporte dos elétrons do fotossistema II(PSII) intensifica, devido principalmente, a ativação pela energia luminosa de enzimas envolvidas no metabolismo de carbono e abertura estomática, dessa forma a medida da eficiência fotoquímica do PSII reflete a taxa de transporte de elétrons, indicando a medida global da fotossíntese e a proporção da energia absorvida que é então utilizada no processo fotoquímico (FRYER et al., 1998). Como a atividade fotossintética dos tecidos vegetais sofre alterações provocadas pela seca, isso resulta em um desbalanço entre a geração e utilização dos elétrons e a dissipação do excesso de energia (PELTZE; DREYER; POLLE, 2002). Com isso, a realização das medidas de extinção fotoquímica e não-fotoquímica (dissipação da energia em forma de calor) da fluorescência fornecem informações sobre o estado do PSII podendo revelar em qual extensão este está usando a energia absorvida ou em qual extensão está sendo danificado pelo excesso de luz (ROHÁČEK, 2002).

A regulação da fotossíntese em resposta ao ambiente é altamente dinâmica e é modulada rapidamente pela dissipação da energia térmica, a qual ocorre quando a planta não

consegue escapar do excesso de luz pela fotoproteção arquitetônica ou morfológica (ORT, 2001). Esse mecanismo de dissipação da energia em excesso tem papel fundamental na fotoproteção foliar sob estresse ambiental, como a seca, podendo dissipar 75% ou mais dos fótons absorvidos (NIYOGI, 1999). Esse processo pode ser quantificado através da medida da extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ), que influencia na eficiência intrínseca do PSII (F_V/F_M), sendo usada como indicador da performance fotossintética (JOHNSON et al., 1993). Contudo, a dissipação do excesso de energia leva as folhas a sofrerem uma diminuição transitória da eficiência fotoquímica do PSII ($\Delta f/Fm$) ou fotoinibição, processo de inibição da fotossíntese através do excesso de luz, quando o declínio da eficiência fotoquímica máxima (F_V/F_M) é observada. O aumento da dissipação térmica de energia, dada pelo aumento em NPQ resulta de processos que protegem a folha de danos induzidos pela luz (MAXWELL; JOHNSON, 2000), que podem ser insuficientes para manter os aceptores de elétrons parcialmente oxidados em plantas sob condição de estresse. Nessa situação, o PSII é danificado sendo produzidas moléculas altamente reativas que podem causar estresse oxidativo no aparato fotossintético, a menos que haja um dreno alternativo de elétrons(NIYOGI, 1999). Com isso, a habilidade das plantas em tolerar o estresse ambiental pode ser determinada pela capacidade de manter as moléculas aceptoras de elétrons parcialmente oxidadas (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

A deficiência hídrica em cana-de-açúcar é um dos estresses ambientais mais danosos (ROCHA et al., 2007), sendo os requerimentos sazonais de água para essa cultura derivados principalmente da relação entre produção e uso da água através da transpiração e evaporação de água do solo, as quais são dependentes da relação genótipo x ambiente (CHAVES, 1991). Dessa forma os danos causados na produtividade pelo estresse hídrico variam amplamente de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, uma vez que este influencia no requerimento de água pela cultura (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005).

A cana-de-açúcar utiliza várias estratégias para tolerar o déficit hídrico, incluindomudanças morfológicas como diminuição do número de folhas novas, redução da área foliar e enrolamento da folha para evitar transpiração excessiva (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). A deficiência hídrica também influencia as trocas gasosas foliares, reduzindo a transpiração e a fotossíntese através do fechamento dos estômatos, sendo uma adaptação ao estresse impedindo assim, a perda de água excessiva (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Ofechamento estomático influencia as trocas gasosas diretamente, limitando a assimilação de CO_2 e a perda de água pela transpiração (MACHADO, 2009; PEDROZO, 2010), indicando

que o acúmulo de matéria seca e a transpiração estão extremamente ligados, sendo necessário o balanceamento pelas plantas da necessidade de conservar água e assimilar CO_2 usando controles na área foliar, difusão de CO_2 e vapor de água através do estômato (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Devido ao conjunto de resistências associadas ao transporte de vapor d'água e CO_2no mesofilo foliar, a transpiração é mais afetada do que a fotossíntese durante o estresse hídrico, (ANGELOCCI, 2002).Consequentemente, as plantas de cana-de-açúcar apresentam valores significativos de eficiência no uso da água (MACHADO, 2009). Outro fator importante para tolerância à seca é oacúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos em resposta às condições estressantes de baixa disponibilidade de água (TURNER, 1986). Este mecanismo, denominado ajuste osmótico (MUNNS, 1988) tem sido considerado um processo crucial na adaptação da cana-de-açúcar a seca, sendo que essa adaptação fisiológica pode levar a manutenção da atividade metabólica do tecido, o que permite a rebrota na reidratação. Porém, tal mecanismo varia amplamente entre genótipos sendo normalmente um processo lento, desencadeado quando se ultrapassa um determinado limiar de déficit hídrico na célula (MORGAN, 1984).

Os aspectos fotoquímicos também são afetados pelo déficit hídrico em cana-de-açúcar, podendo ser observada redução significativa da eficiência de carboxilação em genótipos dessa cultura (MACHADO, 2009). Dessa forma, a redução na Fv/Fm e aumento da extinção não-fotoquímica da fluorescência podem ser consequências indiretas dos efeitos do déficit hídrico na fotossíntese sendo considerada uma estratégia de fotoproteção (CORNIC et al., 1992; YORDANOV et al., 2003).De uma forma geral, a análise da fluorescência indica a habilidade da planta tolerar estresses ambientais e pode indicar em que proporção esse estresse pode danificar o aparato fotossintético através dos valores de NPQ, transporte de elétrons, eficiência quântica e fotoinibição em resposta a luz, temperatura e outros fatores ambientais. Contudo, apesar de sua importância, tais análises são melhores utilizadas quando combinadas a medidas de trocas gasosas, permitindo assim uma visão mais ampla da resposta da planta a variação do ambiente (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Dessa forma fica evidente a necessidade de melhorar o entendimento dos efeitos da seca nas plantas, e a genômica e proteômica, que dão conhecimento dos mecanismos moleculares fundamentais na resposta da planta ao estresse e ferramentas integradas tais como isótopos estáveis, podem dar suporte a estudos interdisciplinares de resposta da planta ao estresse na natureza (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003).

2.2 Discriminação Isotópica de^{13}C

A discriminação isotópica de ^{13}C se baseia no fato de que a razão isotópica de $^{13}C/^{12}C$ no tecido vegetal é menor do que a relação isotópica de $^{13}C/^{12}C$ na atmosfera,como resultado do fracionamento isotópico que ocorre durante a fotossíntese.A composição isotópica de carbono na biomassa é basicamente determinada pela disponibilidade de água e limitação estomática, sendo mais positiva em locais mais secos (BOWLING, 2002), consequentemente, a composição isotópica de ^{13}C e ^{12}C em plantas ($\Delta^{13}C$) varia principalmente como resultado das propriedades bioquímicas das enzimas de fixação do CO_2 atmosférico (RuBisCo e PEPcase) e das limitações à difusão do CO_2 para o interior das folhas (MONNEVEUX et al., 2007). Dessa forma, há um efeito isotópico causado pela preferência da ribulose-1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) por $^{12}CO_2$ sobre $^{13}CO_2$, e a taxa de difusão do $^{13}CO_2$ através do poro estomático ser inferior à de $^{12}CO_2$, sendo, portanto, o processo discriminantecontra o isótopo mais pesado, ou seja, ^{13}C (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989). Além disso, arazão isotópica de carbono em plantas C_4depende também da taxa de "escape" (*leakiness*) do CO_2 das células da bainha do feixe (taxas de refixação) e do carbono ser fixado duas vezes, primeiro como bicarbonato pela PEP carboxilase e depois pela Rubisco (FARQUHAR, 1983).A razão do isótopo estável ($\Delta^{13}C$) é expressa como a razão $^{13}C/^{12}C$ em relação ao padrão Pee Dee Belemnite (PDB), fóssil belemnita da formação calcária *Pee Dee* (CRAIG, 1957). O valor resultante de $\Delta^{13}C$ pode ser usado para estimar a discriminação isotópica (Δ) como: $\Delta = (\delta_a - \delta_p)/(1+ \delta_p)$, onde δ_p é a composição isotópica do material vegetal e δ_a atmosférica (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989).

A discriminação isotópica do $^{13}C(\Delta^{13}C)$ é uma medida útil para avaliar a variação inter- e intra-específica nas trocas gasosas fotossintéticas, podendo estar correlacionada com parâmetros morfofisiológicos associados a tolerância à seca, como por exemplo, razão da pressão interno de carbono em relação à pressão de carbono do ambiente (pressão interna e externa de carbono), difusão de CO_2, ajuste osmótico, e densidade estomática (MEINZER; PLAUT; SALIENDRA, 1994). Em plantas C_3, $\Delta^{13}C$tem sido usada para determinar a variação genotípica na eficiência do uso da água e na caracterização das respostas da planta à seca (SALIENDRA et al., 1996) ou estresse salino (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989), assim como na seleção de híbridos comerciais (MONNEVEUX et al., 2007). No entanto, em plantas C_4 há poucos estudos publicados com associações entre a discriminação isotópica de carbono e a variabilidade

contraste com espécies C_3, a fotossíntese, crescimento e produção parecem estar negativamente correlacionados com $\Delta^{13}C$ em plantas C_4 (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989). Contudo, a variação de $\Delta^{13}C$em plantas C_4 pode ocorrer devido às mudanças no p_i/p_a, o qual representa a relação entre a pressão interna de CO_2 na câmara estomática e a pressão externa da atmosfera, e pelo "vazamento" (*leakage*) do CO_2 das células da bainha do feixe (φ). Tal "vazamento" representa a fração de CO_2 fixada pela fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEPC) no mesofilo, e que ocasionalmente acaba "vazando" da bainha, retornando ao mesofilo sem ser refixado pela Rubisco (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989), sendo dependente do balanço entre a atividade PEPC no mesofilo e a atividade da Rubisco nas células da bainha (PEISKER; HENDERSON, 1992). Dessa forma, em plantas C_4, a discriminação isotópica é predita como: $\Delta = a + (b_4 + b_3\varphi - a)p_i/p_a$,sendo a o fracionamento devido a difusão no ar; b_4 o efeito do fracionamento pela PEP carboxilase contra $^{13}CO_2$; b_3 o fracionamento pela Rubisco contra $^{13}CO_2$ e φ representa o "escape" (*leakiness*). Desse modo, quando a atividade de carboxilação é menor que a atividade de descarboxilação, o consumo de CO_2 nas células da bainha diminui, levando ao aumento na concentração do mesmo nessas células, assim como seu fluxo através da parede celular resultando dessa forma no aumento do "escape" *leakiness*(GHANNOUM et al., 2003). Saliendra et al. (1996) relataram que com a redução da frequência de irrigação ocorre aumento do*leakiness*,o que está associado a diminuição na atividade Rubisco/PEPC como resultado do fato da atividade da Rubisco não apresentar mudanças, enquanto que a PEPC apresenta um leve aumento na sua atividade. Bowman et al. (1989) observa que diminuição da razão entre a atividade do ciclo C_3 (rubisco) e C_4 (PEP carboxilase)está inteiramente relacionada ao aumento do "escape"em resposta ao estresse hídrico. Por último, há uma relação linear entre mudanças no "escape"e inibição da fotossíntese em resposta ao estresse hídrico, o que indica que a atividade da Rubisco é mais sensívelao estresse hídrico, o que provavelmente deve levar a limitaçõesda fotossíntese C_4. Além disso, fatores ambientais e genéticos que influenciam no particionamento da atividade carboxilase entre Rubisco e PEPC também apresentam profundos efeitos no φ, $\Delta^{13}C$ e desempenho fotossintético em plantas C_4 (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989).

Devido à pequena, porém significativa, variação na discriminação isotópica do carbono em plantas C_4, informações sobre as relações entre $\Delta^{13}C$e tolerância à seca são escassas. Em milho, o uso da $\Delta^{13}C$ demonstrouprecisão na seleção inicial de híbridos altamente contrastantes para tolerância à seca (MONNEVEUX et al., 2007). Porém para uma seleção

mais fina,se faz necessário o entendimento das causas da variação da $\Delta^{13}C$, bem como definir qual tecido vegetal e durante qual fase do desenvolvimento, realizar as amostragens, considerando que tais valores podem variar conforme a fenologia do material analisado (MONNEVEUX et al., 2007). Em cana-de-açúcar, foram realizados estudos relacionados à discriminação isotópica do carbono para investigar a resposta genotípica à salinidade (MEINZER; PLAUT; SALIENDRA, 1994); eficiência na absorção de nitrogênio (MEINZER; ZHU, 1998); variação espacial foliar (MEINZER; SALIENDRA, 1997) e desempenho fotossintético em condições de déficit hídrico, demonstrando que a atividade relativa Rubisco/PEPC declina significativamente com a diminuição da frequência de irrigação, sendo φ e $\Delta^{13}C$ negativamente correlacionadas com a variação ambiental e genética na atividade Rubisco/PEPC (SALIENDRA et al., 1996). Dessa forma, em condições de estresse hídrico os valores de $\Delta^{13}C$ devem ser menores, como resultado do fechamento estomático, levando assim a uma menor produtividade, podendo a discriminação isotópica ser associada com a eficiência do uso da água (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK,1989) e desse modo ser usada em programas de melhoramento para seleção de genótipos tolerantes à seca (HENDERSON et al., 1998), assim como uma ferramenta para esclarecer o mecanismo de resposta diferenciada das enzimas do ciclo C_4 ao estresse hídrico e seu eventual impacto no "escape"em plantas C_4 (GHANNOUM et al., 2003).

2.3 Fotossíntese C_4

A via fotossintética C_4foi primeiramente descrita em cana-de-açúcar por Hatch e Slack (1966), que observaram que os ácidos de quatro carbonos, malato e aspartato eram os primeiros intermediários estáveis detectáveis da fotossíntese. As plantas C_4 exibemuma complexa combinação de especializações anatômicas e fotossintéticas que resultam na concentração do CO_2 nos sítios da Rubisco, característica essa, que classifica as plantas que usam a via fotossintética C_4 entre as mais eficientes e produtoras de biomassa do planeta (BYRT; GROF; FURBANK, 2011). A presença desse mecanismo de concentração de CO_2torna a fotossíntese C_4 mais competitiva em condições de temperatura elevada, alta intensidade luminosa e menor disponibilidade de água, limitando a perda de carbono através da fotorespiração (EDWARDS; FRANCESCHI; VOZNESENKAYA, 2004). As características anatômicas compreendem a chamada anatomia Kranz, que representa a divisão

espacial do aparato fotossintético, de forma que a fixação de CO_2do espaço intercelular ocorre nas células do mesofilo pela PEP carboxilase,produzindo ácidos C_4 que são translocados para as células da bainha do feixe vascular,através de transportadores especializados no envoltório do cloroplasto, onde é descarboxilado,elevando assim a concentração de CO_2 nesse compartimento, onde será então re-fixado pela Rubisco (FURBANK; HATCH, 1987).Sendo assim, o ciclo C_4 básico consiste na fixação do CO_2 pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) nas células do mesofilo, para formar um ácido C_4, o qual será transportado para as células da bainha vascular onde ocorrerá a descarboxilação dos ácidos C_4, gerando assim CO_2, o qual é então reduzido a carboidrato via ciclo de Calvin. Por último, umácido C_3 (piruvato ou alanina), formado na etapa de descarboxilação, é transportado de volta à célula do mesofilo onde é regeneradoa fosfo*enol*piruvato, aceptor do CO_2(TAIZ; ZEIGER, 2004).

São reconhecidas três variações da via fotossintética C_4 diferindo quanto o tipo de ácido orgânico com quatro (4) carbonos transportado para as células da bainha vascular (malato ou aspartato) e o tipo de ácido com três (3) carbonos que retorna para as células do mesofilo (piruvato ou alanina) e quanto a enzima de descarboxilação presente nas células da bainha vascular, podendo ser enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato (NADP:ME), enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo(NAD:ME) ou fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK) (TAIZ; ZEIGER, 2004),que ocorrem respectivamente em*Sorgum bicolor*, *Panicum miliaceum* e *Panicum texanum* (HATTERSLEY; WATSON, 1976). A etapa de descarboxilação também varia conforme o compartimento da célula de bainha vascular: NADP-ME encontra-se nos cloroplastos, enquanto a NAD-ME émitocondrial e a PCK possui atividade citosólica (Figura 1,TAIZ; ZEIGER, 2004).

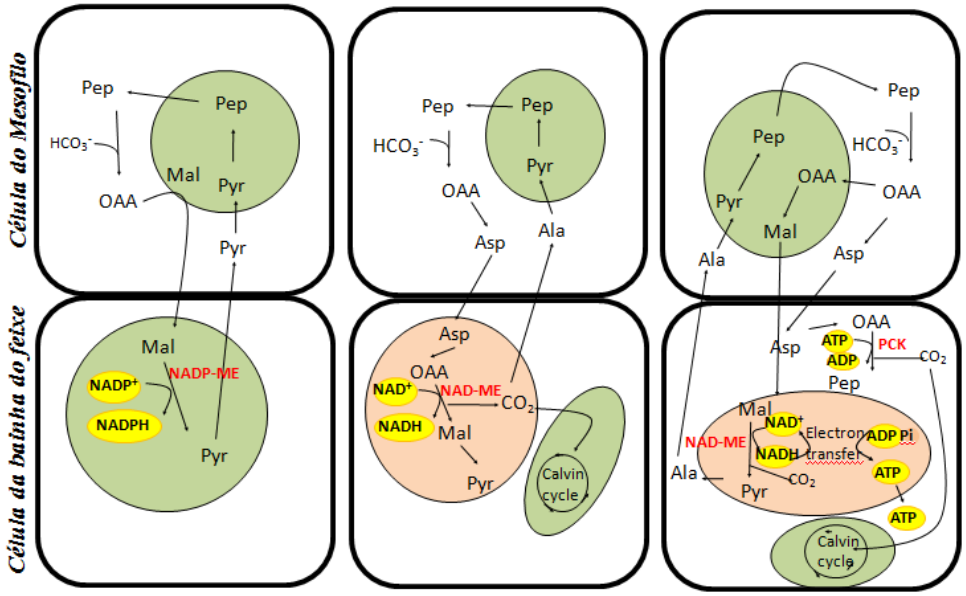


Figura 1 - Mecanismo fotossintético tipo NADP:ME (A), NAD:ME (B) e PCK (C). PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxaloacetato; Asp, aspartato; Ala, alanina; Pyr, piruvato; Mal, malato.Cloroplastos em verde, mitocôndria emvermelho. NADP-ME, enzima málica NADP; NAD-ME, enzima málica NAD; fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK)

O ciclo C_4 inicia com a enzima PEP carboxilase, a qual é comum para os três tipos de descarboxilação, sendo a primeira enzima de fixação de CO_2, produzindo então o oxaloacetato, podendo este, entrar no cloroplasto das células do mesofilo, onde será reduzido a malato no subtipo NADP:ME, ou convertido no citosol a aspartato e em seguida transportado para as células da bainha, nos subtipos NAD:ME e PCK (HATCH; KAGAWA; CRAIG, 1975), onde o aspartato será então convertido a OAA no citosol das células da bainha. Nos subtipos NAD:ME e PCK, a mitocôndria está envolvida, sendo o compartimento onde se encontra a NAD:ME; entretanto, no tipo PCK a maioria do OAA é convertido a fosfo*enol*piruvato pela PCK, sendo NAD:MEusado para fornecer NADH para a fosforilação oxidativa para gerar ATP como combustível para a PCK (FURBANK, 2011). Apesar dos esforços para determinar a pressão seletiva que direcionou a evolução dos tipos de descarboxilação, há poucas informações em relação as vantagens energéticas de um tipo em relação ao outro (SAGE, 2004).

Adifusão do CO_2 entre o mesofilo e as células da bainha do feixe em C_4, exige especializações morfológicas e bioquímicasnecessárias para cada um dos três tipos de descarboxilação,sugerindo que o mecanismo de descarboxilação deve gerar diferenças na eficiência do mecanismo de concentração do CO_2 devido a localização subcelular do mecanismo de descarboxilação e a localização física dos cloroplastos e mitocôndrias nas

células da bainha, assim como diferentes taxas de “escape” (CAEMMERER;FURBANK, 2003). Desse modo, o tipo NADP:ME deve possuir uma vantagem no que se refere ao “escape”, uma vez que a descarboxilação ocorre no cloroplasto das células da bainha. Para o subtipo NAD:ME, a descarboxilação do ácido C_4 ocorre na mitocôndria. Os cloroplastos da bainha do feixe vascular dessas plantas são arranjados circularmente em torno da mitocôndria, e estão localizadas ao lado do feixe vascular. Isso deve afetar a taxa de *leakiness* nessas plantas, uma vez que o CO_2 precisa atravessar cloroplastos da bainha do feixe (onde pode ser refixado pela Rubisco), o citosol da bainha do feixe e então a membrana plasmática e a parede celular. No tipo PCK, a descarboxilação ocorre no citosol e na mitocôndria, mas os cloroplastos são arranjados centrifugamente em direção ao mesofilo. Neste caso, o CO_2 deve atravessar o cloroplasto para “escapar” das células da bainha do feixe vascular (HATCH; KAGAWA; CRAIG, 1975). Além dessas diferenças, é importante considerar a ausência ou presença da lamela suberizada na parede celular das células da bainha, o que funciona como uma barreira, dificultando a difusão do CO_2 através dessas células (HATCH; AGOSTINO; JENKINS, 1995). Como consequência, o tipo NADP:ME apresenta menor *leakiness* quando comparado aos outros dois tipos, sendo maior no tipo NAD:ME (HATTERSLEY, 1982; HATCH; AGOSTINO; JENKINS, 1995).Sendo assim, o*leakiness* deve ser considerado quando se deseja quantificar a eficiência do bombeamento de CO_2 na fotossíntese C_4 (FARQUHAR, 1983), uma vez que o ciclo C_4 consome energia na forma de ATP durante a regeneração da PEPC de modo que representa um custo energético para a folha (HATCH, 1987).

Apesar das definições das três vias de descarboxilação, elas poderiamocorrer simultaneamente em um mesmo indivíduo, apresentando assim flexibilidade no mecanismo fotossintético. Quantidade considerável da proteína PEP-carboxyquinase foi encontrada ativa nas células da bainha de espécies do tipo NADP:ME como *Zea mays*(FURUMOTO; HATA; IZUI, 1999; WALKER et al., 1997), *Echinochloa colona*, *Digitaria sanguinalis* e *Paspalum notatum* (WALKER et al., 1997). Esses estudos demonstram que a relaçãoaspartato:malato translocado nesse grupo de plantas C_4 varia muito, possivelmente devido a influências sazonais da irradiação luminosa ou outras condições ambientais, em vez de serem definidas geneticamente (MEISTER; AGOSTINO; HATCH,1996). Dessa forma, a produção do aspartato no lugar do malato pode contribuir para a concentração do CO_2 nas células da bainha nas espécies NADP:ME(HATCH, 1987) de modo que o aspartato é reconvertido a oxaloacetato,podendo então ser reduzido a malato por descarboxilação pela NADP:ME ouutilizado diretamente pela PCK(Figura 2,MEISTER; AGOSTINO; HATCH, 1996).Essa

plasticidade na utilização da enzima NADP:ME ou PCK indicaria que não existam apenas três tipos de mecanismo de descarboxilação operando individualmente, podendo existir uma permuta entre esses mecanismos em plantas C_4, a qual pode estar relacionada a fatores ambientais.

