

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



AMANDA PEREIRA DE SOUZA

“A CANA-DE-AÇÚCAR E AS MUDANÇAS CLIMÁTICAS: EFEITOS
DE UMA ATMOSFERA ENRIQUECIDA EM CO₂ SOBRE O
CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO DE
CARBOIDRATOS DE *SACCHARUM SSP*”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Amanda Pereira de Souza
M. S.
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Mestre em Biologia
Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.

Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Co-Orientadora: Dra. Marília Gaspar Maïs

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So89c	<p>Souza, Amanda Pereira de A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de <i>Saccharum</i> ssp. / Amanda Pereira de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadores: Marcos Silveira Buckeridge, Marília Gaspar. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Dióxido de carbono atmosférico. 2. Cana-de-açúcar - Produção. 3. Sequêstro de carbono. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Gaspar, Marília. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Sugarcane and climate changes: effects of CO₂ enrichment atmosphere in growth, development and carbohydrate metabolism in *Saccharum* ssp.

Palavras-chave em inglês: Atmospheric carbon dioxide; Sugarcane - Production; Carbon sequestration.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Marcos Silveira Buckeridge, Weber Antonio Neves do Amaral, Carlos Alberto Labate.

Data da defesa: 20/04/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 20 de abril de 2007.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)



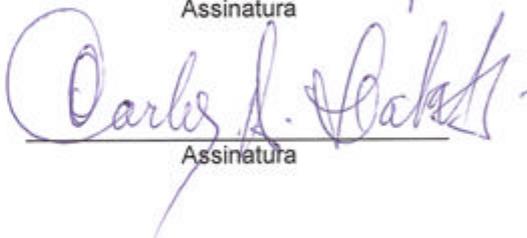
Assinatura

Prof. Dr. Weber Antonio Neves do Amaral



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate



Assinatura

Prof. Dr. Alessandro Jaquiel Waclawovsky

Assinatura

Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar

Assinatura

DEDICO

Aos meus pais, Valmir e Fátima,
por todo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao término desta etapa, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos àqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho:

- Ao Dr. Marcos Silveira Buckeridge, pela orientação e confiança;
- À Dra. Marília Gaspar, pela orientação, amizade e incentivo;
- Ao pesquisador Emerson Alves da Silva, do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo auxílio e sugestões;
- Ao Centro de Tecnologia Canavieira por financiar a construção das câmaras, ceder as plantas e permitir o uso do Laboratório de Análises;
- Ao Laboratório de Transdução de Sinal (Instituto de Química/USP) nas pessoas da Dra. Gláucia Mendes de Souza e Dr. Alessandro Waclawovsky, pelas análises moleculares;
- Ao Dr. Nicholas Carpita e à Dra. Maureen McCann, da Universidade de Purdue, pela oportunidade do estágio em seus laboratórios;
- Aos pesquisadores Carlos Martinez (IB/USP – Ribeirão Preto), Marco Aurélio Tiné (Instituto de Botânica de São Paulo) e Alessandro Waclawovsky (IQ/USP) pelas sugestões dadas na pré-banca;
- Ao IAG/USP, por fornecer os dados climáticos;

- Aos amigos e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, do Instituto de Botânica de São Paulo;
- Às amigas Amanda Asega, Vanessa, Kelly, Paty Pinho, Aline, Fernanda K., Fernanda M., Marina, Claudinha e Paola pelos momentos de diversão e apoio;
- Aos novos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, IB/USP;
- Ao programa de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural da Unicamp;
- À secretária Líliam, por ter me ajudado com toda a documentação necessária durante o curso;
- À FAPESP, pelo auxílio da bolsa de estudo;
- Ao CNPq e ao Ministério da Ciência e Tecnologia pelo financiamento de parte da pesquisa;
- À minha querida família, Valmir, Fátima, Rafael e Nicole, por toda a compreensão e carinho;
- Ao Adriano, meu amor, por todas as horas distantes e por ser minha fortaleza ao longo dessa caminhada;

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Aumento nas emissões de gases do efeito estufa e mudanças climáticas ...	12
1.2 Efeitos do aumento da concentração de CO ₂ sobre as plantas.....	13
1.3 Crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar.....	18
1.4 Cana-de-açúcar como planta modelo para o estudo dos efeitos do aumento previsto de CO ₂ atmosférico.....	20
2. OBJETIVO	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Cultivo e coletas das plantas.....	26
3.2 Dados meteorológicos.....	28
3.3 Medidas de parâmetros fisiológicos.....	29
3.3.1 Trocas gasosas.....	29
3.3.2 Fluorescência da clorofila a.....	29
3.3.3 Crescimento.....	30
3.3.4 Conteúdo de água no tecido.....	31
3.4 Análises bioquímicas.....	32
3.4.1 Quantificação de carboidratos solúveis.....	32
3.4.2 Análise dos polissacarídeos de parede celular por <i>Fourier-transformed infrared</i> (FT-IR).....	33

3.4.3 Análise do perfil de monossacarídeos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).....	35
3.5 Análises de produtividade.....	35
3.5.1 Grau BRIX.....	36
3.5.2 Porcentagem de fibras (Fc).....	36
3.5.3 Teor de sacarose (Pc).....	37
3.6 Análise de expressão gênica.....	38
3.6.1 Extração de RNA total.....	38
3.6.2 Síntese e marcação da sonda de cDNA.....	39
3.6.3 Hibridizações em <i>microarray</i> de DNA.....	41
3.6.4 Validação dos resultados do <i>microarray</i> por qPCR em tempo real....	41
3.7 Análises estatísticas.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Dados meteorológicos.....	44
4.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	45
4.3 Crescimento.....	47
4.4 Conteúdo de água.....	52
4.5 Análises bioquímicas.....	53
4.5.1 Conteúdo de carboidratos solúveis.....	53
4.5.2 Polissacarídeos de parede celular por FT-IR.....	54
4.5.3 Perfil de monossacarídeos por GC-MS.....	57
4.6 Produtividade.....	58
4.7 Análise de expressão gênica.....	58

5. DISCUSSÃO	63
5.1 Parâmetros fisiológicos	63
5.2 Parâmetros bioquímicos	68
5.3 Produtividade.....	71
5.4 Expressão gênica.....	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

Desde o início da Revolução Industrial as concentrações de CO₂ atmosférico aumentaram em cerca de 30% e estimativas apontam que esta concentração poderá atingir aproximadamente 720 ppm até a metade deste século. Estudos sobre o efeito do alto CO₂ no desenvolvimento de diversas espécies vegetais já foram realizados, porém poucos com espécies de gramíneas tropicais do tipo C₄, como é o caso da cana-de-açúcar. Considerando a importância econômica da cana e seu potencial na obtenção de biocombustíveis é importante saber como esta cultura irá responder ao aumento previsto na concentração de CO₂ atmosférico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do aumento do CO₂ atmosférico sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos da cana-de-açúcar visando avaliar o potencial de seqüestro de carbono e o impacto das mudanças climáticas sobre a produtividade. Parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares foram analisados em plantas cultivadas em câmaras de topo aberto durante 50 semanas com atmosfera de CO₂ ambiente (~370 ppm) e elevada (~720 ppm). Os principais resultados obtidos indicam incremento em altura, na taxa fotossintética e em biomassa de colmo e folhas das plantas cultivadas sob elevado CO₂. Ao final das 50 semanas foi detectado no colmo das plantas crescidas em tais condições, um aumento no teor de sacarose, de fibras e no conteúdo de celulose. A análise do perfil de transcritos de folhas após 9 e 22 semanas de cultivo usando microarranjos revelou expressão diferencial de 37 genes, sendo que 14 foram reprimidos e 23 foram induzidos e correspondem principalmente a genes de fotossíntese e desenvolvimento. Nossos resultados indicam que a cultura da cana-de-açúcar tem capacidade para seqüestro de carbono e potencial para aumento na produtividade em condições de alta concentração de CO₂.

Palavras – chave: celulose, elevado CO₂, seqüestro de carbono, produtividade.

ABSTRACT

Since the beginning of the Industrial Revolution, the concentrations of CO₂ in the atmosphere increased about 30% and the current forecasts point out that this concentration will reach approximately 720 ppm until the middle of this century. Studies about the effect of CO₂ on the development of several plant species have been performed. However, few studies have been performed with tropical grass species having photosynthesis C₄, as is the case of sugar cane. Due to the economic importance of sugar cane and its high potential to obtain biofuel, it is important to know how this crop will respond to the forecasted increase in the CO₂ concentration in the atmosphere. Therefore, the goal of this work was to study the effects of increased CO₂ concentration on growth, development and carbohydrate metabolism of sugar cane aiming the evaluation of the potential of this species for carbon sequestration and the impact of the global climatic change on its productivity. Physiological, biochemical and molecular features of these plants have been analyzed during 50 weeks of growth in Open-Top-Chambers (OTCs) with ambient (~370 ppm) and elevated (~720 ppm) CO₂ concentrations. After 50 weeks of growth under these conditions, we observed an increase of sucrose content, fiber and also in cellulose contents in stems of plants grown under elevated CO₂. The microarray analysis of the transcriptome of leaves was obtained after 9 and 22 weeks and revealed differential expression of 37 genes. Fourteen genes were repressed and 23 induced by elevated CO₂. The latter correspond mainly to the processes of photosynthesis and development. Our results indicate that the sugar cane crop has a high potential for carbon sequestration and increase of productivity under elevated CO₂ concentrations.

Key words – cellulose, elevated CO₂, carbon sequestration, productivity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aumento nas emissões de gases de efeito estufa e mudanças climáticas

O efeito estufa é um fenômeno natural que ocorre na atmosfera e que possibilita a ocorrência de vida no planeta. Este fenômeno é promovido pela presença de gases como o dióxido de carbono (CO_2), o ozônio (O_3) e o metano (CH_4) que, juntamente com o vapor d'água, possuem a propriedade de absorver e refletir parte dos raios infravermelhos, contribuindo para aquecer a superfície terrestre. Por possuírem esta propriedade, estes gases também são conhecidos como gases de efeito estufa.

Apesar do benefício que este fenômeno propicia, atualmente ele tem sido visto como algo negativo. Isso porque o aumento nas emissões dos gases de efeito estufa, em decorrência da ação antrópica, tem intensificado o fenômeno que, aumentado, pode trazer conseqüências negativas para o homem. Por este motivo, termos como mudanças climáticas e aquecimento global começam a ser amplamente utilizados em nosso vocabulário.

Dentre os gases de efeito estufa, o dióxido de carbono (CO_2) é o que tem maior contribuição através da atividade humana (Freund, 2005). O aumento das emissões provenientes, principalmente, da queima de combustíveis fósseis e do desmatamento, teve início na Revolução Industrial no século XVIII (Buckeridge & Aidar, 2002). Entre os anos de 1996 e 2001, a média anual de aumento das concentrações de CO_2 na atmosfera foi de 1,74 ppm (partes por milhão) e entre os anos de 2002 e 2006, essa média subiu para 2,09 ppm, atingindo a concentração de 384 ppm neste último ano (NOAA, 2006).

Além disso, as previsões indicam concentrações próximas a 720 ppm para a metade do século XXI (Prentice, 2001).

Dados compilados pelo IPCC - *Intergovernmental Panel Climate Change* – (2001) mostram alterações climáticas correlacionadas diretamente ao aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, que podem trazer conseqüências diversas para a população humana e para a biodiversidade mundial. Apesar das incertezas nas previsões sobre as mudanças climáticas globais, Berthelot *et al.* (2005) revelam, em uma análise com dados de diferentes fontes, cenários bem definidos para a Região dos Trópicos, a Região Mediterrânea e as altas latitudes do Hemisfério Norte.

Para a América Latina está previsto um aumento de 2 - 6 °C na temperatura da superfície terrestre e aumento da freqüência e intensidade de eventos extremos, tais como: ondas de calor/frio, secas, enchentes e, principalmente, furacões e tempestades tropicais. No setor econômico, a pesca, a agricultura e o turismo tendem a ser os mais afetados devido aos desastres naturais. O decréscimo da quantidade de água potável e o aumento de doenças como dengue e malária são algumas das conseqüências previstas sobre a população humana dessa região. No Brasil, especificamente, espera-se elevação de aproximadamente 4 °C na temperatura da superfície terrestre; aumento de 10-15% na precipitação durante o outono e redução desta durante o verão e intensificação de eventos com El Niño e La Niña na Região Sul do país (IPCC, 2001).

1.2 Efeitos do aumento da concentração de CO₂ sobre as plantas

Ao longo dos períodos geológicos, as plantas habitaram um ambiente no qual a concentração de CO₂ atmosférico variou entre 180 e 300 ppm, como mostram dados

coletados em testemunhas de ar no gelo antártico (Figura 1). Entretanto, com o aumento nas emissões desse gás nos últimos séculos, pode-se dizer que esses organismos nunca habitaram um ambiente como o encontrado atualmente, no que diz respeito à concentração atmosférica de CO₂ (Körner, 2006).

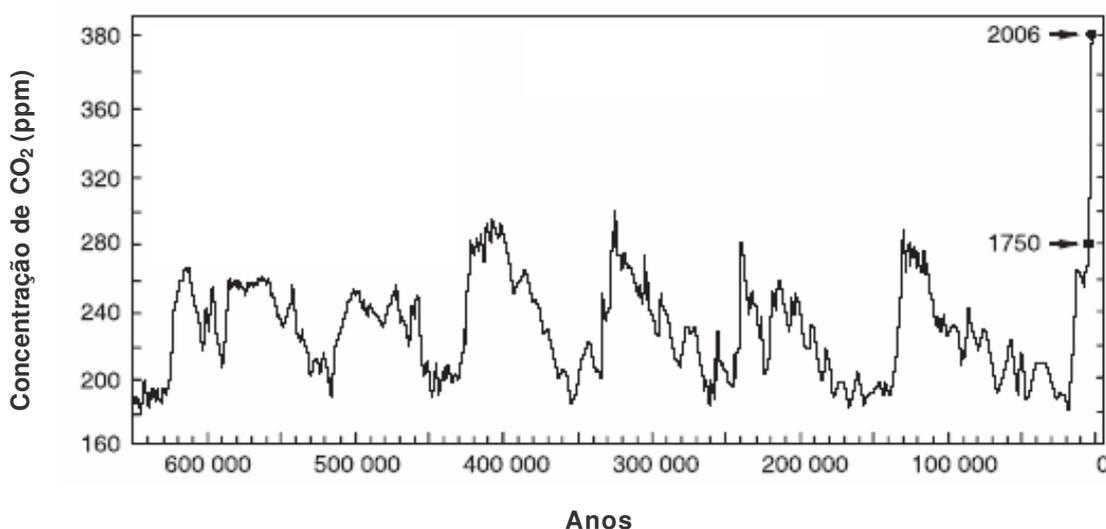


Figura 1 – Acompanhamento das concentrações de CO₂ atmosférico desde 650.000 anos atrás até o ano de 2006. Fonte: Körner (2006), modificado.

Este fato, associado ao potencial que as plantas possuem em assimilar carbono atmosférico através da fotossíntese e da produção de compostos de carbono, faz com que estudos sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de plantas cultivadas sob alto CO₂ recebam ampla atenção (Poorter & Navas, 2003).

O aumento de CO₂ atmosférico pode afetar os processos biológicos em diferentes níveis de organização (Mooney *et al.*, 1999), sendo que os controles fisiológicos e ecológicos são os estudados há mais tempo (Ward & Strain, 1999). Em uma revisão, compilando 124 trabalhos realizados em FACE (do inglês, *Free Air Carbon Enrichment*),

Ainsworth & Long (2005) verificaram que as taxas fotossintéticas de plantas cultivadas em elevado CO_2 aumentam 28%. Valores similares a este (aumento de 33%) foram encontrados anteriormente por Wand *et al.* (1999) em espécies de gramíneas C_3 em diferentes condições de crescimento. O estudo de Ainsworth & Long (2005) também mostra que ocorre redução na taxa de condutância estomática de aproximadamente 20% e aumento na eficiência do uso da água em até 50%.

O aumento nas taxas fotossintéticas e a melhora nas relações hídricas observados nas plantas cultivadas em elevado CO_2 normalmente geram incrementos de biomassa e altura nestas plantas, que são respectivamente 49% e 12% maiores do que nas plantas cultivadas em atmosfera ambiente de CO_2 (Poorter & Pérez-Soba, 2002; Ainsworth & Long, 2005). Aidar *et al.* (2002) estudando plântulas de jatobá (*Hymenaea courbaril*) encontraram também alterações na relação raiz:parte aérea, decorrentes das mudanças no conteúdo de biomassa dos diferentes tecidos, quando as plantas foram cultivadas em ambiente com CO_2 elevado.

Efeitos como aumento da capacidade de crescimento em plântulas, da rebrota de indivíduos podados, mudanças no padrão de reprodução (Ward & Strain, 1999) e aumento da massa em sementes (Poorter & Navas, 2003) também podem ser observados neste tipo de experimento.

Comparando o padrão de incremento de biomassa de plantas de diferentes grupos funcionais, Poorter & Navas (2003) verificaram aumento de 45% neste parâmetro em espécies herbáceas do tipo C_3 , 48% em arbóreas C_3 , 23 % em plantas com metabolismo fotossintético CAM e 12% em plantas C_4 crescidas em alto CO_2 . Wand *et al.* (1999) também comparando C_3 x C_4 em elevado CO_2 , encontraram diferenças em assimilação fotossintética de 33% e 25%, respectivamente.

Apesar do estímulo médio de ganho de biomassa e assimilação fotossintética serem menores para plantas C_4 , eles não podem ser considerados insignificantes. Por muito tempo acreditou-se que as plantas C_4 não responderiam ao aumento do CO_2 em função do mecanismo de concentração de CO_2 presente nas células da bainha vascular destas espécies, que confere alta eficiência fotossintética às mesmas. E, de fato, alguns experimentos como o realizado por Bowes (1993), mostraram que não houve diferenças significativas quando plantas C_4 foram submetidas ao tratamento com elevado CO_2 . Por outro lado, outros estudos demonstraram que plantas C_4 podem responder significativamente ao aumento de CO_2 e algumas até de forma semelhante a espécies C_3 (Ghannoum *et al.*, 1997; Read *et al.*, 1997; Ziska & Bunce, 1997; Morgan *et al.*, 2001; Pooley *et al.*, 2003; Sage & Kubien, 2003; Leakey *et al.*, 2004).

Diversas especulações são feitas em torno dessas diferenças de comportamento de plantas C_4 em elevado CO_2 e as respostas encontradas são normalmente atribuídas a três fatores: (1) algumas espécies C_4 podem estar saturadas às concentrações atuais de gás carbônico enquanto outras não; (2) o efeito pode ser devido à diminuição da condutância estomática decorrente do cultivo em alto CO_2 que pode reduzir a transpiração e melhorar o status de água; (3) a diminuição da transpiração pode aumentar a temperatura foliar, proporcionado a temperatura ótima para o processo fotossintético (Ghannoum *et al.*, 2000)

Contudo, outros autores como LeCain & Morgan (1998) e Ziska *et al.* (1999) acreditam que as plantas C_4 também podem responder ao aumento do CO_2 atmosférico por mudanças na razão Rubisco:PEPCarboxilase, através da fixação direta de CO_2 pelas células da bainha vascular e devido aos modelos de “bombeamento” de CO_2 para essas mesmas células.

