



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MARCIO DE OLIVEIRA MARTINS

**REGULAÇÃO DA FOTOSÍNTESE POR DEFICIÊNCIA HÍDRICA, NITROGÊNIO
E CO₂ ELEVADO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

FORTALEZA

2012

MARCIO DE OLIVEIRA MARTINS

**REGULAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE POR DEFICIÊNCIA HÍDRICA, NITROGÊNIO
E CO₂ ELEVADO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio
Gomes da Silveira

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M341r Martins, Marcio de Oliveira.
 Regulação da fotossíntese por deficiência hídrica, nitrogênio e CO₂ elevado em cana-de-açúcar /
 Marcio de Oliveira Martins – 2012.
 95 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de
 Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
 Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
 Orientação: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira.
- 1.Saccharum spp. 2. Estresse hídrico. 3.Assimilação de carbono. 4. Assimilação de nitrato.
 I. Título.

CDD 574-192

MARCIO DE OLIVEIRA MARTINS


**REGULAÇÃO DA FOTOSÍNTESE POR DEFICIÊNCIA HÍDRICA, NITROGÊNIO
E CO₂ ELEVADO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

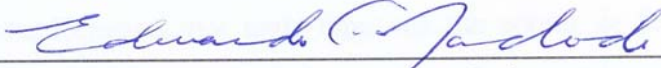
Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

Aprovada em 03 /10 /2012

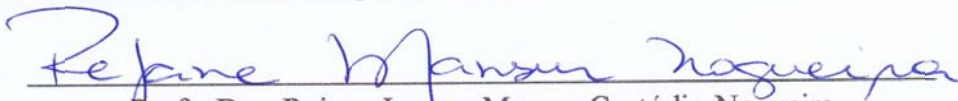
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC



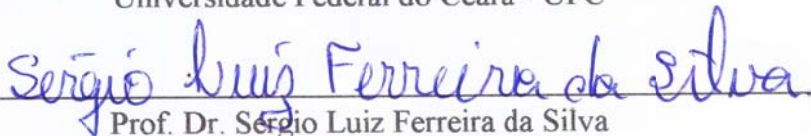
Dr. Eduardo Caruso Machado
Instituto Agrônômico de Campinas - IAC



Profa. Dra. Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof. Dr. Enéas Gomes Filho
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, onde realizei este curso e por ter utilizado suas dependências.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, ao qual dediquei quatro anos da minha vida e saio com excelentes lembranças.

À FUNCAP e a CAPES, pela concessão da bolsa.

À FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento do projeto temático BIOEN (proc. n° 2008/57495-3).

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Salinidade/INCTSal, pelo financiamento de equipamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, pela excelente orientação e acolhimento na sua equipe de trabalho.

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado, pela colaboração científica nos experimentos.

Ao Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro, pela discussão dos resultados obtidos.

Ao Instituto Agronômico de Campinas, pela concessão do material vegetal utilizado em todas as etapas deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas excelentes considerações.

Aos grandes amigos Milton, Ana Karla, Aurenívia, Adilton e Fabrício Eulálio pelo companheirismo, amizade e preciosa ajuda durante todo o período do doutorado.

A todas as pessoas que compõem o LABPLANT, que ajudaram direta ou indiretamente.

À minha família por me acompanhar e dar suporte durante esse período.

À minha esposa, Keisiane, por mais uma vez me apoiar de forma incondicional nos meus projetos e por estar sempre ao meu lado quando tudo parece impossível.

À Deus, por sempre estar olhando por mim.

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma planta de grande potencial econômico, sendo utilizada principalmente para produção de açúcar e biocombustíveis. O Brasil tem destaque internacional na produção de cana-de-açúcar, sendo o maior produtor mundial dessa cultura. Apesar dessa liderança, o Brasil está localizado em uma região tropical e apresenta várias adversidades climáticas. O estudo da fisiologia da cana-de-açúcar em situações de estresse, como deficiência hídrica, torna-se fundamental para manutenção e melhoria da produção dessa cultura. A cana-de-açúcar é uma espécie de fotossíntese C₄, com um mecanismo de concentração de CO₂. Dessa maneira, espera-se que a crescente elevação de CO₂ na atmosfera não afete a produtividade da cana-de-açúcar de maneira relevante, mas os estudos acerca do assunto são ainda bem escassos. Diante desse quadro, objetivou-se avaliar a regulação da fotossíntese por deficiência hídrica, suprimento de nitrogênio e CO₂ elevado em plantas de cana-de-açúcar. O Capítulo 1 contempla o estado da arte a respeito do tema em estudo. No capítulo 2, foi realizado um trabalho com o objetivo de avaliar as respostas de duas cultivares de cana-de-açúcar consideradas contrastantes em relação às respostas à deficiência hídrica, IAC SP 94-2094 e IAC SP 95-5000. Estas cultivares foram expostas a déficit hídrico severo, com suspensão da irrigação por cinco dias, e recuperação, reirrigadas por dois dias após o estresse. O tratamento aplicado foi capaz de afetar fortemente as trocas gasosas, com fechamento estomático nas duas cultivares, levando a fortes reduções de transpiração e assimilação de CO₂. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foram afetados, mas não o suficiente para apresentar fotoinibição. A cultivar tolerante apresentou maior atividade de PEPcase no estresse, mas a atividade de Rubisco não foi alterada. Na cultivar sensível, não houve alteração na atividade de PEPcase enquanto que a atividade de Rubisco foi reduzida em 40% no estresse mas com total recuperação. A expressão de PEPcase foi aumentada no estresse mas com maior incremento na cultivar tolerante, com padrão semelhante na quantidade de rubisco. No capítulo 3, foi realizado um trabalho com o objetivo de avaliar o sistema de defesa anti-oxidativo em plantas de cana-de-açúcar expostas ao estresse hídrico moderado. Neste capítulo, apenas a cultivar IAC SP 94-2094 foi utilizada e a deficiência hídrica foi aplicada através de ciclos de irrigação, com plantas irrigadas a cada cinco dias por um período de 15 dias e recuperação de três dias. O estresse hídrico aplicado causou reduções marcantes na condutância estomática, na transpiração foliar e na fotossíntese líquida, com recuperação parcial, refletindo em uma menor eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação. Os parâmetros fotoquímicos apresentaram modificações transitórias,