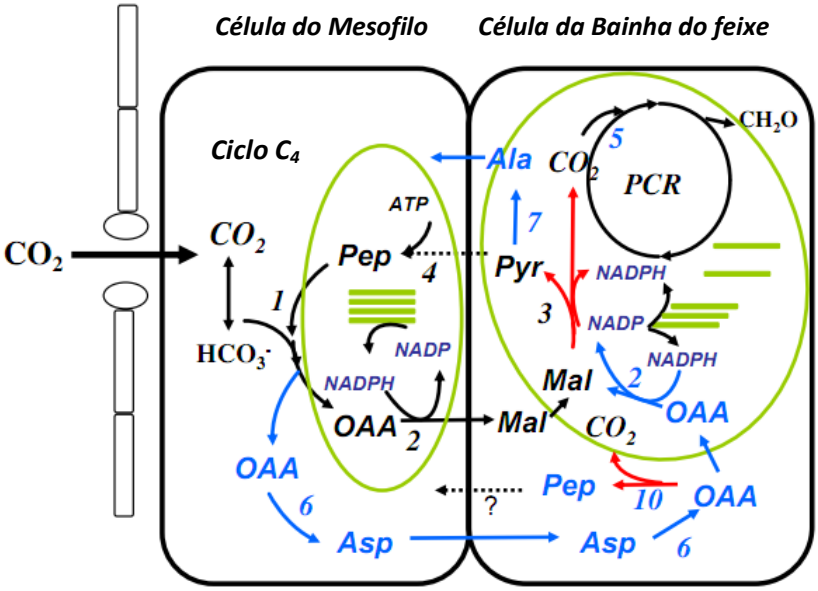


Figura 2 - Mecanismo C_4 tipo NADP:ME onde aspartato (linhas azuis) em adição ao malato (linhas pretas) é produzido no mesofilo. PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxaloacetato, Asp, aspartato; Ala, alanina; Pyr, piruvato; Mal, malato. Cloroplastos e tilacóides coloridas em verde, mitocôndria azul. (1) fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPC); (2) NADPH- malato desidrogenase; (3) NADP:ME; (4) piruvato Pi-diquinase; (5) Rubisco; (6) aspartato aminotransferase; (7) alanina aminotransferase; (8) NAD-malato desidrogenase; (9) NAD:ME; (10) fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK) (FURBANK, 2011)

Em cana-de-açúcar, admite-se que o mecanismo de transporte de compostos de quatro carbonos seja aquele referente à enzima málica $NADP^+$ (NADP:ME). Porém estudos recentes observaram que transcritos da enzima PCK são aparentemente mais abundante que aqueles de NADP:ME em folhas maduras, sugerindo a possibilidade de ocorrência de mais de um tipo de transporte de C_4entre o mesofilo e as células da bainha talvez influenciado pelas condições ambientais (CALSA JUNIOR; FIGUEIRA, 2007). No entanto, tal alteração do mecanismo de fixação de carbono precisaria ser confirmado. Além disso, é necessário o melhor entendimento da plasticidade das três vias bioquímicas de C_4 em relação ao estresse hídrico em cana-de-açúcar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Dez genótipos foram utilizados para o ensaio de seca em campo (conduzido na Usina Jalles Machado, Goianésia/GO) e análise de discriminação isotópica de carbono: 'IACSP01-8112', 'IACSP03-8014', 'IACSP03-8022', 'IACSP03-8125', 'IACSP03-8189', 'IACSP94-2094', 'IACSP96-7586', 'IACSP97-3391', 'IACSP97-7065' e 'SP87-365'. No ensaio de seca em casa de vegetação, (conduzido na Fazenda Santa Elisa, Instituto Agronômico de Campinas, IAC, Campinas) e nas análises de atividade enzimática e expressão de genes envolvidos com as rotas alternativas de transporte de CO_2, foram utilizados ostrêsgenótiposclassificados previamente como tolerante a deficiência hídrica 'IACSP94-2094' (LANDELL, comunicação pessoal[1]; LANDELL et al., 2005) e sensíveis a deficiência hídrica 'IACSP97-7065'e 'SP87-365' (LANDELL, comunicação pessoal[2]).

3.2 Ensaio de Seca em Campo

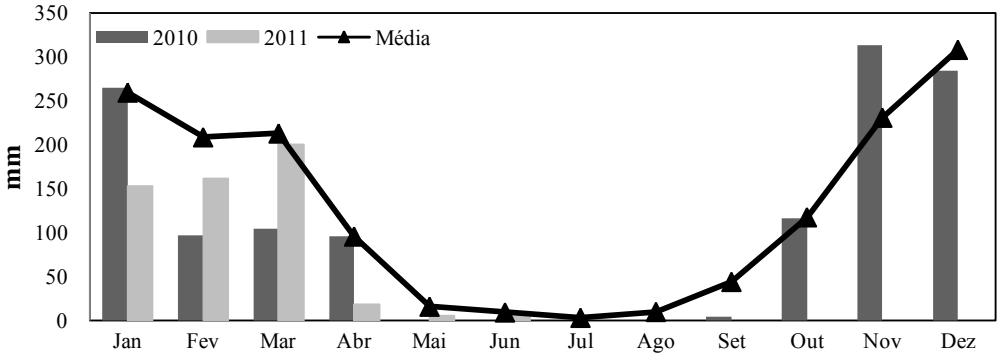
Neste experimento foram avaliados os 10 genótipos listados acima, sendo seis para avaliação (todos considerados de elite para tolerância a déficit hídrico) e quatro definidos como padrões: dois de sensibilidade ('IACSP97-7065' e 'SP87-365') e dois de tolerância ('IACSP96-7586' e 'IACSP94-2094') (LANDELL, comunicação pessoal[3], LANDELL et al., 2005). O experimento foi instalado na fazenda Revolta na usina Jalles Machado no município de Goianésia, GO, em 13/10/2009, de modo que no início do período de seca as plantas estavam com cerca de sete meses.O ensaio correspondeu a um período de dois anos, sendo colhido em 26/10/2010 (cana-planta), e o segundo ano em 04/09/2011 (cana-soca). Os dez genótipos foram submetidos a dois tratamentos: controle (hidratado por chuva até o início do período de seca sendo posteriormente por irrigação com lâmina de 30 a 60 mm água) e déficit hídrico (não irrigado), dispostos em três blocos casualizados. As parcelas foram compostas de quatro sulcos de 4 m de comprimento, com o espaçamento entre sulcos de 1,5 m com

[1]/[2]/[3] Landell, M. Diretor do Programa Cana IAC (Procana), Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Cana, Instituto Agronômico (IAC), Ribeirão Preto/SP, Brasil. Informação pessoal.

carreadores de 2 m. A densidade de plantio foi de 15 gemas/m linear. O ensaio foi delimitado por bordaduras laterais (quatro sulcos de cada lado) e bordaduras frente e fundo de 10 m cada para evitar interferências nas parcelas experimentais(Anexo A). As análises fisiológicas e coletas das amostras de folhas foram feitas nas duas linhas centrais. As folhas coletadas foram aquelas totalmente expandidas sempre tomando como referência o primeiro *dewlap* visível dos colmos amostrados.

Durante o primeiro ano do ensaio, as medidas fisiológicas e a coleta de material vegetal foram realizadas mensalmente. As amostras foram coletadas antes do início do período seco (12/05/2010; primeira coleta), seguido de três coletas dos tratamentos irrigado e sob déficit em 11/06/2010 (segunda coleta), 28/07/2010 (terceira coleta) e 26/08/2010 (quarta coleta), sendo esta última sob déficit severo. A última coleta (quinta coleta) foi feita após as chuvas (reidratação) e ocorreu em 22/10/2010 próximo a colheita (cana-planta).

No segundo ano do ensaio, as coletas se iniciaram antes do início do período seco (17/06/2011), da mesma forma que no primeiro ano, seguido de duas coletas dos tratamentos irrigado e sob déficit, nas datas, 29/07/2011 e 01/09/2011, sendo a última coleta (03/09/2011) correspondente a reidratação.Os índices mensais de precipitação em Goianésia em 2010 foram inferiores a média dos últimos 14 anos (Figura3), sendo que houve prolongada estiagem (maio a agosto) e baixa precipitação durante os meses de abril e setembro, comparado com a média dos últimos 14 anos. Em 2011 o período de estiagem foi mais curto, se estendendo de junho a agosto (Figura 3). Não foram fornecidos os dados a partir de outubro de 2011.



	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2010	264,9	97	105	95,4	0	0	0	0	3,9	116,3	313,5	284,3
2011	153,1	161,7	200,8	18	5,2	6,6	0	0	0	0	0	0
Média	259,1	208,2	212,5	95,2	15,3	8,7	2,6	9,3	43,5	117,1	230,5	307,8

Figura 3 - Índices mensais de precipitação de Goianésia em mm nos anos de 2010 e 2011. Não foram fornecidos os dados a partir de outubro de 2011

3.3 Ensaio de Seca em Casa de Vegetação

O experimento de suspensão de irrigação foi conduzido em casa de vegetação na Fazenda Santa Elisa, em colaboração com pesquisadores do Centro de Fisiologia do IAC, com destaque para a colaboração do MSc Ricardo Machado. Os mesmos dez genótipos de cana-de-açúcar listados anteriormente foram empregados nesse estudo, porém apenas quatro tiveram material vegetal amostrado ('IACSP94-2094', 'IACSP96-7586', 'IACSP97-7065' e 'SP87-365'). As plantas foram obtidas a partir da brotação de gemas de toletes plantados em bandejas. O processo de obtenção das plantas foi padronizado de forma que as mesmas tivessem origem e porte semelhantes. Após 42 dias do plantio das gemas (DAP) em casa de vegetação com controle automático de irrigação, as plantas foram transplantadas para tanques de alvenaria (0,6 m^3) contendo solo, sendo mantidas com o colmo principal e três perfilhos. Cada tanque continha plantas de cinco genótipos, sendo os quatro genótipos principais selecionados mais um genótipo dos seis restantes, de tal forma que os mesmos competissem pelo recurso água, com cinco repetições. As plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas em casa de vegetação onde a temperatura do ar e do solo e a radiação fotossinteticamente ativa (Q) foram monitoradas. Durante o período experimental, a temperatura média do ar foi de 19,7°C (máxima de 40,7°C e mínima de 4,1°C), a temperatura do solo com rega (controle) de 22,3°C (máxima de 34,3°C e mínima de 12,6°C) e a do solo sem rega (déficit hídrico) de 23,6°C (máxima de 33,5°C e mínima de 7,8°C).O potencial hídrico do solo (ψ, kPa) foi monitorado por tensiômetros (Tracom). Como substrato, utilizou-se solo previamente analisado e corrigido quanto ao aspecto nutricional, seguindo as recomendações de Van Raij et al. (1996). As plantas foram submetidas a dois tratamentos: controle (mantendo o solo próximo à capacidade de campo) e déficit hídrico (suspensão da irrigação). O tratamento de déficit hídrico foi induzido pela suspensão da irrigação durante a fase intermediária de desenvolvimento, sendo iniciada aos 181 DAP.

3.4 Avaliações Fisiológicas

Nos ensaios de seca em campo e em casa de vegetação foram avaliados parâmetros fisiológicos baseados em trocas gasosas foliares, entre as quais estão a assimilação de CO_2 (P_N, µmol $m^{-2}s^{-1}$), condutância estomática (g_s, mol $m^{-2}s^{-1}$), transpiração (E, mmol $m^{-2}s^{-1}$), e concentração intercelular de CO_2 (p_I µmol mol^{-1}). Além disso, foram avaliadas as

fluorescências da clorofila (eficiência efetiva do fotossistema II; e transporte aparente de elétrons) sendo realizadas três repetições por genótipo.As trocas gasosas foram avaliadas com analisador de gases por radiação infravermelha (IRGA) modelo Li-6400F (Licor; Lincoln, NE, EUA) que possui fluorômetro acoplado ao sistema, e assim permite a análise simultânea da atividade fotoquímica a partir dos sinais de fluorescência. As avaliações do ensaio de campo com IRGA foram realizadas com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) fixada em 2.000 μmol m^{-2} s^{-1} e sob condições naturais de temperatura e umidade (entre 9:00 e 11:00 h). As fluorescências mínimas (F_O) e máximas (F_M) foram monitoradas em tecidos foliares adaptados ao escuro (30 min). As fluorescências em estado de equilíbrio dinâmico (F_S) e máxima (F_M') foram avaliadas em tecidos adaptados à luz. Os valores de F_Me F_M' foram determinados pelo método do pulso de saturação (λ < 710 nm, Q ~ 12000 μmol m^{-2} s^{-1}, 0,8 s) (BÒLHAR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993). A fluorescência mínima após a excitação do fotossistema I (F_O') com luz vermelha distante também foi avaliada (λ = 735 nm, Q < 15 W m^{-2}, 3,0 s). A partir dos valores de F_O, F_M, F_Se F_M', foram calculadas a fluorescência variável no escuro ($F_V = F_M$-F_O) e no claro ($\Delta F = F_M$'-F_S), sendo possível a obtenção de algumas variáveis fotoquímicas: eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_M$') do fotossistema II (*FSII*) e o transporte aparente de elétrons [$ETR = Q$ x $\Delta F/F_M$' x 0,4 x 0,85] (EDWARDS; BAKER, 1993; MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2008; ROHÁCEK, 2002). O potencial hídrico do solo (ψ, em kPa) foi monitorado por tensiômetros (Tracom). O estado hídrico das plantas foi avaliado pelo potencial da água na folha, medido na antemanhã com o auxílio de uma câmara de pressão de Scholander modelo 3005 H07G4P4 (Soil Moisture Equipments;Santa Barbara, CA,EUA). No ensaio de suspensão de irrigação em casa de vegetação a coleta das amostras foi realizada na antemanhã (6:00 h) do dia de máximo déficit hídrico, sendo as medidas realizadas após a estabilização da umidade do ar no interior da câmara.

3.5 Discriminação Isotópica de^{13}C

Para análise de Δ^{13}C, as amostras de tecidos de plantas do ensaio de seca em casa de vegetação foram coletadas aos 15 e 21 dias após a suspensão da irrigação e cinco dias após a reidrataçãocom seis repetições biológicas (plantas) por tratamento dos diversos genótipos. No ensaio de seca em campo, as coletas foram realizadas nos dias 11/06/2010, 28/07/2010 e 28/08/2010, sendo coletadas seis repetições (plantas) por tratamento. Amostras foliares foram

agrupadas de acordo com a cultivar e tratamento, e então secas em forno a 70°C e moídas. Posteriormente, as amostras foram oxidadas e a abundância relativa produzida de ^{13}C e ^{12}C analisada em espectrômetro de massa no Laboratório de Isótopos Estáveis, CENA/USP. A abundância isotópica de carbono foi expressa na razão ^{13}C:^{12}C ($\delta^{13}C$) em relação ao padrão *Pee Dee Belemnite*. Os valores de δ^{13} resultantes foram utilizados para calcular a discriminação isotópica (Δ) como $\Delta = (\delta_a - \delta_p) / (1 + \delta_p)$. Nas células da bainha, o "vazamento" (*leakiness*) do CO_2 (Φ) foi estimado como: $\Phi = [\Delta - a + (a - b_4)(p_i / p_a)] / [(b_3 - s)(p_i / p_a)]$, onde a (4,4‰) é o fracionamento durante a difusão de CO_2 no ar; b_4 (-5,7‰ a 30°C) é o fracionamento combinado durante a dissolução de CO_2 a bicarbonato, e posterior fixação pela PEP carboxilase; p_i/p_a é a razão entre a pressão parcial de CO_2 intercelular e no ambiente; b_3 (29 ‰), é o fracionamento durante a carboxilação pela Rubisco; e s (1,8 ‰), é o fracionamento durante o "vazamento" do CO_2 das células da bainha para as células do mesofilo.

3.6 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de amostras foliares de plantas submetidas aos diversos tratamentos utilizando-se o método de precipitação em cloreto de lítio. Para extração de RNA, 300 mg de tecido foram macerados, e então adicionou-se 1 mL do tampão de extração contendo 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 2 mM NaCl, 2% PVP e 2 % β-mercaptoetanol, pré-aquecido durante 5 min em banho-maria a 65°C. Após a adição do tampão de extração, as amostras foram misturadas em vortex e submetidas a 65°C por 10 minutos, e em seguida levadas ao gelo por 1 min. Adicionou-se então 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (CIA; 24:1 v/v), e após misturar por agitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo, e a este foi adicionado mais 1 mL de CIA (24:1 v/v). As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, centrifugada novamente a 4°C para precipitação de qualquer eventual contaminante que tenha restado, e então se adicionou volume equivalente a ¼ do volume restante no tubo com solução 8 M LiCl. As amostras foram deixadas a -20°C por 12 h, e então centrifugadas a 10.000 *g* por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi então lavado por duas vezes com 0,5 mL de etanol 75%, centrifugado a 10.000 *g* por

10 min a 4°C, e seco a temperatura ambiente por 20 min, antes de ser finalmente ressuspendido em 20 µL de água 0,001% DEPC autoclavada. O RNA foi quantificado através do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e sua integridade foi confirmada via eletroforese.

3.7 Análise de Amplificação Quantitativa de Transcritos Reversos (RT-QPCR)

Amostras de 3 µg de RNA total adicionadas de oligo dT (0,5 µg μL^{-1}) foram desnaturadas a 70°C por 10 min, sendo incubadas a 4°C por 2 min, seguido da adição de 4 µL de 5x buffer M-MuLV RT, 1 mM dNTP, 40 U de *RNAseOUT* (Invitrogen), e 20 U da enzima *SuperScript* III (Invitrogen). A reação foi então incubada a 50°C por 1 h, seguida de 70°C por 10 min e a 4°C por 2 min. Finalmente, adicionou-se 5 U de RNAseH (BioLabs) mantendo-se a reação a 37°C por 20 min, resfriando por fim até 4°C. As análises de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas no RotorGene-3000 (Corbett Research), utilizando reações contendo 5 µL de *Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 0,5 µL de cada iniciador (5 µM) (Tabela 1), 1 µL do cDNA 1:10 (v:v) e água ultrapura (Milli-Q) estéril, sendo que foram conduzidas em triplicatas para cada combinação gene/amostra. Os iniciadores específicos para genes relacionados a enzimas envolvidas no transporte de compostos de quatro carbonos foram empregados para análise da expressão gênica em cana-de-açúcar (Tabela 1,CALSA JUNIOR;FIGUEIRA, 2007). A amplificação foi conduzida em incubações iniciais a 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos de 45 ciclos de dois passos: 95°C por 15 s e 60°C por 30 s para os iniciadores PEPCK e NADP:ME e de três passos a 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 20 s para o iniciador NAD:ME, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após o término dos ciclos de reações, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado entre 72°C e 95°C (curva de *melting*). Os experimentos incluíram controle negativo contendo água sem cDNA. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa *Rotor-Gene QReal-Time Analysis 6.0* (Qiagen). Os valores dos C_T (*cycle threshold*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica entre os tratamentos (15 dias de seca; 21dias de seca; e após reidratação). Para a normalização dos valores de expressão para cada uma das amostras, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes de interesse de forma relativa ao gene referência *Ubiquitina*, de acordo com Pfaffl et al. (2002).

Os valores de expressão relativos foram originados da diferença entre os tratamentos (seco-irrigado).

Tabela 1 - Iniciadores de genes codificadores das enzimas relacionadas ao transporte de carbono em C_4

Alvo	**TC**	**Anotação presumível**	**Iniciador *Forward* (5´- 3´)**	**Iniciador *Reverse* (5´- 3´)**
PEPCK	TC59951	PEP-carboxiquinase	GCTTCTCACTGCCAACTACCA	TCATCTTCACACGCACACAC
NADP: ME	TC56734	NADP+ - enzimamálica	ATCTTCCCACCCTTCACCA	CAGCAGCACCAGCAACAA
NAD:ME	TC66589	NAD+- enzimamalice	TGAGGGGTGTTGCGATGT	CAAGGGGGCTGTAAATAGGG

FONTE: CALSA JUNIOR; FIGUEIRA, 2007

3.8 Extração e Quantficação de Proteínas Foliares

As amostras foliares de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido até a formação de um pó homogêneo, ao qual foi adicionado 10% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida foram pesadas 200mg de material vegetal, sendo então acrescido tampão de extração na proporção 1:3 (peso/volume). Para aextração daenzima málica $NADP^+$ foi utilizado tampão contendo 400 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM β-mercaptoetanol; 10 mM ascorbato; 5 mM EDTA, 20% glicerol;1 mM PMSF; e 1%Triton X-100 (BORSANI et al., 2009). A enzima málica NAD^+ foi extraída com tampão 50 mM MES-NaOH pH 6,5; 10 mM β-mercaptoetanol; 5 mM $MnCl_2$, 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,05% Triton X-100;20%glicerol (TRONCONI et al., 2008).

O tampão contendo100 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM $MnCl_2$; 5 mM β-mercaptoetanol; 2 mM EDTA; 1 mM PMSF; 20% glicerol;0,5% ascorbato e 0,5% Triton X-100 foi utilizado para extração da enzima PEP carboxiquinase (MARTÍN; RIUS; PODESTÁ, 2011). Posteriormente os materiais foram homogeneizados e centrifugados a 14.000*g* por 25 min a 4°C e o precipitado descartado, sendo o sobrenadante coletado e congelado a -80°C até a utilização. Foram utilizadas três replicatas técnicas e três replicatas biológicas por amostra. A concentração de proteína solúvel das amostras foi determinada por ensaio de Bradford (1976) em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 PRO, Amersham Biosciences) a 595 nm, utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.9 Ensaios de Atividade Enzimática

A determinação da atividade de NADP:ME foi realizada espectrofotometricamente usando tampão de reação contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM NADP; 10 mM malato (Sigma Aldrich). O aumento na absorbância a 340 nm foi acompanhado por 1 min e atribuído a descarboxilação do malato pela NADP-ME conforme Borsani et al. (2009). A determinação da atividade de NAD:ME foi obtida espectrofotometricamente empregando tampão de reação contendo 50 mM MES-NaOH, pH 6,5; 4 mM NAD; 10 mM malato; 5 mM ditiotreitol (DTT); 10 mM $MnCl_2$ e 10 U de malato desidrogenase MDH (Sigma Aldrich). O aumento na absorbância a 340 nm foi acompanhado por 1 min e atribuído a descarboxilação do malato pela NAD-ME (TRONCONI et al., 2008).

A determinação da atividade descarboxilativa de PCK foi conduzida espectrofotometricamente utilizando tampão contendo 100 mM HEPES-NaOH pH 8,0; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM $MnCl_2$; 2 mM ATP; 0,4 mM ADP; 0,5 mM oxaloacetato (OAA); 0,35 mM NADH; 5 U de lactato desidrogenase (LDH); e 2 U piruvato quinase (PK) 2U (Sigma Aldrich). Para ensaio de atividade, primeiramente foi preparada solução contendo 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 2 mM ATP, 0,4 mM ADP e 0,35 mM NADH mantida a 30°C. Posteriormente, foi acrescentado 5 U de LDH e 2 U de PK a solução em cubeta de quartzo, seguido da adição da amostra protéica e por último 0,5 mM oxaloacetato. Foi realizada a leitura a 340 nm a cada 30 s por 5 min (MARTÍN; RIUS; PODESTÁ, 2011).

3.10 Análises Multivariadas

Os dados obtidos, referentes aos parâmetros: fisiológicos, de discriminação isotópica e "vazamento" de CO_2, obtidos nos experimentos de campo e de casa de vegetação foram analisados utilizando-se a Análise de Componentes Principais (ACP) e representados através de gráficos *biplots* (GOWER et al., 2011). O método ACP *biplot* possibilita determinar como os diferentes parâmetros avaliados (variáveis) estão relacionados com as cultivares (amostras). Tipicamente, um gráfico PCA *biplot* é representado por linhas e pontos, sendo que as linhas representam as variáveis e os pontos, as observações. O comprimento das linhas está associado à variância da variável que ela representa, enquanto que o ângulo entre duas linhas representa a correlação entre as variáveis correspondentes. Outra informação importante que pode ser extraída do *biplot* é que valores maiores das variáveis ocorrem para as amostras para

os quais as linhas apontam, ou seja, valores maiores de um determinado parâmetro ocorrerão para a cultivar para a qual a linha que representa tal parâmetro apontar. Análises foram conduzidas no ambiente computacional R Development Core Team (2010).

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros Fisiológicos em Experimento de Campo

Quando os diferentes genótipos de cana-de-açúcar foram cultivados em condições de déficit hídrico em campo foi possível observar a presença de fenótipos típicos de estresse induzido por seca. No início do experimento, os genótipos apresentavam poucas folhas secas, senescentes devido ao estágio de desenvolvimento das plantas. No decorrer do déficit hídrico, os sintomas de desidratação ficaram evidentes e os diferentes genótipos de cana-de-açúcar apresentaram folhas enroladas, amarelecidas e secas, sendo que, em genótipospreviamente classificados como sensíveis como 'IACSP97-7065', os sintomas foram ainda mais acentuados. Dessa forma, após a imposição de longo período de déficit hídrico (90 dias), as características fenotípicas entre os genótipos cultivados nos campos sequeiro e irrigado foram marcantes (Figura4).