Além das mudanças em nível fisiológico, as mudanças ocasionadas pelo aumento no CO₂ em nível celular também são de extrema importância para tentarmos entender como ocorre a interligação destes processos (Pritchard *et al.*, 1999). Segundo estes autores, mudanças no padrão de divisão celular, aumento da expansão celular e mudanças nas concentrações de carboidratos solúveis e amido são os efeitos mais observados em plantas crescidas em atmosfera enriquecida com CO₂. Em soja, o cultivo em elevado CO₂ resultou em aumento nos teores de sacarose, frutose, glucose e amido em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (Rogers *et al.*, 2004). Em cana-de-açúcar, também foi verificado um aumento de 26% e 15% no teor de açúcares solúveis totais após 7 e 14 dias da emergência da folha, respectivamente em plantas cultivadas em atmosfera com 720ppm de CO₂ (Vu *et al.*, 2006).

Estudos de alterações do conteúdo de componentes da parede celular em plantas crescidas em elevado CO₂, em especial da celulose, são bastante importante, pois ao acumular celulose as plantas seqüestram carbono (Buckeridge & Aidar, 2002). Estudando árvores de carvalho, Aranda *et al.* (2006) encontraram diferenças significativas no conteúdo de celulose em folhas, mas não observaram mudanças nos teores de lignina e hemiceluloses. Um aumento no conteúdo de celulose (aproximadamente 33% em folhas e 19% em caules) também foi observado em plântulas de jatobá crescidas em atmosfera com 720 ppm de CO₂ (Marília Gaspar e Marcos S. Buckeridge, comunicação pessoal). Em folhas de *Arabidopsis* o aumento no teor deste composto foi de 22% (Teng *et al.*, 2006).

Empregando a técnica de *microarray* ou chip de DNA, diversos autores têm mostrado uma ampla variedade de respostas em nível molecular de plantas crescidas em atmosfera com elevado CO₂. Taylor *et al.* (2005), estudando árvores de *Populus*

euramericana, mostraram que a expressão de genes relacionados com fotossíntese, metabolismo de carboidratos e de aminoácidos e ciclo celular é modificada sob alto CO₂ e que essas alterações de expressão dependem da idade das folhas. Ainda em *Populus*, genes de armazenamento de proteínas e genes envolvidos na expansão celular foram induzidos em folhas de plantas cultivadas em 1200 ppm de CO₂. No caule destas mesmas plantas os genes relacionados à síntese de lignina foram induzidos e aqueles relacionados com formação de parede celular e crescimento foram reprimidos (Druart *et al.*, 2006).

Ainsworth *et al.* (2006), verificaram aumento de transcritos em folhas jovens de soja (crescida em elevado CO₂) envolvidos principalmente com crescimento e proliferação celular e também genes que podem estar relacionados com o processo respiratório e mobilização de carboidratos, fornecendo energia e açúcares precursores para a expansão foliar e para o crescimento.

1.3 Crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar

Como a maioria das espécies de Poaceae, a cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp) se desenvolve formando touceiras (Segalla, 1964). Na prática, a cana-de-açúcar é propagada vegetativamente por secções do colmo, denominadas toletes, contendo uma ou mais gemas. O processo de transição da gema do estado de dormência para o crescimento ativo é um fenômeno complexo, desencadeado por enzimas e regulado por hormônios de crescimento (Malavolta & Haag, 1964).

A brotação da gema se inicia com o crescimento das raízes de fixação, que após o desenvolvimento das raízes verdadeiras, desintegram-se (Pinto, 1965). O sistema

radicular da cana-de-açúcar pode atingir grandes profundidades, aumentando as possibilidades de sobrevivência, mesmo em períodos de deficiência hídrica. O crescimento e a distribuição das raízes variam acentuadamente com a idade da planta e podem variar também em função da frequência de irrigação (Machado, 1987).

O colmo que se desenvolve a partir da gema é denominado, inicialmente, de “materno” ou primário. Esse caule é composto por uma sucessão de internós em diferentes estádios fisiológicos (internós maduros, em maturação e imaturos). Os internós imaturos, que possuem crescimento intenso, estão localizados na região do colmo com folhas verdes, são fibrosos, com alta concentração de hexoses e baixa concentração de sacarose (Paranhos, 1987). À medida que esses internós se desenvolvem, a taxa de crescimento diminui progressivamente e ocorre, em condições favoráveis, o armazenamento de sacarose (Machado, 1987).

As folhas da cana-de-açúcar, que possuem metabolismo fotossintético C_4 , são inseridas nos nós, ocupando usualmente posições alternadas no colmo. São constituídas de duas partes: bainha (parte que sustenta e fixa a folha no colmo) e lâmina, que apresenta comprimento e largura variáveis e possui as margens serradas (Pinto, 1965). No período inicial do desenvolvimento da cana, a maior parcela de fotoassimilados produzidos é destinada ao crescimento das folhas (Machado, 1987).

Segundo Van Dillewijn (1952), o crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar dependem de fatores internos e externos, sendo estes últimos especialmente elementos climáticos como precipitação, umidade do ar e temperatura.

A cana cultivada atualmente no Brasil é uma variedade obtida através de melhoramento genético, que conferiu à planta maior produtividade e resistência a doenças (Figueiredo *et al.*, 1995).

Segundo Castro (1999) o plantio da cana-de-açúcar na região Centro-Sul é feito em duas épocas conhecidas como “plantio de cana de ano” e “plantio de cana de ano e meio”. O plantio feito em outubro permite a colheita da cana com 12 meses (“cana de ano”), enquanto o plantio feito em janeiro-fevereiro, permite a colheita com 18 meses (“cana ano e meio”) (Figura 2).

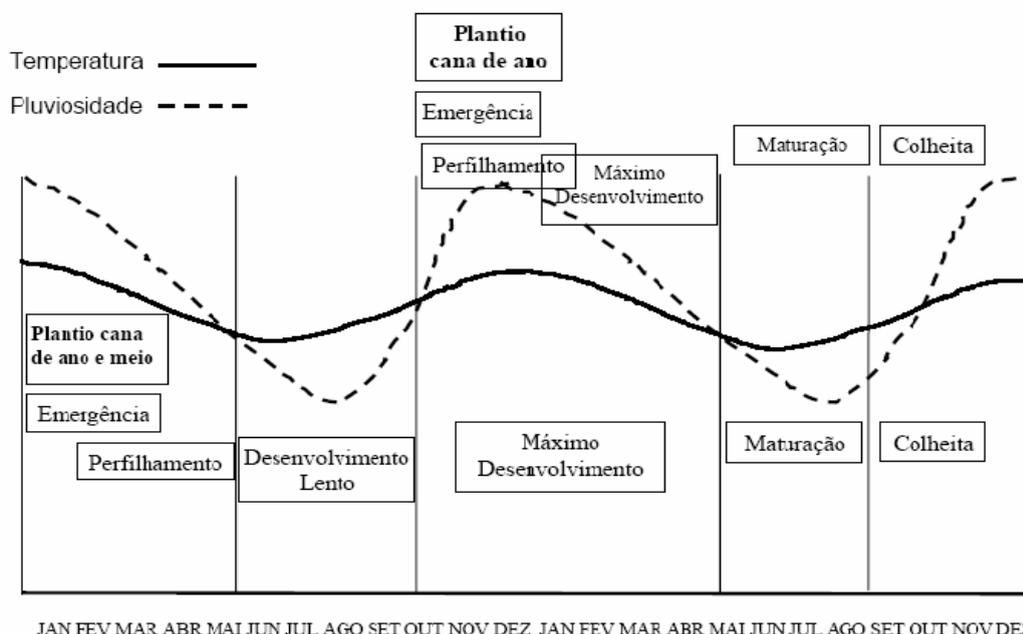


Figura 2 – Ciclos da cana-de-açúcar e variações de temperatura e pluviosidade para a região Centro-Sul do Brasil. Fonte: Castro, 1999.

1.4 Cana-de-açúcar como planta modelo para o estudo dos efeitos do aumento previsto de CO₂ atmosférico

Apesar de cerca da metade das gramíneas do mundo possuir metabolismo fotossintético do tipo C₄, como é o caso da cana-de-açúcar, poucos estudos têm testado a

resposta ao aumento de CO₂ em gramíneas de clima temperado e somente uma pequena parcela utiliza gramíneas tropicais. Estas plantas contribuem, segundo Ehleringer *et al.* (1997), com aproximadamente 18% da produtividade global. Dessa forma, uma mudança no clima poderá trazer conseqüências para a produtividade primária do mundo (IPCC, 2001; Prior *et al.*, 2005).

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical que tem provável origem na Nova Guiné e que foi introduzida no Brasil em 1533 (Doorembos & Kassam, 1979). Sua cultura tornou-se importante para o país desde o período colonial, mas teve sua maior expansão após a década de 80, com o advento do Proálcool. Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e Austrália (UNICA, 2006). Segundo dados estatísticos do IBGE (2006), o país produziu no ano de 2005 cerca de 420 milhões de toneladas da planta.

O país cultiva mais de cinco milhões de hectares de cana-de-açúcar em todo o seu território, mas é no Estado de São Paulo que se concentra a maioria das lavouras, o que representa aproximadamente metade da produção nacional (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004).

No Brasil, os sistemas de produção de cana-de-açúcar ainda são bastante heterogêneos, no que se refere à modernização tecnológica dessa atividade (Embrapa, 2004). A queimada do canavial, utilizada para facilitar a colheita, libera na atmosfera uma alta concentração de poluentes (Guarnieri & Jannuzzi, 1992). Assim, a extinção dessa técnica configura uma alternativa bastante interessante e viável para o processo de redução da emissão de gases do efeito estufa, entre eles o CO₂, denominado de “mitigação”.

A cana-de-açúcar é responsável por cerca de 98% das emissões de gases provenientes da queima de resíduos agrícolas no Brasil (Lima, 1999). Entretanto, segundo a Embrapa (2002), apesar de ocorrer emissão de CO₂ durante as queimadas, o balanço entre a emissão deste gás na atmosfera e a retirada dele pelo processo fotossintético no ciclo seguinte é nulo, uma vez que a cultura reabsorve uma quantidade de CO₂ equivalente ao emitido. A adoção do manejo da colheita sem queima prévia tornaria o balanço de CO₂ positivo e com este intuito, o Governo do Estado de São Paulo promulgou em 19 de setembro de 2002 a lei nº 11.241, que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas (Governo do Estado de São Paulo, 2004).

Considerando que a cana-de-açúcar ocupa uma grande área agrícola brasileira e constitui uma parcela importante da economia no país, é de grande importância saber como esta cultura irá responder às mudanças nas concentrações de CO₂ previstas para a primeira metade deste século, com o intuito de presumir qual o possível cenário para a cultura de cana no Brasil.

Além disso, a cultura de cana-de-açúcar tem recebido ampla atenção internacional. A queima de combustíveis fósseis, que são a forma predominante de obtenção de energia no mundo (86%), contribui com 75% da emissão do CO₂ para a atmosfera. Sendo assim, o álcool, obtido da cana-de-açúcar, consiste em um combustível alternativo importante em substituição ao uso dos combustíveis fósseis. Essa grande dependência de combustíveis fósseis pelos países desenvolvidos e em desenvolvimento, aliada a um período de crescimento econômico intenso e mais recentemente à aceleração do crescimento econômico dos países asiáticos, vem pressionando os setores relacionados ao desenvolvimento tecnológico a encontrar fontes alternativas de energia.

Segundo Macedo (2000), a produção de álcool e sua utilização como combustível alternativo à gasolina, têm permitido ao Brasil reduzir as suas emissões totais de gases de efeito estufa em 20%. O álcool, juntamente com outros produtos provenientes da cana-de-açúcar, proporciona à indústria canavieira privilégios, no que se refere à obtenção dos certificados de redução de emissões do Mecanismo de Desenvolvimento Limpo, do Protocolo de Kyoto (UNICA, 2006).

Em 2001, o Brasil finalizou um passo importante para melhorar o conhecimento sobre a cana e sua capacidade produtiva. O projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST), que teve a duração de 2 anos, permitiu que 238 mil fragmentos de genes (*Expression Sequence Tags* ou ESTs) fossem identificados, o que equivale a aproximadamente 50 mil genes da planta (Vettore *et al.*, 2001).

Este projeto deu origem a um banco de dados (<http://sucest.cbmeg.unicamp.br/public/>), que foi aberto a um número restrito de pesquisadores que mineraram o banco a procura de genes relacionados com diversos processos biológicos. Como resultado dessa busca, Lima *et al.* (2001) encontraram 459 genes potencialmente relacionados com o metabolismo de parede celular. Da mesma forma, outros trabalhos foram desenvolvidos, constituindo um conjunto básico e fundamental de dados para um maior entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos da cana-de-açúcar (Vettore *et al.*, 2003).

Com o objetivo de relacionar algumas das seqüências obtidas pelo projeto SUCEST com a função de genes de interesse biotecnológico, foi iniciado o projeto SUCEST-FUN (<http://www.sucest-fun.org>), que deu origem a um chip de DNA que reúne aproximadamente 4.600 genes, principalmente do metabolismo de carboidratos.

Utilizando este chip do projeto SUCEST-FUN, já foi possível identificar padrões de expressão diferenciados para plantas de cana-de-açúcar contrastantes para acúmulo de sacarose e submetidas a estresse hídrico, além de possibilitar a compreensão a respeito da herança genética dos ancestrais da cana (Equipe da Dra. Gláucia Mendes Souza, do Laboratório de Transdução de Sinal, Instituto de Química – USP, dados não publicados).

Toda essa situação coloca atualmente a cana-de-açúcar como um foco central para a obtenção de biocombustíveis em larga escala (Furtado & Scandiffio, 2006).

No cenário previsto para o ano de 2050, uma resposta positiva da cana ao aumento do CO₂ poderá auxiliar o país a elevar ainda mais a produção de biocombustível.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo analisar os efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre variáveis fisiológicas (trocas gasosas, crescimento e acúmulo de biomassa), bioquímicas (conteúdo e composição de carboidratos solúveis e ligados à parede celular) e moleculares (expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos) durante um ano de desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar.

O principal interesse deste estudo é auxiliar na compreensão do processo de resposta desta gramínea tropical, de grande importância econômica, à presença de altas concentrações de CO₂ na atmosfera visando avaliar o potencial de sequestro de carbono e o impacto na produtividade das culturas de cana-de-açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo e coletas das plantas

A cana-de-açúcar foi cultivada a partir de toletes com uma gema, provenientes de plantas da variedade SP80-3280 (cedidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) – Piracicaba), que foram previamente selecionados de acordo com a massa fresca, visando a uniformidade do plantio. Os toletes foram plantados em vasos plásticos de aproximadamente 0,036 m³ contendo terra vegetal. Em cada um dos vasos foram colocados quatro toletes. O plantio foi realizado no dia 07 de abril de 2005.

Logo após o plantio, os vasos foram distribuídos em quatro câmaras de topo aberto (OTC's, do inglês *Open Top Chambers*) de 1,5 metros de diâmetro e 4 metros de altura, providas de um sistema de circulação de ar (Figura 3). Após 13 dias de cultivo, os toletes que não brotaram foram retirados, restando de duas a três plantas por vaso. Os vasos foram redistribuídos aleatoriamente nas câmaras de tal forma que cada um dos tratamentos (ambiente ou controle – aproximadamente 370 ppm e elevado CO₂ – aproximadamente 720 ppm) ficasse com 28 plantas. Em duas das câmaras foi acoplado um cilindro de dióxido de carbono (CO₂) para que a atmosfera interna da câmara se mantivesse a uma concentração próxima a 720 ppm desse gás. Nas outras duas foi injetado somente ar atmosférico (370 ppm de CO₂). As concentrações do gás no interior das câmaras foram monitoradas a cada dois dias com um medidor de CO₂, modelo Testo 535.

Após 32 semanas de experimento, as plantas foram transferidas para vasos maiores (0,109 m³) com o mesmo substrato inicial, sendo replantadas 2 plantas por vaso.

Ao longo do experimento, a umidade do solo foi monitorada com auxílio de tensiômetros instalados em um vaso por câmara, de modo que a tensão da água do solo nunca ultrapassasse 20 kPa. A adubação foi realizada a cada 4 meses, seguindo as instruções do Centro de Tecnologia Canavieira.

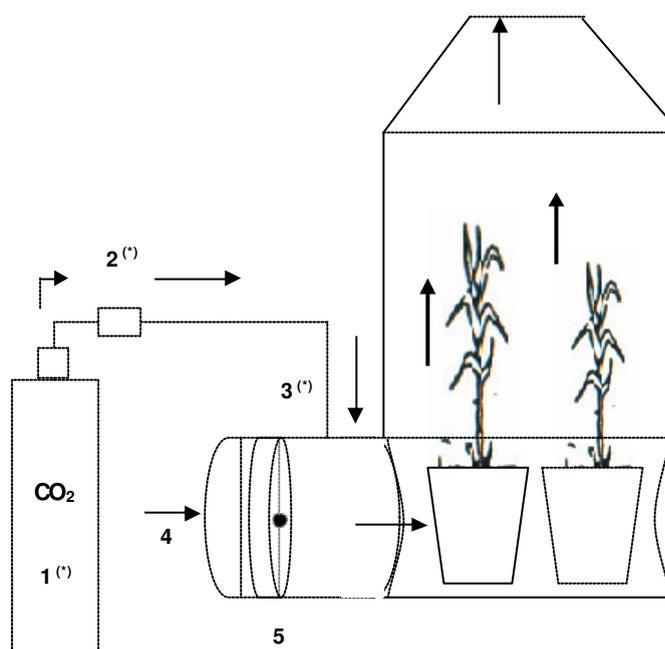


Figura 3 - Esquema das câmaras de topo aberto (OTCs) onde as plantas foram cultivadas. 1 – Cilindro de CO₂; 2 – Válvula reguladora de fluxo; 3 – Entrada de CO₂ no sistema; 4 – Entrada de ar atmosférico; 5 – Ventilador. (*) Presentes somente nas câmaras com 720ppm de CO₂.

Para as análises do conteúdo de açúcares solúveis totais e redutores e de expressão gênica foram feitas três coletas como mostrado na Tabela 1. Amostras de folha, colmo e raiz foram retiradas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e

estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em cada uma das coletas foram retirados dois vasos por tratamento. As plantas coletadas de cada um dos vasos foram reunidas em uma amostra única, resultando em duas amostras finais por tratamento. Na coleta após 50 semanas foram retirados 4 vasos por tratamento.