completamente revertidas pela recuperação. As atividades da Rubisco e PEPcase não mostraram modificações, mas houve aumento na quantidade relativa de PEPcase e estado de ativação da Rubisco. O estresse hídrico aplicado aumentou a peroxidação lipídica e o conteúdo de H₂O₂, induzindo aumentos de atividades de SOD e APX, principalmente APX tilacoidal e Fe-SOD. O perfil de açúcares foi alterado nas plantas estressadas, com aumento de hexoses e diminuição do teor de amido nas folhas. O objetivo do capítulo 4 foi avaliar as modificações fisiológicas e bioquímicas em relação aos processos fotossintéticos em cana-de-açúcar submetida a um ambiente de elevado CO₂ e baixo suprimento de nitrogênio (-N). A fotossíntese líquida foi reduzida nas plantas com CO₂ elevado e -N. Os parâmetros fotoquímicos foram reduzidos apenas no tratamento -N, mas sem sinal de fotoinibição. As enzimas da carboxilação, PEPcase e Rubisco, sofreram regulações diferenciadas, tanto pelo alto CO₂ como pelo baixo suprimento de nitrogênio. A determinação de nitrato mostrou acúmulo nas raízes, indicando deficiência no transporte para parte aérea. O tratamento -N diminuiu o conteúdo de aminoácidos, proteínas solúveis e nitrogênio total. O teor de sacarose foi reduzido em todos os tratamentos. Por fim, verificamos que a cultivar IAC SP 94-2094 possui maior fotoproteção indicada pelo maior NPQ e possui ainda maior atividade e expressão de PEPcase, permitindo melhor performance em períodos de déficit hídrico severo. Quando estudada com déficit hídrico moderado, as plantas desta cultivar apresentaram uma organizada defesa anti-oxidativa para proteção contra as espécies reativas de oxigênio. Quando sob elevada concentração de CO₂, as plantas de cana-de-açúcar exibem modificações estomáticas e bioquímicas, reduzindo a atividade fotossintética pela redução da assimilação de nitrato e atividade de redutase do nitrato, mostrando uma forte relação entre a assimilação de carbono e nitrogênio.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Estresse hídrico. Estresse oxidativo. Assimilação de carbono. Assimilação de nitrato.

ABSTRACT

Sugarcane is a plant of great economic potential, mainly utilized to sugar and biofuel production. Brazil has an international importance, leading the world production of this culture. In spite of this high production, Brazil is located in a tropical region and presents several climatic adversities. The study of sugarcane physiology in stress situations, like water deficit, becomes essential to maintenance and improvement of the production. Sugarcane is a C₄ species, with a CO₂ concentration mechanism. It is expected that the growing elevation of CO₂ in the atmosphere does not affect the sugarcane productivity in a relevant way but the studies about this subject are very scarce. Thus, it was aimed to evaluate the photosynthesis regulation by water deficit, nitrogen supply and high CO₂ in sugarcane plants. Chapter 1 contains the state of the art concerning the study theme. In the chapter 2, it was performed an work in order to evaluate the responses to water deficit of two sugarcane cultivars considered contrasting about water deficit, IAC SP 94-2094 and IAC SP 95-5000. These cultivars were exposed to severe water deficit, with withholding water for five days, and recovery, irrigated after for two days after stress. The applied treatment strongly affected the gas exchanges, with stomatal closure in both cultivars, leading to great reductions in transpiration and CO₂ assimilation. The chlorophyll *a* fluorescence parameters were affected, but without photoinhibition. Tolerant cultivar showed higher PEPcase activity in stress, but Rubisco activity was not altered. In the sensitive cultivar there was not alteration in the PEPcase activity whereas Rubisco activity was reduced 40% in stress but totally recovered. PEPcase expression was increased in stress but with a higher increment in sensitive cultivar, with a similar pattern in the Rubisco amount. In the chapter 3, it was performed an work in order to evaluate the antioxidative system in sugarcane plants exposed to mild water stress. In this chapter, IAC SP 94-2094 was utilized and the water deficit was applied with irrigation cycles, with plants irrigated each five days for fifteen days and recovery for three days. Water stress applied caused remarkable decreases in the stomatal conductance, leaf transpiration and net photosynthesis, with partial recovery, causing lower water use and carboxylation efficiencies. Photochemical parameters showed transient changes completely reversible by recovery. PEPcase and Rubisco activities did not show modifications but it was increase in the relative amount of PEPcase and Rubisco activation state. Water stress increased the lipid peroxidation and H₂O₂ content, inducing increases in SOD and APX activities, mainly thylakoidal APX and Fe-SOD. Sugars profile was altered in stressed plants, with increase in hexoses and decrease in starch content in leaves. The aim of the chapter 4 was evaluate the physiological

and biochemical changes in concern to photosynthetic processes in sugarcane exposed to high CO₂ and low supply of nitrogen (-N). Net photosynthesis was reduced in plants subjected to high CO₂ and -N. Photochemical parameters were decreased only in -N treatment, but with no photoinhibition. Carboxylation enzymes, PEPcase and Rubisco, did suffer differential regulations either by high CO₂ or by low nitrogen. Nitrate determination showed accumulation in roots, indicating deficiency in transport to shoot. -N treatment decreased the amino acids content, soluble proteins and total nitrogen. Sucrose content was reduced in all treatments. At last, it was verified that IAC SP 94-2094 cultivar has more photoprotection indicated by higher NPQ and more PEPcase activity and expression, conferring a better performance in severe water deficit periods. When studied under mild water stress, the plants showed an organized anti-oxidative defense for protection against reactive oxygen species. When under high CO₂, sugarcane plants exhibit stomatal and biochemical changes, reducing the photosynthetic activity by reduction in nitrate assimilation and nitrate reductase activity, showing a strong relation between carbon and nitrogen assimilation.