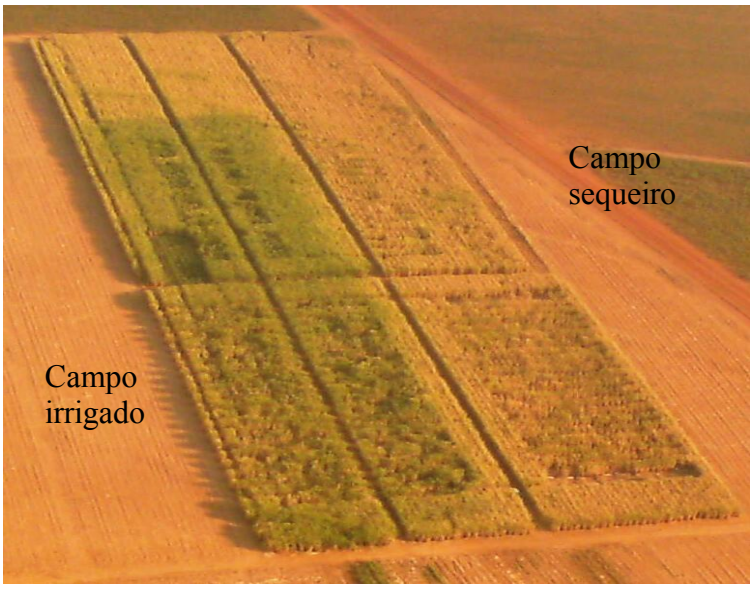


Figura 4 - Imagem aérea do experimento de campo em Goianésia no quarto mês de déficit hídrico em experimento de 2010

Os dados de produtividade expressos em toneladas de cana por hectare (TCH), fornecidos pelo grupo do Centro de Cana do IAC, mostraram que houve diferença significativa entre os 10 genótipos de cana-de-açúcar sob condição irrigada e déficit hídrico (Figura 5). Durante o primeiro ano do experimento a cultivar 'SP87-365' obteve produtividade maior sob as duas condições de fornecimento de água, significativamente diferentes apenas das cultivares 'IACSP97-3391', 'IACSP03-8189', 'IACSP01-8112' e 'IACSP97-7065 (Figura 5). Apesar de não apresentar perdas drásticas de produtividade sob déficit hídrico, a 'IACSP94-2094' não apresentou produção significativamente superior as demais em condições ótimas de cultivo em cana-planta sendo a 3ª mais produtiva. Sob estresse, a 'IACSP94-2094' foi a 4ª mais produtiva. Já no segundo ano de experimento ('cana soca'), entretanto, a 'IACSP94-2094' apresentou produção superior às outras variedades em condições de seca, enquanto que a 'IACSP97-7065' obteve as maiores perdas de produtividade quando submetida ao estresse por seca, significativamente distinta da produção apresentada pela 'IACSP94-2094´, o que demonstrouque essas cultivares possuem resposta diferenciada ao déficit hídrico (Figura 5).

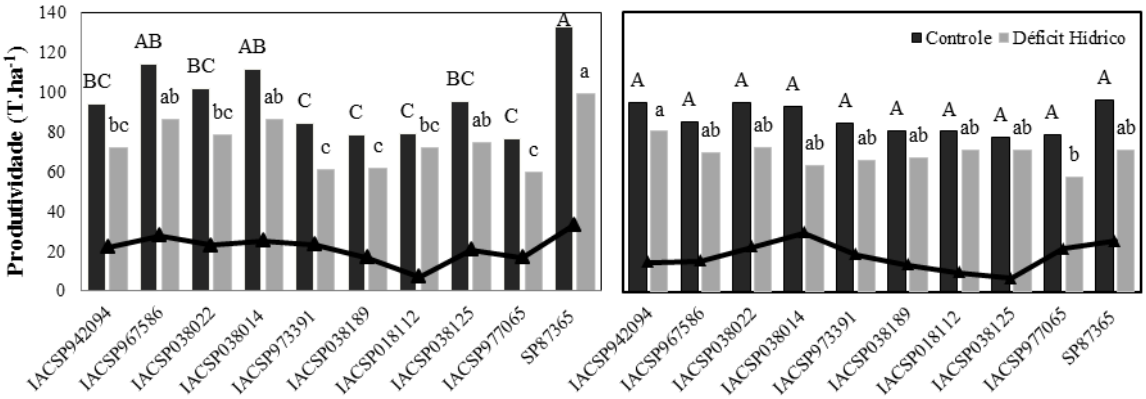


Figura 5 - Produtividade dos 10 genótipos cultivados em experimento de campo. Esquerda, experimento realizado em 2010. Direita,experimento realizado em 2011. Valores de barras indicam média n=3. Triângulos (▲) indicam a diferença entre os tratamentos, controle – déficit hídrico. Letras denotam valores de significância para teste F de médias

Os diversos genótipos foram avaliados quanto ao potencial hídrico da folha, que representa o status energético da água na planta, em ambas as condições de irrigação em campo nos dois anos. A água no xilemaestá sobtensão durantea transpiraçãoe, portanto,o potencial da água é geralmentenegativo.A pressão necessáriapara equilibraresta tensão é a

medida depotencial da água(ROSE,1966).Dessa forma quanto menor o valor do potencial da águana folha (ψ), menor é a quantidade de água presente e maior a transpiração.

Durante o experimento, o ψ decresceu nos 10 genótipos estudados, sendo as menoresdiferenças (controle x seca) observadas nas cultivares 'IACSP03-8125' e 'SP87-365'.As cultivares'IACSP94-2094'e 'IACSP97-7065' apresentaramredução significativa de ψ na condição de déficit hídrico, nas avaliações sob estresse máximo no primeiro (Anexo B) e segundo ano (Figura 6) de experimento.Durante o ensaio em 2011, o ψ decresceu nos 10 genótipos estudados indicando a ocorrência de déficit hídrico severo nos tratamentos (Figura 6), sendo as menores diferenças (controle x seca) observadas nas cultivares 'IACSP03-8125' e 'SP87-365'.As cultivares 'IACSP94-2094' e 'IACSP97-7065' apresentaram redução significativa de ψ na condição de déficit hídrico nas avaliações sob estresse máximo no primeiro (Anexo B) e segundo ano (Figura 6). Durante a reidratação, as plantas de todos os genótipos submetidos a seca atingiram os valores de ψ similares das plantas sob irrigação, a exceção da variedade 'IACSP97-7065' (Figura 6). No primeiro ano de experimento não foram obtidos os valores de ψ após a reidratação.

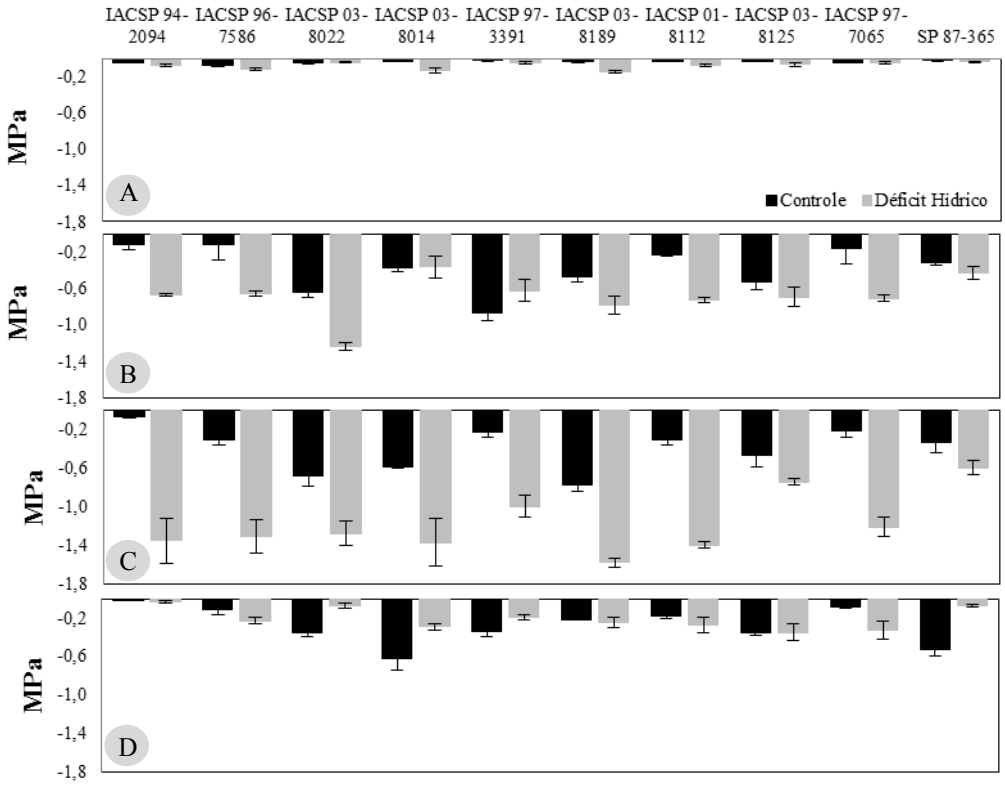


Figura 6 - Análise de potencial hídrico da folha nos 10 genótipos em experimento de campo de 2011. A. Primeira coleta (0 dias). B. Segunda coleta (42 dias; seca intermediária). C. Terceira coleta (75 dias; seca máxima). D. Reidratação. Valores de barras indicam média n=3

A deficiência hídrica reduziu as trocas gasosas foliares das cultivares avaliadas, levando a decréscimos na fotossíntese (P_N) (Anexo C), na transpiração (E) (Anexo D) e na condutância estomática (g_S; Figura 8). A quantidade de carbono assimilada (P_N) por unidade de água perdida através da transpiração (E) pode ser relacionada por meio do cálculo da eficiência do uso da água (EUA = P_N/E), a qual foi primeiramente avaliada para todas as cultivares, nos dois anos de experimento. Em2010, os dados de EUA referentesàscultivares consideradas padrões não demonstraram diferenças significativa para os pontos de amostragem em relação aos tratamentos controle/seca (Anexo E). Por outro lado, durante o segundo ano de experimento, em ambas as condições de disponibilidade de água, a cultivar considerada tolerante, 'IACSP94-2094' se destacou em relação às outras cultivares analisadas, apresentando EUA mais elevado sob no estresse máximo quando comparada ao tratamento irrigado (Figura 7). Já a cultivar 'SP87-365', que apresentou a maior produtividade no primeiro ano de experimento em déficit hídrico, apresentou valores reduzidos de EUA sob déficit hídrico no primeiro ano, e no segundo ano os valores foram os mais baixos quando comparadoàs outras cultivares desde o início do déficit hídrico (primeira coleta - Anexo E, Figura 7). Esses resultados indicam a importância de considerar o estágio de desenvolvimento das plantas, e mostram que existem grandes diferenças nas características fisiológicas de cana-de-açúcar quando se compara cana-planta e cana-soca. Já a cultivar 'IACSP97-7065' não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos nos valores de EUA durante os dois anos de experimento, embora tenha apresentado reduções significativas em P_N no máximo estresse (Anexo F).A análise de EUA entre as cultivares 'IACSP94-2094' e 'IACSP97-7065' demonstram valores contrastantes entre elas. Durante o período de reidratação todas as cultivares conseguiram recuperar os valores de EUA das plantas em déficit hídrico para valores próximos aos das plantas irrigadas no segundo ano (Figura 7), sendo que durante o primeiro ano as variedades 'SP87-365', 'IACSP03-8022' e 'IACSP97-3391' não alcançaram os valores de EUA das plantas irrigadas (Anexo E).

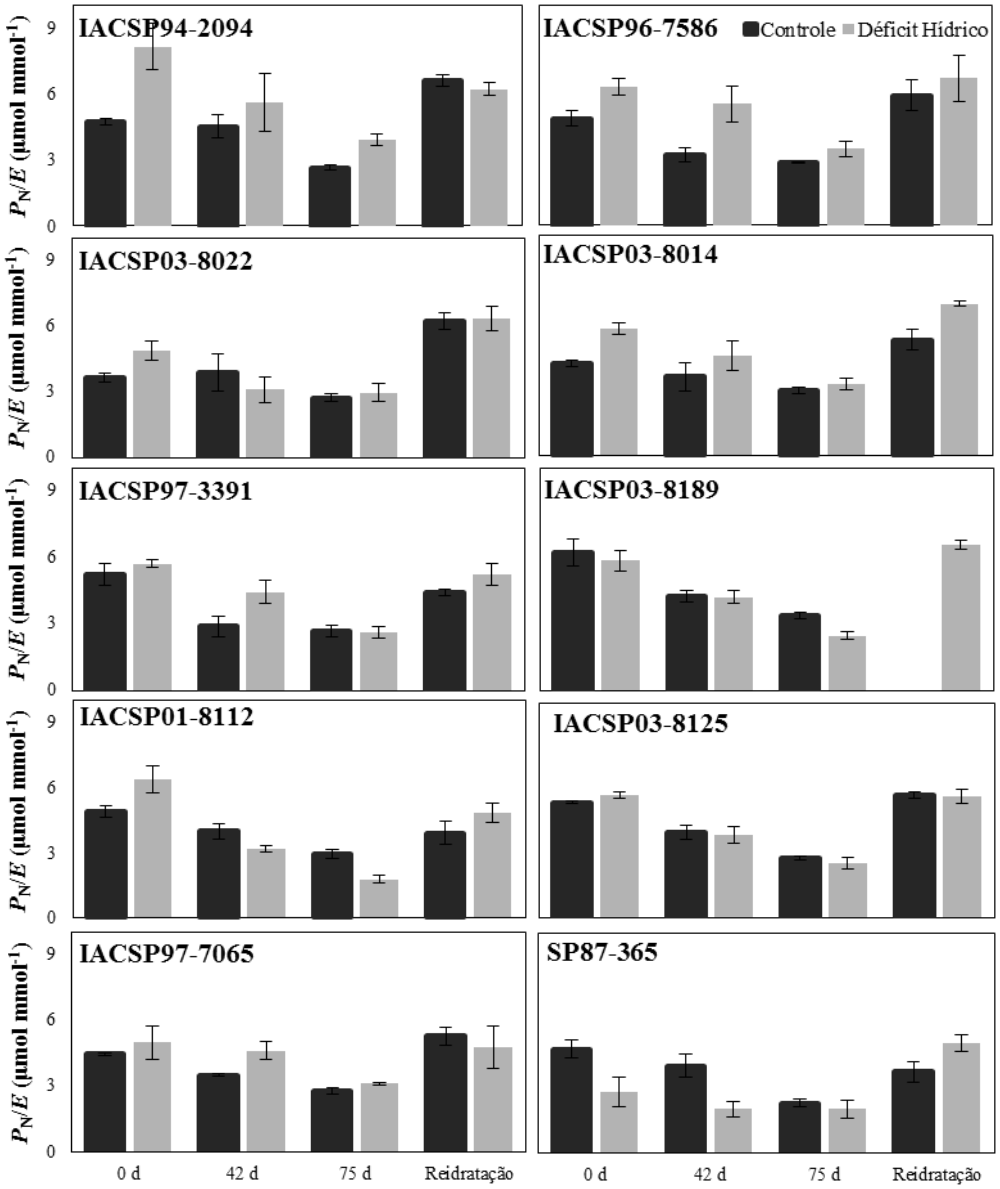


Figura 7 - Eficiência do uso da água (EUA = E/P_N) em experimento de campo de 2011. Valores de barras indicam média n=3

Uma das estratégias para impedir a desidratação excessiva das folhas pela transpiração é o fechamento estomático (SALIENDRA et al., 1996), o que pode ser avaliado pela redução dos valores de condutância estomática (g_S). A redução de P_N conjuntamente com a redução de g_S indica uma inibição difusiva, ou seja, menor absorção e menor difusão de carbono entre as células da folha. Essa resposta foi detectada em praticamente todas as cultivares quando submetidas ao estresse por seca, reduzindo significativamente os valores de g_S se comparadas mesmos genótipos irrigados. Entretanto, durante o primeiro ano do ensaio, as

cultivares‘IACSP97-3391’, ‘IACSP03-8189’ e ‘SP87-365’ não sofreram alterações importantes em g_S (Anexo G) entre os tratamentos irrigado/seca, e consequentemente não apresentaram diminuição na taxa de transpiração (Anexo 8) indicando possivelmente maior consumo de água. Por outro lado, as cultivares ‘IACSP94-2094’, ‘IACSP03-8014’ e ‘IACSP03-8125’ no segundo ano, fecharam os estômatos antecipadamente (primeira coleta) quando sob déficit hídrico, quando comparadas às outras variedades (Figura 8), diminuindo significativamente a taxa de transpiração, o que se reflete nos valores mais elevados de EUA (Figura 7).

Sob o ponto de vista de produtividade e parâmetros fisiológicos, é possível classificar os 10 genótipos testados em termos de resposta ao déficit hídrico. Dois genótipos apresentaram maiores evidências de tolerância a seca baseado em parâmetros fisiológicos, enquanto que os sete restantes apresentaram comportamento de materiais intermediários ou sensíveis quanto à resposta ao déficit hídrico, sendo possível dividi-los em três grupos. O primeiro grupo seria dos materiais mais tolerantes à seca, que inclui os genótipos ‘IACSP94-2094’e ‘IACSP97-3391’, os quais apresentaram baixos valores de redução de produtividade e altos níveis de EUA sob déficit hídrico (Figuras5 e 7). O segundo grupo incluiria os genótipos que apresentaram reduções de rendimento sob condições de déficit hídrico em relação ao controle. Esse grupo foi formado pelos genótipos supostamente mais sensíveis à seca, incluindo ‘IACSP03-8022’, ‘IACSP03-8014’, e ‘SP87-365’, sendo que este último apresenta rendimento superior para algum dos parâmetros fisiológicos avaliados, porém baixo EUA (Figura 7). O terceiro grupo seria de materiais de comportamento intermediário, onde estão inseridos os demais genótipos, como ‘IACSP97-7586’, ‘IACSP97-7065’, ‘IACSP01-8112’ e ‘IACSP03-8125’ e ‘IACSP03-8189’ os quais não apresentam perdas drásticas na produtividade quando submetidos a estresse por seca, assim como não apresentaram aumento na EUA nessa condição quando comparada a condição controle.

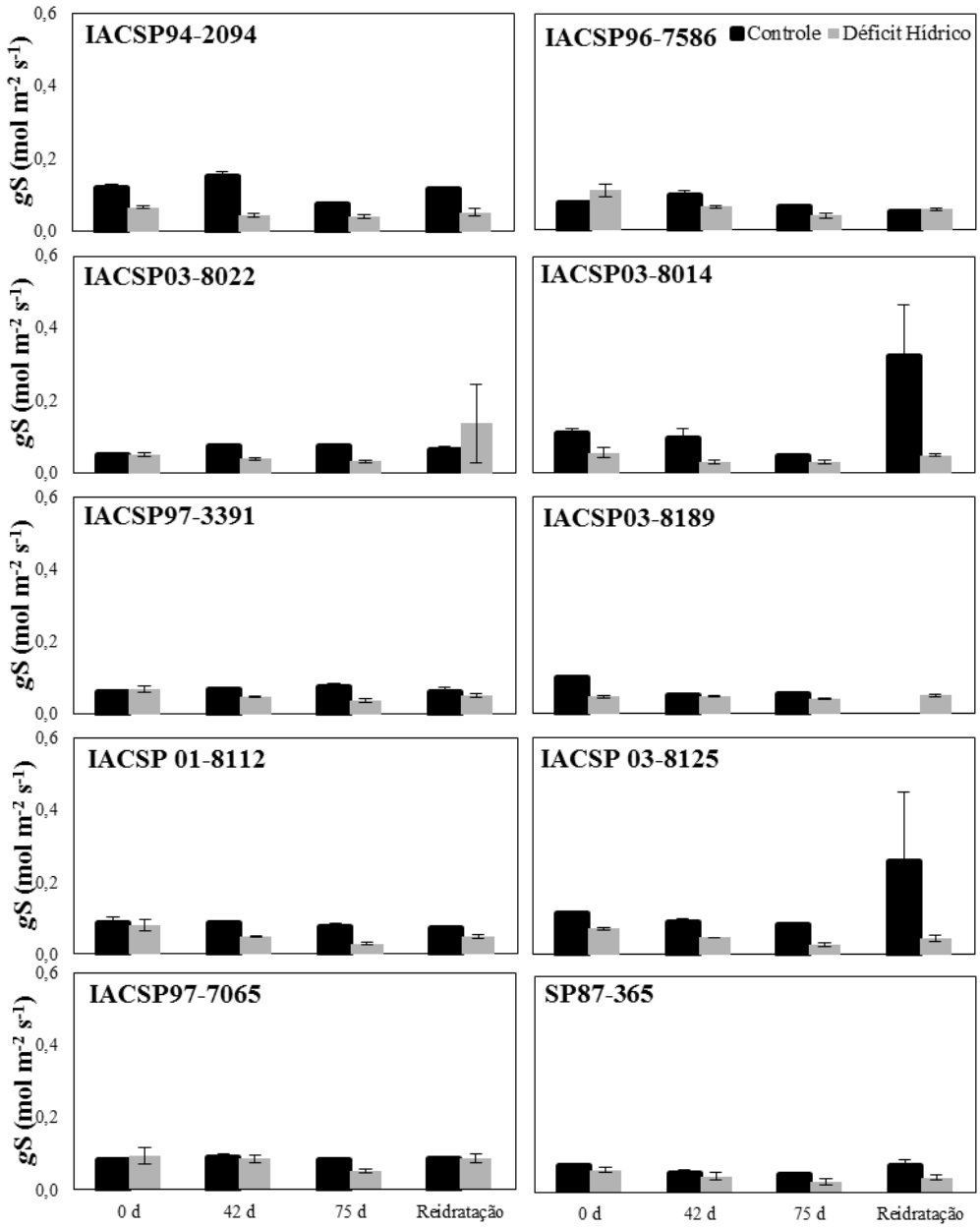


Figura 8 - Condutância estomática (g_S) em experimento de campo de 2011. Valores de barras indicam média n=3

4.2 Parâmetros Fisiológicos em Experimento de Casa de Vegetação

Este ensaio teve como objetivo obter dados fisiológicos dos mesmos genótipos cultivados em campo, agora mantidos em condições controladas de déficit hídrico induzido em casa de vegetação por suspensão de irrigação de forma a comparar resultados, além de fornecer material vegetal para análise de discriminação isotópica e expressão gênica. Sendo

assim, baseados nos resultados obtidos quanto aos parâmetros fisiológicos e de produtividade no campo sob estresse hídrico, três genótipos contrastantes quanto a tolerância por seca foram selecionados e submetidos a experimento de casa de vegetação em condições controladas de cultivo.

Os três genótipos avaliados foram afetados pelo déficit hídrico, apresentando decréscimo expressivo no potencial da água na folha (ψ) no decorrerdo período de seca. A cultivar tolerante ('IACSP94-2094') sofreu redução significativa nos valores de ψ aos 15 dias de suspensão da irrigação quando comparado ao tratamento controle, mantendo esses valores durante todo o período de seca, sugerindo uma resposta mais rápida ao déficit hídrico (Figura 9). Por outro lado, a cultivar 'SP87-365' obteve uma redução no potencial de água menor aos 15 dias, que manteve até 19 dias, quando houve maior decréscimo do potencial de água. Já a cultivar 'IACSP97-7065', não apresentou alteração nos valores de ψ nos primeiros 15 dias de suspensão da irrigação, sofrendo redução drástica no ψapós 17 dias de tratamento, com valores mantidos até os 21 dias, sugerindo que essa variedade possivelmente seria mais insensível a ajuste de potencial de água, não conseguindo, entretanto, mantê-lo em períodos mais longos de seca (Figura 9).

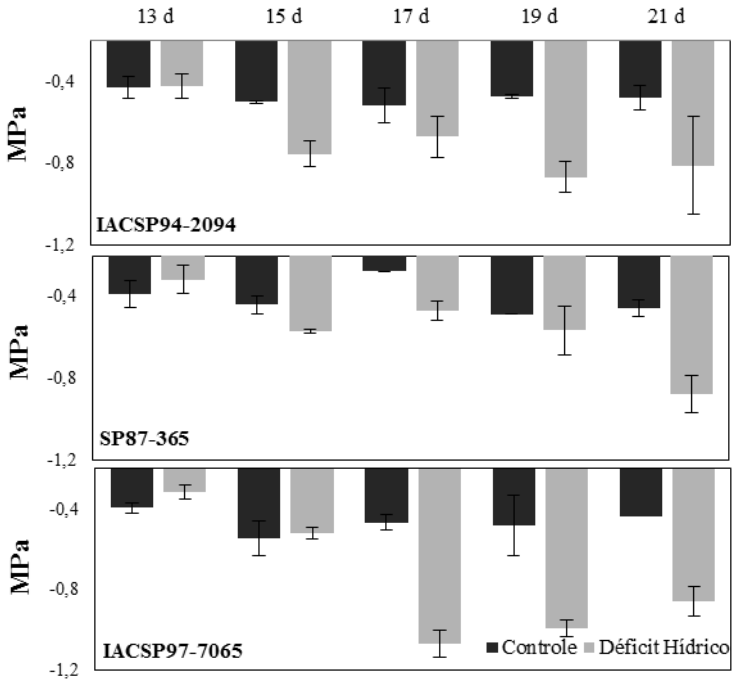


Figura 9 - Análise de potencial hídrico da folha em experimento de casa de vegetação. Valores de barras indicam média n=3

O déficit hídrico imposto afetou as trocas gasosas dos genótipos estudados de forma similar, causando redução significativa da assimilação de CO_2 (P_N), da condutância estomática (g_S)e da transpiração (E) (Figura 10). O genótipo 'IACSP97-7065' foi em média o material mais afetado pelo déficit hídrico em relação a todos os parâmetros avaliados, sendo que, os valores de P_N chegaram próximos de zero na seca máxima (21 dias). Os valores médios de assimilação de CO_2 em déficit hídrico para 'IACSP94-2094' e 'SP87-365' foram semelhantes, com grandes reduções em relação aos controles irrigados, porém menos drásticas do que as reduções observadas para 'IACSP97-7065'.