Para a determinação do acúmulo de biomassa foram feitas cinco coletas e para análises de produtividade uma única coleta ao final do experimento (Tabela 1). As mesmas plantas das quais foram retiradas amostras para congelamento instantâneo foram separadas individualmente em folha (lâmina e bainha), colmo e raiz para obtenção dos dados.

Tabela 1 – Calendário das coletas durante o experimento, com as respectivas análises realizadas.

Semanas de cultivo no CO₂	Tipo de análise
13	Conteúdo de açúcares, expressão gênica e determinação de biomassa
22	Conteúdo de açúcares, expressão gênica e determinação de biomassa
26	Biomassa
31	Conteúdo de açúcares e determinação de biomassa
50	Biomassa e produtividade

3.2 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos foram coletados na Estação Meteorológica do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas – USP, situado no Parque Estadual das

Fontes do Ipiranga (PEFI), a aproximadamente 1 km do local de realização do experimento.

3.3 Medidas de parâmetros fisiológicos

3.3.1 Trocas gasosas

Para a avaliação das taxas de trocas gasosas foi utilizado um IRGA (*Infra Red Gas Analyser*) modelo LI-COR® 6400- Inc., Lincoln, acoplado a uma câmara que permite o controle de luz, temperatura e concentração de CO₂. Os valores foram obtidos a partir de medidas instantâneas após 6, 10, 13, 18, 22, 26, 31 e 50 semanas de experimento.

A intensidade luminosa utilizada foi de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, selecionada a partir de experimentos prévios que determinaram o ponto de saturação luminoso (A_{sat}) para as condições de crescimento especificadas. A temperatura da folha foi mantida constante em 28 °C e a concentração de CO₂ dentro da câmara foi de 370 ppm ou de 720 ppm de acordo com o tratamento da planta analisada. Todas as medidas foram realizadas entre 10 e 14 horas, na região mediana da folha +1 (a primeira folha com a lígula exposta).

3.3.2 Fluorescência da clorofila *a*

As medidas de emissão de fluorescência da clorofila *a* para avaliação da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foram obtidas utilizando-se de um fluorômetro (modelo OS5-FL, Opti-sciences). Antes do início das medidas as folhas

analisadas (folhas +1) foram pré-adaptadas ao escuro por um período de 30 minutos para completa oxidação dos componentes do sistema de transporte de elétrons.

A obtenção de dados foi feita acoplando-se a fibra óptica do fluorômetro nas câmaras de análise, por onde foram disparados inicialmente fracos pulsos de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para determinação da fluorescência mínima emitida (F_o), quando todos os centros de reação do FSII estão na forma oxidada. Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado para promover, temporariamente, a máxima redução do acceptor primário de elétrons do FSII, determinando-se, assim, a fluorescência máxima (F_m) emitida pelas amostras adaptadas ao escuro.

A partir dessas medidas, foram estimados os valores de F_v/F_m , conforme descrito por Genty *et al.* (1989). A nomenclatura utilizada segue as recomendações de Van Kooten & Snel (1990).

As medidas de F_v/F_m foram feitas após 10, 18 e 26 semanas do início do tratamento no CO_2 .

3.3.3 Crescimento

O crescimento das plantas foi avaliado a partir de medidas de altura, cálculo da taxa de crescimento relativo e determinação do acúmulo de biomassa. As medidas de altura foram realizadas da base do tolete até a ponta da folha mais jovem. Essas medidas foram realizadas nas mesmas semanas em que foram coletados os dados de trocas gasosas (item 3.3.1).

Para a determinação do acúmulo de biomassa foram realizadas coletas após 13, 22, 26, 31 e 50 semanas do início da exposição ao elevado CO₂. Foram coletadas de 5 a 6 plantas (2 vasos) por tratamento até a 31^a semana e, na 50^a semana foram coletadas 8 plantas por tratamento (4 vasos). Os diferentes tecidos, divididos em folha (lâmina e bainha), colmo e raízes, foram secos em estufa a 60 °C até peso constante e, posteriormente pesados.

Como não foi possível separar as raízes de cada uma das plantas, devido ao emaranhado que foi formado, a pesagem deste órgão foi feita a partir de todas as raízes contidas em cada um dos vasos.

O acúmulo de biomassa do colmo após 50 semanas foi estimado a partir do cálculo de teor de água, realizado no CTC, devido à utilização dos colmos frescos para as análises dos dados de produtividade (item 3.5).

A taxa de crescimento relativo (TCR), que indica o incremento de matéria seca por unidade de tempo, foi calculada como sugerido por Hunt *et al.* (2002).

3.3.4 Conteúdo de água no tecido

Para o cálculo do conteúdo de água em cada um dos tecidos foram utilizados os valores de massa fresca, obtidos logo após as coletas das semanas 13 e 22.

O cálculo foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de H}_2\text{O} = \frac{\text{MF} - \text{MS}}{\text{MF}} \times 100$$

Onde: MF = Massa Fresca

MS = Massa Seca

Para o colmo também foi calculado o teor de água após 50 semanas, segundo metodologia utilizada no CTC. Cem gramas de cada amostra de colmo, previamente desintegrado, foram colocados na estufa a 105 °C para secagem até peso constante. Depois de seco o material foi pesado e a perda de peso na secagem foi considerada como o valor da porcentagem de água.

3.4 Análises bioquímicas

3.4.1 Quantificação de carboidratos solúveis

Para a quantificação de carboidratos solúveis foi utilizado o material vegetal congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C, como descrito no item 3.1. Após macerar cada uma das amostras, compostas de duas ou três plantas de cada tratamento, uma parte foi liofilizada enquanto a outra permaneceu a -80 °C para as análises de expressão gênica. Depois de liofilizado, 20 mg do pó obtido de cada uma das amostras foram submetidos à extração com 1 mL de etanol 80% (v:v) durante 20 minutos a 80 °C por 6 vezes, para a completa retirada dos açúcares solúveis. O sobrenadante obtido foi diluído com água destilada para que as amostras pudessem ser congeladas e após congelamento, foi seco em liofilizador. O material seco foi ressuscitado em 1 mL de água destilada.

A quantificação de açúcares solúveis totais nas amostras foi efetuada pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e a de açúcares redutores pelo método Somogy-Nelson (Somogy, 1945), sendo usada glucose (1 mg mL^{-1}) como padrão.

3.4.2 Análise dos polissacarídeos de parede celular por *Fourier-transformed infrared* (FT-IR)

Esta análise foi realizada no Departamento de Botânica e Patologia Vegetal da Universidade de Purdue (Indiana, Estados Unidos), sob a supervisão do Dr. Nicholas C. Carpita.

A técnica de espectroscopia denominada *Fourier Transformed Infrared* (FT-IR) é bastante utilizada para análise de compostos de parede celular (Kacuráková & Wilson, 2001). É uma técnica que se baseia na energia de vibrações das moléculas quando estas são submetidas a um feixe de luz infravermelha. Cada molécula tem vibrações específicas, que dependem de suas ligações e grupos funcionais (McCann *et al.*, 1997).

O material utilizado nesta análise foi o material seco de folhas, colmos e fibras da coleta após 50 semanas de cultivo, que foram pulverizados em moinho de bola. Para cada tecido, foram utilizadas 4 amostras de cada um dos tratamentos.

Para a preparação da parede celular, 1,5 mL de água destilada foi adicionado à aproximadamente 15 mg de cada amostra. Estas amostras foram incubadas a 100 °C por 5 minutos, para que o material fosse hidratado. Após a incubação, o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em tampão Tris[HCl] 50 mM, pH 7,0, contendo 1% de SDS e as amostras foram incubadas a 80 °C por 15 minutos para a extração de proteínas e outros componentes não pertencentes à

parede celular. Após a incubação, as amostras foram coletadas em filtro de nylon (poro de 47 μm , Nitex) e lavadas exaustivamente com água destilada a 80 °C. O resíduo de cada amostra após a filtração foi transferido para um novo microtubo e suspenso em água destilada. Três esferas de metal (5 mm de diâmetro) foram colocadas em cada um dos microtubos e as amostras foram, então, homogeneizadas a 1200 ciclos min^{-1} em um agitador orbital (Geno-Grinder, SPEX Certi-Prep) por 10 minutos. As amostras de parede celular foram novamente coletadas em filtro de nylon e lavadas com etanol 50% quente e, em seguida, com água a 80 °C. A etapa de homogeneização foi repetida mais uma vez e, após a filtração, as amostras foram suspensas em água deionizada.

Alíquotas de 6 μL da parede celular suspensa de cada uma das amostras foram pipetadas sobre lâminas de ouro, próprias para a análise por infravermelho (EZ-Spot, Spectra-Tech). As lâminas com as gotas do material pipetado foram secas a temperatura ambiente, de forma que uma fina camada de material ficou depositada sobre a superfície do ouro.

Os espectros foram coletados por um espectrômetro infravermelho com detector de mercúrio- telureto de cádmio (Thermo-Electron, Madison), resfriado com nitrogênio líquido. Uma área de parede celular de 125 x 125 μm foi selecionada para a obtenção de cada espectro, que foi feita pelo software OMNIC 3.2. Cada espectro obtido consiste numa média de 128 digitalizações com 8 cm^{-1} de resolução.

Foram obtidos para cada um dos tecidos dos diferentes tratamentos, 55 espectros que foram, posteriormente, normalizados e analisados.

3.4.3 Análise do perfil de monossacarídeos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

O perfil dos monossacarídeos foi realizado sob supervisão do Dr. Nicholas C. Carpita.

Os monossacarídeos constituintes da parede celular foram analisados por cromatografia gasosa. Alíquotas de 400 µL do material de parede celular suspenso foram hidrolisadas com 400 µL de TFA 4 M com 1 mM de inositol, utilizado como padrão interno. As amostras foram incubadas a 120 °C por 90 minutos, com agitação manual a cada 30 minutos para a hidrólise completa. Após resfriamento do material, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto e o sobrenadante transferido para outro tubo, onde foi seco sob fluxo de ar a 40 °C.

Depois de secas, as amostras, contendo os açúcares a serem analisados, foram convertidas em alditóis-acetatos (Gibeaut & Carpita, 1991). Os alditóis-acetatos foram separados por cromatografia gasosa em coluna capilar de sílica SP-2330 (0,25 mm X 30 m, Supelco, Bellefonte) numa programação de temperatura de 170 a 240 °C, com aumento de 5 °C min⁻¹, sendo o nitrogênio utilizado como gás de arraste. A composição de açúcares foi verificada pelo espectrômetro de massa segundo Carpita & Shea (1989).

3.5 Análises de produtividade

Para a obtenção dos dados de produtividade após 50 semanas, os colmos de 8 plantas de cada tratamento foram coletados separadamente e levados para o Laboratório

de Análises do Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) - Piracicaba, onde foram feitas as análises.

Os colmos de cada uma das plantas foram desintegrados e a amostra resultante foi homogeneizada. Após este processo, foram pesados 500 g de cada amostra de colmo em balança de precisão que foram prensados durante 1 minuto a 250 kgf cm⁻². O caldo resultante da prensa foi coletado e o resíduo, denominado de bolo úmido, foi transferido para uma bacia plástica e pesado em balança de precisão antes de ser mantido em estufa de circulação forçada de ar a 105 °C até peso constante. Após a secagem completa, a amostra foi novamente pesada e obteve-se então, o valor do bolo seco. Os valores de bolo úmido e bolo seco foram utilizados para os cálculos de porcentagem de fibras e teor de sacarose (itens 3.5.2 e 3.5.3).

3.5.1 Grau BRIX

O grau BRIX foi obtido através de leitura em refratômetro óptico com correção a 20 °C com o caldo coletado das amostras após o procedimento descrito acima.

3.5.2 Porcentagem de fibras (Fc)

A porcentagem de fibras das amostras foi obtida a partir dos pesos dos bolos úmido e seco juntamente com o grau BRIX do caldo extraído a partir da fórmula:

$$F_c = \frac{100 \times \text{PBS} - \text{PBU} \times \text{BCE}}{5 (100 - \text{BCE})}$$

Onde : Fc = porcentagem de fibras

PBS = Peso do bolo seco

PBU = Peso do bolo úmido

BCE = grau BRIX do caldo extraído

3.5.3 Teor de sacarose (Pc)

Para a determinação do teor de sacarose nos colmos, 200 mL do caldo extraído foram homogeneizados com 8-10 g de mistura clarificante contendo cloreto de alumínio. Após homogeneizadas, cada uma das amostras foi filtrada em papel filtro colocado no funil sobre uma proveta. O filtrado límpido foi colocado em um sacarímetro provido de tubo polarimétrico de fluxo contínuo, com o qual se efetuou a leitura sacarimétrica (LAI).

O valor do teor de sacarose no tecido foi determinado a partir das seguintes fórmulas:

$$LPb = 1,0078 \times LAI + 0,0444 \quad (1)$$

$$SCE = LPb \times \text{Fator de pol} \quad (2)$$

$$C = 1,0313 - 0,00575 \times Fc \quad (3)$$

$$Pc = SCE (1 - 0,01 Fc) C \quad (4)$$

Onde: LPb = Leitura sacarimétrica equivalente ao subacetato de chumbo

LAI = Leitura sacarimétrica com cloreto de alumínio

SCE = porcentagem de sacarose do caldo extraído

Fator de pol = valor obtido por uma tabela em função do grau BRIX

C = coeficiente de pol

Fc = porcentagem de fibras

Pc = porcentagem de sacarose no tecido

3.6 Análise de expressão gênica

3.6.1 Extração de RNA total

Para a extração do RNA total foram utilizadas as folhas das plantas controle e tratadas, coletadas após 13 e 22 semanas do início do experimento.

A extração foi feita com o método fenol/isotiocianato de guanidina utilizando tampão TRzol[®] (Invitrogen). Em 200 mg do material congelado e macerado foram adicionados 1,5 mL do tampão TRzol[®] e a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 300 μ L de clorofórmio foram adicionados. As amostras foram misturadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos e, posteriormente centrifugadas nas mesmas condições citadas acima. A fase aquosa formada após a centrifugação foi transferida para um novo microtubo e 750 μ L de isopropanol (volume 1:1) foram adicionados. A mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Uma nova centrifugação, nas mesmas condições citadas, foi feita e o sobrenadante foi descartado. O precipitado formado foi lavado em etanol 70% e seco a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. O precipitado foi solubilizado em 200 μ L de água deionizada autoclavada e precipitado com

10% de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 3 volumes de etanol 100%. As amostras foram mantidas a -20 °C por 12 horas.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado novamente seco a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. O precipitado final foi ressuscitado em 30 µL de água deionizada autoclavada e mantido a -80 °C.

3.6.2 Síntese e marcação da sonda de cDNA

As análises de expressão gênica foram realizadas sob a supervisão da Dra. Gláucia Mendes Souza do Departamento de Bioquímica (Instituto de Química – Universidade de São Paulo).

Para a síntese e marcação das sondas de cDNA, utilizou-se o kit *CyScribe Post-Labeling* (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante. A reação de anelamento dos primers ao molde de RNA foi realizada com 12 µg de RNA total, 4 µL de oligo-dT e água deionizada tratada com DEPC para um volume final de reação para 10,5 µL. No tubo contendo a amostra cuja sonda foi marcada com Cy3-dCTP foi adicionado 0,5 µL do RNA *Cy3 Referência* diluído 1:3 e na outra amostra foi adicionado 0,5 µL do RNA *Cy5 Teste*, também diluído 1:3, ambos do sistema *Scorecard* (GE Healthcare). O meio foi incubado a 70 °C por 5 minutos e a seguir, por 10 minutos em temperatura ambiente.

Para a reação de transcrição reversa e marcação das sondas, foram misturados 4 µL de tampão *CyScript* 5 x, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL da mistura de nucleotídeos, 1 µL de aminoalil-dUTP e 1 µL de transcriptase reversa *CyScript* em cada um dos tubos contendo as diferentes amostras de RNA. O meio de reação foi incubado por 10 minutos em

temperatura ambiente, seguido de incubação a 42 °C por 3 horas. A hidrólise alcalina do RNA foi realizada adicionando aos tubos 2 µl de hidróxido de sódio 2,5 mM e incubando cada reação a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, 10 µl de tampão HEPES 2M foram misturados ao meio.

Em seguida, o cDNA sintetizado foi purificado. Para isso, 120 µl de tampão de ligação (acetato de potássio 150 mM / guanidina 5,3 M) foram adicionados a cada reação, todo o volume foi transferido para um poço da placa de purificação de 96 poços (Millipore Multiscreen® filter plate). Cada poço foi lavado 4 vezes com etanol 80%, com centrifugação a 1000 *g* por 1 minuto a 25 °C, utilizando-se uma placa de 96 poços com fundo em U para coletar as lavagens. A última lavagem, diferentemente das outras, foi realizada com centrifugação a 1200 *g* por 5 minutos. O filtrado foi descartado e a placa de coleta trocada por uma nova. O cDNA sintetizado foi eluído 2x com 45 µl de Tris-HCl pH 8,0 10 mM, com centrifugação de 800 *g* por 5 minutos e totalmente seco no speed-vac a 30 °C. Posteriormente, foi realizada a reação de marcação com *CyDye* e, a partir deste ponto, todos os procedimentos foram realizados sem a incidência de luz direta. O cDNA purificado e seco foi dissolvido em 15 µl de água deionizada tratada com DEPC. Uma alíquota de *Cy3* e outra de *Cy5* do kit foram dissolvidas em 15 µl de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,0 separadamente. Uma alíquota de *CyDye* foi misturada a uma alíquota de cDNA e a reação foi incubada em temperatura ambiente por uma hora. Foram adicionados 15 µl de hidroxilamina 4 M a cada reação e o meio foi incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. As sondas marcadas foram purificadas em placa de purificação de 96 poços (Millipore Multiscreen® filter plate) como descrito acima e totalmente secas no speed-vac a 30 °C e mantidas a -20 °C até o momento da hibridização nas lâminas de vidro.

3.6.3 Hibridizações em *microarray* de DNA

As sondas marcadas e secas foram dissolvidas com 6,75 μ l de água deionizada tratada com DEPC. Ambas as sondas foram misturadas, totalizando um volume total de 13,5 μ l, ao qual, foi adicionado 13,5 μ l de tampão de hibridização (*Microarray Hybridization Buffer*- GE Healthcare) e 27 μ l de formamida. As soluções foram incubadas a 92 °C por 2 minutos e colocadas em gelo. Posteriormente, os 54 μ l de solução foram aplicados em uma das extremidades da lâmina, a qual foi então coberta com uma lamínula. Este sistema foi incubado em banho a 42 °C por 16 horas. Após esta etapa, a lâmina foi lavada na seguinte ordem: uma vez em 1 x SSC, 0,2% SDS 10 minutos a 55 °C, duas vezes em 0,1 x SSC, 0,2% SDS por 10 minutos a 55 °C, uma vez em 0,1x SSC por 1 minuto em temperatura ambiente, seguidos de 4 imersões em água deionizada e secagem imediata com jato de nitrogênio.