Keywords: *Saccharum* spp. Water stress. Oxidative stress. Carbon assimilation. Nitrate assimilation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (B), condutância estomática (C), pressão parcial de CO₂ (D) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0.05$) 39
- Figura 2** Eficiência do uso da água (A) e eficiência de carboxilação (B) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0.05$) 40
- Figura 3** Eficiência quântica efetiva (A) e potencial (B) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0.05$) 40
- Figura 4** Quenching fotoquímico (A) e não-fotoquímico (B) e taxa de transporte de elétrons (C) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0.05$) 41
- Figura 5** Atividade de PEPcase (A), atividade inicial de Rubisco (B) e estado de ativação de Rubisco (C) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0.05$) 43
- Figura 6** SDS-PAGE e abundância relativa de PEPcase (100 kDa) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre teste de Tukey ($P < 0.05$) 44

Figura 7 SDS-PAGE e abundância relativa de Rubisco (52 kDa) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre teste de Tukey ($P<0.05$).....	44
--	----

CAPÍTULO 3

Figure 1 Net photosynthesis (A), stomatal conductance (B), intercellular CO ₂ partial pressure (C) and leaf transpiration (D) in well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery for 18 days. Each period has five days and the recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P<0.05$).....	60
---	----

Figure 2 Water use efficiency (A) and carboxylation efficiency (B) in well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery by 18 days. Each period has five days and recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P<0.05$).....	61
--	----

Figure 3 Actual quantum efficiency of photosystem II (A) and potential quantum efficiency of photosystem II (B) of well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery by 18 days. Each period has five days and recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P<0.05$).....	62
---	----

Figure 4 Photochemical quenching (A), non-photochemical quenching (B), apparent electron transport rate (C) and relative excess energy (D) of photosystem II of well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery by 18 days. Each period has five days and recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P<0.05$).....	63
--	----

Figure 5 PEPcase initial activity (A) and band density of western blot (B) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Inset in (B) shows typical bands from an original blot of PEPcase protein, loaded on an equal protein basis. Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P<0.05$).....	64
---	----

Figure 6 Rubisco initial activity (A), activation state (B) and band density of western blot (C) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Inset in (C) shows typical bands from an original blot of PEPcase protein, loaded on an equal protein basis. Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P<0.05$).....	65
---	----

- Figure 7** Lipid peroxidation (A) and H₂O₂ content (B) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P<0.05$) 66
- Figure 8** SOD activity (A) and SOD zymogram (B) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P<0.05$) 67
- Figure 9** Total APX (A) and tAPX (B) activities from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P<0.05$) 68
- Figure 10** Glucose (A), fructose (B) and sucrose (C) contents of leaves and stalks and starch content (D) in leaves from well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments in leaves or stalks by Tukey test ($P<0.05$) 69

CAPÍTULO 4

- Figure 1** Net photosynthesis (A), CO₂ intercellular concentration (B), leaf transpiration (C) and stomatal conductance (D) of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P<0.05$) 83
- Figure 2** PEPcase activity initial (A) and band density of western blotting (B) in sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Inset in (B) shows typical bands from an original blot of PEPcase protein, loaded on an equal protein basis. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P<0.05$) 85
- Figure 3** Rubisco initial activity (A), activation state (B) and band density of western blotting in sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Inset in (C) shows typical bands from an original blot of Rubisco protein, loaded on an equal protein basis. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P<0.05$) 86

- Figure 4** Nitrate reductase activity initial (A) and activation state (B) in sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P < 0.05$) 87
- Figure 5** Ammonium content (A) and glutamine synthetase activity (B) in leaves of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different capital letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P < 0.05$) 88
- Figure 6** Nitrate content in leaves (A), stalk (B) and roots (C) of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P < 0.05$) 89
- Figure 7** Amino acids (A), soluble proteins (B), total nitrogen (C) and photosynthetic nitrogen use efficiency (D) in leaves of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P < 0.05$) 90
- Figure 8** Sucrose (A), glucose (B) and fructose (C) content in leaves of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by t test ($P < 0.05$) 91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Conteúdo relativo de água (CRA), vazamento de eletrólitos (VE), potencial hídrico pré-dawn e ao meio-dia de plantas irrigadas (controle), suspensão de irrigação por cinco dias (estresse) e recuperação em condições irrigadas por três dias (recuperação)	42
---	----

CAPÍTULO 3

Table 1 Relative water content (RWC) in leaves and biomass allocation of leaves, stalk and roots from well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments in leaves or stalks by Tukey test ($P < 0.05$)	59
Table 2 Parameters obtained from P_N/C_i and $P_N/PPFD$ fitting curves. V_{pmax} , carboxylation maximum rate of PEPcase and V_{pr} , regeneration maximum rate of PEP from P_N/C_i curve and α , quantum efficiency, P_{Nmax} , maximum photosynthesis and light curve convexity (Θ) from the $P_N/PPFD$ curve. Uppercase letters compares among water treatments by Tukey test ($P < 0.05$)	62