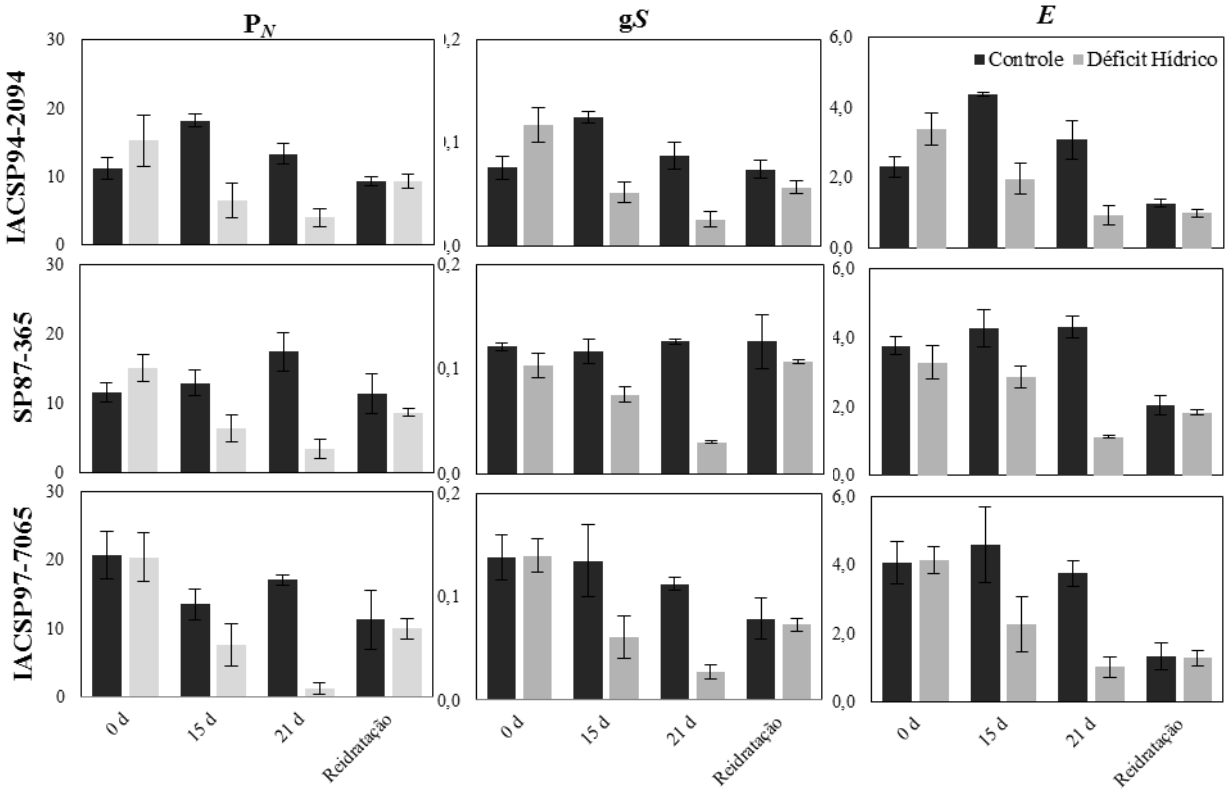


Figura 10 -Assimilação de carbono (P_N/µmol m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (gS/mol m^{-2} s^{-1}) e transpiração (E/mmol m^{-2} s^{-1}) em experimento de casa de vegetação. Valores de barras indicam média n=3

Quando em déficit hídrico, a condutância estomática (g_S), foi reduzida para as três cultivares analisadas de forma semelhante, porém a resposta mais rápida parece ocorrer para 'IACSP94-2094' e 'IACSP97-7065'.Padrão similar foi observado paraassimilação de CO_2 (P_N), exceto para 'IACSP97-7065' (Figura 10), que ao reduzir g_S, reduziu tambémP_N,sugerindo que essa variedade possui maior sensibilidade a seca, sofrendo maiores perdas nas condições de déficit hídrico.Durante o período de reidratação, a recuperação do

estresse hídrico imposto ficou evidente, sendo que, todos os genótipos apresentaram aumentos relevantes na condutância estomática (g_S), assimilação de CO_2 (P_N) e na transpiração (E), aproximando dos valores das plantas controle para esses parâmetros (Figura 10).

A eficiência do uso da água (EUA $=P_N/E$) não sofreu grandes alterações entre os tratamentos para 'IACSP94-2094' e 'SP87-365', enquanto que 'IACSP97-7065'em déficit hídrico apresentou redução em EUA consideravelmente no período de máximo estresse. Quanto àeficiência instantânea de carboxilação (EIC = P_N/p_I), houve redução em todas as cultivares, enquanto que a cultivar 'IACSP97-7065' apresentou a menor eficiência sob máximo estresse (21 dias) com redução significativa da EIC quando em seca (Figura 11). Esses resultados sugerem que a variedade 'IACSP94-2094' possui mecanismo de tolerância a seca, o qual reflete numa maior assimilação de CO_2 com menor consumo de água, principalmente quando comparada a variedade 'IACSP97-7065', que reduz drasticamente a capacidade de assimilar CO_2 com suprimento reduzido de água, não sendo capaz de manter o potencial de água na folha quando em seca (Figura 11).Na reidratação, todas as variedades recuperaram EUA e EIC, atingindo os valores observados nas plantas-controle sob irrigação(Figura 11).

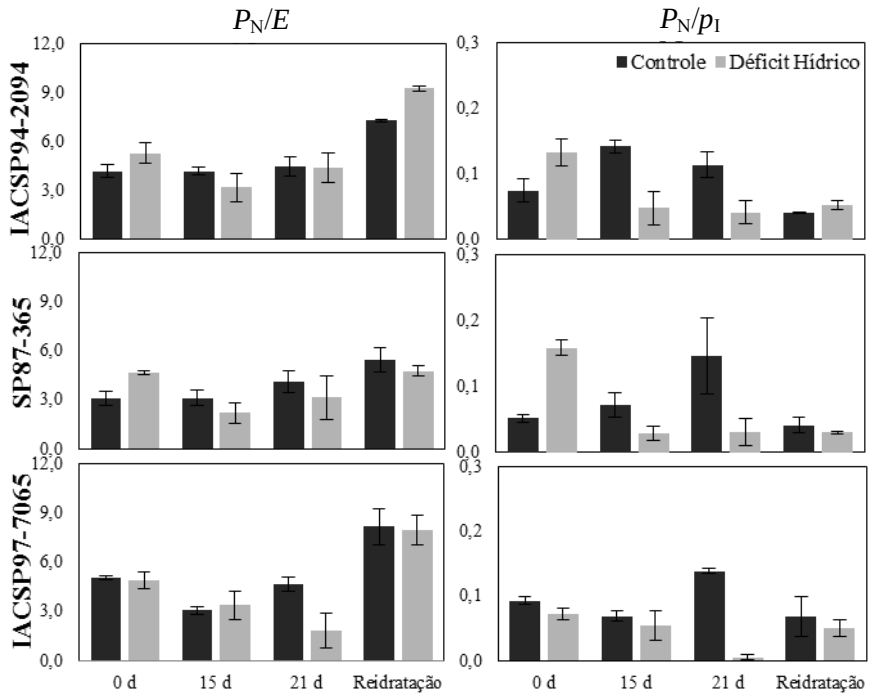


Figura 11 -Eficiência do uso da água (EUA = P_N/Eµmol mmol^{-1}) e eficiência instantânea de carboxilação (EIC = P_N/p_Iµmol m^{-2} s^{-1} Pa^{-1}) emexperimento de casa de vegetação.Valores de barras indicam média n=3

Quando expostas a seca, as plantas podem sofrer danos fotoquímicos, causando fotoinibição (LONG et al., 1994), que pode ter a função de fotoproteção,dissipando o excesso de energia e minimizando o dano ao aparato fotossintético em condições estressantes (BISWAL; BISWAL, 1999). Dessa forma a energia que seria usada na atividade fotoquímica é desviada para fluorescência (qP) ou para a geração de calor (NPQ). Em condições de máximo estresse hídrico foi observada redução significativa da atividade fotoquímicaquando os valores de gS foram menores que 0,1mol m^{-2} s^{-1}, ou seja, após os primeiros 15 dias de suspensão da irrigação. A eficiência quântica efetiva do fotossistema II ($\Delta F/F_M$') reduziu de forma semelhante em todas as variedades quando em estresse hídrico (Figura 12). O transporte aparente de elétrons (ETR), que é uma medida global da atividade fotoquímica, reduziu significativamente em todas as variedades de forma semelhante aos 21 dias (Figura 12), enquanto que os valores de coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (*NPQ*) aumentaram expressivamente em seca, indicando que a energia fotoquímica foi em grande parte perdida através de calor. Os genótipos IACSP94-2094' e 'SP87-365', tiveram aumento expressivo no coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (*NPQ*)a partir de 17 dias de seca, enquanto que em 'IACSP97-7065' esse aumento foi observado logo aos 15 dias de suspensão da irrigação (Figura 13), sendo uma resposta antecipada em relação às outras variedades. Por outro lado, os valores de Eficiência Quântica Potencial do Fotossistema II (F_v/F_M) não sofreram alterações entre os tratamentos para 'IACSP97-7065', ao contrário das outras cultivares que apresentaram redução significativa nos valores de (F_v/F_M) no máximo estresse hídrico em relação ao controle irrigado (Figura 13).

Em resumo, a análise da atividade fotoquímica sugere que os menores valores de eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_M) na variedade 'IACSP94-2094', associado a elevada perda da energia em forma de calor em relação a 'IACSP97-7065', indicam a presença de um mecanismo de fotoproteção dessa cultivar ('IACSP94-2094') ao déficit hídrico, reduzindo a atividade fotoquímica para evitar a danificação do aparato fotossintético.

Para a utilizar todos os dados dos parâmetros fisiológicos obtidos para discriminar os genótipos, foi conduzida uma análise multivariada (Figura 14). Apesar das diferenças observadas entre os experimentos de campo e casa de vegetação para os parâmetros fisiológicos, por meio de análises multivariadas, observa-se que as variedades selecionadas como padrões ('IACSP94-2094', 'SP87-365' e 'IACSP97-7065') são posicionadas de tal

forma que se apresentam distanciadas umas das outras, indicando que realmente apresentam resposta à seca diferenciada.

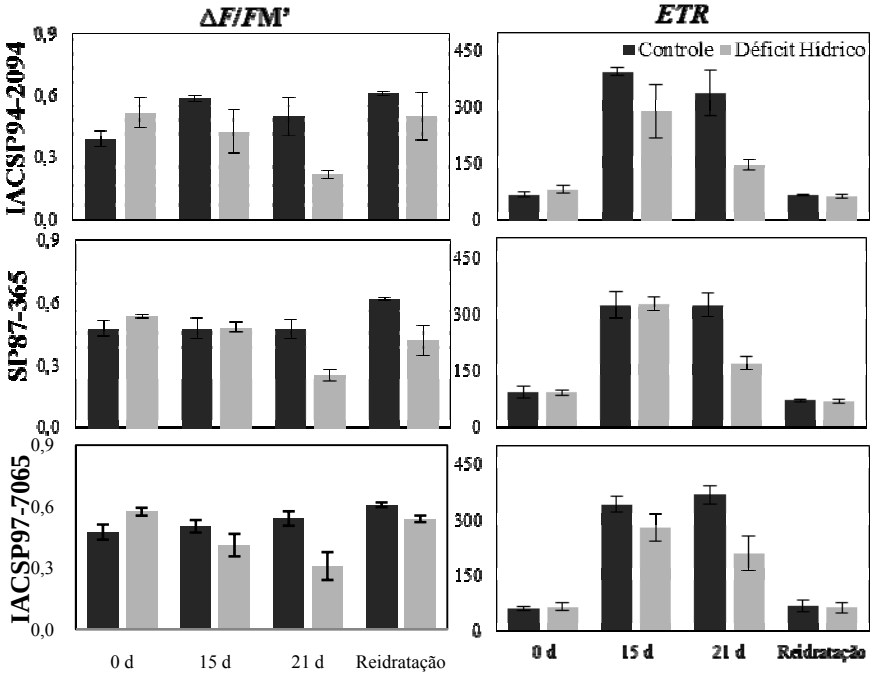


Figura 12 -Eficiência quântica efetiva do Fotossistema II (Δ*F*/*F*M') e transporte aparente de elétrons (*ETR*/µmol m^{-2} s^{-1}) em experimento de casa de vegetação.Valores de barras indicam média n=3

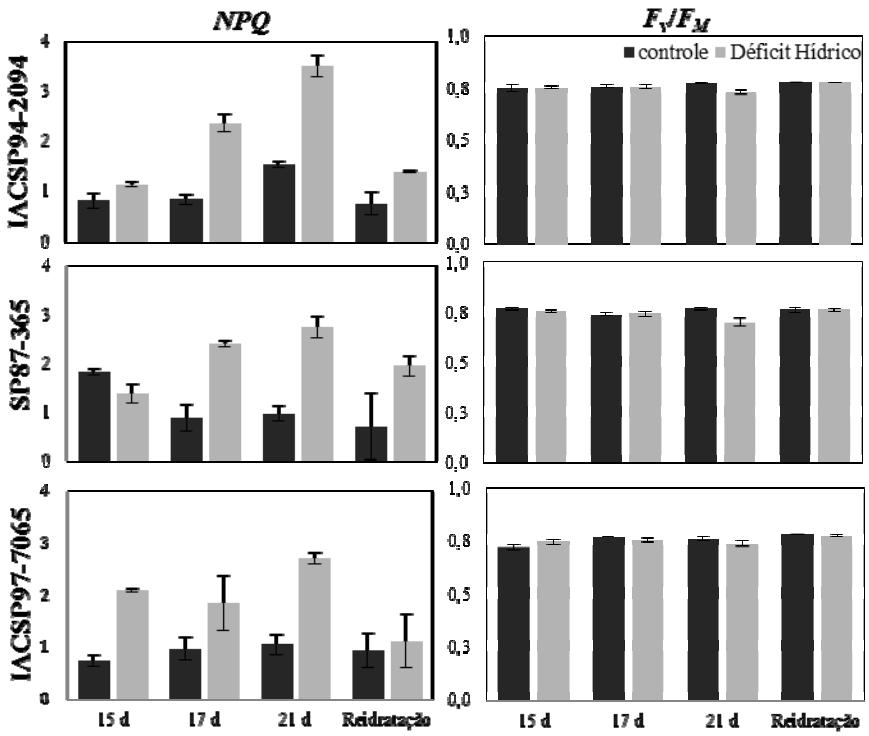


Figura 13-Coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (*NPQ*) e eficiência quântica potencial do Fotossistema II (F_v/F_M) emexperimento de casa de vegetação.Valores de barras indicam média n=3

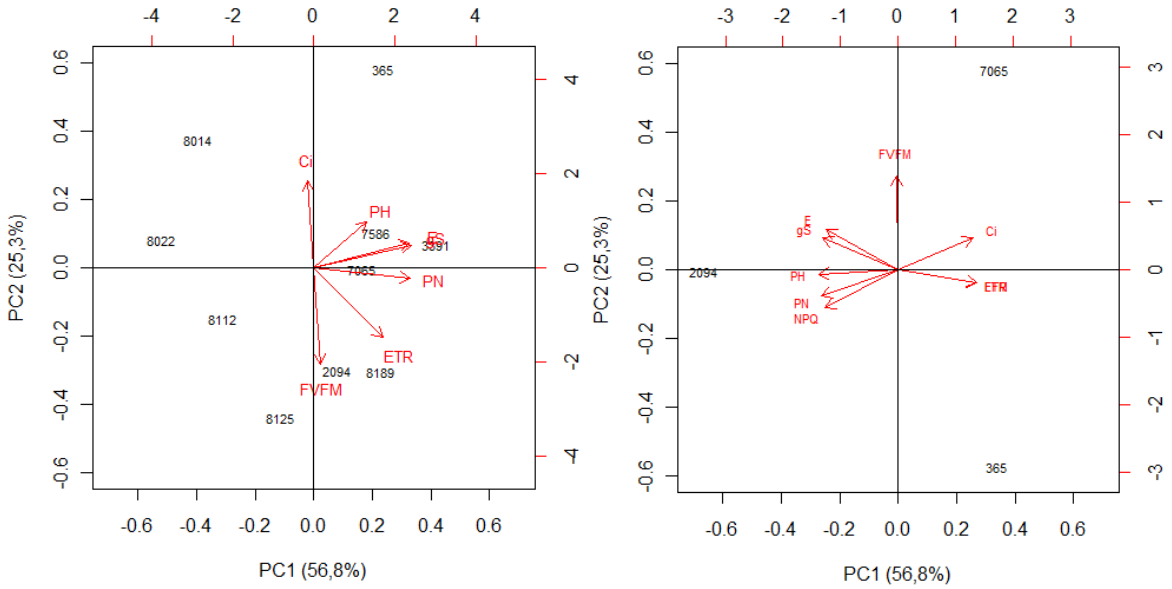


Figura 14 - Análise multivariada dos parâmetros fisiológicos do experimento em campo de 2011 e em casa de vegetação. Valores obtidos são de tratamento de seca relativo ao tratamento controle (déficit hídrico – controle irrigado). Potencial hídrico (PH); assimilação de carbono (PN); transpiração (E); condutância estomática (gS); carbono interno (Ci –carbono intracelular); transporte aparente de elétrons (ETR);coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (NPQ); eficiência quântica potencial do fotossistema II(FVFM); eficiência quântica efetiva do fotossistema II (FFM); 'IACSP01-8112' (8112); 'IACSP03-8014' (8014); 'IACSP03-8022' (8022); 'IACSP03-8125' (8125); 'IACSP03-8189' (8189); 'IACSP94-2094' (2094);'IACSP96-7586' (7586); 'IACSP97-3391' (3391); 'IACSP97-7065' (7065); 'SP 87-365' (365)

4.3 Discriminação Isotópica do ^{13}C

A discriminação isotópica (Δ) do ^{13}C é uma medida útil para avaliar a variação inter- e intra-específica nas trocas gasosas fotossintéticas, podendo estar correlacionada com parâmetros morfofisiológicos associados a tolerância à seca, sendo que o aumento de Δ ocorre em plantas sob condições de déficit hídrico (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989). Durante o ensaio em casa de vegetação, a avaliação da discriminação isotópica do $^{13}C(\Delta^{13}C)$nas cultivares contrastante para o déficit hídrico demonstrou que a cultivar 'IACSP94-2094' apresenta valores maiores de $\Delta^{13}C$ durante o déficit hídrico do que as outras cultivares analisadas, assim como maior variação dessa medida entre os tratamentos (Figura 15).

Baseado em modelos teóricos é possível predizer que a variação de $\Delta^{13}C$ em plantas C_4 depende do vazamento ou escape (*leakiness*), que é afração de CO_2 originalmente fixada pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) no mesofilo, que escapa da bainha retornando ao mesofilo sem ser fixada pela Rubisco (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989). A

medição de escape (*leakiness* - φ) durante o déficit hídrico exibiu padrão distinto para cada cultivar. 'SP87-365' não sofre alteração em φ nos diversos tratamentos, enquanto que 'IACSP94-2094' apresenta φ maior em seca que no controle em todos os períodos de déficit hídrico. A cultivar 'IACSP97-7065' não apresentou φ alterado nos primeiros 15 dias sob déficit hídrico, entretanto, aos 21 dias foi possível observar um aumento significativo dessa medida no tratamento de seca. A relação, concentração intercelular e atmosférica de CO_2 (p_I/p_a) para 'IACSP94-2094' permaneceu inalterada nos tratamentos, sendo que para as outras variedades essa relação foi maior quando sob déficit hídrico, sugerindo uma maior fixação de CO_2.

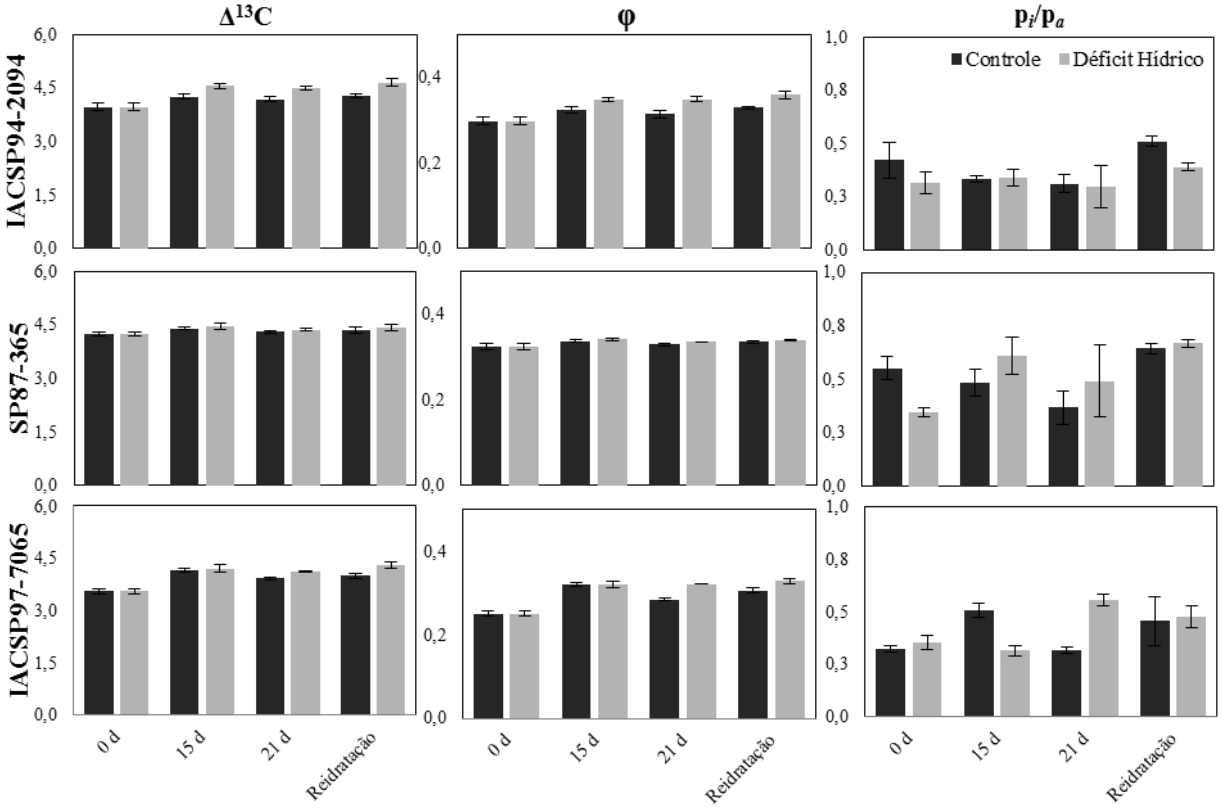


Figura 15 - Discriminação isotópica de carbono ($\Delta^{13}C$), *Leakiness*(φ) e relação carbono interno/carbono atmosférico(p_I/p_a) em experimento de casa de vegetação. Valores de barra indicam n=6

No ensaio em campo sob déficit hídrico, os genótipos responderam de forma distinta ao ensaio de casa de vegetaçãono que se refere a $\Delta^{13}C$. A cultivar 'IACSP96-7586' foi a única que apresentou aumento expressivo de $\Delta^{13}C$ em condições de seca quando comparado ao tratamento controle, conforme esperado. Foi observada queda significativa nos valores de $\Delta^{13}C$sob estresse máximo para os genótipos 'SP87-365', 'IACSP03-8022' e

‘IACSP03-8125’, relativos ao controle. As demais variedades não sofreram alterações entre os tratamentos nos diferentes momentos sob estresse não corroborando as observações feitas em casa de vegetação para as mesmas cultivares (Figura 16).

Nesse mesmo ensaio, houve alteração significativa no escape de CO_2 (*leakiness)*entre os tratamentos para algumas cultivares: ‘IACSP96-7586’ e ‘IACSP03-8125’ apresentaram um aumento nos valores de *leakiness* sob déficit máximo (quarta coleta) quando comparado ao tratamento controle. Por outro lado,‘IACSP03-8022’ e ‘IACSP03-8014’ apresentaram queda no escape a partir da terceira coleta (déficit intermediário), enquanto que ‘SP87-365’ a redução só foi observada sob estresse máximo (Figura 17). Nas demais variedades não houve alteração no *leakiness,* e o comportamento observado em casa de vegetação para ‘IACSP94-2094’ e ‘IACSP97-7065’ não foi confirmado em campo.