Depois de secos, os chips foram digitalizados e as imagens geradas foram normalizadas e analisadas de acordo com o descrito por Papini-Terzi *et al.* (2005), modificado.

3.6.4 Validação dos resultados do *microarray* por qPCR em tempo real

Para a validação por qPCR em tempo real, utilizou-se 5 μ g de RNA total (o mesmo utilizado para fazer as hibridizações no chip) que foram previamente tratados com DNase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de transcrição reversa utilizou-se o kit *Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®). Para esta reação foram utilizados 7,5 μ L de RNA tratado, 2 μ L de tampão

RT 10 x, 0,5 mM de cada um dos dNTPs, 50 ng primers hexâmeros randômicos, 0,25 µg de oligo (dT), 5 mM de MgCl₂; 10 mM DTT (ditiotreitól); 40 U de RNaseOUT e 50 U de *SuperScript II Reverse Transcriptase*, totalizando 20 µL de volume final. O RNA, os primers hexâmeros randômicos, os dNTPs e oligo (dT)s foram primeiramente misturados e incubados a 70 °C por 5 minutos e depois mantidos em gelo. Após este procedimento, todos os outros reagentes foram adicionados a esta mistura, com exceção da *SuperScript II Reverse Transcriptase*, e a reação foi mantida a 25 °C por 10 minutos e então incubada a 42 °C durante 2 minutos. A *SuperScript II Reverse Transcriptase* foi adicionada em cada um dos microtubos e a reação foi incubada a 42 °C durante 1 hora e meia e a 72 °C durante 10 minutos e depois resfriada em gelo. O produto final (cDNA) foi tratado com 2 U de RNaseH (Invitrogen®) durante 30 minutos a 37 °C e a 72 °C durante 10 minutos.

As reações para o qPCR em tempo real foram feitas utilizando o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®) no equipamento *GeneAmp 5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems®). Os primers dos genes de interesse, utilizados na validação, foram obtidos após verificação de especificidade através de consulta ao banco de dados do SUCEST. Cada reação foi feita em triplicata contendo 0,8 µL de cDNA diluído 1:5; 4 µL de primers com concentração de 600 nM cada; 10 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* e 5,2 µL de água DEPC autoclavada, totalizando 20 µL em cada microtubo para a reação. Os parâmetros utilizados para a reação do qPCR em tempo-real foram de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos seguido de anelamento a 60 °C durante 1 minuto. A especificidade para os produtos de amplificação foi avaliada através de curvas de dissociação geradas pelo próprio aparelho. A razão de expressão das amostras controle

(ambiente) e tratado (elevado CO₂) foi determinada pelo método 2^{-??Ct} (Livak & Schmittgin, 2001), modificado.

3.7 Análises estatísticas

Os dados de trocas gasosas, fluorescência, crescimento e produtividade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo todo e qualquer contraste entre duas médias avaliado pelo teste t de Student em níveis de significância de 0,1%, 1% ou 5% de probabilidade.

Para as análises foi utilizado o pacote estatístico *WinSTAT for Excel*, versão 2001.1, Robert Fish.

A porcentagem do efeito do tratamento em alto CO₂, quando calculada, foi feita de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Efeito CO}_2 (\%) = \frac{(\mu_{\text{elevado}} * 100) - 100}{\mu_{\text{ambiente}}}$$

No caso das análises de carboidratos por cromatografia gasosa, foi seguido o padrão utilizado na literatura, aceitando-se diferenças detectáveis pela análise do erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 Dados meteorológicos

Durante o período experimental foram observadas temperaturas médias que variaram de 16 °C a 22,6 °C, sendo que no mês de abril de 2005 (início do experimento) e após o mês de outubro de 2005 foram verificados os valores médios mais altos (Figura 4).

A umidade relativa média se manteve em torno de 80%, sendo o mês de agosto o mais seco e os meses de setembro e outubro os mais úmidos (Figura 4).

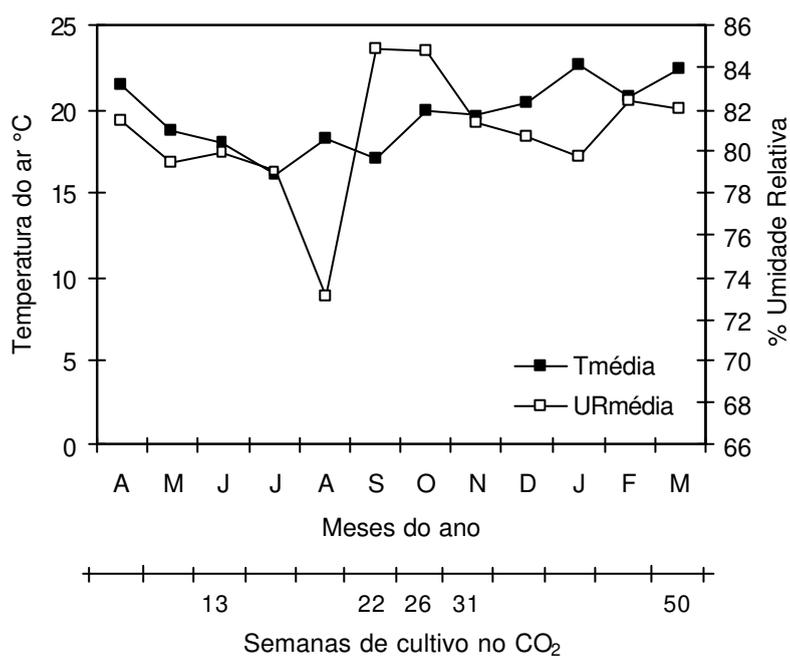


Figura 4 – Temperatura média do ar e porcentagem de umidade relativa média durante o experimento. Os meses de junho, setembro, outubro, novembro e março, correspondem às coletas de 13, 22, 26, 31 e 50 semanas, respectivamente.

4.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Os valores da taxa de assimilação fotossintética (A) medidos durante o experimento mostram que a cana-de-açúcar apresenta alterações nas taxas fotossintéticas em resposta ao elevado CO₂ a partir da 10^a semana de cultivo (Figura 5). Os valores de assimilação para as plantas crescidas em alto CO₂ foram significativamente maiores do que os do controle até a 22^a semana atingindo a diferença máxima de aproximadamente 60% após 13 semanas de tratamento. A partir da 25^a semana, os valores de ambos os tratamentos decresceram e uma diferença significativa não foi mais observada.

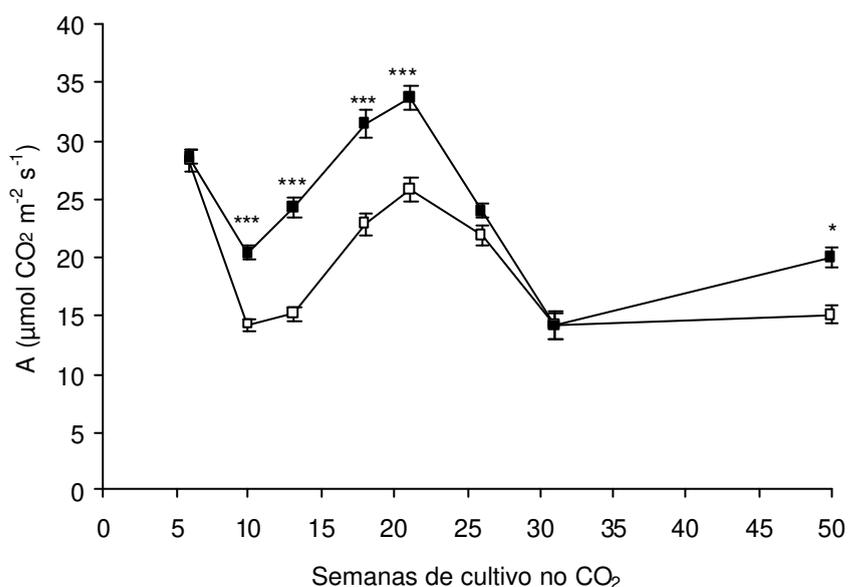


Figura 5 – Valores de assimilação fotossintética instantânea da cana-de-açúcar cultivada em concentrações ambiente (□) e elevada (■) de CO₂ ao longo do experimento. Valores correspondem à média ± erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em níveis de 5% (*) e 0,1% (***) pelo teste-t de Student.

Após 50 semanas, os valores de assimilação das plantas controle foram similares aos obtidos na 31ª semana. Entretanto, nas plantas crescidas em elevado CO₂, ocorre um aumento da taxa fotossintética, proporcionando diferença de 30% entre os tratamentos nesse período.

Na Tabela 2 observa-se que as taxas de condutância estomática (g_s) e transpiração (E) variaram ao longo do tempo em ambos os tratamentos. Contudo, os valores obtidos para as plantas crescidas em elevada concentração de CO₂ foram, em geral, menores ao longo das 50 semanas de experimento. Os percentuais médios de decréscimo em condutância estomática e transpiração das plantas em elevado CO₂ em relação às plantas crescidas em condições de CO₂ ambiente foram de 37% e 32%, respectivamente.

Tabela 2 - Taxa de condutância estomática (g_s), transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA) nas plantas crescidas em concentrações ambiente e elevada de CO₂ ao longo do experimento. Valores correspondem à média \pm erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em níveis de 5% (*), 1% (**) e 0,1% (***) pelo teste-t de Student.

Semanas de cultivo no CO ₂	Parâmetros					
	g_s (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)		E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)		EUA (μ mol CO ₂ /mmol H ₂ O)	
	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂
6	0,22 \pm 0,01	0,13 \pm 0,005 ***	4,08 \pm 0,20	2,39 \pm 0,07 ***	7,04 \pm 0,18	12,04 \pm 0,39 ***
10	0,10 \pm 0,004	0,091 \pm 0,005	1,34 \pm 0,03	1,25 \pm 0,06	10,72 \pm 0,23	16,61 \pm 0,51 ***
13	0,12 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	2,19 \pm 0,17	2,30 \pm 0,13	6,76 \pm 0,35	11,19 \pm 0,59 *
18	0,20 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01 **	3,56 \pm 0,14	2,49 \pm 0,08 ***	6,47 \pm 0,12	12,62 \pm 0,32 ***
21	0,26 \pm 0,01	0,23 \pm 0,03	3,53 \pm 0,17	3,12 \pm 0,30	7,91 \pm 0,31	11,53 \pm 1,05 *
26	0,22 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01 ***	2,84 \pm 0,14	2,74 \pm 0,43	7,77 \pm 0,47	10,29 \pm 0,90
31	0,12 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01 **	2,66 \pm 0,17	1,46 \pm 0,18 ***	5,12 \pm 0,18	8,63 \pm 0,58 ***
50	0,20 \pm 0,005	0,13 \pm 0,007 **	3,30 \pm 0,16	2,33 \pm 0,16 *	4,57 \pm 0,06	8,73 \pm 1,02 *

Como consequência da menor taxa de transpiração e maior taxa de assimilação fotossintética das plantas em elevado CO₂, observa-se um aumento médio de 62% da eficiência do uso da água nestas plantas (Tabela 2).

Em relação à eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) (Tabela 3) observa-se pelos dados obtidos, que as plantas não sofreram nenhum tipo de estresse, pois os valores estão dentro da normalidade para plantas saudáveis.

Tabela 3- Dados da eficiência fotoquímica (F_v/F_m) das plantas crescidas em concentrações ambiente e elevada de CO₂. Valores correspondem à média \pm erro padrão. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

Semanas de cultivo no CO ₂	F_v/F_m	
	Ambiente	Elevado CO ₂
10	0,780 \pm 0,002	0,778 \pm 0,009
18	0,786 \pm 0,008	0,802 \pm 0,003
26	0,786 \pm 0,005	0,800 \pm 0,004

4.3 Crescimento

A Figura 6 apresenta os valores de altura obtidos durante o experimento. Os resultados mostram uma diferença significativa neste parâmetro entre as plantas controle e tratadas a partir da 13^a semana de cultivo. Os valores para as plantas crescidas em atmosfera com CO₂ elevado são, em média, 17% maiores do que os obtidos para as plantas controle. Na Figura 7 pode ser verificado o aspecto geral das plantas após 26

semanas de cultivo, onde se pode verificar a diferença em altura entre os dois tratamentos.

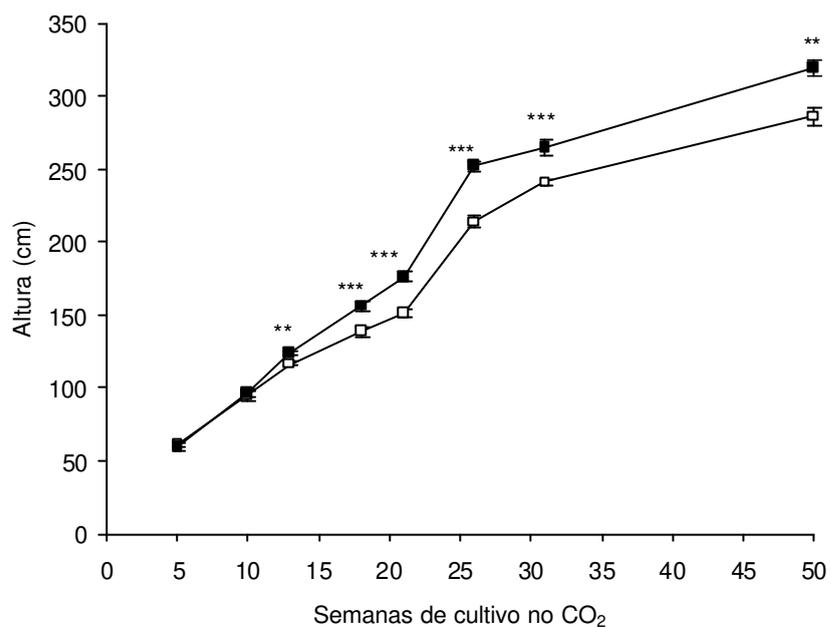


Figura 6 - Altura das plantas (cm) cultivadas em concentrações ambiente (□) e elevada (■) de CO₂ ao longo do experimento. Valores correspondem à média \pm erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em níveis de 1% (**) e 0,1% (***) pelo teste-t de Student.



Figura 7 – Aspecto geral das plantas após 26 semanas de desenvolvimento. Câmara da esquerda: plantas cultivadas em atmosfera ambiente; câmara da direita: plantas cultivadas em atmosfera elevada de CO_2 . As setas vermelhas indicam a altura dos grupos de plantas.

A avaliação do crescimento pelo acúmulo de biomassa mostrou que as plantas crescidas em elevado CO_2 tiveram um acúmulo maior de matéria seca do que as plantas crescidas em condições de CO_2 ambiente (Figura 8A), sendo as plantas tratadas, em média, 40% maiores do que as controle.

As folhas e o colmo foram os órgãos que contribuíram para esta diferença observada. De maneira geral, as folhas das plantas tratadas apresentaram valores maiores de biomassa durante todo o experimento, com exceção da 22^a semana, onde a queda da biomassa pode ser atribuída a um episódio isolado de herbivoria que ocorreu em uma das câmaras com elevado CO_2 . Neste órgão a diferença significativa é observada partir da 31^a semana (Figura 8B), quando as plantas tratadas apresentaram biomassa 45% maior do que as controle e, após 50 semanas, o acúmulo foi 25% maior.

A partir da 26ª semana houve um aumento significativo de biomassa nos colmos das plantas cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ (Figura 8C). A maior diferença entre os tratamentos foi observada após 31 semanas de experimento (295%) e no final, após 50 semanas, a diferença foi de 60%. O aspecto dos colmos após 50 semanas pode ser observado na Figura 9.

Não houve diferença para os valores obtidos para as raízes (Figura 8D).

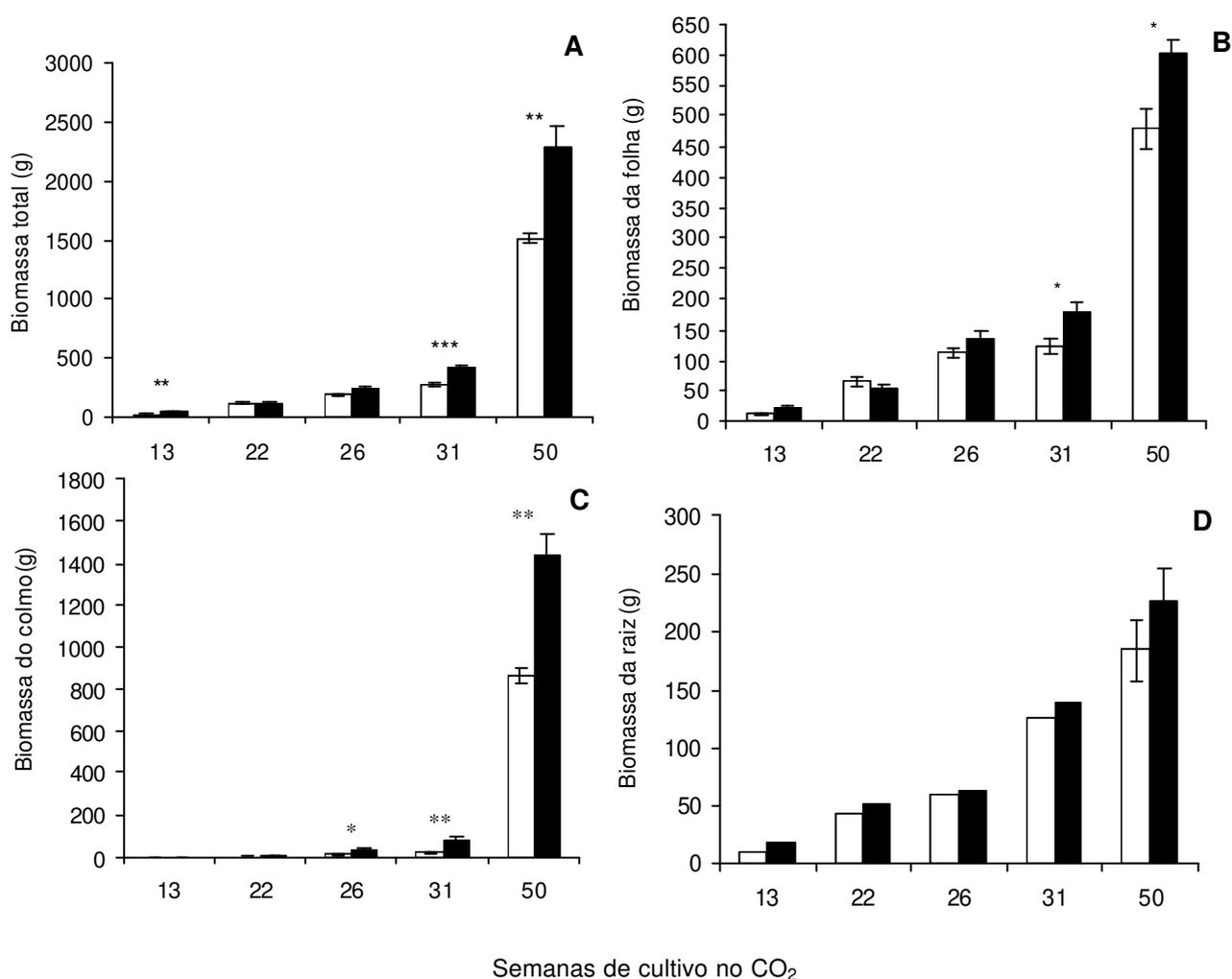


Figura 8 – Massa seca média (g) das plantas controle (□) e plantas crescidas em alto CO₂ (■). (A) – Biomassa total; (B) – Folhas; (C) – Colmo; (D) - Raiz. Barras correspondem à média ± erro padrão. Raiz – média de dois vasos de cada tratamento até a 31ª semana. Asteriscos indicam diferença significativa em níveis de 5% (*), 1% (**) e 0,1% (***) pelo teste-t de Student.