CAPÍTULO 4

Table 1 Actual ($\Delta F/F_m'$) and potential (F_v/F_m) quantum efficiency of PSII, photochemical (qP) and non-photochemical (NPQ) quenching, electron transport rate (ETR), relative energy excess (EXC), carboxylation efficiency (P_N/C_i) and ETR/P_N of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO_2].....	84
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	17
I. Aspectos Gerais da Cana-de-açúcar.....	18
II. Fotossíntese e o ciclo C4	19
III. Aspectos do déficit hídrico na fotossíntese C4.....	21
IV. Influência da concentração elevada de CO ₂ sobre a fotossíntese C4	23
V. Integração do Metabolismo de Carbono e Nitrogênio.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2 - FOTOSSÍNTESE DE DUAS CULTIVARES DE CANA-DE- AÇÚCAR EXPOSTAS A DÉFICIT HÍDRICO SEVERO E RECUPERAÇÃO	31
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
Trocas gasosas e Fluorescências da Clorofila <i>a</i>	35
Conteúdo Relativo de Água e Dano de Membrana	36
Determinação do Potencial hídrico	36
Atividades de PEPcase e Rubisco	36
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE).....	37
Análise Estatística	38
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPITULO 3 - EFFICIENT ANTIOXIDATIVE PROTECTION AND PHOTOSYSTEM II PRESERVATION DURING WATER DEFICIT CONTRIBUTE TO CO₂ ASSIMILATION AFTER RECOVERY IN SUGARCANE ...	50
INTRODUCTION.....	52
MATERIAL AND METHODS	53
Plant Material and Experimental Design.....	53
Gas Exchange Measurements and Chlorophyll <i>a</i> Fluorescence.....	54
PEPcase and Rubisco Activities	55
SDS-PAGE and Western Blot.....	56
Lipid Peroxidation and H ₂ O ₂ Content	56
Activities of Antioxidant Enzymes.....	57

Carbohydrates, Relative Water Content and Biomass Determination	58
Statistical Analysis	59
RESULTS.....	59
DISCUSSION.....	69
REFERENCES	72
CAPÍTULO 4 - NITRATE ASSIMILATION CONTROLS NEGATIVELY PHOTOSYNTHESIS IN SUGARCANE EXPOSED TO HIGH CO₂.....	76
INTRODUCTION.....	78
MATERIAL AND METHODS	79
Plant Material and Growth Conditions.....	79
Gas Exchange and Chlorophyll <i>a</i> Fluorescence Measurements.....	80
PEPcase and Rubisco Activities and Western Blot.....	80
Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase Activities	81
N-compounds and Carbohydrates Determinations.....	81
RESULTS.....	82
DISCUSSION.....	92
REFERENCES	94

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta de grande importância e potencial econômico, tendo em vista sua utilização para produção de açúcar e biocombustíveis. Neste último, se destaca a produção do etanol, um biocombustível com crescente potencial de utilização, uma vez que o debate sobre a escassez de combustíveis fósseis e a utilização de recursos renováveis com potencial energético têm tomado grandes proporções.

O Brasil tem destaque no cenário internacional por ser o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, com uma produção de 569 mil toneladas em 2008/09. A região Norte-Nordeste é a segunda região mais produtora do país, que compreende 11% do total (UNICA, 2009). Apesar da liderança na produção da cana-de-açúcar, o Brasil é um país localizado em uma região tropical do globo terrestre e com adversidades climáticas que influenciam a produtividade. Dessa forma, o entendimento das relações hídricas dessa cultura se torna primordial para o incremento e melhoria constante da produção. A cana-de-açúcar é uma espécie de fotossíntese C4, que é mais adaptada a regiões com altas temperaturas, com elevadas taxas de fotossíntese líquida e com baixa perda por transpiração, tornando-se altamente eficiente no uso da água (TAIZ; ZEIGER, 2008).

As plantas que possuem a fotossíntese C4 são aptas a ocupar áreas mais quentes e com maior luminosidade, com maior concentração nos trópicos e sub-trópicos. As plantas C4 tem um sistema de concentração de CO₂ no sítio da Carboxilase:oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco), aumentando a eficiência dessa enzima e reduzindo sua ação oxigenásica, reduzindo a fotorrespiração (SAGE, 1999). Esse mecanismo de concentração de CO₂ é realizado no mesófilo com a inserção de uma nova via que tem como principal enzima, a carboxilase do fosfoenolpiruvato (PEPcase). Essa enzima capta o carbono atmosférico e o transfere para um ácido orgânico (malato ou aspartato) que será transferido para as células da bainha do feixe vascular, onde está confinada a Rubisco. Dessa forma, a eficiência de carboxilação será bastante elevada (WANG et al., 2011).

Plantas de fotossíntese C4 tendem a manter a alta eficiência de uso de água mesmo em situações de déficit hídrico, mas existe uma grande diversidade de respostas das plantas C4 a situações de seca (LOPES et al., 2011). A cana-de-açúcar, por exemplo, apresenta uma regulação estomática em nível de planta inteira, sendo altamente regulada com o intuito de não perder muita água pela transpiração, mas sem comprometer o efeito de resfriamento foliar (INMAN-BAMBER et al., 2005). Entretanto, é comprovado que plantas C4 apresentaram

maiores limitações metabólicas em momentos de deficiência hídrica e, após esse período, a recuperação é mais lenta (RIPLEY et al., 2010).