A discriminação isotópica é também influenciada pela relação carbono interno (p_I)/ carbono atmosférico (p_a), medida que relaciona o carbono intracelular e o carbono atmosférico, externo à abertura estomática, o que explica as variações nos resultados acima, onde não é regra que uma maior discriminação isotópica leve particularmente, à um maior *leakiness.* Esses resultados demonstram que as variedades classificadas previamente como padrões de tolerância e susceptibilidade não sofreram alterações significativas quanto a discriminação isotópica de ^{13}C e *leakiness* nas condições de campo, contrariando os resultados obtidos em casa de vegetação para essas mesmas cultivares (Figuras 16 e 17).

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre as variedades padrão em campo, enquanto que em casa de vegetação houve diferenças significativas, as análises multivariadas considerando $\Delta^{13}C$, φ e p_i/p_a dos dados obtidos sob estresse máximo nos dois experimentos, agruparam essas variedades de forma similar a anterior, indicando que apesar das diferenças serem menores em campo, elas corroboram os resultados de casa de vegetação (Figura 18).

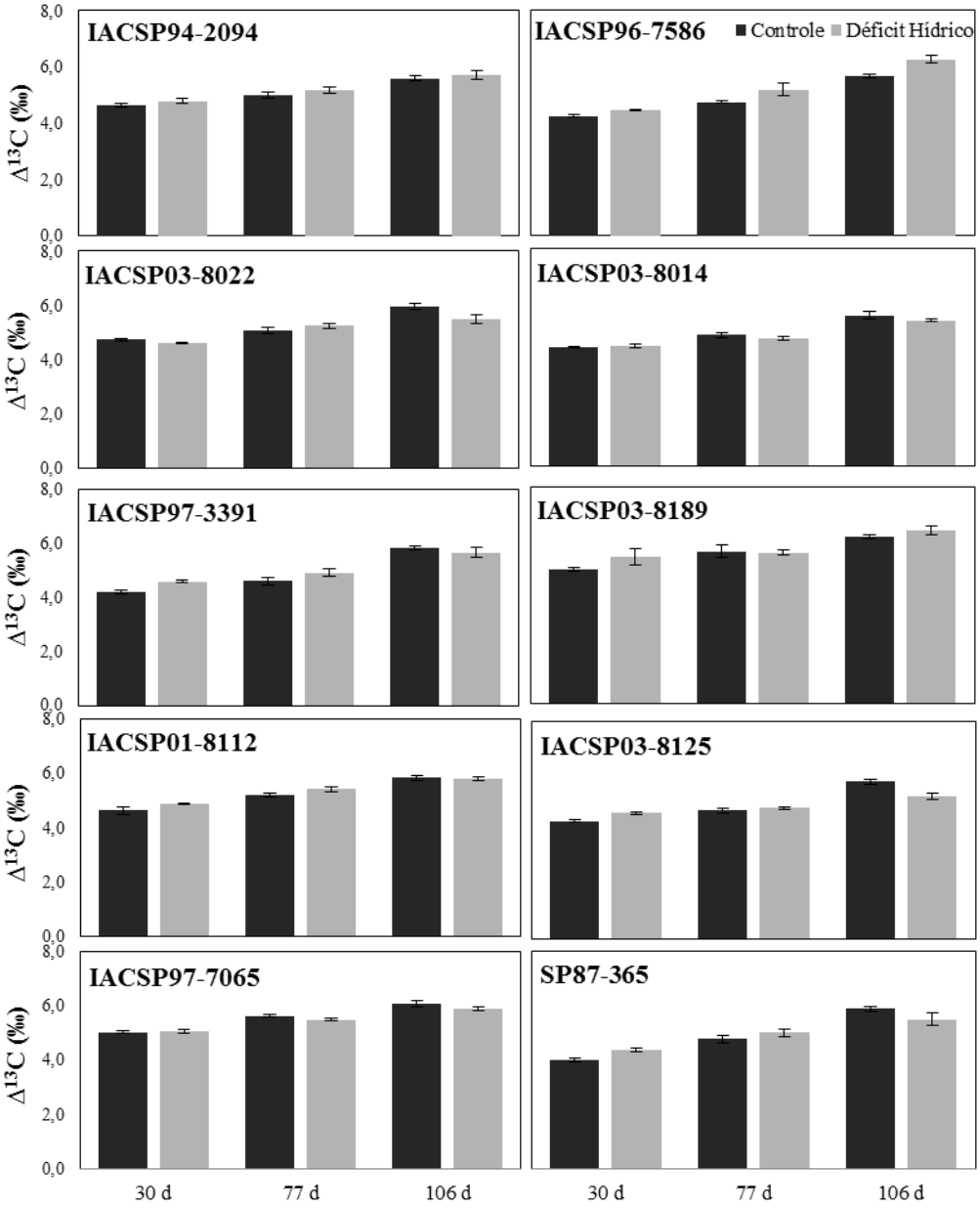


Figura 16 -Discriminação isotópica de ^{13}C em experimento de campo 2010.Valores de barra indicam n=6

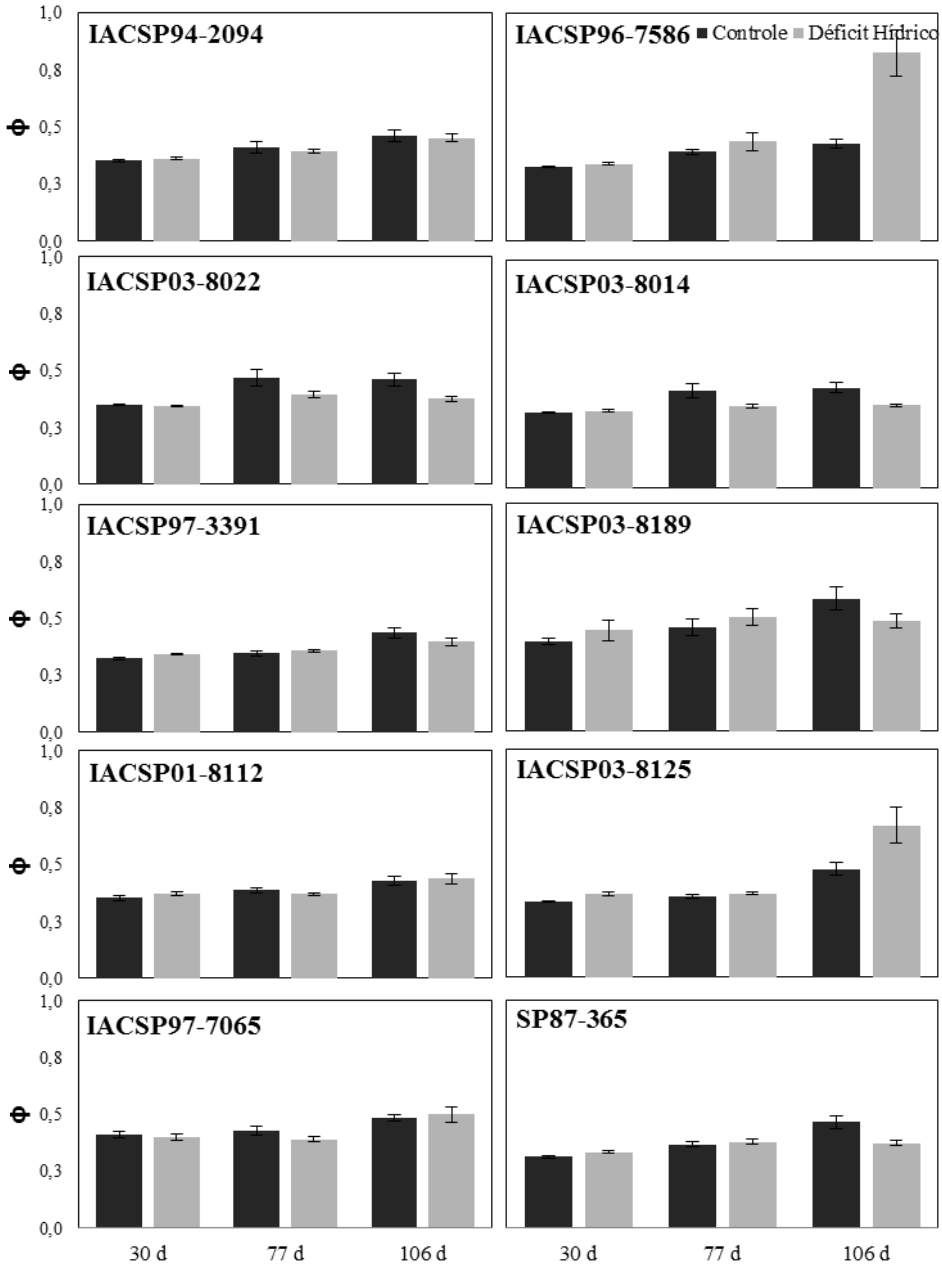


Figura 17 -Valores de *Leakiness*(φ) em experimento de campo de 2010.Valores de barra indicam n=6

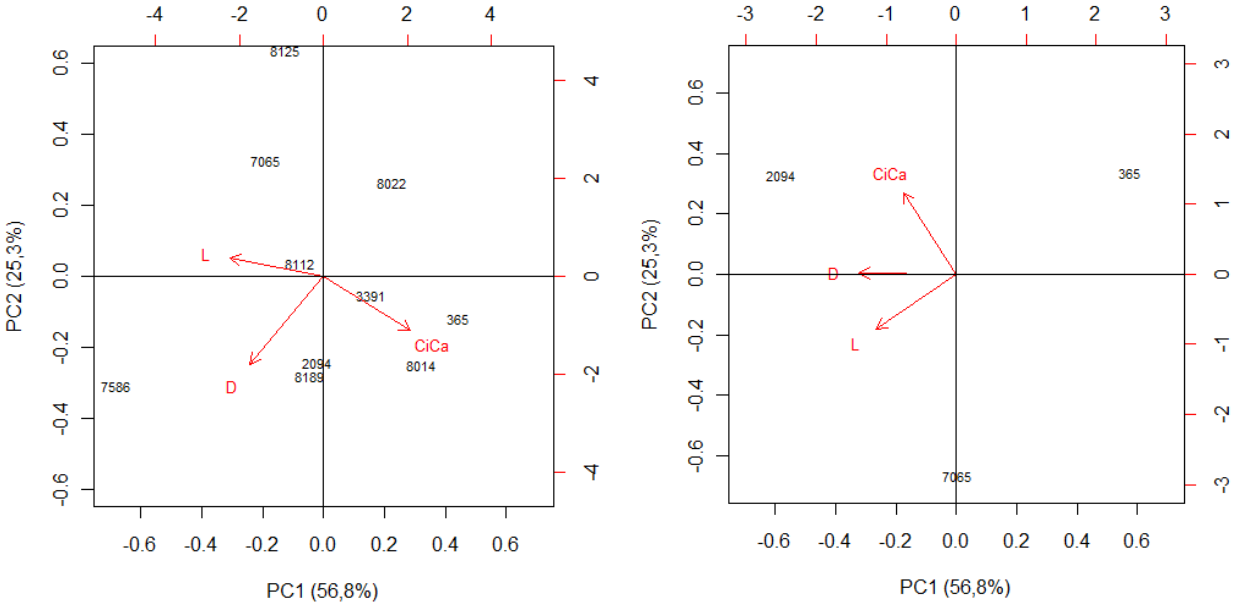


Figura 18 - Análise multivariada deensaio de campo de 2011 (esquerda) e de casa de vegetação (direita). Os parâmetros analisados foram: discriminação isotópica de carbono 13 (D), *Leakiness* (L) e a relação carbono interno/carbono externo (CiCa). Valores obtidos são do tratamento de seca, relativos ao controle (déficit hídrico – controle irrigado)

4.4 Expressão de Genes e Atividade das Enzimas da Via de Descarboxilação da Fotossíntese C_4

São reconhecidas três variações da via fotossintética C_4 diferindo quanto ao ácido de quatro carbonos transportado entre o mesofilo e as células da bainha, e quanto a enzima de descarboxilação presente nas células da bainha, podendo ser enzima málica dependente de $NADP^+$ (NADP:ME); enzima málica dependente de NAD (NAD:ME); ou fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK). O mecanismo padrão de transporte de compostos de quatro carbonos presente na cana-de-açúcar é reconhecido como aquele referente à enzima málica $NADP^+$ (NADP:ME) (BOWYER; LEEGOOD, 1997). Entretanto, estudos recentes em nosso laboratório (CALSA; FIGUEIRA, 2007) sugeriram a possibilidade de ocorrência de mais de um tipo de transporte de compostos C_4, talvez influenciado pelas condições ambientais, como o déficit hídrico. Para avaliar essa hipótese foram feitas análises de expressão dos genes codificadores das enzimas NADP:ME, NAD:ME e PCK assim como ensaios de atividade enzimática.

Evidências anteriores sugeriram que os genótipos testados diferiam para características fisiológicas em resposta ao déficit hídrico. Amostras do ensaio em casa de vegetação foram então empregadas para análise de expressão dos genes referentes às enzimas NAD:ME, NADP:ME e PCK, que caracterizam os diferentes subtipos de enzimas da via de descarboxilação da fotossíntese C_4. Nos genótipos contrastantes para resposta ao déficit hídrico foi observado para 'IACSP94-2094' que houve expressão significativa da via de descarboxilação do tipo PCK além da via NADP-ME sob condições de estresse hídrico (Figura 19). A análise da expressão gênica por RT-qPCR na cultivar 'IACSP94-2094' foi observado aumento no número de transcritos tanto de PCK quanto de NADP:ME, embora a PCK tenha apresentado um número de transcritos relativamente maior que da NADP:ME em condições extremas de seca (Figura 19). A cultivar 'SP87-365', por outro lado, não apresentou variação no número de transcritos para nenhuma das enzimas sob estresse hídrico (Figura 19), enquanto que 'IACSP97-7065' demonstrou aumento na expressão gênica referente a enzima NADP:ME, mas não apresentou variação no número de transcritos para PCK, sugerindo que variações na expressão desse mecanismos alternativo poderia influenciar na tolerância a seca. A ocorrência dessa variação nos transcritos pode indicar uma plasticidade metabólica ligada à alta demanda fotossintética entre as vias do ciclo C_4.

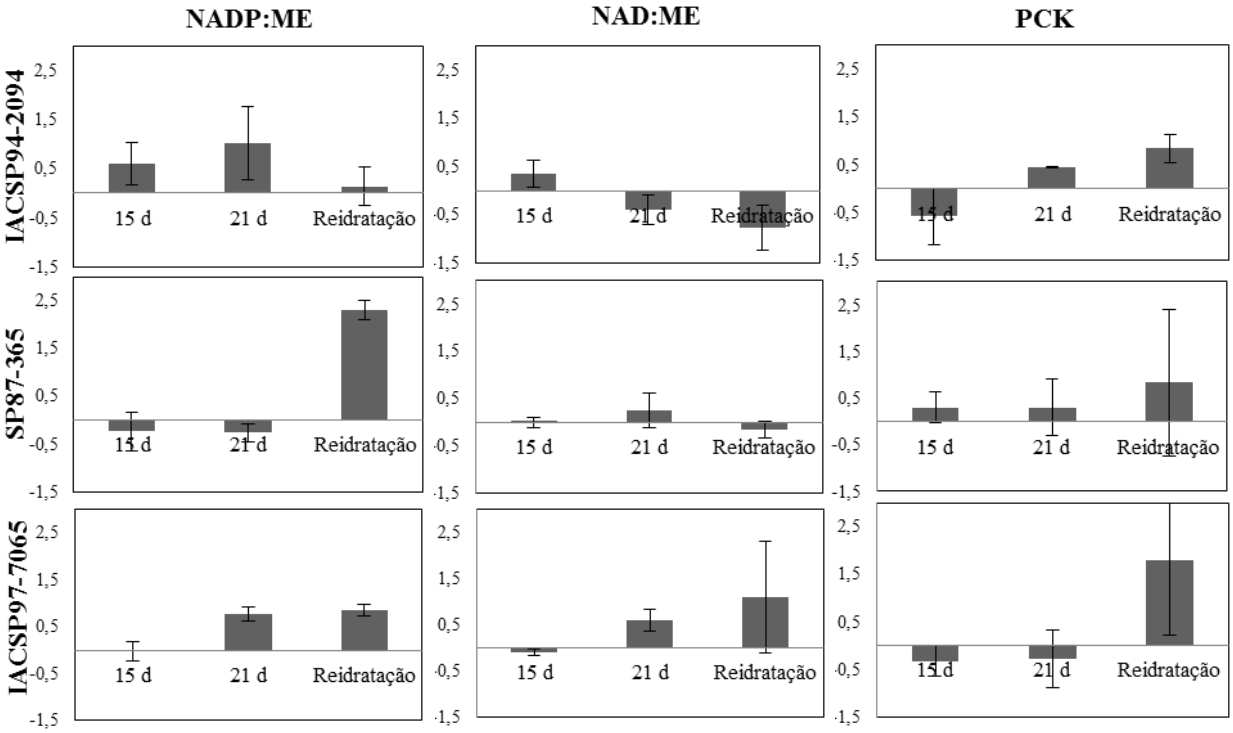


Figura 19 - Expressão gênica referente às enzimas NADP:ME, NAD:ME e PCK. Experimento em casa de vegetação. Dados referentes à expressão dos genes em condição de déficit hídrico em relação aos genes no tratamento controle

A partir desses resultados surgiu a necessidade de obter mais informaçõessobre a expressão desses genes relativos às enzimas envolvidas nas três classes de transporte de carbono nas plantas C_4, sendo,portanto, realizadasanálises de expressão gênica em amostras de 'IACSP94-2094' e 'IACSP97-7065' cultivadas em campo para confirmar a presença do mecanismo de indução da via do tipo PCK. A análise de expressão gênica em campo corroborou os resultados anteriores, com expressão significativamente maior para o gene PCK em 'IACSP94-2094' em relação a 'IACSP97-7065' (Figura 20). Houve acúmulo significativo de transcritos de NAD-ME, NADP-ME e PCK para a cultivar 'IACSP94-2094', enquanto que para 'IACSP97-7065' o acúmulo de PCK não foi significativamente diferente entre déficit e controle, embora os valores da expressão basal do gene codificador da enzima PCK nessa cultivar sejam semelhantes aos valores obtidos na variedade tolerante sob déficit hídrico (Figura 20).

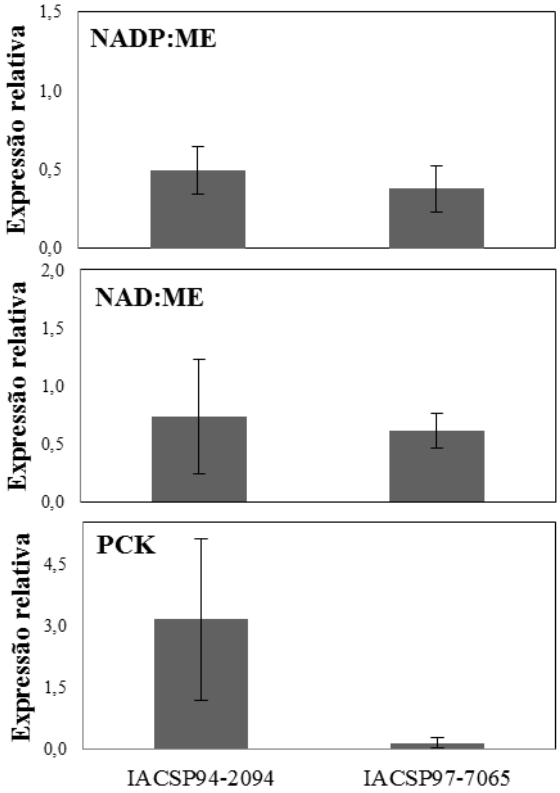


Figura 20 - Expressão gênica do experimento de campo de 2011sob estresse máximo. NADP:ME, NAD:ME e PCK. Dados referentes a expressão das enzimas no déficit hídrico em relação ao controle

Também foram conduzidos ensaios de atividade para as enzimas málicas (NADP:ME e NAD:ME) e PCK para amostras foliares coletadas no ensaio de casa de vegetação dos três genótipos. O ensaio da atividade dessas enzimas indicou que apenas a cultivar tolerante 'IACSP94-2094' apresenta atividade significativamente maior da enzima PCK nas plantas mantidas sob estresse hídrico em relação ao controle para os dois momentos amostrados (15 e 21 dias após suspensão de irrigação; Figura 21). A cultivar 'IACSP94-2094' também apresentou atividade maior da enzima NAD:ME sob máximo estresse aos 21 dias. A cultivar 'IACSP97-7065' apresentou atividade significativamente reduzida para a enzima NADP:ME sob déficit hídrico, não havendo diferença para as demais variedades.Os resultados de atividade enzimáticaconfirmaram a análise de expressão gênica sugerindo haver um mecanismo de indução da via do tipo PCK em condições de déficit hídrico na 'IACSP94-2094', que poderia estar ou não associado a sua maior tolerância a seca.

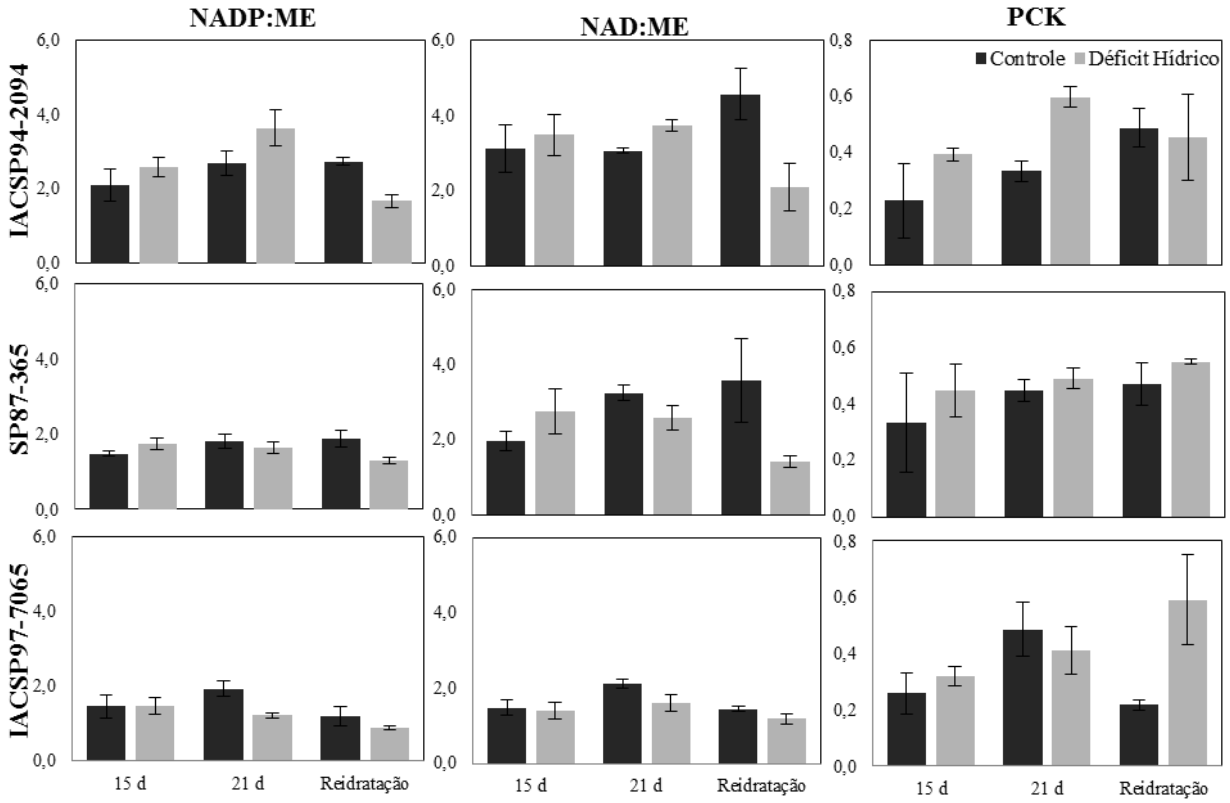


Figura 21 - Atividade enzimática NADP:ME, NAD:ME e PCK em experimento de casa de vegetação. Valores do eixo y em $\mu mol.min^{-1}.mgProt^{-1}$

Para confirmar os resultados em casa de vegetação para atividade enzimática, foram realizados os ensaios específicos das enzimas para as amostras do ensaio de campo. Para os dois anos de experimento, as amostras foliares de 'IACSP94-2094' apresentaram aumento da atividade de PCK sob estresse hídrico quando comparada ao tratamento controle irrigado, enquanto que para as amostras de 'IACSP97-7065' não houve diferenças na atividade de nenhuma enzima entre os tratamentos (Figura 22).