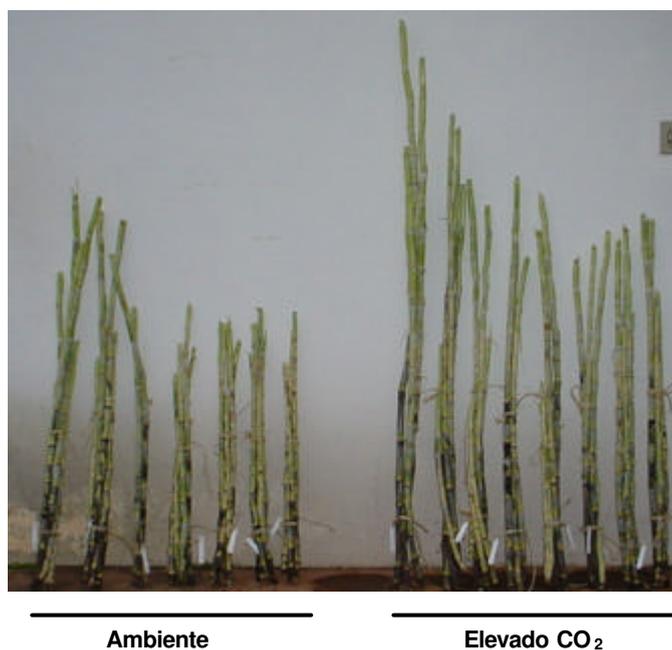


Figura 9 – Aspecto geral dos colmos após coleta da 50^a semana das plantas cultivadas em concentração de CO₂ ambiente (esquerda) e elevada (direita).

Através da taxa de crescimento relativo (TCR), que indica a quantidade de biomassa nova produzida por unidade de biomassa já existente, em um determinado intervalo de tempo, pode-se observar que da 13^a a 22^a semana o valor da TCR para as plantas crescidas em elevado CO₂ foi menor do que para as plantas controle (Figura 10). No entanto, no período da 22^a a 31^a semana, os valores da TCR das plantas tratadas foram maiores do que as plantas controle em aproximadamente 45%. O valor obtido para o primeiro período citado pode ter sido prejudicado devido à queda na biomassa das folhas na 22^a semana devido do episódio de herbivoria previamente citado.

Observa-se também que, após a 26^a semana, os valores da TCR decrescem para ambos os tratamentos. Essa queda coincide com a diminuição das taxas fotossintéticas,

que ocorreu a partir da 26ª semana, mostrando a relação direta entre a fotossíntese e o crescimento.

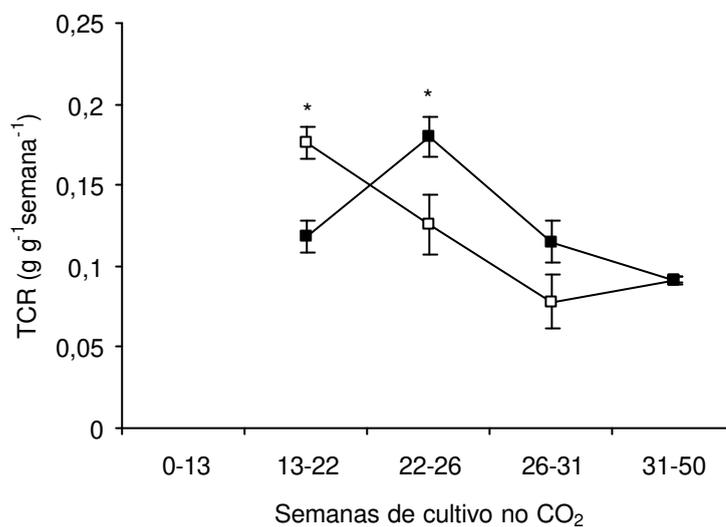


Figura 10 – Taxa de crescimento relativo (TCR) das plantas cultivadas em concentrações ambiente (□) e elevada (■) de CO₂ durante o experimento. Valores correspondem à média ± erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em níveis de 5% (*) pelo teste-t de Student.

4.4 Conteúdo de água

Na Tabela 4 são mostrados os dados do conteúdo de água de folha, colmo e raiz das plantas cultivadas em atmosfera com concentrações de CO₂ ambiente e elevada. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

Tabela 4 - Conteúdo de água em diferentes partes da planta nas coletas após 13, 21 e 50 semanas. Valores correspondem à média \pm erro padrão. Raiz – média de dois vasos de cada tratamento. nd – não determinado. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

Semanas de cultivo no CO ₂	% de H ₂ O no tecido					
	Folha		Colmo		Raiz	
	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂
13	78,79 \pm 1,18	82,29 \pm 3,35	78,92 \pm 3,08	83,67 \pm 4,03	91,22 \pm 0,51	91,54 \pm 0,06
21	81,01 \pm 0,42	83,57 \pm 2,61	87,05 \pm 0,91	88,83 \pm 3,42	91,68 \pm 0,22	92,07 \pm 0,07
50	nd	nd	86,56 \pm 0,47	85,68 \pm 0,23	nd	nd

4.5 Análises bioquímicas

4.5.1 Conteúdo de carboidratos solúveis

Nas Tabelas 5 e 6 são mostrados os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, respectivamente, obtidos nos diferentes tecidos na 13^a, 22^a e 31^a semanas de cultivo. Na 13^a semana ocorreu um aumento no teor de açúcares solúveis totais (Tabela 5) nas raízes das plantas cultivadas em elevado CO₂, enquanto na 31^a semana, o aumento foi observado em folhas e colmo.

Tabela 5– Teor de açúcares solúveis totais (μ g/ mg Massa Seca) em folha, colmo e raiz das plantas controle e tratadas. nd - não determinado. Valores correspondem a médias de duplicatas com mistura de 2-3 plantas.

Semanas de cultivo no CO ₂	Açúcares solúveis totais (μ g/ mg MS)					
	Folha		Colmo		Raiz	
	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂
13	26,16	17,22	nd	nd	53,34	96,2
22	46,7	51,88	112,42	116,47	86,54	88,17
31	68,28	93,27	328,22	405,11	109,27	97,77

Na Tabela 6, pode-se observar um aumento no teor de açúcares redutores nas raízes após 13 semanas de cultivo e no colmo após 22 semanas nas plantas tratadas. Na 31ª semana, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento no teor de açúcares redutores do colmo, foi detectada uma diminuição destes nas folhas e raízes das plantas do alto CO₂ com relação às plantas controle.

Tabela 6– Teor de açúcares redutores (µg/ mg Massa Seca) em folha, colmo e raiz das plantas controle e tratadas. nd – não determinado. Valores correspondem a médias de duplicatas com mistura de 2-3 plantas.

Semanas de cultivo no CO ₂	Açúcares solúveis redutores (µg/ mg MS)					
	Folha		Colmo		Raiz	
	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂
13	16,07	17,33	nd	nd	37,44	57,09
22	19,78	22,43	11,68	26,47	66,81	68,5
31	43,12	20,8	126,18	200,6	52,39	36,4

4.5.2 Polissacarídeos de parede celular por FT -IR

Na Figura 11 são mostrados, do lado esquerdo, os espectros médios obtidos pelo FT-IR de folhas (Figura 11A), colmo (Figura 11C) e fibras (Figura 11E) e, do lado direito, espectros gerados pela subtração dos espectros médios das plantas cultivadas em alto CO₂ pelos espectros médios das plantas controle, dos referido tecidos (Figuras 11B, 11D e 11F).

No espectro obtido a partir da análise das folhas (Figura 11B), observa-se a presença de 5 picos diferenciais, que correspondem a proteínas (1554 e 1650 cm⁻¹) (Carpita *et al.*, 2001; Yang & Yen, 2002), mananos (1168 cm⁻¹), xilose (980 cm⁻¹) e, possivelmente, a um composto com ligações β (898 cm⁻¹) (Kacuráková *et al.*, 2000).

Nossos resultados apontam um aumento no conteúdo de proteínas e mananos e diminuição de xilose e de compostos de ligações β em folhas de plantas cultivadas em elevado CO_2 .

No colmo (Figura 11D), os picos que aparecem são característicos de celulose (1040 e 1060 cm^{-1}) (Tsuboi, 1957) e ramnogalaturonano (1122 cm^{-1}) (Kacuráková *et al.*, 2000) e ambos compostos tendem ao aumento nas plantas cultivadas em atmosfera enriquecida com CO_2 . O pico em 1040cm^{-1} (celulose), também aparece como diferença entre os tratamentos nas fibras (Figura 11F).

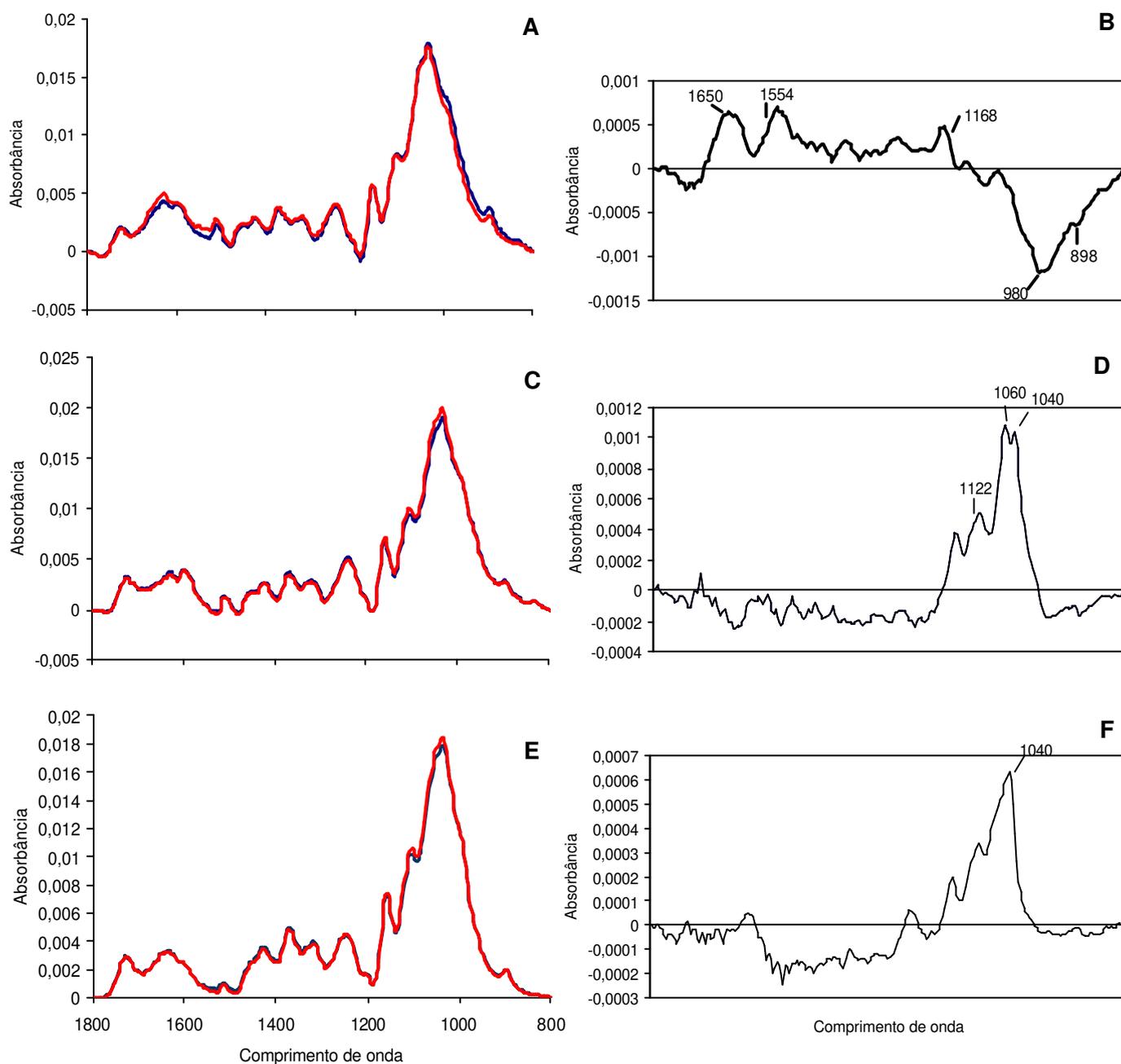


Figura 11 – Espectros de FTIR obtidos de folhas (A e B), colmo (C e D) e fibras (E e F) de plantas cultivadas durante 50 semanas em atmosfera ambiente (—) e elevada de CO₂. À esquerda: média de 55 espectros de cada tratamento; à direita: espectro gerado pela subtração do tratado pelo controle, mostrando as diferenças entre os tratamentos.

4.5.3 Perfil de monossacarídeos por GC-MS

A análise de monossacarídeos da parede celular, após a hidrólise, revelou mudanças na porcentagem de moles em ramnose nas folhas e colmo das plantas tratadas. Houve mudanças também na porcentagem de fucose no colmo destas mesmas plantas. Pode-se observar ainda que houve uma tendência do monossacarídeo xilose diminuir em folhas e colmo das plantas crescidas em elevado CO₂, ao mesmo tempo em que manose, galactose e glucose tendem ao aumento.

Nas fibras pode-se observar que a galactose e glucose tendem ao aumento e a xilose tende à diminuição nas plantas do alto CO₂, seguindo o padrão encontrado em folhas e colmo.

Tabela 7 – Porcentagem de moles de monossacarídeos presentes na parede celular, após hidrólise com TFA, das plantas cultivadas em concentrações ambiente e elevada de CO₂ durante 50 semanas de tratamento.

% de mol de monossacarídeos nos tecidos						
Monossacarídeos	Folhas		Colmo		Fibras	
	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂	Ambiente	Elevado CO ₂
Ramnose	0,75 ± 0,04	1,20 ± 0,18	0,59 ± 0,03	0,69 ± 0,04	1,19 ± 0,29	0,90 ± 0,16
Fucose	0,78 ± 0,18	1,03 ± 0,17	1,96 ± 0,18	2,80 ± 0,24	4,10 ± 0,66	3,15 ± 0,33
Arabinose	11,04 ± 0,59	11,34 ± 0,2	8,31 ± 0,36	8,32 ± 0,29	10,18 ± 0,74	10,38 ± 0,87
Xilose	69,18 ± 0,67	66,84 ± 1,29	75,32 ± 0,84	72,38 ± 1,01	65,60 ± 1,48	63,28 ± 4,2
Manose	0,50 ± 0,13	0,53 ± 0,07	0,20 ± 0,04	0,30 ± 0,09	1,24 ± 0,67	0,73 ± 0,38
Galactose	1,66 ± 0,10	1,72 ± 0,08	1,75 ± 0,11	1,90 ± 0,05	2,52 ± 0,12	2,87 ± 0,33
Glucose	16,00 ± 0,9	17,27 ± 0,79	11,81 ± 0,46	13,53 ± 1,09	15,04 ± 0,84	18,51 ± 2,75
Ácido galacturônico	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,004	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,05

4.6 Produtividade

Os resultados dos parâmetros de produtividade, que foram amostrados no colmo após 50 semanas de cultivo, mostram um aumento de 29,35% no teor de sacarose na cana-de-açúcar crescida em atmosfera com alto CO₂ (Tabela 8).

Entretanto, ainda que exista uma tendência ao aumento do grau BRIX e da porcentagem de fibras nas plantas expostas ao elevado CO₂, não foram verificadas diferenças significativas nos valores destes parâmetros (Tabela 8).

Tabela 8 – Grau BRIX, Fibra (%) e Teor de sacarose (%) no colmo das plantas de cana-de-açúcar após um ano de cultivo em atmosfera de 360ppm e 720ppm de CO₂. Valores correspondem à média ± erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em níveis de 5% (*) pelo teste-t de Student.

	Grau BRIX	% Fibra	Teor de sacarose no tecido (%)
Ambiente	7,17 ± 0,21	6,62 ± 0,13	2,18 ± 0,20
Elevado CO₂	7,75 ± 0,17	7,13 ± 0,21	2,82 ± 0,14*

4.7 Análise de expressão gênica

A partir das hibridizações realizadas com os RNAs de folhas após 13 e 22 semanas de cultivo em atmosfera de ambiente e elevada concentração de CO₂, foi obtido um conjunto de 11 genes diferencialmente expressos após 13 semanas de cultivo (8 induzidos e 3 reprimidos) e um conjunto de 26 genes diferencialmente expressos após 22 semanas (15 induzidos e 11 reprimidos) (Tabela 9). Os genes diferencialmente expressos

tiveram sua identidade confirmada em bancos de dados públicos e suas possíveis funções categorizadas de acordo com a anotação feita pelo projeto SUCEST-FUN.

Foram verificadas 13 categorias de genes cuja expressão foi alterada com o cultivo em atmosfera enriquecida de CO₂. Dentre os genes diferencialmente expressos destacam-se, após 13 semanas de cultivo, principalmente genes relacionados ao processo de fotossíntese e, após 22 semanas, genes relacionados ao desenvolvimento das plantas (Tabela 9).

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar após 13 e 22 semanas de cultivo em elevado CO₂. Categorias feitas de acordo com processo biológico no qual o gene está envolvido. SAS = *Sugarcane Assembled Sequences*.