Em virtude das previsões de aumento na concentração de CO₂ atmosférico para o século XXI, o estudo em relação às respostas das plantas a essa elevação se tornam imprescindíveis para a agricultura (LEAKEY, 2009). As plantas C₄, como a cana-de-açúcar, têm um sistema de concentração de CO₂ para a Rubisco e, portanto, alterações de CO₂ no ambiente teoricamente não teriam efeito na taxa fotossintética ou no crescimento (PRASSAD et al., 2009). Entretanto, em situações de estresse, as respostas podem ser diferenciadas em um ambiente enriquecido com CO₂, com consequências no desenvolvimento da planta (LEAKEY et al., 2009).

Dessa forma, com os cenários de deficiência hídrica e alterações na atmosfera que são projetados para um futuro próximo, a pesquisa envolvendo essas variáveis na fisiologia da cana-de-açúcar se tornam de fundamental importância já que essa cultura tem papel marcante no que diz respeito à economia e potencial bioenergético. Nesta Tese, inicialmente é verificado o Estado da arte na pesquisa global atual (Capítulo I) e são abordados estes temas envolvendo experimentos com deficiência hídrica (Capítulos II e III) e alterações na concentração de CO₂ na atmosfera e suprimento de nitrogênio (Capítulo IV).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

I. Aspectos Gerais da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea de origem asiática que possui o metabolismo fotossintético do tipo C4 do carbono, podendo alcançar uma taxa fotossintética próxima a $63 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e produzir 40 g de fitomassa por m^2 de área cultivada por dia, na qual a maior parte do carbono é acumulada nos vacúolos centrais das células parenquimáticas do entrenó, no colmo (MOORE; MARETZKI, 1996). Essa cultura é um importante componente da economia de muitos países nas zonas tropicais e subtropicais. Muitos destes são países em desenvolvimento onde o açúcar contribui substancialmente para a economia. A cana-de-açúcar tem, portanto, sido considerada como uma cultura modelo de alto rendimento e para estudos relativos à supressão da fotorrespiração e fotossíntese C4 (INMAN-BAMBER et al., 2005). Nas regiões tropicais, a produção de alimentos está muito relacionada a plantas com fotossíntese C4, dentre elas a cana-de-açúcar, o milho, o milheto e o sorgo (BROWN, 1999). Até 75% da produção de açúcar no mundo é provido pela cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2008), com uma estimativa de aproximadamente 150 milhões de toneladas em 2005/2006 (GLASSOP et al., 2007). Somado a isso, está o potencial da cana-de-açúcar para a produção de biocombustíveis (GOLDENBERG, 2007).

A cana-de-açúcar é uma espécie que acumula altas quantidades de sacarose nos internódios maduros, e com menores quantidades nos mais jovens (MCCORMICK et al., 2009). O colmo maduro da cana-de-açúcar é capaz de acumular sacarose em concentrações de aproximadamente 650 mM, dependendo da variedade (WELBAUN; MEINZER, 1990). Apesar da alta produtividade dessa cultura, o estudo da fisiologia da cana-de-açúcar é mais difícil do que em outras culturas estabelecidas. Para a cana-de-açúcar, o interessante seria aperfeiçoar a partição de carbono para a sacarose em um período de tempo mais curto, melhorando a produtividade. No entanto, o tamanho e a complexidade do genoma poliploide da cana-de-açúcar impossibilitam que cientistas utilizem ferramentas comuns nos dias de hoje que são utilizadas em outras culturas, e.g. arroz (INMAN-BAMBER et al., 2005).

Em muitas regiões do mundo onde a cana-de-açúcar é cultivada, principalmente em regiões tropicais, a água é um fator limitante de produtividade. Dessa forma, o conhecimento das relações hídricas em cana-de-açúcar se torna primordial para o sucesso no cultivo e

melhorias na produtividade (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Grantz e Meinzer (1991) concluíram que o controle da resistência estomática em cana-de-açúcar é realizado em nível de planta inteira e que a transpiração é proporcional a quantidade de energia recebida sem induzir calor excessivo para as folhas, revelando um controle fino dos estômatos em função da necessidade.

II. Fotossíntese e o ciclo C4

A fotossíntese é o processo no qual o carbono obtido do CO_2 atmosférico é utilizado para produzir compostos orgânicos a partir da luz solar. Esse processo é utilizado por organismos autotróficos e é o responsável por dar suporte a maioria dos organismos heterotróficos baseados em cadeias alimentares ao longo de milhões de anos (WANG et al., 2011). Em plantas superiores, a fotossíntese é conceitualmente separada em duas fases: Fotoquímica, com reações dependentes da luz onde existem os complexos coletores de luz, fotossistemas e uma cadeia de transporte de elétrons responsável por produzir ATP e energia redutora na forma de NADPH, e Bioquímica, um conjunto de reações bioquímicas que formam o Ciclo de Calvin utilizando o ATP e NADPH gerado para produzir carboidratos a partir do CO_2 absorvido (TAIZ; ZEIGER, 2008).

Durante a evolução, as duas fases da fotossíntese tem promovido melhorias nos seus processos, como mudanças que aumentam a eficiência nos complexos que coletam a luz, promovendo maior eficácia na produção de ATP e NADPH (VASIL'EV; BRUCE, 2004), e mecanismos que promovam a maior eficiência da Carboxilase:oxigenase da Ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco), que é a responsável pela carboxilação (SAGE, 2004). A Rubisco é uma enzima que, em seu sítio de ativação, pode receber tanto gás carbônico (CO_2) como oxigênio (O_2). Essa característica não foi problema, pois, quando do surgimento desta enzima e do processo fotossintético, a atmosfera tinha uma relação CO_2/O_2 elevada o suficiente para que o processo de oxigenação fosse desprezível (TAIZ; ZEIGER, 2008).