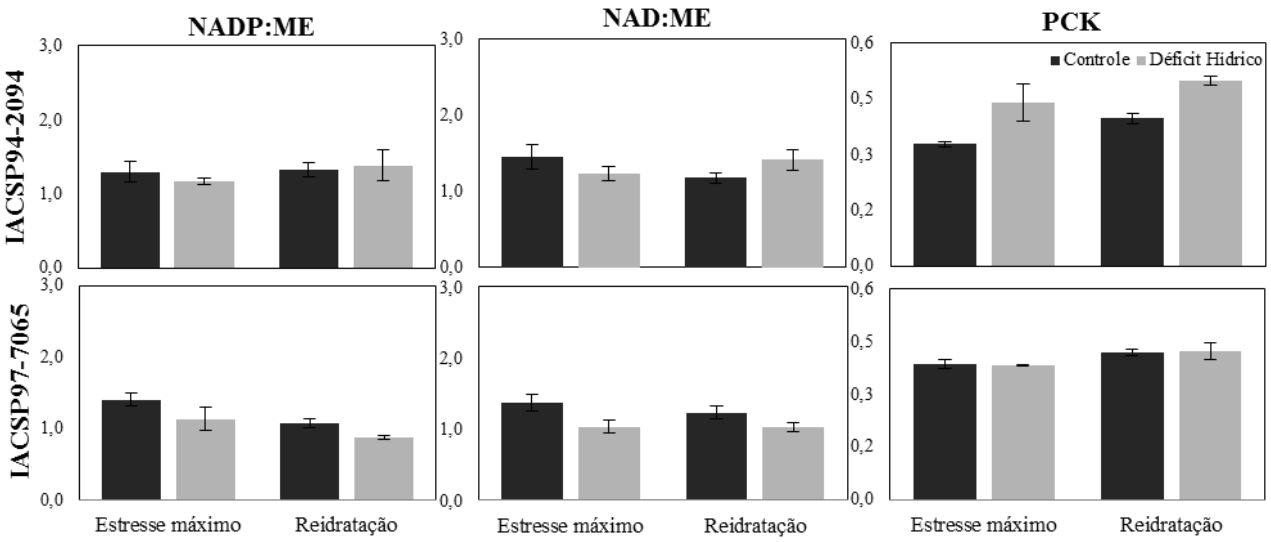


Figura 22 -Atividade enzimática em experimento de campo em 2010. NADP:ME, NAD:ME e PCK. Valores do eixo y em $\mu mol.min^{-1}.mgProt^{-1}$

Os resultados de expressão gênica e atividade das enzimas envolvidas no mecanismo de descarboxilação em fotossíntese do tipo C_4 corroboram os dados fisiológicos e de discriminação isotópica de ^{13}C, sugerindo que 'IACSP94-2094' pode possuir um mecanismo de tolerância a seca provavelmente não presente nas demais variedades analisadas, e que, poderia estar relacionado a uma plasticidade metabólica envolvendo o mecanismo fotossintético C_4 em resposta ao estresse hídrico.

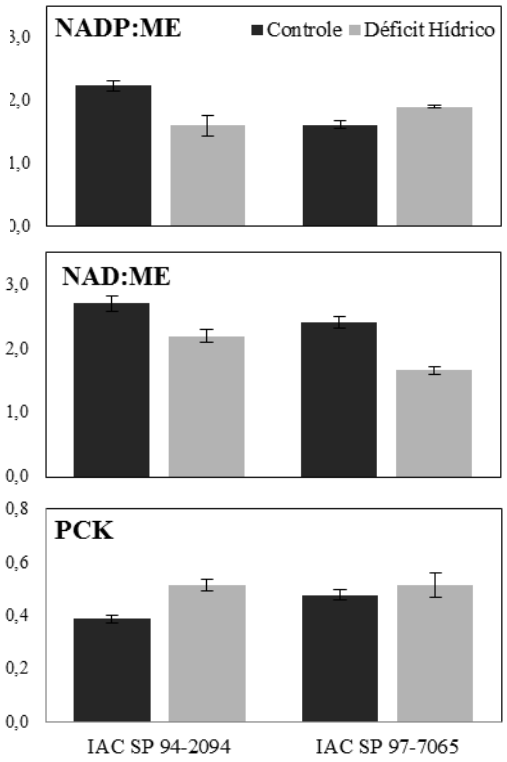


Figura 23 -Atividade enzimática em experimento de campo de 2011 sobestresse máximo. Valores do eixo y em µmol.min^{-1}.mgProt^{-1}

5 DISCUSSÃO

As plantas reagem ao déficit hídrico de maneira coordenada através de alterações em mecanismos fisiológicos e bioquimícos que podem ser controlados por características quantitativas hereditárias em diferentes níveis (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004; SHANKHDHAR; SHANKHDHAR; PANT, 2004; SEKI et al., 2007; MILLER et al., 2010). As análises dos parâmetros fisiológicos demonstraram as adaptações fisiológicas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, sendo que: assimilação de CO_2 (P_N), transpiração (E) e condutância estomática (gS), foram afetados negativamente pela falta de água, onde esses valores diminuíram significativamente em todas as variedades analisadas (Figuras 7, 8 e 10). Essa redução nos valores de P_N, E e gS nas plantas quando submetidos a estresse hídrico também foi observada em diversos outros trabalhos com cana-de-açúcar (BASRA; AHMAD; KHALIQT, 1999; MACHADO, 2009; PEDROZO et al., 2010), demonstrando que esses parâmetros fisiológicos são significativamente influenciados pelo déficit hídrico.

O fechamento dos estômatos, uma das primeiras respostas esperadas em plantas submetidas à deficiência hídrica, resulta da perda de turgor das células-guarda do mesmo (SILVA et al., 2007) e é considerada uma das estratégias para impedir a desidratação excessiva das folhas a partir da redução da assimilação de CO_2 e da perda de água pela transpiração (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; SALIENDRA et al., 1996). Esse mecanismo fisiológico pode ser observado principalmente na variedade considerada sensível ao estresse hídrico, ‘IACSP97-7065’, a qual apresentou no experimento em casa de vegetação valores de P_N próximos de zero, conjuntamente com uma acentuada redução de g_S no estresse máximo (Figura 10). Esses resultados indicam um processo de inibição difusiva, ou seja, menor absorção e menor difusão de carbono entre as células da folha causando inibição da fotossíntese (KAISER, 1987). Entretanto variações no processo de adaptação ao déficit hídrico foram descritaspor Basra et al.(1999) em cana-de-açúcar, sendo que, a variedade de cana-de-açúcar sensível (BL-4) à seca exibiu similar taxa de fotossíntese, porém com maior taxa de transpiração e condutância estomática quando comparado a variedade tolerante (CP 43/33), mostrando assim menor eficiência do uso da água (Figura 11). Em nossos estudos, ambas as variedades (‘IACSP94-2094’ e ‘IACSP97-7065’) apresentaram comportamento semelhante relacionado a condutância estomática em seca, em casa de vegetação e ao longo do primeiro ano do experimento conduzido em campo (Figura 10). Entretanto, durante o segundo ano do experimento de campo, ‘IACSP94-2094’ quando em déficit hídricoapresentou fechamento estomático antecipado em relação a ‘IACSP97-7065’, com

condutância estomática reduzida em relação ao controle irrigado no início da suspensão da irrigação, o que foi observado logo na primeira amostragem realizada no dia 17/06/2011, indicando que essa variedade ('IACSP94-2094') possui um mecanismo diferenciado de tolerância ao estresse hídrico, característica também observada porMachado (2009) para as mesmas cultivares.

A tolerância a seca requer a manutenção das funções da planta sob condições de disponibilidade de água limitadas e/ou a rápida recuperação do status da água na planta depois do estresse, e é determinada pela capacidade de manter a absorção de CO_2 com baixa condutância estomática (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003), características observadas na cultivar 'IACSP94-2094', a qual manteve a assimilação de CO_2 mesmo com uma condutância estomática baixa, em todos os experimentos (Figuras 7 e 10). Com isso a cultivar tolerante não apresentou mudanças entre os tratamentos seca/irrigado quanto a eficiência do uso da água (EUA), chegando a apresentar EUA maior em estresse máximo no segundo ano do experimento em campo, quando comparado ao controle irrigado no mesmo período (Figura 7). O aumento na eficiência do uso da água quando sob estresse por seca é resultado da relação não-linear entre a assimilação de CO_2 e da condutância estomática, onde a perda de água é reduzida antes e mais intensamente que a inibição da fotossíntese (COWAN; FARQUHAR, 1977). A cultivar 'IACSP94-2094' apresentou maior eficiência intrínseca de carboxilação (EIC) dentre as cultivares analisadas em casa de vegetação em condição de máximo déficit hídrico (Figura 11). Os parâmetros EUA e EIC são medidas que fornecem um indicativo da quantidade de carbono assimilada em relação a quantidade de água perdida pela transpiração e quantidade de carbono intracelular respectivamente, e dessa forma podemos considerar que 'IACSP94-2094' demonstra ser tolerante à seca por sercapaz de manter níveis relativamente altos de fotossíntese com menor perda de água quando comparada as demais cultivares.

O acúmulo de matéria seca e a transpiração estão correlacionados uma vez que ambos dependem das trocas gasosas através dos estômatos. Dessa forma, as plantas tendem a equilibrar a necessidade de conservar água e assimilar CO_2 usando controles na área foliar, difusão de CO_2 e vapor de água através do estômato (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Isso pode ser observado através da análise de produtividade realizada no experimento de campo. No primeiro ano de experimento (cana 'planta'), a variedade tolerante não apresentou taxas maiores de produção em nenhum dos tratamentos, sendo 'SP87-365' a que apresentou os maiores valores de produtividade. Entretanto, no segundo ano (cana 'soca'), as cultivares

consideradas padrões para tolerância e sensibilidade se comportaram da forma esperada, ou seja, a produtividade em condições de déficit hídrico foram superiores para a 'IACSP94-2094' e inferiores para 'IACSP97-7065' dentre os 10 genótipos, confirmando assim a escolha prévia desses padrões. Esses resultados reforçam estudos anteriores que determinaram que requerimentos sazonais de água para cana-de-açúcar deriva principalmente da relação entre produção de açúcar e uso da água através da transpiração e evaporação de água do solo, as quais são dependentes da relação genótipo-ambiente (CHAVES, 1991). A recuperação do crescimento vegetal depois da reidratação foi previamente descrita (XU; ZHOU; SHIMIZU, 2009), entretanto, algumas plantas quando submetidas a seca prolongada ou severa podem não alcançar o nível do tratamento controle com a reidratação dependendo do período e intensidade da seca. Nos resultados dos experimentos após a reidratação foi observada a recuperação do estresse hídrico, sendo que, todos os genótipos apresentaram aumentos relevantes na condutância estomática (g_S), assimilação de CO_2 (P_N) e na transpiração (E), EUA e EIC, atingindo os valores observados nas plantas controle (Figuras 7, 8, 10 e 11). Inclusive, valores de EUA na cultivar tolerante ('IACSP94-2094') foram superiores nas plantas submetidas a seca em relação as plantas irrigadas, quando reidratadas, indicando que o mecanismo de tolerância a seca ativado durante o estresse hídrico talvez continue ativo mesmo após a hidratação das plantas. Resultados semelhantes foram encontrados por Machado (2009) e Pedroso (2010), onde as plantas de cana-de-açúcar estressadas conseguiram atingir os valores das plantas controle para esses parâmetros, comprovando a extrema capacidade de recuperação da cana-de-açúcar após a reidratação.

O PSII é considerado uma das partes do aparato fotossintético mais vulneráveis a danos induzidos pela luz, e, dessa forma, quando expostas a seca, as plantas podem sofrer danos fotoquímicos, causando fotoinibição (LONG; HUMPHRIES; FALKOWSKI, 1994), a qual pode ter a função de fotoproteção, dissipando o excesso de energia na forma de calor, minimizando assim o dano ao aparato fotossintético em condições estressantes (BISWAL; BISWAL, 1999). Os valores relacionados a foquímica diminuíram significativamente para todas as cultivares em casa de vegetação (Figuras 12 e 13), indicando a presença de fotoinibiçao sob déficit hídrico. O transporte aparente de elétrons (ETR) reduziu significativamente em todas as variedades de forma semelhante (Figura 12), enquanto que os valores de Coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (*NPQ*) aumentaram expressivamente em seca, indicando que a energia fotoquímica foi em grande parte perdida através de calor. A variedade considerada sensível ('IACSP97-7065') apresentou aumento significativo em NPQ quando em déficit hídrico, antecipadamente em relação as outras

variedades, embora tenha mantido esses valores durante todo o período de seca (Figura 13). Por outro lado, os valores de Eficiência Quântica Potencial do Fotossistema II (F_v/F_M) não sofreram alterações nessa cultivar entre os tratamentos, ao contrário das outras cultivares que apresentaram redução significativa nos valores de (F_v/F_M) no máximo estresse hídrico em relação ao controle irrigado (Figura 13). Em resumo a análise da atividade fotoquímica sugere que os menores valores de eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_M) na 'IACSP94-2094', associado a elevada perda da energia em forma de calor indicam a presença de um mecanismo de fotoproteção eficientenessa variedade durante o déficit hídrico, reduzindo a atividade fotoquímica para evitar a danificação do aparato fotossintético, enquanto que, 'IACSP97-7065' não sofre alterações significativas nas medidas de fluorescência, o que indica uma alta eficiênciadeuso da radiação solar nesse genotipo. Dessa forma, a seca deve influenciar a cultivar 'IACSP97-7065' através de outros fatores que não fotoquímicos.

Durante a reidratação, os genótipos de cana-de-açúcar recuperaram os valores das medidas de fluorescência nos diversos experimentos realizados (PEDROZO, 2010;MACHADO, 2009;INMAN-BAMBER, 1995), demonstrando a plasticidade dos genótipos de cana-de-açúcar em responder a mudanças nas condições hídricas e dando suporte a hipótese de que mecanismos básicos da bioquímica fotossintética e fotoquímica (não-estomática) não são comprometido pelo déficit hídrico moderado, sendo portanto, a regulação da fotossíntese líquida durante o estresse hídrico em cana-de-açúcar realizada principalmente pelo estômato (PEDROZO, 2010).

A tolerância a seca é uma característica complexa que depende de muitos fatores e é determinada por vários processos interativos (MULLER; LUTTSCHWAGER; LENTZSCH, 2010), sendo a discriminação isotópica de carbono uma ferramenta complementar para auxiliar no entendimento da resposta das plantas ao déficit hídrico. Durante experimento em casa de vegetação, a avaliação da discriminação isotópica (Δ) do ^{13}C em genótipos contrastante para o déficit hídrico demonstrou que a cultivar 'IACSP94-2094' apresenta valores maiores de Δ, durante a seca, em relação as outras cultivares analisadas, assim como maior variação dessa medida entre os tratamentos (Figura 15).Entretanto, era esperado que os valores de $\Delta^{13}C$ fossem menores para a cultivar tolerante, uma vez que esta associada com a eficiência do uso da água (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989).Porém, a discriminação isotópica de carbono é influencia por diversos fatores como a relação concentração intercelular e atmosférica de CO_2 (p_I/p_a) e o *leakiness*, que representa a fração

de CO_2 fixada pela fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEPC) no mesofilo, e que ocasionalmente acaba retornando ("vazando") da bainha, voltando ao mesofilo sem ser fixada pela Rubisco (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989). Os valores de (p_I/p_a) permaneceram inalterados nos tratamentos para a cultivar tolerante (Figura 15), sendo que para as outras variedades essa relação foi bem maior quando em seca e, uma vez que (p_I/p_a) é um parâmetro fisiológico que fornece um indicativo da quantidade de CO_2 que está sendo fixada.Uma razão maior para esse parâmetro é um indicativo de que o CO_2 que está chegando àscélulas do mesofilo não deve estar sendo fixado pela fase carboxilativa da fotossíntese. Associado a esses dados, a medição de vazamento (*leakiness*) durante o déficit hídrico para essa cultivar foi alta, sugerindo que a taxa de vazamento tem correlação positiva direta com a alta taxa de discriminação isotópica (Δ) do ^{13}C na cultivar 'IACSP94-2094'. Em experimento realizado em campo, as cultivares tolerante e sensível não apresentaram diferenças significativas no $\Delta^{13}C$ entre os tratamentos.Entretanto, nessas condições, são esperadas respostas diferenciadas em relação a experimento em casa de vegetação, uma vez que em campo as plantas são afetadas por diversos outros fatores (FRYER et al., 1998). Esses resultados corroboram estudos realizados em genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes tipos de estresse, como carência de nitrogênio, déficit hídrico e salinidade, na qual a variação do Δ é governada pelo vazamento de CO_2 da bainha, mediado pelas variações na atividade da Rubisco nessas células e a atividade da PEPC no mesófilo e que tal variação pode estar relacionada à tolerância aos diferentes estresses (MEINZER; ZHU, 1998; SALIENDRA et al., 1996).

As plantas que apresentam subtipo NADP:ME da fotossíntese C_4, são menos afetadas pelas mudanças ambientais uma vez que mantém *leakiness* estável e menor, quando comparado ao tipo PCK e NAD:ME (HATTERSLEY, 1982; BUCHMANN et al., 1996). O "vazamento" é também influenciado pela presença da lamela suberizada envolta da bainha nos tipos NADP:ME e PCK limitando a difusão do CO_2 de volta para o mesofilo, o que não ocorre no tipo NAD:ME uma vez que este não possui esta característica anatômica (HATCH; AGOSTINO; JENKINS, 1995). Com isso, o *leakiness* nos genótipos que possuem o tipo NADP:ME é menor, sendo que os maiores valores são encontrados em espécies NAD:ME. Dessa forma, é esperado que as espécies NADP:ME sejam mais eficientes energeticamente. Entretanto, foi descoberta uma forma alternativa na fotossíntese C_4, onde o tipo PCK é usado por plantas do tipo NADP:ME,como *Zea mays*(FURUMOTO; HATA; IZUI, 1999) e *Flaveria bidentis* (MEISTER; AGOSTINO; HATCH, 1996), indicando uma plasticidade da fotossíntese C_4, onde a relação aspartato:malato translocado nessas plantas varia muito,

possivelmente devido a variações sazonais da irradiação ou outras condições ambientais (MEISTER; AGOSTINO; HATCH, 1996). Entretanto o aspartato pode estar contribuindo para a concentração do CO_2 nas células da bainha nas espécies NADP:ME de duas formas. Primeira, se a PCK estiver presente, OAA produzido pela aspartato aminotransferase pode ser diretamente descarboxilada no citosol, sendo o ATP proveniente do cloroplasto (HATCH, 1987). Alternativamente, o OAA gerado do aspartato pode serreduzido a malato nas células da bainha e então descarboxilado no cloroplasto pela NADP:ME (CHAPMAN; HATCH, 1981). Em resumo, o mecanismo C_4 do tipo NADP:ME modificado, produz aspartato ao invés do malato no mesofilo e, desse modo, o aspartato pode ser reconvertido a OAA e reduzido a malato por descarboxilação pela NADP:ME ou a PCK pode utilizar o OAA diretamente. (Figura 2; MEISTER; AGOSTINO; HATCH, 1996).

As consequências da presença desse mecanismo alternativo na planta ainda não estão claras. De acordo com os resultados de RNAseq obtidos pelo nosso grupo, os níveis de expressão gênica referente a enzima malato desidrogenase (MDH) são maiores em déficit hídrico na variedade 'IACSP94-2094', (dados não mostrados) indicando que o OAA estaria sendo convertido em malato.Entretanto, os baixos níveis de expressão do gene referente a enzima piruvato ortofosfato dikinase (PPDK), indicam que o piruvato não estaria sendo convertido, em quantidades suficientes, em PEP. O maior acúmulo de transcritos para a alanina aminotransferase sugereuma maior atividade dessa enzima pode levar a conversão do piruvato a alanina A alanina aminotransferase tem a função de regenerar 2-oxoglutarato (2-OG) apartir de glutamato, através do acoplamento da conversão de piruvato para alanina (MEISTER; AGOSTINO; HATCH, 1996). Assumindo que 2-OG é necessário para converter aspartato em OAA esses produtos são consistentes com a rota do metabolismo do aspartato. Em gramíneas C_4 do tipo NADP:ME como *Zea mays* e *Sorgum bicolor*, o cloroplasto das células da bainha mostram baixa atividade do PSII (KU et al., 1974; CHAPMAN; BERRY; HATCH,1980), porém a recuperação do malato pelo aspartato como fonte de CO_2 na bainha diminui a transferência de equivalentes reduzidos para essas células. Como o papel do malato na transferência de CO_2 diminui, a atividade do PSII nas células da bainha deve ser aumentada (MEISTER; AGOSTINO; HATCH, 1996). Esse aumento na atividade do PSII deve estar presente na variedade 'IACSP94-2094', quando em déficit hídrico, uma vez que nas análises de *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing* (RNA-seq), ocorre aumento nos níveis de expressão dos genes relacionados as enzimas envolvidas no PSII (dados não mostrados). Na análise de medidas de fluorescência, a cultivar'IACSP94-2094' não

apresentou alteração na atividade do fotossistema II sob déficit hídrico, quando comparada as outras cultivares (Figuras 12 e 13). Portanto, a manutenção da atividade do fotossistema II (PSII) nessa variedade é outro indicativo de atuação da via do aspartado em cana-de-açúcar sob estresse por seca.

Nesse modelo alternativo, provavelmente ocorre a conversão do piruvato para alanina na bainha e reconversão para piruvato no mesofilo, o que permitiria o balanço dos resíduos amino entre os tipos celulares (MEISTER; AGOSTINO; HATCH, 1996). Dessa forma, nas células da bainha, a taxa de produção de alanina a partir de piruvato é suficiente para a produção de mais que um quarto do nitrogênio assimilado, sendo que nessa cultura é considerado que um quarto do total de nitrogênio assimilado está na forma de alanina (VALLE; HELDT, 1991). Se uma descarboxilacao significante do aspartato ocorre na bainha, então deve ser obrigatório que aproximadamente a mesma quantidade de piruvato seja convertida em alanina, a qual deve retornar ao mesofilo para manter um balanço dos grupos amino entre as células (HATCH; OSMOND, 1976).

Essaplasticidade na utilização da enzima NADP:ME ou PCK pode apresentar derivações relacionadas ao requerimento de energia para a fotossíntese em plantas C_4 do tipo NADP:ME. Como discutido acima, a via envolvendo PCK requer ATP para a descarboxilação, o que poderia ser derivado de fontes mitocondriais ou cloroplásticas. Se o ATP for gerado no interior das células da bainha do feixe e o fosfoenolpiruvato for devolvido diretamente para o cloroplasto do mesófilo, o ATP necessário nesse compartimento seria consideravelmente reduzido, dessa forma a plasticidade do processo pode ser visto como uma forma de equilibrar a capacidade energética dos dois compartimentos em diferentes condições ambientais (FURBANK, 2011). O tipo NADP:ME não envolve reações mitocondriais e a descarboxilaçao ocorre exclusivamente no cloroplasto das células da bainha (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001), não sendo observada nenhuma modificação associada ao tipo NAD:ME. Entretanto, no que se refere ao tipo PCK, este nunca foi encontrado separadamente, ou seja, sem a operação da enzima NAD:ME(KANAI; EDWARDS, 1999), apesar de a PCK citosólica ser responsável por fornecer a maior parte do CO_2 fixado pela Rubisco, o que acrescenta um maior gasto de energia no processo (BURNELL; HATCH, 1988). O motivo pelo qual as duas descarboxilases (PCK e NAD:ME) são necessárias nas plantas do tipo PCK não está totalmente desvendado, mas um dos possíveis papeis da NAD:ME deve estar envolvido com a fosforilação oxidativa. Com isso, o NADH produzido pela NAD:ME no tipo PCK é oxidado pela cadeia de transporte de elétrons para produzir

ATP, o qual é utilizado pela PCK para converter OAA para PEP e CO2 (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001).

Considerando esses aspectos é possível inferir quenão existem apenas três tipos de mecanismo de descarboxilação operando individualmente, mas uma plasticidade entre esses mecanismos em plantas C_4 que pode estar relacionada a fatores ambientais. O mecanismo padrão de transporte de compostos de quatro carbonos presente na cana-de-açúcar até agoraé reconhecido como aquele referente enzima málica $NADP^+$ (NADP:ME).Entretanto, essa espécie possivelmente possui ummecanismo alternativo de transporte de compostos C_4 via PCK, o qual pode estar sendo influenciado pelas condições ambientais, como o déficit hídrico (CALSA; FIGUEIRA, 2007). As análises de expressão dos genes referentes as enzimas NADP:ME, NAD:ME e PCK e as medidas da atividade dessas enzimasem cana-de-açúcar indicam a presença da via PCK mais ativa na cultivar 'IACSP94-2094', a qual não estaria presente na variedade 'IACSP97-7065', quando submetidas ao estresse hídrico (Figuras 21-23). Os altos valores de atividade basal da enzima PCK na 'IACSP97-7065'pode estar relacionada a outras funções dessa enzima, a qual tem sido estudada em folhas de plantas C_4 (WALKER; LEEGOOD, 1996), onde sua atividade é modulada pela luz, fosforilação e ligação a adenilatos. Sua atividade descarboxilase é conhecida na gluconeogênese em sementes e folhas de espécies C_4 e CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), mas outras possíveis funções da PCK nas diversas células vegetais podem estar relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, regulação do pH e cataplerose (conversão de metabólitos mitocondriais em intermediários da biossíntese de lipídios).