SUCEST SAS	Número de acesso do homólogo	Descrição do gene	13 semanas		22 semanas	
			Induzidos	Reprimidos	Induzidos	Reprimidos
Metabolismo de carboidratos						
SCQSRT1034D03.g	gb ABG22346.1	Alpha-L-arabinofuranosidase			1,371	
SCAGLR1021F11.g	gb AAL14713.1	beta-glucosidase isozyme		2,189		
SCCCRT1C06D06.g	gb AAO21213.1	cell-wall invertase				1,616
SCVPRT2079H06.g	ref XP_466575.1	glucose-6-phosphate dehydrogenase		1,232	1,635	
SCBFLR1046C09.g	emb CAI44139.1	xyloglucan endo-transglycosylase/hydrolase	3,591			
Ciclo celular						
SCAGLR2011H09.g	gb AAR07076.1	cyclin H1				1,633
SCVPRT2075B03.g	dbj BAD61385.1	nucleostemin			1,397	
Desenvolvimento						
SCSGST3121C06.g	dbj BAD38083.1	auxin-independent growth promoter			1,910	
SCCCLR2002F08.g	gb AF467730.1	dormancy-associated protein			2,300	
SCAGLR1043E03.g	gb ABF94220.1	kelch repeat-containing F-box family protein				1,541
SCRFAD1116F06.g	gb AAV43814.1	Lateral organ boundaries protein				1,495
SCEPRZ1010F07.g	gb ABA61130.1	light-induced protein	1,194			

Tabela 9 - continuação

SUCEST SAS	Número de acesso do homólogo	Descrição do gene	Razão de expressão (elevado CO ₂ /controle)			
			13 semanas		22 semanas	
			Induzidos	Reprimidos	Induzidos	Reprimidos
Metabolismo de lipídeos						
SCCCLR1C10A12.g	ref XP_480561.1	AE9 stearoyl-ACP desaturase	2,583			
No match						
-	-	No match			1,272	
-	-	No match			1,543	
SCBGRT1048A07.g	-	No match				1,398
Metabolismo de ácido nucléico						
SCCCLR1C07F08.g	ref NM_115590.2	ATP-dependent helicase			1,702	
SCCCCL3005E10.b	gb AF139211.2	pre-mRNA splicing factor			1,541	
Fotossíntese						
SCACLR2007B05.g	ref XP_472726.1	Chlorophyll A-B binding protein	1,508			
SCSBSD2029H02.g	sp P27787	Ferredoxin-1	1,261			
SCCCLR2002H05.g	emb AJ318340.1	phosphoenolpyruvate carboxylase			1,245	
SCSBSB1053D03.g	gb AAS46106.1	photosystem II protein K	1,315			
Metabolismo de proteínas						
SCCCCL4010D05.g	ref XP_465295.1	C2 domain-containing protein-like				1,343
SCRULB1060C09.g	gb AAX11351.1	cathepsin B-like cysteine protease			1,373	
SCEQHR1082F06.g	ref XP_463910.1	glutamate-tRNA ligase			1,505	
SCACSB1035E05.g	emb CAA43983.1	large ribosomal protein 2			1,455	
SCSGCL6071A12.g	ref NM_105382.3	similar to Midasin			1,230	
SCCCLR1072G07.g	gb AAB67607.1	translational initiation factor eIF-4A		1,606		
Receptor						
SCCCCL5003G07.g	gb ABA91210.1	serine/threonine-protein kinase NAK			1,706	

Tabela 9 - continuação

SUCEST SAS	Número de acesso do homólogo	Descrição do gene	Razão de expressão (elevado CO ₂ /controle)			
			13 semanas		22 semanas	
			Induzidos	Reprimidos	Induzidos	Reprimidos
Metabolismo secundário						
SCCCLR1079A02.g	gb AAQ89930.1	caffeoyl-CoA 3-O methyltransferase 1				1,355
Estresse						
SCSFRT2068D12.g	gb AAX96480.1	ASR-like	1,735			
SCJLFL1048D03.g	gb AAA33480.1	dehydrin				1,420
SCCCRZ2C01H04.g	emb CAA43663.1	ferritin				2,768
SCVPRT2079D08.g	gb ABA34042.1	Thaumatococcus				1,367
Fatores de transcrição						
SCEZLR1031A03.g	ref NP_914881.1	auxin response factor 2				1,352
Transporte						
SCAGHR1018F03.g	gb ABF96105.1	Sugar transporter				1,253

Após as análises dos genes diferencialmente expressos, foram escolhidos 10 SAS (*Sugarcane Assembled Sequences*) para serem validados por qPCR em tempo real (Tabela 10).

Tabela 10 - SAS escolhidos para a validação por qPCR em tempo real, com as seqüências dos primers utilizados.

SAS	Homólogo	Seqüência (5'-3')	
		Direto	Reverso
SCACLR1129A11.g	<i>Photosystem I reaction centre subunit N</i>	CCTTCCCCTCGCACTCAAT	ACCTCGCCAAGCAGAAGAAA
SCSBSB1053D03.g	<i>photosystem II protein K</i>	TTTCAACCAATCGTGGATGT	AGCTTGCCAAACAAACGCTAA
SCACLR2007B05.g	<i>Chlorophyll A-B binding protein</i>	AGTTAAAGAAGAGCGTAGCAGCAAT	AAAACAGAGAAGAAGCTCCCCATT
SCSBSD2029H02.g	<i>Ferredoxin-1</i>	CGTACTGCTTGTGCTTTGCA	CACGTTCTAGGGCGTCTCT
SCVPRT2079H06.g	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	GGAAATCTTCACTCCTTTGCTTCA	GGTTCCCGGCTTGTATGGA
SCCCTR1C06D06.g	<i>cell-wall invertase</i>	ACCGACCCACAAAGTATGC	GTGCAATGTGGTTGCTGTGAT
SCAGLR1021F11.g	<i>beta-glucosidase isozyme</i>	CCTTCCGCTTCTCCATTGC	CACGCCCTTCTTGTGATTCC
SCCCLB1C06E01.g	<i>cellulose synthase-like</i>	GAGTCTGGACGAGGGCAATCT	AGCCCCGAGTCCGATTTTCTC
SCCCLR1072G07.g	<i>translational initiation factor eIF-4A</i>	TCCCAGCCAAGATTCAGGTT	CATGAAGTCCGGGTAATCTCAA
Normalizador	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	CACGGCCACTGGAAGCA	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC

A expressão diferencial de 7 dos 10 transcritos selecionados foi confirmada por qPCR, sendo eles: uma subunidade N do centro de reação do fotossistema I (SCACLR1129A11.g); uma ferredoxina I (SCSBSD2029H02.g); uma proteína K do fotossistema II (SCSBSB1053D03.g); um fator de tradução (SCCCLR1072G07.g); uma invertase de parede celular (SCCCRT1C06D06.g); uma glucose-6- fosfato desidrogenase (SCVPRT2079H06.g) e uma β -glucosidase (SCAGLR1021F11.g) (Figura 13).

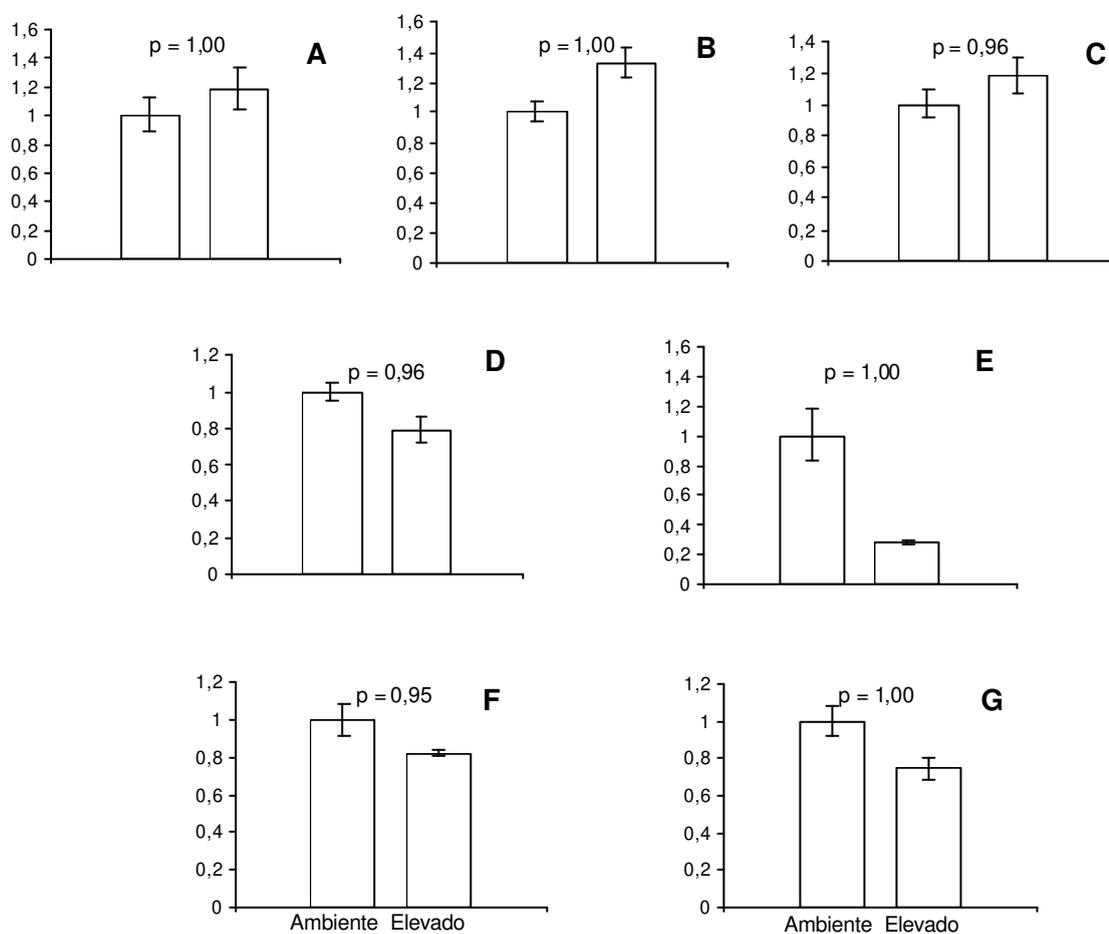


Figura 13 – Confirmação dos resultados do *microarray* de DNA das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em atmosfera ambiente e elevada de CO₂ após 13 ou 21 semanas de cultivo. A - subunidade N do centro de reação do fotossistema I; B - ferredoxina I; C - proteína K do fotossistema II; D - fator de tradução; E - invertase de parede celular; F - glucose-6- fosfato desidrogenase; G - β -glucosidase.

5. DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros fisiológicos

O efeito do aumento de CO₂ na fotossíntese de plantas C₄ é uma questão muito discutida entre os cientistas. Diferentemente das espécies C₃ para as quais os efeitos do alto CO₂ são bem conhecidos, ainda não foi determinado um padrão geral de respostas para plantas C₄ (Ainsworth & Long, 2005). O aumento na taxa fotossintética em espécies C₄ como resposta ao aumento na concentração atmosférica de CO₂ tem sido reportado em diversos estudos (LeCain & Morgan, 1998, Wand *et al.*, 1999; Ghannoum *et al.*, 2000; Sage & Kubien, 2003; Leakey *et al.*, 2004; Vu *et al.*, 2006), mas a discrepância entre as respostas encontradas é enorme.

A proposição inicial dos estudos de LeCain & Morgan (1998) e Ziska *et al.* (1999) era de que, a variedade de respostas encontradas para espécies C₄ em função do aumento do CO₂ atmosférico, ocorreria devido às diferentes enzimas de descarboxilação presentes nestas espécies. Entretanto essa idéia não foi mantida e os autores sugeriram, então, que a diversidade observada pode ser atribuída às diferenças intrínsecas entre as espécies utilizadas e também às condições de cultivo (LeCain & Morgan, 1998) ou que folhas jovens e imaturas de plantas C₄ têm o funcionamento semelhante às folhas de plantas C₃ (Ziska *et al.*, 1999).

Outra hipótese, sugerida por Dengler & Nelson (1999), é que algumas enzimas do ciclo C₃ estariam ativas no mesofilo das folhas C₄, o que acarretaria em efeito direto do aumento da concentração de CO₂ sobre a taxa fotossintética. Tal hipótese foi corroborada por estudos mais recentes, nos quais se verificou o acúmulo de Rubisco na base de folhas jovens antes do aparecimento da PEPCarboxilase (Cousins *et al.*, 2003).

O acréscimo de 41% na fotossíntese, observado por Leakey *et al.* (2004) em milho crescido em alto CO₂ em sistema FACE (*Free Air Carbon Enrichment*) foi atribuído à seca, uma vez que após o início da estação chuvosa, a diferença não foi mais observada. Contudo, em nosso experimento a cana-de-açúcar foi crescida sob regime de rega constante, de forma que a disponibilidade de água não foi um fator que influenciou as respostas obtidas.

No presente estudo, não se pode afirmar o motivo exato pelo qual a taxa fotossintética nas plantas cultivadas em elevado CO₂ foi maior. No entanto, é possível que a atividade de Rubisco esteja envolvida, pois o experimento de Vu *et al.* (2006) com cana-de-açúcar mostrou que após 14 dias de emergência da folha ocorre um aumento de 21% na atividade desta enzima e que isso poderia estar proporcionando o incremento de fotossíntese observado. É possível também que o incremento em fotossíntese esteja relacionado com o Ci. Nas plantas cultivadas sob elevado CO₂ os valores de Ci foram, em média, 160% maiores do que as plantas controle (dados não mostrados), indicando maiores concentrações de CO₂ no mesófilo dessas plantas.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o discreto aumento da eficiência fotoquímica do PSII observado nas plantas cultivadas em elevado CO₂. Este aumento, ainda que muito pequeno, nos sugere que o fluxo de elétrons possa estar alterado nestas plantas, facilitando a produção de ATP e NADPH, que são utilizados no ciclo de Calvin para a fixação do carbono e subsequente produção de moléculas de açúcares. O aumento no transporte de elétrons em decorrência do aumento da força do dreno também foi verificado por Wu & Birch (2007) em um estudo com cana transformada com a introdução do gene UQ68J *SI*, que codifica uma enzima que converte sacarose em isomaltulose (um isômero da sacarose). Com a conversão da sacarose em isomaltulose,

o dreno das plantas transformadas foi aumentado e, com isso, observou-se maior transporte de elétrons nestas plantas.

O aumento médio de 35% na taxa fotossintética observado até a 22^a para as plantas de cana-de-açúcar cultivadas em elevado CO₂ é maior do que a média geralmente encontrada para plantas C₄, que é de aproximadamente 25% (Wand *et al.*, 1999). Estes valores são maiores até mesmo quando comparados aos dados obtidos por Vu *et al.* (2006), que estudaram cana-de-açúcar (var. CP73-1547) em sistema TGGs (temperature-gradient greenhouses) durante 48 dias em atmosfera com 720 ppm de CO₂. Esses autores observaram aumento significativo na taxa fotossintética de 20% somente no 7^o dia após a emergência da folha e, no final do experimento, aos 48 dias, nenhuma resposta foi verificada. O fato das plantas terem sido cultivadas em locais diferentes (sob luz solar direta x casa de vegetação) pode ter influenciado essas respostas, pois plantas de cana-de-açúcar apresentam valores maiores de fotossíntese quando cultivadas sob incidência direta de luz solar (Du *et al.*, 2000).

No entanto, em um experimento similar realizado previamente com a variedade SP80-3280 (a mesma utilizada no presente estudo) em casa de vegetação (Souza, 2004), as plantas de cana-de-açúcar crescidas em alto CO₂, atingiram, após 50 dias de cultivo, uma taxa fotossintética 30% maior do que as plantas controle. De Costa *et al.* (2007) encontraram diferenças significativas em biomassa e quantidade de grãos estudando 16 variedades diferentes de arroz em elevado CO₂ e sugeriram a presença de uma forte variação intraespecífica no padrão de respostas ao cultivo nesta condição. O mesmo pode ocorrer entre as diferentes variedades de cana sendo que a variedade SP80-3280 tem, possivelmente, maior capacidade de resposta à elevação na concentração de CO₂ atmosférica do que a variedade CP73-1547, estudada por Vu *et al.* (2006).

A partir da 25ª semana de desenvolvimento, as diferenças entre as taxas fotossintéticas das plantas controle e tratada foram decrescendo até não serem mais observadas após 31 semanas de cultivo. Contudo, após 50 semanas (período após a substituição dos vasos), as diferenças entre os tratamentos reapareceram, sugerindo que houve um decréscimo da taxa fotossintética devido à limitação de espaço para o crescimento radicular. Segundo Arp (1991), a diminuição da força de dreno da raiz causada por limitação de espaço pode acarretar em diminuição das taxas fotossintéticas.

Em gramíneas C_4 , a redução da condutância estomática e conseqüente melhora nas relações hídricas parece ser um dos principais efeitos observados em estudos com este tipo de planta em condições de alto CO_2 (Ward & Strain, 1999; Ainsworth & Long, 2005). Da mesma forma, no presente estudo os valores de condutância estomática e transpiração foram menores nas plantas de cana-de-açúcar cultivadas em elevado CO_2 , enquanto os valores para a eficiência do uso da água foram, em média, 62% maiores. Nas plantas C_4 , a diminuição da condutância estomática além de melhorar as relações hídricas, pode proporcionar o aumento da temperatura foliar, que resultaria em incremento da taxa fotossintética (Ghannoum *et al.*, 2000). Esse aumento de temperatura ocasionado pelo fechamento estomático pode também auxiliar as taxas de divisão e expansão celular (Bem Haj Salah & Tardieu, 1995).

O acréscimo da fotossíntese, juntamente com o possível aumento das taxas de divisão e expansão celulares, pode aumentar substancialmente a biomassa da planta, pelo efeito composto que esses processos podem promover (Ghannoum *et al.*, 2000). Além disso, um estudo com *Dactylis glomerata*, mostra evidências de que a exposição ao elevado CO_2 estimula o crescimento da parte aérea pelo aumento da velocidade de divisão celular e diminuição na duração do ciclo celular nos ápices (Kinsman *et al.*, 1997). Os autores propuseram que o aumento dos fotoassimilados no meristema pode ter

aumentado a velocidade de divisão celular por estimular a atividade de ciclinas. Outro trabalho, realizado com trigo, aponta resultados similares (Masle, 2000). Na cana-de-açúcar, observamos ganho em altura de 17% e incremento de biomassa (25 % em folhas e 60% em colmo) após 50 semanas de tratamento que podem ser decorrentes desse tipo de processo.

O trabalho de Wand *et al.* (1999) mostrou que o aumento médio de biomassa total para gramíneas C₄ é de 33%, enquanto que para gramíneas C₃ é de 44%, corroborando os dados de experimentos anteriores que demonstram que plantas C₃ respondem mais ao elevado CO₂ do que plantas C₄. No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que gramíneas C₃ e C₄ respondem igualmente ao alto CO₂ (Morgan *et al.*, 2001; Nowak *et al.*, 2004) e até mesmo que gramíneas C₄ podem responder melhor ao elevado CO₂ do que gramíneas C₃ (Tang *et al.*, 2006).

No experimento de Vu *et al.* (2006), com cana-de-açúcar, foi analisada somente a massa fresca dos tecidos. Os valores verificados para a parte aérea após 16 meses de cultivo foram de 44% superiores nas plantas do elevado CO₂. Para as folhas, estes autores observaram incremento de 13,5% e para o colmo de 55,5%. Levando em consideração o fato do conteúdo de água nos tecido não ser alterado em alto CO₂ (conforme dados obtidos neste estudo), pode-se supor que a diferença entre os tratamentos para massa seca das plantas estudadas por Vu *et al.* (2006) seria similar às citadas acima. Sendo assim, os valores de biomassa foliar encontrados após 50 semanas (aproximadamente 12 meses) no presente estudo, foram superiores aos observados por Vu *et al.* (2006) (13,5 x 25%), enquanto os de colmo foram bastante similares (55,5 x 60%).