À medida que a evolução fez com que as plantas dominassem o ambiente terrestre, a relação CO_2/O_2 foi sendo reduzida até o ponto em que a atividade oxigenase da Rubisco não era mais desprezível. Nesse momento, o processo fotorrespiratório tornou-se uma porção considerável da atividade total da Rubisco (SAGE, 1999). Esse processo, chamado fotorrespiração acontece quando a Rubisco assimila oxigênio, gerando dois compostos

diferentes, o 3-fosfoglicerato e o 2-fosfoglicolato. O primeiro é normalmente utilizado no ciclo de Calvin, mas o segundo, por conter apenas dois átomos de carbono, segue um caminho diferente para ser regenerado, passando por peroxissomos e mitocôndrias, além dos cloroplastos e com maior gasto energético. Dessa forma, a fotorrespiração passou a ser um processo dispendioso para os vegetais (PETERHANSEL; MAURINO, 2011).

Com o objetivo de reduzir as taxas fotorrespiratórias e aumentar a eficiência fotossintética, alguns grupos de plantas, que evoluíram independentemente, desenvolveram duas importantes características. Na primeira, a Rubisco foi confinada em um local que formaria uma barreira de difusão que limitaria a difusão de gases, impedindo a entrada de O_2 e a saída de CO_2 . Assim, houve uma separação entre as células do mesófilo e a recém-formada bainha do feixe vascular, com uma diferença de concentração de CO_2 de 100 a $200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ no mesófilo para 1000 a $3000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ na bainha do feixe (VON CAEMMERER; FURBANK, 1999). Na segunda, foi formada uma via em que o CO_2 seria levado do mesófilo até o compartimento onde estaria a Rubisco, a bainha do feixe (SAGE, 1999).

A principal enzima da nova via de carboxilação formada é a Carboxilase do fosfoenolpiruvato (PEPcase). Essa enzima, ao contrário da Rubisco, tem afinidade apenas pelo CO_2 , evitando a possibilidade da fotorrespiração. Ela carboxila o fosfoenolpiruvato (PEP) utilizando o CO_2 formando oxaloacetato (OAA), um composto de quatro carbonos, razão pela qual essa nova forma de captação de CO_2 ser chamada de ciclo C4. O carbono assimilado é para as células da bainha do feixe na forma de malato ou aspartato para ser assimilado pela Rubisco. Dessa forma, a Rubisco terá disponível apenas o CO_2 levando a fotorrespiração para níveis desprezíveis. Essa via foi inicialmente descrita na década de 60 por Hatch e Slack (1966; 1967) e Osmond (1967).

A fotossíntese C4 evoluiu independentemente e hoje em dia está presente um número que varia de 8000 a 10000 espécies classificadas em 18 famílias taxonômicas (KELLOG, 1999; SAGE et al., 1999). Importantes diferenças existem na fotossíntese C4, como reflexo das suas diversas origens filogenéticas. A principal diferença está no processo de descarboxilação na bainha do feixe vascular, quando o CO_2 se torna disponível para a Rubisco. Três tipos principais de descarboxilação já foram identificados: as plantas que utilizam a enzima málica dependente de $NADP^+$ (subtipo NADP-ME); as que utilizam a enzima málica dependente de NAD^+ (subtipo NAD-ME) e aquelas que utilizam a

carboxiquinase do PEP (subtipo PCK). Desses três subtipos, o primeiro é o mais simples e o mais comumente encontrado entre as plantas C4 (SAGE, 1999).

A distribuição das plantas C4 é altamente dependente de gradientes de latitude e altitude. Estas plantas são dominantes em zonas tropicais e subtropicais, em latitudes menores que 45° a 50°, e em altitudes menores que 2000 m. Este padrão notavelmente reflete a dependência da distribuição das plantas C4 a temperatura e luminosidade. Além disso, verificamos ainda algumas áreas que são ocupadas tanto por plantas C4 como por C3. Nestas áreas, geralmente verifica-se que as C4 são formadas por gramíneas e as C3 por espécies arbóreas (SAGE et al., 1999).

III. Aspectos do déficit hídrico na fotossíntese C4

O Painel Intergovernamental para Mudanças Climáticas (IPCC, 2007) previu que, em um futuro próximo, haverá decréscimos consideráveis na quantidade e frequência de precipitações, e elevações nas temperaturas de maneira globalizada, resultando em grandes perdas de água por evapotranspiração. Dentro desse contexto de previsões de maiores problemas com escassez de água para a agricultura, o maior conhecimento da fotossíntese C4 tem grande potencial para a melhoria da produção da agricultura e segurança alimentar (LOPES et al., 2011). Embora as plantas C4 compreendam apenas 4% das espécies vegetais terrestres, elas são importantes em um contexto agrícola e ecológico, e contribuem com aproximadamente 20% da produtividade primária global (EHLERINGER et al., 1997).

As fotossínteses C3 e C4 compartilham dos mesmos processos fotossintéticos fundamentais, tais como ciclo C3, complexos coletores de luz e componentes de transporte de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2008). Dessa forma, esperava-se que as duas vias fotossintéticas mostrassem grandes similaridades em resposta à disponibilidade hídrica. No entanto, existem diferenças significativas entre os dois tipos fotossintéticos, que poderiam fazer as respostas diferirem em vários níveis em um ambiente de estresse hídrico (GHANOUMM, 2009). As plantas C4 se distinguem das C3 por algumas características presentes, tais como: (1) bainha do feixe vascular bem definida; (2) dimorfismo dos cloroplastos; (3) duas vias de carboxilação, envolvendo PEPcase, nas células do mesófilo, e Rubisco, nas células da bainha do feixe vascular e; (4) fotorrespiração desprezível devido aos mecanismos de concentração de CO₂ (NAYYAR; GUPTA, 2006).