Esses resultados, associados aosvalores de *leakiness* superiores para essa cultivar em casa de vegetação, sugerem que o déficit hídrico induz a via alternativa de descarboxilação da fotossíntese C_4 na cultivar 'IACSP94-2094'indicando que esse mecanismo é proveniente de variabilidade genética em cana-de-açúcar, ao invés de ser induzida por fatores ambientais, conforme Meister et al. (1996), o qual sugere que a plasticidade da fotossíntese C_4varia muito, possivelmente devido a influencias sazonais da irradiação ou outras condições ambientais ao vez de serem definidas geneticamente.

Embora ainda não se saiba quais os fatores responsáveis pelas diferenças energéticas encontradas entre os três mecanismos, assim como as vantagens de um mecanismo sobre outro, cálculos prévios indicam que, teoricamente, a produção de quantum de energia pelas espécies tipo PCK são em torno de 14 por CO_2 fixado, enquanto que NAD:ME este valor é de 18 sendo potencialmente ainda maiores para NADP:ME (VON CAEMMERER;

FURBANK, 1999). Notavelmente, as vias NAD:ME e PCK possuem requerimentos energéticose número de etapas no transporte intracelular maiores que a via NADP:ME (LANGDALE, 2011). O custo energético no processo de concentração do CO_2 nas células da bainha do feixe, o qual equivale a 2 moléculas de ATP consumida a cada molécula de CO_2 incorporado pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC; HATCH, 1987), resulta que qualquer molécula de CO2 que "escape" das células da bainha sem ser refixada pela rubisco irá reduzir a eficiência da fotossíntese C_4. Os dados obtidos referentes ao *leakiness*na cultivar tolerante 'IACSP94-2094', onde os valores em déficit hídrico para esse parâmetro é expressivamente maior que em condições irrigada (Figura 15), corroboram os resultados de expressão gênica e atividade enzimática, indicando a presença da via PCK alternativa de descarboxilação da fotossíntese C_4, sugerindo uma desvantagem energética na utilização da via alternativa em relação a via NADP:ME. Por outro lado, a ativação desse mecanismo em condições de estresse hídrico, apenas na variedade tolerante, sugere que exista uma vantagem no uso da via PCK em relação à NADP:ME nessas condições.Dessa forma não fica claro a vantagem energética que a cultivar tolerante teria em utilizar o mecanismo PCK alternativo ao invés de usar o mecanismo NADP:ME, entretanto, a ativação desse mecanismo alternativo pela planta,poderiaevitar a produção de energia em excesso, minimizando assim a formação de espécies reativas de oxigênio, o que poderia representar uma vantagem em condições de déficit hídrico.

Os dados apresentados no presente trabalho sugerem que o mecanismo alternativo de descarboxilaçao é induzido pelo déficit hídrico, podendo ser utilizado para a seleção de híbridos, considerando a variabilidade genética no controle desse mecanismo.

6 CONCLUSÕES

As análises fisiológicas comprovaram o melhor desempenho do genótipo 'IACSP94-2094' à condição de seca.

A discriminação isotópica de carbono 13 ($\Delta^{13}C$) e "escape"(φ) mostraram variações significativas entre os genótipos contrastantes quanto à tolerância a seca quando em experimento de casa de vegetação, indicando serem ferramentas úteis para seleção.

As análises de expressão gênica e atividade das enzimas relacionadas aos mecanismos de descarboxilação em plantas C_4 sugerem a indução, pelo déficit hídrico, de um mecanismo alternativo através da enzima PCK em cana-de-açúcar, presente no genótipo tolerante ao estresse por seca.

REFERÊNCIAS

ANGELOCCI, L.R. **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera**: Introdução ao tratamento biofísico. Piracicaba:Esalq/USP, 2002. 272p.

BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1607-1621, 2004.

BASRA, S.M.; AHMAD, N.; KHALIQT, A. Water relation studies in water stressed sugarcane (*Saccharumofficinarum* L.).**International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad,v.1, n.1/2, p.1-4, 1999.

BISWAL, B.; BISWAL, U.C. Photosynthesis under stress: Stress signals and adaptive response of chloroplasts. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress.** New York: Marcel Dekker, 1999. p.315-336.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.**Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.2, p.48–54, 1997.

BÒLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. (Ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment.** London: Chapman & Hall, 1993. p. 193-206.

BORSANI, J.; BUDDE, C.O.; PORRINI, L.; LAUXMANN, M.A.; LOMBARDO, V.A.; MURRAY, R.; ANDREO, C.S.; DRINCOVICH, M.F.; LARA, M.V. Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modification. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 1823-1837, 2009.

BOWLING, D.R.; MCDOWELL, N.G.; BOND, B.J.; LAW, B.E.; EHLERINGER, J.R. ^{13}C content of ecosystem respiration is linked to precipitation and vapor pressure deficit. **Oecologia**, Berlin, v.131, p.113-124, 2002.

BOWMAN, W.D.; HUBICK, K.T.; CAEMMERER, S. von; FARQUHAR, G.D. Short-term changes in leaf carbon isotope discrimination in salt- and water-stressed C_4 grasses.**Plant Physiology**, Rockville, v.90, p.162-166, 1989.

BOWYER, J.R.; LEEGOOD, R.C. Photosynthesis. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.) **Plant biochemistry**. 1.ed. San Diego: Academic Press, 1997. cap.2, p.49-110.

BUCHMANN, N.; BROOKS, J.R.; RAPP, K.D.; EHLERINGER, J.R. Carbon isotope composition of C4 grasses is influenced by light and water supply. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 19, p. 392-402, 1996.

BURNELL, J.N.; HATCH, M.D. Photosynthesis in phosphoenolpyruvatecarboxykinase-type C4 plants: Pathways of C4 acid decarboxylation in bundle sheath cells of Urochloapanicoides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 260, p. 187–199, 1988.

BYRT, C.; GROF, C.P.; FURBANK, R.T. C_4 plants as biofuel feedstocks: optimising biomass production and feedstock quality from a lignocellulosic perspective. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 53, n.2, p. 120-135, 2011.

CAEMMERER, S. von; FURBANK, R.T. Modeling of C4 photosynthesis.In: SAGE, R.; MONSON, R.K. (Ed.). **C_4 plant biology**.London: Academic Press, 1999. p. 173-211.

CAEMMERER, S. von;FURBANK, R.T. The C_4 pathway: an efficient CO_2 pump. **Photosynthesis Research**, Hague, v.77, p.191–207, 2003.

CALSAJUNIOR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C_4 metabolism and putative antisense transcripts.**Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.63, p.745-762, 2007.

CATIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCIA, E.; MARÉ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.105, p.1-14, 2008.

CHAPMAN, K.S.R.; HATCH, M.D. Aspartate decarboxylation in bundle sheath cells of Zea mays and its possible contribution to C4 photosynthesis.**AustralianJournal of Plant Physiology**, Melbourne, v.8, p.237–248, 1981.

CHAPMAN, K.S.R.; BERRY, J.A.; HATCH, M.D. Photosynthetic metabolism in the bundle sheath cells of the C4 species Zea mays: sources of ATP and NADPH and the contribution of photosystem II. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 202, p. 330-341, 1980.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 42, p. 1-16, 1991.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant.**Functional Plant Biology**, Collingwood, v.30, p.239-264, 2003.

COMSTOCK, J.P. Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration.**Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 195-200, 2002.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 187-188, 2000.

CORNIC, G.; GHASHGHAIE, J.; GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M. Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. **Photosynthetica**, Dordrecht, v.27, p.295-309, 1992.

COWAN, I.R.F.; FARQUHAR, G. Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. **Symposia for the Society of Experimental Biology**, Cambridge, v.31, p.471-505, 1977.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide.**GeochimicaetCosmochimicaActa**, New York, v. 12, p. 133-149, 1957.

DERCON, G.; CLYMANS, E.; DIELS, J.; MERCKX, R.; DECKERS, J. Differential ^{13}C isotopic discrimination in maize at varying water stress and at low to high nitrogen availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 282, p. 313-326, 2006.

DR. MARCOS GUIMARÃES DE ANDRADE LANDELL, diretor do Programa Cana IAC (Procana), Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Cana, Instituto Agronômico (IAC), Ribeirão Preto/SP, Brasil. time PCR. Nucleic Acids Res 30:e36.

EDWARDS, G.E.; BAKER, N.R. Can CO_2 assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? **Photosynthesis Research**, Hague, v. 37, p. 89-102, 1993.

EDWARDS, G.E.; FRANCESCH, V.R.; VOZNESENKAYA, E.V. Single cell C4 photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm.**Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.55, p. 173-196, 2004.

EFEOGLU, B.; EKMEKÇI.; ÇIÇEK, N. Physiological responses of three mayze cultivars to drought stress and recovery. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.75, p.34-42, 2009.

EHLENRIGER, J.R.; COOPER, T.A. On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs.**Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.15, p.301-306, 1992.

FARIA, T.; SILVERIO, D.; BREIA, E.; CABRAL, R.;ABADIA, A.; ABADIA, J.; PEREIRA, J.S.; CHAVES, M.M. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. **PhysiologiaPlantarum**, Copenhagen, v.102, p.419-428, 1998.

FARQUHAR, G.D. On the nature of carbon isotope discrimination in C4 species.**AustralianJournal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 10, p. 205-226, 1983.

FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J.R.; HUBICK, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis.**Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 503-537, 1989.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C_3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, London, v.89, p.183-190, 2002.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; BOTA, J.; GALMES, J.; HENKLE, M.; MARTINEZ-CANELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO2 concentration. **New Phytologist**, London, v.172, p. 73-82, 2006.

FRYER, M.J.; ANDREWS, J.R.; OXBOROUGH, K.; BLOWERS, D.A.; BAKER, N.R. Relationship between CO_2 assimilation, photosynthetic electron transport, and active O_2 metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 571-580, 1998.

FURBANK, R.T. Evolution of the C4 photosynthesis mechanism: are there really three C4 acid decarboxylation types? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3103-3108, 2011.

FURBANK, R.T.; HATCH, M.D. Mechanism of C_4 photosynthesis: the size and composition of the inorganic carbon pool in bundle sheat cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 958-964, 1987.

FURUMOTO, T.; HATA, S.; IZUI, K. cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvatecarboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme.**Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, p. 301–311, 1999.

GHANNOUM, O.; CONROY, J.P.; DRISCOLL, S.P.; PAUL, M.J.; FOYER, C.H.; LAWLOR, D.W. Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C_4 grasses. **New Phytologist**, London, v. 159, p. 599-608, 2003.

GOWER, J.; LUBBLE, S.; ROUX, N.**Understanding biplots**. New York: John Wiley & Sons, 2011.

HATCH, M.D. C_4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. **BiochimicaetBiophysicaActa**, Amsterdam, v.895, p.81–106, 1987.

HATCH, M.D.; SLACK, C.R. Photosynthesis in sugarcane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. **Biochemical Journal**, London, v.101, p.103–111, 1966.

HATCH, M.D.; AGOSTINO, A.; JENKINS, C.L.D. Measurements of leakage of CO_2 from bundle sheath cells of leaves during C_4 photosynthesis.**Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 173-181, 1995.

HATCH, M.D.; KAGAWA, T.; CRAIG, S. Subdivision of C_4-pathway species based on differing C4 decarboxylating systems and ultrastructural features.**Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 2, p. 111–128, 1975.

HATCH, M.; OSMOND, C. Transport in plants III. Berlin: Springer, 1976.

HATTERSLEY, P.W. $\delta^{13}C$ values of C_4 types in grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 9, n. 1, p. 39-54, 1982.

HATTERSLEY, P.W.; WATSON, L. C4 grasses: an anatomical criterion for distinguishing between NADP-Malic enzyme species and PCK or NAD-Malic enzyme species. **Australian Journal Botany**, Melbourne, v.24, p.297-308, 1976.

HENDERSON, S.; CAEMMERER, S. von; FARQUHAR, G.D.; WADE, L.; HAMMER, G. Correlation between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in lines of the C4 species Sorghum bicolor in the glasshouse and the field. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, p. 111–123, 1998.

INMAN-BAMBER, N.G.A growth model for sugar-cane based on a simple carbon balance and the CERES-maize water balance.**South African Journal ofPlant and Soil**, Pretoria, v.8, p.93–99, 1991.

INMAN-BAMBER, N. Automatic plant extension measurement in sugarcane in relation to temperature and soil moisture.**Field Crops Research**, Amsterdam, v. 42, p. 135-142, 1995.

INMAR-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficits.**Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 185-202, 2005.

JOHNSON, G.N.; YOUNG, A.J.; SCHOLES, J.D.; HORTON, P.The dissipation of excess excitation energy in British plant species.**Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 16, p. 673-679, 1993.

JONES, H.G. **Plants and microclimate**: a quantitative approach to environmental plant physiology. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

KAISER, W.M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity.**PhysiologiaPlantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 142-149, 1987.

KANAI.R.; EDWARDS, G.E.The biochemistry of C4 photosynthesis. In: SAGE, R.F.; MONSON, R.K. (Ed.).**C_4 plant biology**. London: Academic Press, 1999. p. 49–87.

KU, S.B.; GUTIERREZ, M.; KANAI, R.; EDWARDS, G.E.Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of C 4 plants: chlorophyll and Hill reaction studies. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 72, p. 320-337, 1974.

LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; VASCONCELOS, A.C.M.; XAVIER, M.A.; BIDOIA, M.A.P.; PRADO, H.; SILVA, M.A.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; SANTOS, A.S.; PERECIN, D.; ROSSETTO, R.; SILVA, D.N.; MARTINS, A.L.M.; GALLO, P.B.; KANTACK, R.A.D.; CAVICHIOLl, J.C.; VEIGA FILHO, A.A.; ANJOS, I.A.; AZANIA, C.A.A.M.; PINTO, L.R.; SOUZA, S.A.C.D. **Variedades de cana-de-açúcarpara o Centro-Sul do Brasil**. Campinas: InstitutoAgronômico, 2005. 33 p. (IAC.BoletimTécnico, 197).

LANGDALE, J.A. C_4 cycles: past, present, and future research on C_4 photosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, 2011. Disponívelem: http://www.plantcell.org/content/early/2011/11/24/tpc.111.092098.full.pdf+html.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.W.; FALKOWSKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature.**Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 633-662, 1994.

LUDLOW, M.M. Strategies of response to water stress. In: KREEB, K.H.; RICHTER, H.; HINCKLEY, T.M.(Ed.).**Structural and functional responses to environmental stresses**.The Hague: SPB Academic, 1989. p. 269-281.

MACHADO, R.S. **Respostas fisiológicas de genótipos de cana-de-açúcar ao deficit hídrico imposto na fase inicial de desenvolvimento.** 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2009.

MALKIN, R.; NIYOGI, K. Photosynthesis. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3. ed. Rockville: American society of Plant Biologists, 2001. cap. 12, p.568-628.

MARTÍN, M.; RIUS, S.P.; PODESTÁ, F.E. Two phosphoenolpyruvatecarboxykinases coexist in the Crassulacean Acid Metabolism plant *Ananascomosus*. Isolation and characterization of the smaller 65 kDa form. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.49, p. 647-653, 2011.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence - a practical guide.**Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 659-668, 2000.

MCCORMICK, A.J.; CRAMER, M.D.; WATT, D.A. Changes in photosynthetic rates and gene expression if leaves during a source-sink perturbation in sugarcane. **Annals of Botany**, London, v. 101, p. 89-102, 2008.

MEINZER, F.C.; PLAUT, Z.; SALIENDRA, N.Z. Carbon isotope discrimination, gas exchange, and growth of sugarcane cultivars under salinity.**Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 521-526, 1994.

MEINZER, F.C.; SALIENDRA, N.Z. Spatial patterns of carbon isotope discrimination and allocation of photosynthetic activity in sugarcane leaves.**Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 24, p. 769-775, 1997.

MEINZER, F.C.; ZHU, J. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C_4 CO_2 concentrating system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 1227-1234, 1998.

MEISTER, M.; AGOSTINO, A.; HATCH, M.D.The roles of malate and aspartate in C4 photosynthetic metabolism of *Flaveriabidentis* (L.).**Planta**, Berlin, v.199, p.262–269, 1996.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses.**Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.33, p.453–467, 2010.

MONNEVEUX, P.; SHESHSHAYEE, M.S.; AKHTER, J.; RIBAUT, J.M. Using carbon isotope discrimination to select maize (*Zea mays* L.) inbred lines and hybrids for drought tolerance. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, p. 390-396, 2007.

MONTANARO, G.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. Response of photosynthetic machinery of field-grown kiwifruit under Mediterranean conditions during drought and rewatering.**Photosynthetica**, Dordrecht, v. 45, n. 4, p. 533-540, 2007.

MORGAN, J.M. Osmoregulation and water estress in higher plants.**Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v. 35, p. 299-319, 1984.

MULLER, T.; LUTTSCHWAGER, D.; LENTZSCH, P. Recovery from drought stress at the shooting stage in oilseed rapre (*Brassica napus*).**Journal of Agronomy & Crop Science**, New York, v.196, p.81-89, 2010.

MUSS, R. Why measure osmotic adjustment? **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.15, p.717-726, 1988.

NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 333-359, 1999.

ORT, D.R.When there is too much light.**Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 29-32, 2001.

PEDROZO, C.A. **Morphophysiological and molecular responses of sugarcane genotypes to water stress.** 2010. 67p. Thesis (Doctor Scientiae) - Federal University of Viçosa, Viçosa, 2010.

PEISKER, M.; HENDERSON, S.A. Carbon: terrestrial C_4 plants. **Plant, Cell and Environment,** Oxford, v. 15, p. 987-1004, 1992.

PELTZE, R.D.; DREYER, E.; POLLE, A. Temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species.**Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 141–50, 2002.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for groupwise comparison and statistical analysis of relative expression results in real- real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v.30, e.36, 2002.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004. 191 p.

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2010. Disponívelem: <http://www.r-project.org/>.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; SPIRONELLO, A.; PENATTI, C.P.; MORELLI, J.L.; FILHO OLARNDO, J.; LANDELL, M.G.A.; ROSETTO, R. Cana-de-açúcar. In: VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1996. p. 237-239.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants.**Journal of Plant Physiology**,Stuttgart, v. 161, p. 1189–1202, 2004.

ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA-JUNIOR, M.Y.; VENCIO, R.Z.N.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.; VINAGRE, F.; MEDEIROS, A.; DI MAURO, S.M.Z.; ULIAN, E.C.; DE ROSA JUNIOR, V.E.; HEMERLY, A.S.; FIGUEIRA, A.; SILVA-FILHO, M.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**.London, v. 8, p. 71,2007.doi:10.1186/1471-2164-8-71.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, Dordrecht, v. 40, p. 13-29, 2002.

ROSE, C.W. **Agricultural physics**. Oxford: Pergamon Press, Oxford, 1966. 226 p.

SAGE, R.F.The evolution of C_4 photosynthesis.**New Phytologist**, London, v. 161, p. 341–370, 2004.

SALIENDRA, N.Z.; MEINZER, F.C.; PERRY, M.; THOM, M. Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO_2, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 907-914, 1996.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses.**Current Opinion in Plant Biology**,London, v. 10, p. 296–302, 2007.

SHANKHDHAR, D., SHANKHDHAR, S.C. AND PANT, R.C. Osmoprotectants: an overview. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, India, v. 10, p. 167–180, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; LIU, Q.; KASUAGA, M.; ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; URAO, T.; MIYATA, S.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z.K.; ABE, H.; SAKUMA, Y.; ITO, T.; SEKI, M. Molecular responses to drought stress in plants: regulation of gene expression and signal transduction. In: SMALLWOOD, M.F.; CALVERT, C.M.; BOWLES, D.J. (Ed.).**Plant responses to environmental stress**. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1999. p. 133–143.

SILVA, M.A.; JIFON, J.L.; DA SILVA, J.A.G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.19, n. 3, p. 193-201, 2007.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.98, p.91-97, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TRONCONI, M.A.; FAHNENSTICH, H.; WEEHLER, M.C.G.; ANDREO, C.S.; FLUGGE, U.I.; DRINCOVICH, M.F.; MAURINO, V.G. Arabidopsis NAD-Malic Enzyme Functions as a Homodimer and Heterodimer and Has a Major Impact on Nocturnal Metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 1540-1552, 2008.

TURNER, N.C. Crop water deficits: a decade of progress. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 39, p. 1-51, 1986.

ÚNICA.Estimativa de safra e tabela comparative 2011/2012. Disponível em: http://www.portalunica.com.br. Acessoem: 10 jul. 2012.

VALLE, E.M.; HELDT, H.W. Alanina synthesis by bundle sheath cells of maize.**Plant Physiology**, Rockville, v. 95, p. 839-845, 1991.

WALKER, R.P.; LEEGOOD, R.C. Phosphorylation of phosphoenolpyruvatecarboxykinase in plants.Studies in plants with C4 photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism and in germination seeds.**Biochemical Journal**, London, v. 317, p. 653-658, 1996.

WALKER, R.P.; ACHESON, R.M.; TÉCSI, L.I.; LEEGOOD, R.C. PhosphoenolpyruvateCarboxykinase in C_4 Plants: Its Role and Regulation. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 24, p. 459-468, 1997.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years.**Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.17, n.12, p.482-487, 1999.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 13, p. 3737-3749, 2009.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance.**Photosynthetica**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 171-186, 2000.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance.**Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, special issue, p. 187-206, 2003.