O maior acúmulo de biomassa nas folhas e colmo das plantas de cana cultivadas em alto CO₂, foi consequência da maior taxa de crescimento relativo (TCR) verificada

nestas plantas. As maiores TCRs observadas nas plantas cultivadas em atmosfera enriquecida de CO₂ indicam que estas plantas possuem maior eficiência de conversão de carbono em matéria seca quando comparadas com as plantas controle, principalmente no período compreendido entre a 22^a e 31^a semanas. Na literatura não são encontrados dados de TCR para plantas C₄, mas para plantas C₃ a média de estímulo da TCR é de 8% (Poorter & Navas, 2003).

5.2 Parâmetros bioquímicos

Uma das estratégias que as plantas utilizam para lidar com o excesso de carbono assimilado é a estocagem de carboidratos não estruturais (Chapin *et al.*, 1990). O acúmulo de carboidratos não estruturais em folhas de plantas crescidas em atmosfera com altas concentrações de CO₂ é um efeito bastante documentado em espécies C₃ (Stitt, 1991; Cheng *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2004).

Parecem existir rotas definidas de fluxo de carbono nas plantas as quais variam de espécie para espécie. Em alguns casos, quando o fluxo de carbono aumenta, o amido é a primeira opção de acúmulo. Esse é o caso do jatobá, por exemplo, que quando crescido em atmosfera com elevado CO₂, acumula maior quantidade de amido por unidade de área em folhas (Costa, 2004).

No entanto, em espécies C₄, o acúmulo desses carboidratos não é comumente relatado (Wand *et al.*, 1999), mas foi observado um aumento na concentração de açúcares solúveis totais em *Bouteloua gracilis*, que oscilou durante o desenvolvimento (períodos de aumento e diminuição), sugerindo que parte do açúcar produzido foi utilizada em crescimento foliar, uma vez que houve aumento da área específica das folhas (Read *et al.*,

1997). Segundo LeCain & Morgan (1998) o aumento do conteúdo de carboidratos não estruturais observados após 39 dias na folha de 3 espécies C_4 , coincidiu com o maior crescimento dessas plantas.

Os dados obtidos com cana-de-açúcar sugerem que o açúcar produzido com o aumento da taxa fotossintética nas plantas do elevado CO_2 é utilizado para o crescimento, assim como observado nos outros estudos citados acima, uma vez que estas plantas possuem altura e biomassa superiores às aquelas cultivadas em concentrações de CO_2 ambiente.

Após 22 semanas de cultivo em elevado CO_2 , foi observado um aumento no conteúdo de açúcares redutores no colmo, que não foi seguido de aumento dos açúcares totais. O aumento de açúcares redutores em comparação aos não redutores, sugere uma possível redução na razão sacarose:monossacarídeos, o que indicaria que o colmo das plantas tratadas estaria se tornando dreno antes do colmo das plantas controle. Esse fato pode explicar a maior alocação de biomassa para esse órgão após esse período. Com a maior alocação de biomassa para o colmo, a força de dreno aumenta e isso pode regular a atividade da fonte (Paul & Foyer, 2001).

Na 31ª semana de cultivo, os valores de açúcares totais e redutores nos colmo das plantas cultivadas em elevado CO_2 continuaram altos, indicando que as plantas tratadas continuam a acumular mais açúcares do que as plantas controle.

A maior entrada de carbono na cana-de-açúcar via fotossíntese, também provocou alterações na parede celular das plantas crescidas em elevado CO_2 . A análise por FT-IR nas folhas destas plantas indicou alterações no conteúdo de mananos e xilose, que coincidem com as variações observadas pela análise por cromatografia gasosa.

Além disso, a cromatografia gasosa também sugere aumento no conteúdo de ramnose e galactose nas folhas e colmo, que podem indicar uma mudança nas

proporções de ramnogalacturonano do tipo I (RG I), que é um dos principais polissacarídeos pécticos encontrado em gramíneas (Carpita, 1989). O aumento proporcional de pectinas na parede pode estar relacionado com alterações mecânicas nos tecidos, uma vez que poderia haver, por exemplo, um reforço da lamela média, dando maior suporte ao desenvolvimento de plantas mais altas. Ao mesmo tempo, observou-se uma diminuição proporcional de xilose, principal componente das hemiceluloses em gramíneas (Buckeridge *et al.*, 2004) e um aumento na proporção de celulose. Há pouquíssima literatura enfocando este aspecto, valendo a pena mencionar a observação feita para folhas de *Arabidopsis thaliana* crescidas em atmosfera com elevado CO₂, as quais tiveram o domínio de pectinas aumentado significativamente (Teng *et al.*, 2006).

O aumento de celulose em fibras e no colmo, apontados pela análise de FT-IR sugerem que estes compostos estejam sendo acumulados em decorrência do aumento da alocação de carboidratos para a parede celular. O acúmulo deste polissacarídeo já foi observado para outras espécies cultivadas em elevado CO₂, tais como jatobá (Marília Gaspar & Marcos Buckeridge, comunicação pessoal) e *Arabidopsis* (Teng *et al.*, 2006). Apesar de não ter sido detectado pela análise por FT-IR, foi verificado um pequeno aumento de 3% no conteúdo de celulose nas folhas de cana-de-açúcar após 22 semanas de cultivo em elevado CO₂ (dados não mostrados), o que sugere que este composto também pode estar sendo acumulado neste órgão.

Em resumo, o aumento do fluxo de carbono em plantas de cana leva a um aumento da partição para o colmo, que acumula mais sacarose e açúcares redutores e, paralelamente, constrói mais paredes celulares possivelmente devido ao aumento na taxa de crescimento.

5.3 Produtividade

Em um artigo de meta análise, Ainsworth & Long (2005) mostraram que o aumento médio de produtividade para plantas cultivadas crescidas em elevado CO_2 é de 17%. Entretanto, essa média é válida somente para espécies C_3 , como trigo e algodão, pois para espécies C_4 , não foi observado aumento significativo na produtividade de grãos em condições ideais de irrigação (Ottman *et al*, 2001; Leakey *et al*, 2006). Porém, mesmo que tais dados estivessem disponíveis, talvez não se pudesse extrapolar para a cana, uma vez que esta última não tem a semente como base de sua produtividade e, no caso específico deste estudo, foi utilizada a variedade SP80-3280, que não produz sementes. Este é um aspecto crucial, pois ao passar pelo processo reprodutivo para produzir sementes (como em milho e sorgo, por exemplo), há um gasto considerável de energia, o qual leva a uma perda de carbono por respiração. Portanto, pode se esperar que a cana-de-açúcar seja mais eficiente em comparação a outras gramíneas, pois acumula o carbono em uma forma bioquimicamente bem mais próxima ao processo de assimilação, ou seja, como sacarose.

Na cana-de-açúcar o teor de sacarose no colmo observado após 50 semanas de cultivo em alto CO_2 foi maior, o que juntamente com o incremento de biomassa observado no órgão, configura a maior produtividade desta planta. Em 1980, Orlando Filho e colaboradores, propuseram que a produtividade é maior quando existe uma tendência de diminuição da relação material seco das folhas: material seco da parte aérea. Para as plantas de cana-de-açúcar do nosso experimento, obtivemos uma relação de 0,36 para as plantas cultivadas em atmosfera ambiente e valor de 0,29 para as plantas crescidas em elevado CO_2 , reforçando a idéia que as plantas crescidas em atmosferas com elevado CO_2 aumentam sua produtividade, através de acúmulo de matéria seca no colmo.

O teor de fibras das plantas cultivadas em elevado CO₂ foi maior do que nas plantas controle, ainda que diferenças significativas pela análise de variância não tenham sido observadas. Esta tendência ao aumento do teor de fibras pode estar correlacionada ao aumento do conteúdo de celulose observado pela análise por FT-IR, que poderia levar a um aumento da espessura das fibras.

5.4 Expressão gênica

Os resultados de genes diferencialmente expressos em folhas obtidos neste experimento são compatíveis com os resultados observados nas medidas de parâmetros fisiológicos. Após 13 semanas de cultivo, as plantas crescidas em atmosfera elevada de CO₂ atingiram taxas fotossintéticas 60% maiores do que as plantas controle e, neste período, foram encontrados genes diferencialmente expressos relacionados principalmente com o processo fotossintético.

Em *Populus euramericana*, o aumento de fotossíntese observado coincidiu com o aumento nos transcritos relacionados com a Rubisco, quando estas plantas foram cultivadas em atmosfera de 1200 ppm de CO₂ (Druart *et al.*, 2006). Foi verificado ainda que ocorre aumento dos transcritos desta enzima para folhas jovens e repressão das mesmas em folhas maduras (Taylor *et al.*, 2005).

Contrário a isso, a expressão induzida de genes da proteína K do fotossistema II, da subunidade N do centro de reação do fotossistema I e da ferredoxina I sugere que a cana-de-açúcar cultivada em elevadas concentrações de CO₂ modifica o sistema de transporte de elétrons uma vez que estes genes estão relacionados com este tipo de atividade (Haldrup *et al.*, 1999; Ihalainen *et al.*, 2002; Allen, 2005; Melkozernov *et al.*, 2006).

A indução da expressão do gene que codifica a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCarboxilase) observada após 22 semanas de experimento nas plantas em elevado CO₂, pode indicar um aumento desta enzima para a manutenção das maiores taxas fotossintéticas.

O aumento de biomassa observado por alguns autores em plantas de milho, é atribuído à melhora nas relações hídricas, decorrente da diminuição da condutância estomática e não relacionada com o incremento de fotossíntese. De fato, quando os transcritos de milho são analisados observou-se repressão dos genes relacionados tanto com a Rubisco e fotossistemas I e II, quanto a genes relacionados com o controle de distribuição estomática (Kim *et al.*, 2006).

Na 13^a semana foi verificada nas plantas crescidas em atmosfera com elevado CO₂, a indução do gene que codifica a enzima XET (xiloglucano endo-transglicosilase). A XET possui a função de clivar e reconstruir cadeias de xiloglucanos e é considerada uma enzima importante no processo de controle da expansão celular (Wu & Cosgrove, 2000). Neste mesmo período, as plantas do elevado CO₂ apresentaram área foliar total 145% maior do que as plantas controle (dados não mostrados). Em plantas de *Populus* cultivadas em alto CO₂, também foi observado aumento nos transcritos do gene que codifica para a enzima XET em folhas, que foi associado ao incremento de tamanho, área e biomassa foliar obtidos em outros experimentos (Druart *et al.*, 2006).

A COMT (*caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase 1*) é uma enzima relacionada com a via metabólica que leva à síntese de lignina. Plantas transgênicas de alfafa deficientes em COMT apresentam decréscimo de 20% no conteúdo de lignina e aumento de 10% no teor de celulose (Marita *et al.*, 2003). Segundo Hu *et al.* (1999) A mudança da razão de deposição celulose:lignina pode ocorrer de forma a manter a integridade estrutural da planta, sendo que a deposição pode ser regulada por um processo compensatório. Nas

plantas de cana-de-açúcar deste experimento, a COMT teve sua expressão reprimida nas plantas crescidas em atmosfera com alto CO₂, após 22 semanas de tratamento, ao passo que observamos um aumento de celulose nas folhas (dados não mostrados) neste mesmo período. Com base nestas observações, é possível especular que o aumento do conteúdo de celulose observado nas folhas de plantas crescidas no elevado CO₂ pode ter levado a repressão do gene da COMT, na tentativa de balancear a razão entre estes dois compostos, como proposto por Hu *et al.* (1999).

Em relação ao desenvolvimento da planta, podemos destacar a alteração na expressão do promotor de crescimento auxina-independente, da proteína da família “kelch”, que geralmente está associada à morfologia e organização da célula e modulação do citoesqueleto (Adams *et al.*, 2000) e do gene LOB (do inglês, *lateral organ boundaries*), que parece ser requerido durante o crescimento sob condições ambientais específicas (Shuai *et al.*, 2002).

Algumas espécies de plantas podem estar “predispostas” a responder ao elevado CO₂ não somente devido ao aumento da fotossíntese e capacidade de dreno de carbono, mas também devido à eficiência do transporte dos assimilados entre fonte e dreno (Pritchard *et al.* 1999). Nesse sentido, outra alteração significativa que observamos na cana se refere às invertases de parede celular, que estão mais ativas nos órgãos dreno e estão envolvidas com a partição de sacarose, com o controle da diferenciação celular e desenvolvimento da planta (Roitsch *et al.*, 2003). A baixa atividade desta enzima em órgãos fonte ocorreria, segundo Prioul *et al.* (1990), em prol de uma exportação massiva de fotoassimilados. Dessa forma, a menor expressão do gene de invertase em folhas das plantas crescidas em alto CO₂ pode ser explicada pelo aumento de fotossíntese nestas plantas, que acarretou uma maior produção de sacarose que estaria sendo exportada em maior quantidade para os órgãos dreno.

A indução na expressão de alguns tipos de transportadores de açúcar nas plantas tratadas pode também estar correlacionada ao aumento da capacidade de transporte dos fotoassimilados. Os transportadores de açúcares podem se ajustar à função de fornecedores de açúcares para o crescimento e desenvolvimento da planta ou estar envolvidos em formação de gradiente osmótico para determinar o fluxo de açúcares. Alguns transportadores também podem estar envolvidos com sinalização, podendo ser regulados em diferentes níveis durante o desenvolvimento da planta ou quando há uma perturbação ambiental (Williams *et al.*, 2000).

Em suma, as alterações na expressão gênica em cana-de-açúcar sugerem uma mudança em nível transcricional compatível com as mudanças observadas nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos analisados nestas plantas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os dados obtidos neste trabalho foi construído um esquema geral ilustrando a integração dos mecanismos envolvidos na resposta da cana-de-açúcar após 50 semanas de cultivo em elevado CO_2 (Figura 14).

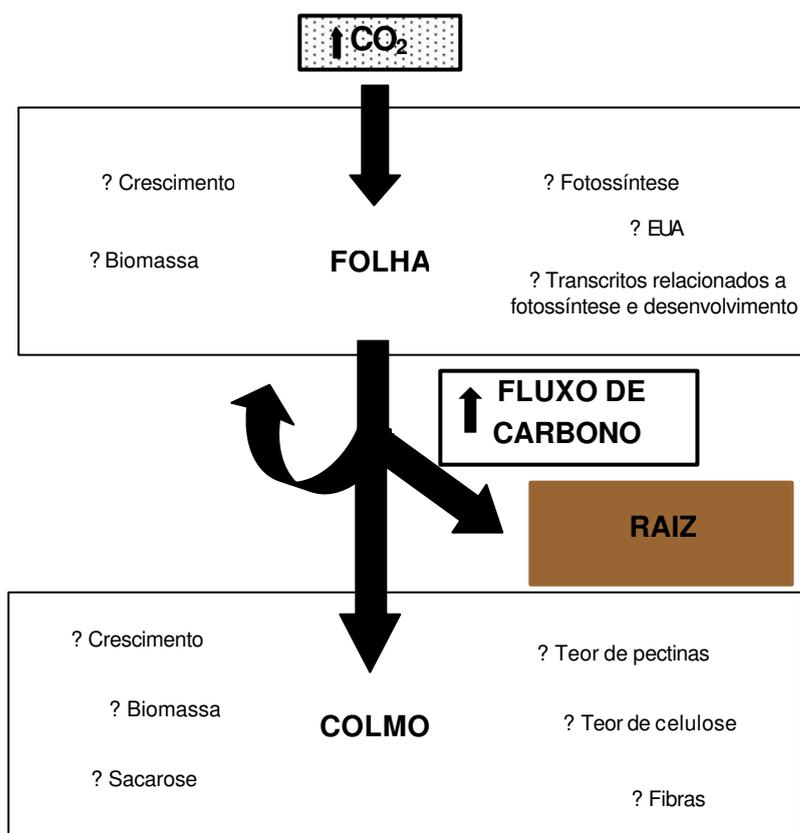


Figura 14 – Esquema geral do provável mecanismo de respostas ao elevado CO_2 de plantas de cana-de-açúcar.

Os dados indicam que o cultivo da cana-de-açúcar durante 50 semanas em elevado CO_2 promove aumento na taxa fotossintética durante um longo período, muito diferente do que é encontrado para a maioria das espécies C_4 já estudadas. Esse aumento na taxa fotossintética pode ser decorrente do aumento da atividade enzimática da

Rubisco, como verificado no experimento de Vu *et al.* (2006) e também do aumento do transporte de elétrons que, no presente estudo, foi verificado através de um possível aumento no transporte de elétrons e também através da indução na expressão de genes relacionados à este atividade.

A maior taxa de entrada de carbono na planta confere um aumento de fluxo interno deste elemento, incrementando a biomassa na parte aérea, sendo o colmo o órgão que sofre a maior alteração. A melhora do status fotossintético direcionou o metabolismo da planta principalmente para o acúmulo de biomassa e sacarose no colmo, principal órgão dreno em cana-de-açúcar.

A partição de carbono nas paredes celulares do colmo também foi alterada, com um aumento do teor de pectinas e celulose que pode ser relacionado com o aumento da extensibilidade celular e maior crescimento. Todas estas alterações têm conseqüências tecnológicas significativas, que conferem às plantas cultivadas em elevado CO₂, um potencial maior para a produção de energia através de hidrólise acoplada a fermentação. Além disso, conferem à cana-de-açúcar uma boa capacidade de seqüestrar carbono da atmosfera.

O maior potencial de produção de energia renovável (biocombustíveis) somado as medidas que devem ser tomadas para limitar as queimadas da cana e, conseqüentemente, diminuir a emissão de CO₂, traz conseqüências positivas para a mitigação das emissões de gases do efeito estufa.