As plantas C4 têm maior eficiência do uso de água (EUA) e a presença de mecanismos concentradores de CO₂ fazem com que a fotossíntese dessas plantas seja mais competitiva em condições que promovem a perda de carbono pela fotorrespiração, tais como altas intensidades de luz e temperatura e decréscimos na disponibilidade de água (EDWARDS et al., 2004). As características citadas no parágrafo anterior são importantes porque permitem vantagens em termos de EUA possibilitando maiores taxas fotossintéticas mesmo quando os estômatos estão praticamente fechados, limitando a fotorrespiração (LOPES et al., 2011). Inman-Bamber e Smith (2005) avaliando pesquisas com cana-de-açúcar verificaram que a regulação estomática é realizada em nível de planta inteira e que a condutância estomática é igualmente sensível ao conteúdo de água na planta como o déficit de pressão do vapor.

Evidências recentes sugerem que a fotossíntese C4 está mais propensa a limitações metabólicas e que tem baixas taxas de recuperação após um período de seca (RIPLEY et al., 2010). Ghannoum (2009) sugere que existe uma inibição preferencial da atividade das enzimas do ciclo C3 durante a seca. A inibição diferencial das enzimas dos ciclos C3 e C4 poderiam levar a um aumento na concentração de CO₂ dentro da bainha do feixe vascular que culminaria em um maior vazamento de CO₂ para o mesófilo (LOPES et al., 2011). Entretanto, Navyar e Gupta (2006) colocam que estudos comparativos entre espécies C3 e C4 em resposta à déficit hídrico são escassos, principalmente quando se leva em consideração o nível metabólico.

O estudo da limitação não-estomática tem mostrado que as enzimas fotossintéticas de plantas C4 tem alterações significativas durante ou pós-estresse hídrico. Analisando a Rubisco, vemos que as respostas podem ser negativas ou sem alterações no déficit hídrico, enquanto que as enzimas chave do ciclo C4, como a PEPcase, têm respostas diferenciadas, podendo ser negativamente reguladas, não apresentar mudança ou até aumentar sua atividade (GHANNOUM, 2009). Esse mesmo autor conclui que, como via de regra, considera-se que plantas C4 sob deficiência hídrica tem a relação das atividades C3/C4 reduzida. Essa alteração pode ser confirmada pelo vazamento de CO₂ da bainha para o mesófilo, em consequência da menor atividade das enzimas do ciclo C3 em relação as do ciclo C4 (VON CAEMMERER; FURBANK, 1999).

A fotorrespiração tende a não aumentar durante o déficit hídrico em plantas C4 (CARMO-SILVA et al., 2008). Os cloroplastos dessas plantas têm uma alta capacidade para realizar a reação de Mehler, que gera peróxido de hidrogênio. Essa via tem a capacidade de

ser um dreno alternativo de elétrons durante o período de seca. As enzimas da via C4 localizadas nos cloroplastos do mesofilo podem ser inativadas pela intensa oxidação durante o período de estresse e isto poderia explicar porque a recuperação de plantas C4 após a seca é mais tardia (IBRAHIM et al., 2008).

IV. Influência da concentração elevada de CO₂ sobre a fotossíntese C4

As mudanças climáticas no século XXI impactarão negativamente em muitos aspectos da humanidade, mas as previsões a respeito da influência dessas mudanças na agricultura são as mais preocupantes (IPCC, 2007). A concentração atual de CO₂ na atmosfera está em torno de 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, mas, com o ritmo de crescimento atual, está projetada para alcançar 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ até o fim deste século (LEAKEY, 2009). As elevações previstas na concentração de CO₂ atmosférico e outros gases serão responsáveis por causar impactos negativos no clima em várias regiões, entre os quais estão aumentos na temperatura e alterações no padrão de precipitação que poderiam resultar em menor disponibilidade hídrica para plantas em muitas áreas do globo terrestre (LONG et al., 2004).

As espécies com fotossíntese do tipo C4 contribuem com 25 a 30% da produtividade agrícola global, e compreendem aproximadamente 40% da colheita de grãos no mundo (MARKELZ et al., 2011). Somado a isso, as plantas C4 tem muitas candidatas a culturas que suportariam a produção de biocombustíveis, incluindo cana-de-açúcar, milho e *Mischantus* (SOMERVILLE et al., 2010). O ciclo fotossintético C4 concentra CO₂ no sítio ativo da Rubisco nas células da bainha vascular, levando a um aumento na carboxilação e supressão da fotorrespiração. Consequentemente, as plantas C4 são capazes de alcançar uma alta taxa fotossintética na concentração de CO₂ ambiente atual, e um aumento futuro na quantidade de CO₂ na atmosfera teria pouco ou nenhum efeito na fotossíntese e no crescimento dessas plantas (PRASAD et al., 2009).

Apesar da insensibilidade das plantas C4 ao aumento do CO₂ na atmosfera, as respostas poderiam ser diferentes se essas mesmas espécies estivessem em situação de estresse, como em uma situação de déficit hídrico. Nesta situação, o estresse pode ser atrasado ou reduzido pelo baixo uso de água sob elevado CO₂ conservando os recursos hídricos escassos. A redução na absorção de CO₂ em consequência da condutância estomática diminuída sob seca

pode ser compensada pela maior concentração de CO₂ intercelular estimulada pela maior quantidade de CO₂ no ambiente (LEAKEY et al., 2009).