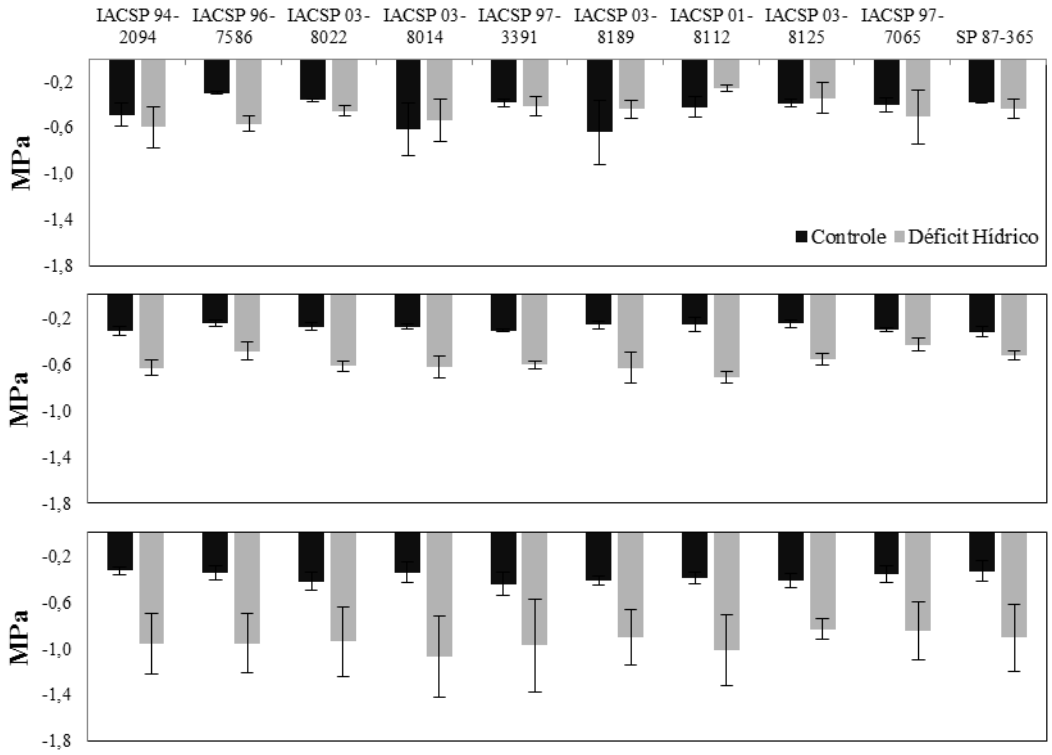
ANEXOS

Anexo A - Disposição das parcelas nos campos de sequeiro e irrigado na Fazenda Revolta, Usina Jalles Machado, onde foi instalado o experimento de seca em campo. Números de 1 a 30 indicam o número das parcelas

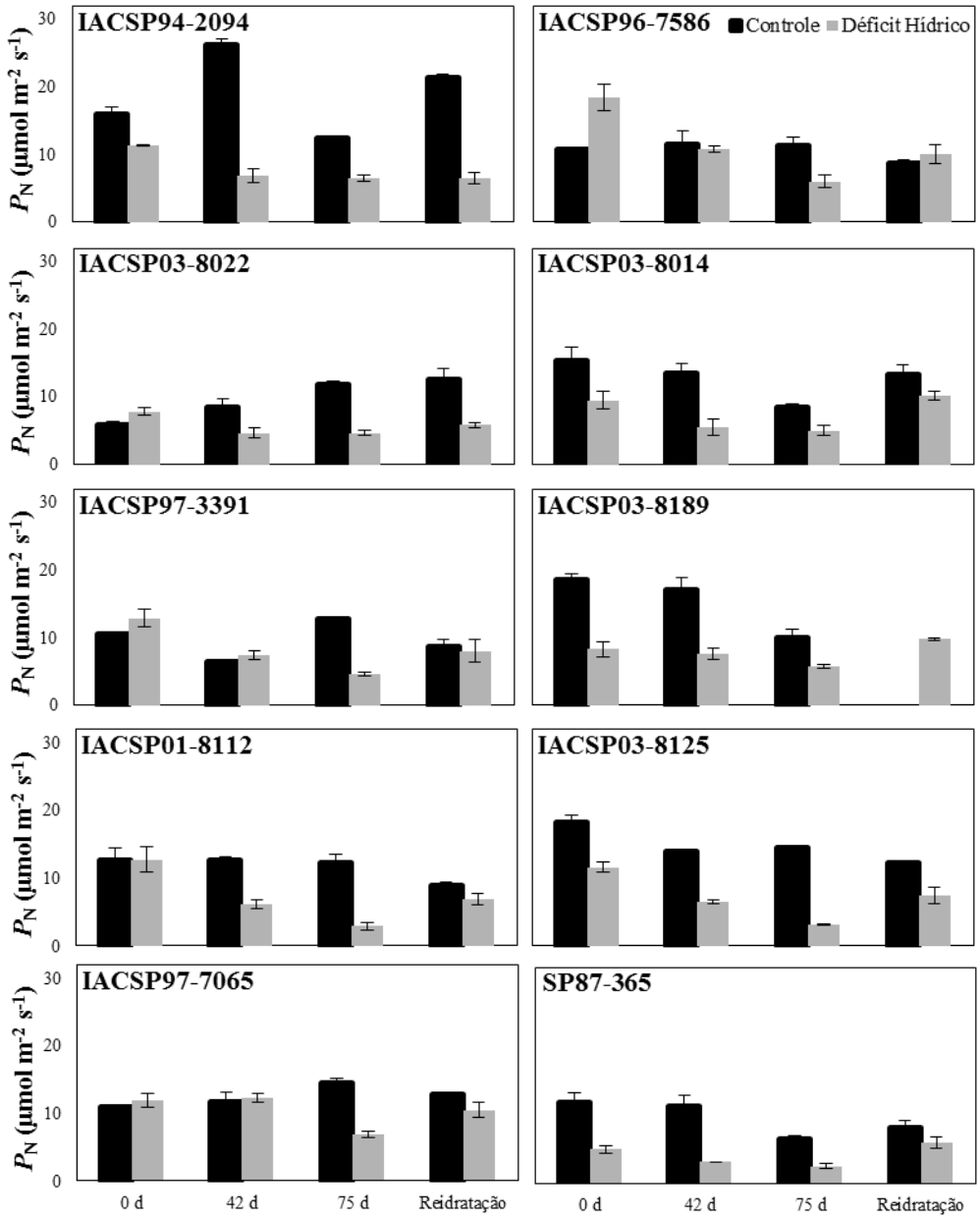
29	30
IACSP 03-8189	SP 365
28	27
IACSP 96-7586	IACSP 01-8112
25	26
IACSP 97-3391	IACSP 03-8022
24	23
IACSP 94-2094	IACSP 03-8014
21	22
IACSP 03-8125	IACSP 97-7065
Bloco 3	
20	19
IACSP 03-8125	IACSP 03-8014
17	18
IACSP 96-7586	SP 365
16	15
IACSP 94-2094	IACSP 01-8112
13	14
IACSP 03-8189	IACSP 03-8022
12	11
IACSP 97-3391	IACSP 97-7065
Bloco 2	
9	10
IACSP 03-8189	SP 365
8	7
IACSP 96-7586	IACSP 01-8112
5	6
IACSP 97-3391	IACSP 03-8022
4	3
IACSP 94-2094	IACSP 03-8014
1	2
IACSP 03-8125	IACSP 97-7065
Bloco 1	
Campo Irrigado	

29	30
IACSP 03-8189	SP 365
28	27
IACSP 96-7586	IACSP 01-8112
25	26
IACSP 97-3391	IACSP 03-8022
24	23
IACSP 94-2094	IACSP 03-8014
21	22
IACSP 03-8125	IACSP 97-7065
Bloco 3	
20	19
IACSP 03-8125	IACSP 03-8014
17	18
IACSP 96-7586	SP 365
16	15
IACSP 94-2094	IACSP 01-8112
13	14
IACSP 03-8189	IACSP 03-8022
12	11
IACSP 97-3391	IACSP 97-7065
Bloco 2	
9	10
IACSP 03-8189	SP 365
8	7
IACSP 96-7586	IACSP 01-8112
5	6
IACSP 97-3391	IACSP 03-8022
4	3
IACSP 94-2094	IACSP 03-8014
1	2
IACSP 03-8125	IACSP 97-7065
Bloco 1	
Campo Sequeiro	

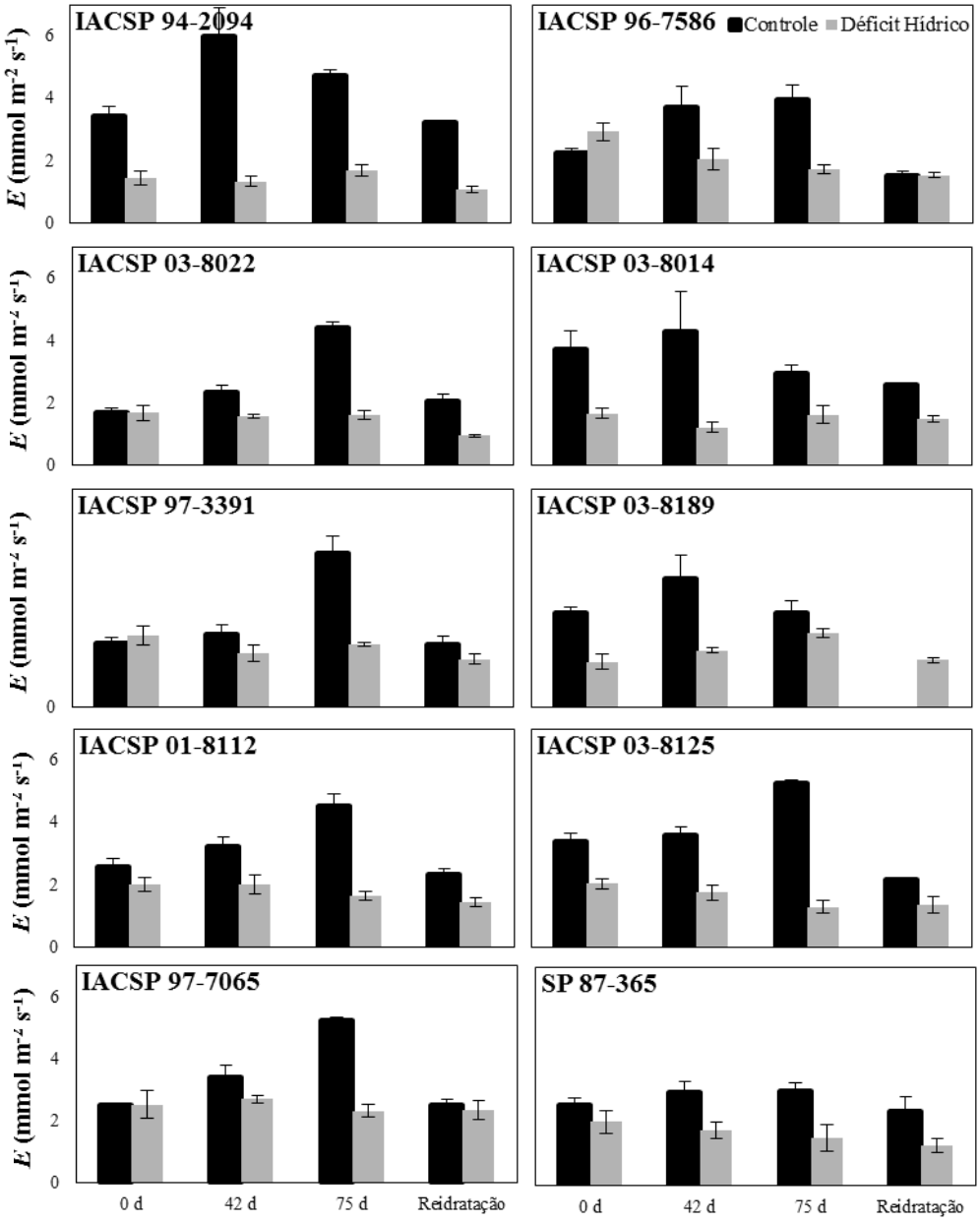
Anexo B - Potencial de água na folha nos 10 genótipos avaliados em experimento de campo de 2010. Valores de barra referentes a n=3



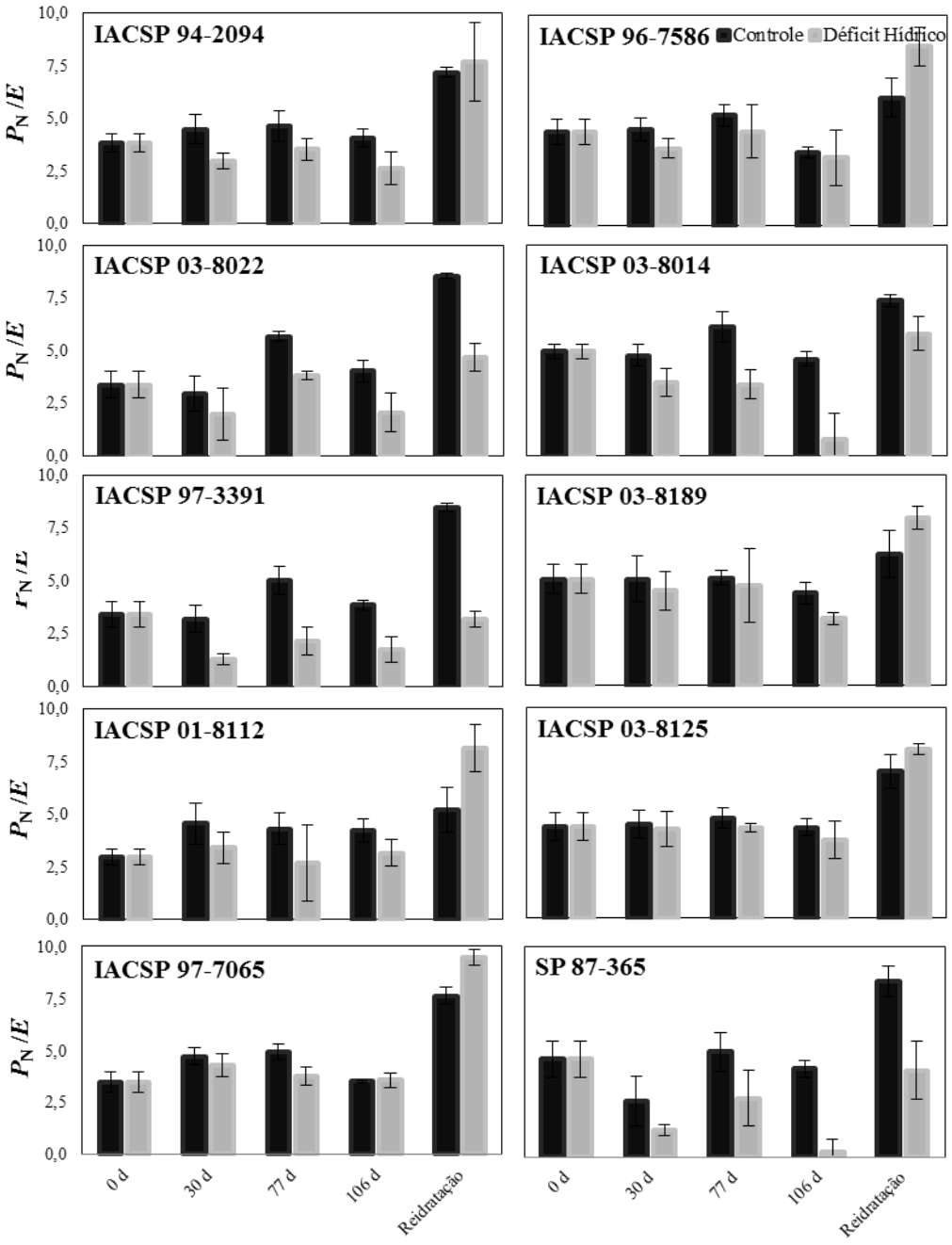
Anexo C - Assimilação de carbono nos 10 genótipos avaliados em experimento de campo em 2011. Valores de barra referentes a n=3



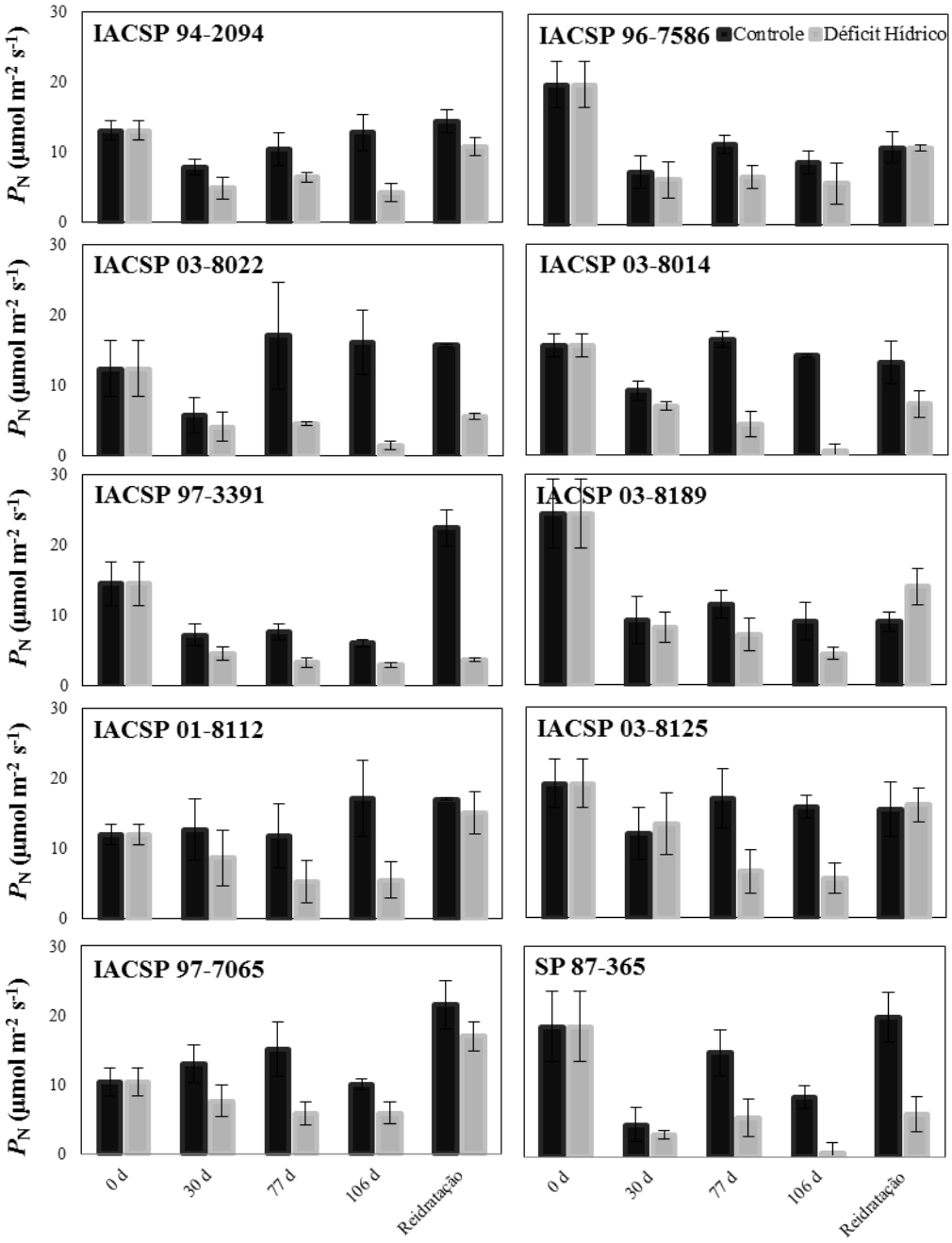
Anexo D - Transpiração nos 10 genótipos avaliados em experimento de campo em 2011. Valores de barra referentes a n=3



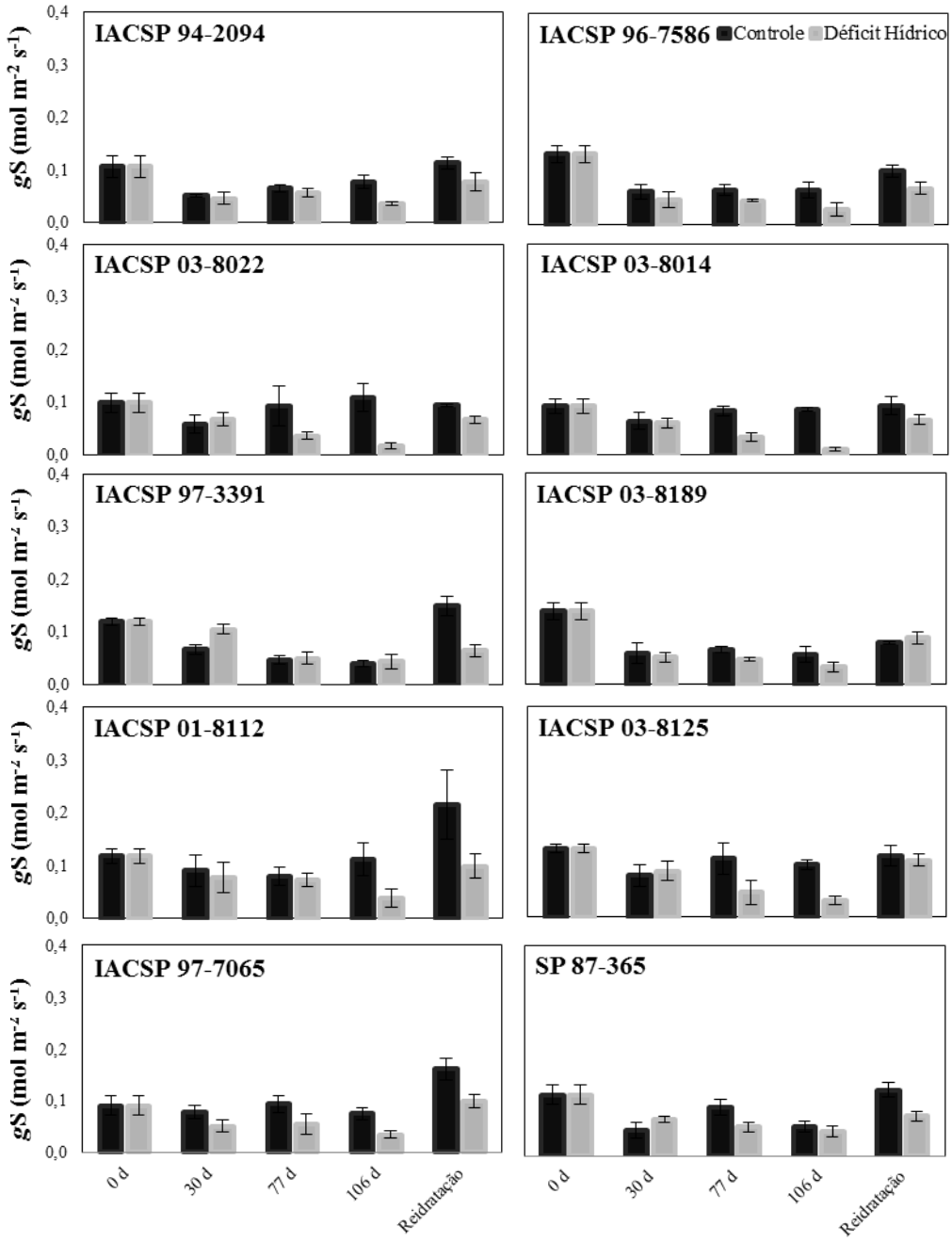
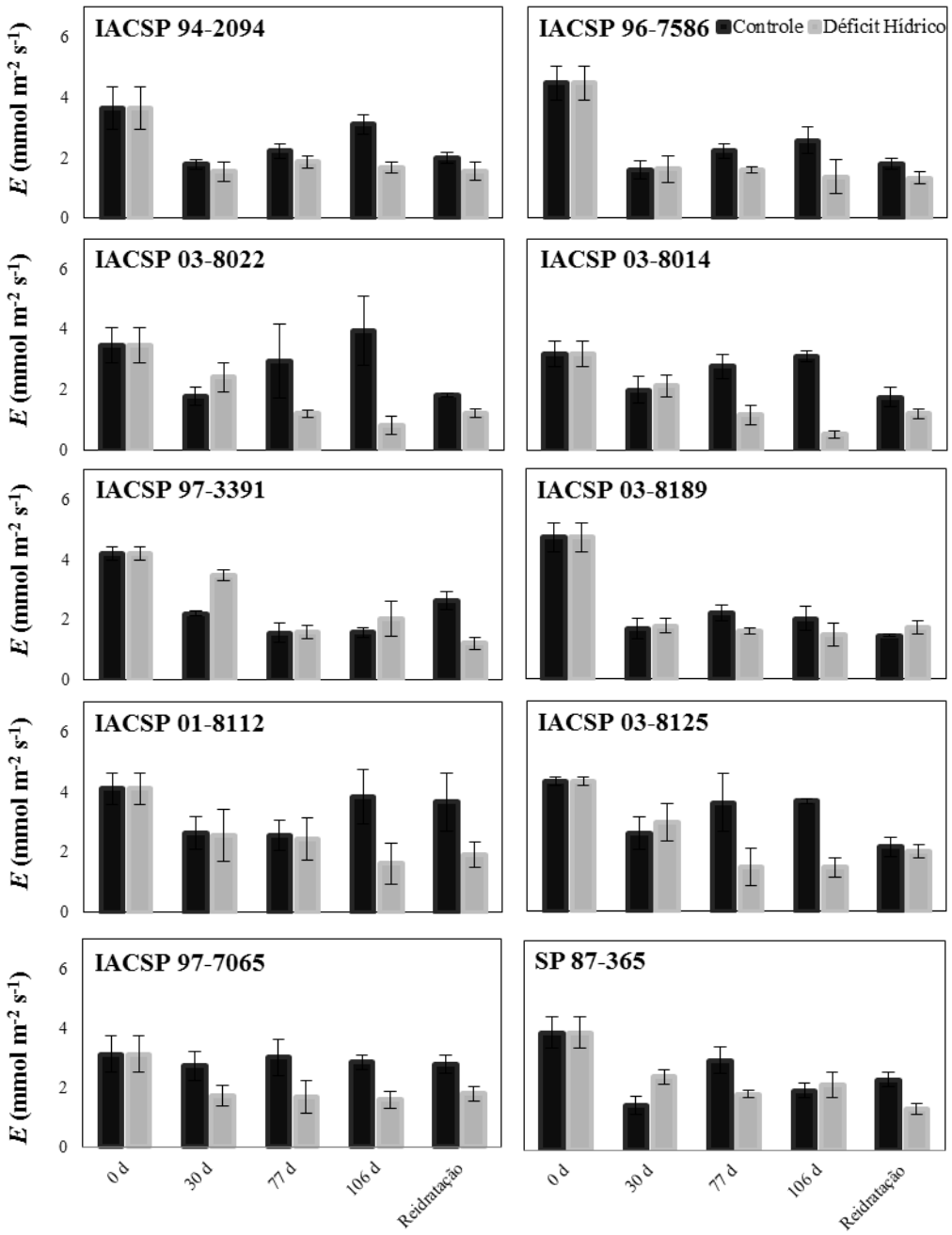
Anexo E -Eficiência do uso da água (EUA = P_N/E) nos 10 genótipos avaliados em experimento de campo em 2010. Valores de barra referentes a n=3



Anexo F -Assimilação de carbono nos 10 genótipos avaliados em experimento de campo em 2010. Valores de barra referentes a n=3



Anexo G -Condutância estomática (*g*S) nos 10 genótipos avaliados em experimento de campo em 2010. Valores de barra referentes a n=3



Anexo H - Transpiração nos 10 genótipos avaliados em experimento de campo em 2010. Valores de barra referentes a n=3