Do ponto de vista de obtenção de aplicações tecnológicas diretas dos dados aqui apresentados, é importante lembrar que as condições experimentais empregadas em nosso estudo são distintas das encontradas no campo. Porém, se considerarmos que no cultivo em campo a cana-de-açúcar tenha um comportamento similar ao observado neste

trabalho, talvez se possa esperar um aumento significativo na produtividade desta cultura com os efeitos do aumento da concentração de gás carbônico na atmosfera.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J., Kelso, R. & Cooley, L. 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in Cell Biology* 10: 17-24.
- Aidar, M.P.M., Martinez, C.A., Costa, A.C., Costa, P.M.F., Dietrich, S.M.C. & Buckeridge, M.S. 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenea coubaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota neotropica* 2 (1). Disponível em: <www.biotaneotropica.org.br>.
- Ainsworth, E.A. & Long, S.P. 2005. What have we learned from 15 years of free air-CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165: 351-372.
- Ainsworth, E.A., Rogers, A., Vodkin, L.O., Walter, A. & Schurr, U. 2006. The effects of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. *Plant Physiology* 142: 135-147.
- Allen, J.F. 2005. Photosynthesis: the processing of redox signals in chloroplasts. *Current Biology* 15 (22): R929 – R932.
- Aranda, X., Agusti, C., Joffre, R. & Fleck, I. 2006. Photosynthesis, growth and structural characteristics of holm oak resprouts originated from plants grown under elevated CO₂. *Physiologia Plantarum* 128: 302-312.
- Arp, W.J. 1991. Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant, Cell and Environment* 14: 869-875.
- Bem Haj Salah, H. & Tardieu, F. 1995. Temperature affects expansion rate of maize leaves without change in spatial distribution of cell length. *Analyses of the*

- coordination between cell division and cell expansion. *Plant Physiology* 109: 861-870.
- Berthelot, M., Friedlingstein, P., Ciais, P., Dufresne, J. & Monfray, P. 2005. How uncertainties in future climate change predictions translate into future terrestrial carbon fluxes. *Global Change Biology* 11: 959-970.
- Bowes, G. 1993. Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂. *Annual Review of Plant Physiology and plant Molecular Biology* 44: 309-332.
- Buckeridge, M.S., Rayon, C., Urbanowicz, B., Tiné, M.A.S. & Carpita, N.C. 2004. Mixedlinkage (1→3) (1→4)-β-glucans of grasses. *Cereal chemistry* 81 (1): 115-12.
- Buckeridge, M.S. & Aidar, M.P.M. 2002. Carbon sequestration in the rain forest: alternatives using environmentally friendly biotechnology. *Biota neotropica* 2(1): 1-4.
- Carpita, N.C. 1989. Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. *Phytochemistry* 28: 121-125.
- Carpita, N.C. & Shea, E.M. 1989. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. *In: Biermann, C.J., McGinnis, G.S. (eds). Analyses of carbohydrates by GLS and MS. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 157-216.*
- Carpita, N.C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D.A., Catchpole, G., Wilson, R.H. & McCann, M.C. 2001. Cell wall architecture of elongating maize coleoptile. *Plant Physiology* 127: 551-565.
- Castro, P.R.C. 1999. Maturadores químicos em cana-de-açúcar. *In: Semana da cana-de-açúcar de Piracicaba – SECAPI 4. Piracicaba: Anais.*
- Chapin, F.S., Schulze, E-D. & Mooney, H.A. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematic* 21: 423-448.

- Cheng, S.H., Moore, B.D. & Seemann, J.R. 1998. Effect on short and long term elevated CO₂ on the expression of Ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Plant Physiology* 116: 715- 723.
- Costa, P.M.F. 2004. Efeitos da alta concentração de CO₂ sobre o crescimento e o estabelecimento de plântulas do jatobá de mata *Hymenea courbaril* L. var. *Stilbocarpa* (Heyne) Lee & Langenhein (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). Dissertação de Mestrado: Universidade Estadual de Campinas.
- Cousins, A.B., Adam, N.R., Wall, G.W., Kimball, B.A., Pinter Jr, P.J., Ottman, M.J., Leavitt, S.W. & Weber, A.N. 2003. Development of C₄ photosynthesis in sorghum leaves grown under free-air CO₂ enrichment (FACE). *Journal of Experimental Botany* 54: 1969–1975.
- De Costa, W.A.J.M., Weerakoon, W.M.W., Chinthaka, K.G.R., Herath, H.M.L.K. & Abeywardena. 2007. R.M.I. Genotypic variation in the response of rice (*Oryza sativa* L.) to increased atmospheric carbon dioxide and its physiological basis. *Journal Agronomy & Crop Science* 193: 117- 130.
- Dengler, N.G. & Nelson, T. 1999. Leaf structure and development in C₄ plants. In: C₄ Plant Biology (eds Sage, R.F. & Monson, R.K.) pp.133 – 172. Academic Press, San Diego, CA.
- Doorenbos, J. & Kassam, A.H. 1979. Yield response to water. Irrigation and drainage paper, nº 33, FAO, Rome. 193p.
- Druart, N., Rodríguez-Buey, M., Barron-Gafford, G., Sjödin, A., Bhalerao, R. & Hurry, V. 2006. Molecular targets of elevated [CO₂] in leaves and stem of *Populus deltoides*: implications for future tree growth and carbon sequestration. *Functional Plant Biology* 33: 121-131.

- Du, Y-C., Nose, A., Kondo, A. & Wasano, K. 2000. Diurnal changes in photosynthesis in sugarcane leaves. I. Carbon dioxide exchange rate, photosynthetic enzymes activities and metabolite levels relating to the C₄ pathway and the Calvin cycle. *Plant Production Science* 3: 3-8.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E. & Helliker, B.R. 1997. C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecologia* 112: 285-299.
- Embrapa. 2002. Emissões de gases de efeito estufa na queima de resíduos agrícolas. Primeiro Inventário Brasileiro de Emissões Antrópicas de Gases de Efeito Estufa. Relatório de Referência.
- Embrapa. 2004. Impacto ambiental das atividades humanas. Disponível em:<<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/impacana.html>>. Acesso em: ago 2005.
- Figueiredo, P., Landell, L.G.A. & Campana, M.P. 1995. Cana-de-açúcar. 6.ed. Campinas: IAC.
- Figueiredo, P., Landell, L.G.A. & Campana, M.P. 1995. Cana-de-açúcar. 6.ed. Campinas: IAC.
- Freund, P. (Coord). 2005. Introduction. *In: IPCC Special Report on carbon dioxide capture and storage, In Press.*
- Furtado, A.T. & Scandiffio, M.I.G. 2006. Álcool no Brasil, uma longa história. *Scientific American (Brasil)* 53: 66-71.
- Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 82-87.

- Ghannoum, O., von Caemmerer, S. Barlow, E.W.R. & Conroy, J. 1997. The effect of CO₂ enrichment and irradiance on the growth, morphology and gas exchange of a C₃ (*Panicum laxum*) and a C₄ (*Panicum antidotale*) grass. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 227-237.
- Ghannoum, O., von Caemmerer, S., Ziska, L.H. & Conroy, J.P. 2000. The growth response of C₄ plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant, Cell and Environment* 23: 931-942.
- Gibeaut, D.M. & Carpita, N.C. 1991. Tracing the biosynthesis of the cell wall in intact cells and plants. Selective turnover and alteration of cytoplasmic and cell wall polysaccharides of proso millet cells in liquid culture and *Zea mays* seedling. *Plant Physiology* 97: 551-561.
- Governo do Estado de São Paulo. 2004. Legislação do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.legislacao.sp.gov.br>> . Acesso em: ago 2004.
- Guarnieri, L.C. & Jannuzzi, R.M. 1992. Proálcool: impactos ambientais. *Revista Brasileira de Energia* 2 (2).
- Haldrup, A., Naver, J. & Scheller, H.V. 1999. The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant Journal* 17: 689-698.
- Hu, W.-J., Harding, S.A., Lung, J., Popko, J.L., Ralph, J., Stokke, D.D., Jung, C.-J. 1999. Repression of lignin biosynthesis promote cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* 17: 808-812.
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B. & Askew, A.P. 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany* 90: 485-488.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. 2006. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>> . Acesso jan 2006.

- Ihalainen, J.A., Jensen, P.E., Haldrup, A., van Stokkum, I.H., van Grondede, R., Scheller, H.V. & Dekker, J.P. 2002. Pigment organization and energy transfer dynamics in isolated photosystem I (PSI) complexes from *Arabidopsis thaliana* depleted of the PSI-G, PSI-K, PSI-L, or PSI-N subunit. *Biophysical Journal* 83: 2190- 2201.
- IPCC - Intergovernmental Panel Climate Change. 2001. Working Group II: Impacts, Adaptations and Vulnerability. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em: julho 2005.
- Kacuráková, M. Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N. & Ebringerová, A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectin polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 43: 195-203.
- Kacuráková, M. & Wilson, R.H. 2001. Developments in mid-infrared FTIR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers* 44: 291-303.
- Kim, S.H., Sicher, R.C., Bae, H., Gitz, D.C., Bakers, J.T., Timlin, D.J. & Reddy, V.R. 2006. Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. *Global Change Biology* 12: 588- 600.
- Kinsman, E.A., Lewis, C., Davies, M.S., Young, J.E., Francis, D., Vilhar, B. & Ougham, H.J. 1997. Elevated CO₂ stimulates cells to divide in grass meristems: a differential effect in two natural populations of *Dactylis glomerata*. *Plant, Cell and Environment* 20: 1309-1316.
- Körner, C. 2006. Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytologist* 172: 393-411.
- Leakey, A.D.B., Bernacchi, C.J., Dohleman, F.G., Ort, D.R. & Long, S.P. 2004. Will photosynthesis of maize (*Zea mays*) in the US Corn Belt increase in future [CO₂] rich atmospheres? An analyses of diurnal courses of CO₂ uptake under free-air concentration enrichment (FACE). *Global Change Biology* 10: 951- 962.

- Leakey, A.D.B., Uribelarrea, M., Ainsworth, E.A., Naidu, S.L., Rogers, A., Ort, D.R. & Long, S.P. 2006. Photosynthesis, productivity and yield of maize are not affected by open-air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought. *Plant Physiology* 140: 779 – 790.
- LeCain, D.R. & Morgan, J.A. 1998. Growth, gas exchange, leaf nitrogen and carbohydrate concentrations in NAD-ME and NADP-ME C₄ grasses grown in elevated CO₂. *Physiologia Plantarum* 102: 297-306.
- Lima, D.U., Santos, H.P., Tiné, M.A., Molle, F.R.R & Buckeridge, M.S. 2001. Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* 24: 191-198.
- Lima, M.A., Ligo, M.A., Cabral, M.R., Boeira, R.C., Pessoa, M.C.P.Y. & Neves, M.C. 1999. Emissão de gases do efeito estufa provenientes da queima de resíduos agrícolas no Brasil. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 60p.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods* 25: 402 – 408.
- Macedo, I. C. 2000. Ciclo da cana-de-açúcar e reduções adicionais nas emissões de CO₂ através do uso como combustível da palha da cana. Centro de Tecnologia Copersucar. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/clima/comunic_old/egee.htm>. Acesso em jan 2005.
- Machado, E.C. 1987. Fisiologia de produção de cana – de – açúcar. *In*: Paranhos, S.B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Vol.1. Campinas: Fundação Cargill.
- Malavolta, E. & Haag, H.P. 1964. Cultura e adubação da cana-de-açúcar. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa.
- Marita, J.M., Ralph, J., Hatfield, R.D., Guo, D., Chen, F. & Dixon, R.A. 2003. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in

- caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* 62: 53-65.
- Masle, J. 2000. The effects of elevated CO₂ concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. *Plant Physiology* 122: 1399-1415.
- McCann, M.C., Chen, L., Roberts, K., Kemsley, E.K., Séné, C., Carpita, N.C., Stacey, N.J. & Wilson, R.H. 1997. Infrared microspectroscopy: sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Plant Physiology* 100: 729-738.
- Melkozernov, A.N., Barber, J. & Blankenship, R.E. 2006. Light harvesting in photosystem I supercomplexes. *Biochemistry* 45 (2): 331- 345.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2004. Governo Brasileiro. Disponível em:<<http://www.agricultura.br>>. Acesso em: julho 2004.
- Mooney, H.A., Canadell, J., Chapin, F.S., Ehleringer, J.R., Körner, C., McMurtie, R.E., Aronson, W.J., Pitelka, L.F. & Schulze, E.D. 1999. Ecosystem physiology responses to global change. *In: The terrestrial biosphere and global change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Morgan, J.A., LeCain, D.R., Mosier, A.R. & Milchunas, D.G. 2001. Elevated CO₂ enhances water relations and productivity and affects gas exchange in C₃ and C₄ grasses of the Colorado shortgrass steppe. *Global Change Biology* 7:451-466.
- NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration. 2006. Disponível em:<www.cmdr.noaa.gov/projects/src/web/trends/co2_mm_meo.dat>. Acesso em: dez 2006.

- Nowak, R.S., Ellsworth, D.S. & Smith, S.D. 2004. Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂ – do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytologist* 162: 253-280.
- Orlando Filho, J., Haag, H.P. & Zambello Junior, E. 1980. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76, em função da idade, em solos do Estado de São Paulo. *Boletim técnico Planalsucar* 2(1): 3-127.
- Ottman, M.J., Kimball, B.A., Pinter, P.J., Wall, G.W., Vanderlip, R.L., Leavitt, S.W., LaMorte, R.L., Matthias, A.D. & Brooks, T.J. 2001. Elevated CO₂ increases sorghum biomass under drought conditions. *New Phytologist* 150: 261- 273.
- Papini-Terzi, F.S., Rocha, F.R., Vêncio, R.Z.N., Oliveira, K.C., Felix, J.M., Vicentini, R., Souza Rocha, C., Simões, A.C.Q., Ulian, E.C., Zingaretti di Mauro, S.M., Silva, A.M., Pereira, C.A.B., Menossi, M. & Souza, G.M. 2005. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. *DNA research* 12: 27 – 38.
- Paranhos, S.B. (Coord). 1987. Cana-de-açúcar. Cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill. V.2. 856p.
- Paul, M.J. & Foyer, C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1383-1400.
- Pinto, E de S.L. 1965. Cana-de-açúcar. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
- Polley, H.W., Johnson, H.B. & Derner, J.D. 2003. Increasing CO₂ from subambient to superambient concentrations alters species composition and increases above-ground biomass in a C₃/C₄ grassland. *New Phytologist* 160: 319- 327.
- Poorter, H. & Navas, M.L. 2003. Plant Growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist* 157: 175 – 198.
- Poorter, H. & Pérez-Soba, M. 2002. Plant growth at elevated CO₂. *In: Encyclopedia of global environmental change*, John Wiley & Sons, Chichester, pp.489-496.

- Prentice, I. C. 2001. The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. *In: Climate change 2001: The Scientific Basis* (ed. IPCC). Cambridge University Press, pp. 183-237.
- Prior, S.A., Runion, G.B., Rogers, H.H., Torbert, H.A. & Reeves, D.W. 2005. Elevated atmospheric CO₂ effects in biomass production and soil carbon in conventional and conservation cropping systems. *Global Change Biology* 11: 657- 665.
- Prioul, J-L., Reyss, A. & Schwebel-Dungué, N. 1990. Relationships between carbohydrate metabolism in ear adjacent leaf during grain filling in maize genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 28: 485-493.
- Pritchard, S.G., Rogers, H.H., Prior, S.A. & Peterson, C.M. 1999. Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Global Change Biology* 5: 807- 837.
- Read, J.J., Morgan, J.A., Chattertons, N.J. & Harrison, P.A. 1997. Gas exchange and carbohydrate and nitrogen concentrations in leaves of *Pascopyrum smithii* (C₃) and *Bouteloua gracilis* (C₄) at different carbon dioxide concentrations and temperatures. *Annals of Botany* 79: 197- 206.
- Rogers, A., Allen, D.J., Davey, P.A., Morgan, P.B., Ainsworth, E.A., Bernachi, C.J., Cornic, G., Dermody, O., Dohleman, F.G., Heaton, E.A., Mahoney, J., Zhu, X.G., Delucia, E.H., Ort, D.R. & Long, S.P. 2004. Leaf photosynthesis and carbohydrate dynamics of soybeans grown throughout their life-cycle under Free-Air Carbon dioxide Enrichment. *Plant, Cell and Environment* 27: 449- 458.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R. & Sinha, A.K. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal Experimental of Botany* 54: 513- 524.
- Sage, R.F. & Kubien, D.S. 2003. *Quo vadis C₄ ?* An ecophysiological perspective on global change and the future of C₄ plants. *Photosynthesis Research* 77: 209- 225.

- Segalla, A.L. 1964. Botânica, melhoramento e variedades. In: Pinto, E de S.L. 1965. Cana-de-açúcar. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
- Shuai, B., Reynaga-Peña, C.G. & Springer, P.S. 2002. The lateral organ boundaries gene defines novel, plant-specific gene family. *Plant Physiology* 129: 747-761.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal Biological Chemistry* 160: 61-63.
- Souza, A.P. 2004. Efeito do alto CO₂ no crescimento, desenvolvimento e metabolismos de carboidratos de cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp). Monografia: Universidade Metodista de São Paulo.
- Stitt, M. 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 395-436.
- Tang, J., Chen, J. & Chen, X. 2006. Response of 12 weedy species to elevated CO₂ in low-phosphorus-availability soil. *Ecological Research* 21: 664-670.
- Taylor, G. Street, N.R., Tricker, P.J., Sjödin, A., Graham, L., Skogström, O., Calfapietra, C., Scarascia-Mugnozza, G. & Janson, S. 2005. Transcriptome of *Populus* in elevated CO₂. *New Phytologist* 167: 143 -154.
- Teng, N., Wang, J., Chen, T., Wu, X., Wang, Y., Lin, J. 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 172: 92-103.
- Tsuboi, M. 1957. Infrared spectrum and crystal structure of cellulose. *Journal of Polymer Science* 25: 420-424.
- Unica – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. 2006. Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: jan 2006.
- Van Dillewijn, C. 1952. Botany of sugarcane. Waltham: The Chronica Botanica. 371p.

- Van Kooten, O. & Snel, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescent nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthetic Research* 25: 147-150.
- Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L. & Arruda, P. 2001. The libraries that made SUCEST. *Genetic Molecular Biology* 24: 1-7.
- Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Souza, G.M. & Arruda, P. 2003. Analysis and functional annotation of a expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research* 13: 2725-2735.
- Vu, J.C.V., Allen Jr, L.H. & Gesch, R.W. 2006. Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO₂. *Plant Science* 171:123-131.
- Ward, S.J.E., Midgley, G.F., Jones, M.H. & Curtis, P.S. 1999. Responses of wild C₄ and C₃ grass (Poaceae) species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a meta-analytic test of current theories and perceptions. *Global Change Biology* 5: 723-741.
- Ward, J.K. & Strain, B.R. 1999. Elevated CO₂ studies: past, present and future. *Tree Physiology* 19:211-220.
- Williams, L.E., Lemoine, R. & Sauer, N. 2000. Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* 5: 283-290.
- Wu, L. & Birch, R. G. 2007. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnology Journal* 5: 109-117.
- Wu, Y. & Cosgrove, D.J. 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany* 51: 1543-1553.
- Yang, J. & Yen, H.E. 2002. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and *Arabidopsis*. A fourier transform infrared spectroscopy study. *Plant Physiology* 130: 1032-1042.

- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. 1997. Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C₄ crops and weeds. *Photosynthesis Research* 54: 199-208.
- Ziska, L.H., Sicher, R.C. & Bunce, J.A. 1999. The impact of elevated carbon dioxide on the growth and gas exchange of three C₄ species differing in CO₂ leak rates. *Physiologia Plantarum* 105: 74-80.