A fotossíntese C4 é quase completamente saturada na atual concentração de CO₂ na atmosfera. Dessa forma, o grau de resposta do crescimento ao CO₂ elevado é pensado estar relacionado a vários mecanismos. Estes podem ser vazamento das células da bainha do feixe vascular, fixação direta do CO₂ nas células da bainha e fotossíntese C3 em nas folhas jovens (GHANOUMM et al., 2000). Uma alteração bioquímica comum em plantas C4 é redução dos níveis da enzima responsável pela primeira carboxilação, a PEPcase. Essa alteração não é acompanhada por alterações na Rubisco, a enzima responsável pela segunda carboxilação, a nível de bainha. Nesse caso, a quantidade de CO₂ levado as células da bainha não é o suficiente para completa saturação, o que leva a uma redução na fotossíntese líquida (WATLING et al., 2000).

O aumento na concentração de CO₂ na atmosfera irá impactar de maneira significativa na muitas culturas agrícolas, de maneira ecológica e econômica (VU; ALLEN, 2009). As pesquisas relativas a respostas das plantas a um crescente aumento na concentração de CO₂ têm focado principalmente em espécies C3, dessa forma, avançando nosso conhecimento sobre os mecanismos e processos a respeito das respostas das plantas C3 a essas previsões de modificações na atmosfera (LONG et al., 2004). No entanto, as informações sobre como essas mesmas alterações na atmosfera terrestre têm sobre as plantas C4 permanecem obscuras (LEAKEY et al., 2006), embora essas plantas tenham reconhecida importância na economia global e na segurança alimentar de comunidades ao redor do planeta.

V. Integração do Metabolismo de Carbono e Nitrogênio

Vários estudos indicam uma coordenação da assimilação de carbono e nitrogênio em plantas superiores através de efeitos na absorção de nitrato nas raízes, translocação pelo xilema e a redução nas folhas (FOYER et al., 2001). Duas observações chave sugerem que a regulação da atividade da enzima Redutase do nitrato (NR) na folha é importante em coordenar a redução do nitrato e a fixação do carbono. Primeiro, a capacidade da redução do nitrato aumentar na luz. Segundo, a atividade de NR é reduzida em baixo CO₂ (PACE et al., 1990). Outros trabalhos tem estabelecido que mudanças na atividade refletem em um controle

múltiplo mediado por vários fatores, que dentre os mais importantes estão luz, nitrato, glutamina (Gln) e carboidratos (STITT et al., 2002).

A expressão dos genes *nia*, que codificam NR, é induzida por nitrato e carboidratos, mas é inibida por gln, mas também existe um controle da luz sobre essa expressão (FOYER; NOCTOR, 2002). Ao nível pós-traducional, a atividade de NR é inibida através da fosforilação da proteína, causada pelos fatores já mencionados. Vários destes controles sobre a atividade de NR parecem ser afetados pelo suprimento de carboidratos. Assim como aumento dos transcritos *nia*, carboidratos exógenos influenciam a regulação pós-traducional. Um aumento na estabilidade enzimática e no estado de ativação podem ser relacionados a decréscimos no estado de fosforilação da NR induzidos por carboidratos (FOYER et al., 2001).

As folhas devem realocar uma proporção significativa de carbono fixado para a síntese de aminoácidos. A proporção de carbono fixado requerido para assimilação de nitrogênio mudará de acordo com o estágio de desenvolvimento, a disponibilidade de nitrogênio e a natureza dos produtos (LEWIS et al., 2000). Para cada molécula de NH_3 assimilada, uma molécula de 2-oxoglutarato (2-OG) é requerida para formar glutamato (Glu), o produto da via GS-GOGAT, formado pelas enzimas Sintetase da glutamina (GS) e Sintase do glutamato (GOGAT). Uma vez que a amônia é incorporada em Gln e Glu, outros esqueletos de carbono são requeridos para a síntese de aminoácidos, via uso do Glu nas reações de transaminação. Os principais destinos do nitrogênio assimilado são a síntese e exportação de proteínas (FOYER; NOCTOR, 2002).

Do ponto de vista fisiológico, uma queda na quantidade de esqueletos de carbono deve ser sinalizado para o processo de redução do nitrato, reduzindo a assimilação de nitrogênio e evitando uma produção excessiva de nitrito e amônia. Uma quantidade de carbono insuficiente em plantas sob iluminação, onde a assimilação de nitrogênio é relativamente rápida, poderia resultar na incapacidade do sistema desviar bastante açúcar-fosfato para oxidação e/ou oxidação de aceptores chave como 2-OG (FOYER; NOCTOR, 2002). De modo contrário, quando o nitrogênio está sendo suprido de forma insuficiente, o amido na folha tende a ser acumulado. Alta quantidade de nitrato promove síntese de ácidos orgânicos via expressão aumentada da PEPcase do tipo-C3, presente também nas plantas C3 (SCHEIBLE et al., 1997). O acoplamento redox também pode influenciar a integração entre a assimilação de

nitrogênio e o metabolismo de carbono. A formação líquida de um 2-OG a partir de um açúcar-fosfato envolve a produção de quatro NAD(P)H (FOYER; NOCTOR, 2002).

Estruturalmente falando, os componentes do tilacóide compõem tipicamente aproximadamente 25% do nitrogênio foliar e consistem de cinco complexos principais: o complexo coletor de luz (LHC), fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), complexo citocromo *b/f* e os fatores de acoplamento na ATPase (CF_0 - CF_1). Em relação às enzimas da via de produção de carboidratos, a Rubisco é a principal, levando em consideração a quantidade de proteína. Geralmente, a Rubisco conta de 25 a 30% do nitrogênio total em uma planta C3 (KUMAR et al., 2002). Em plantas C4, a contribuição dessa enzima é menor, uma vez que a quantidade de Rubisco nessas espécies é menor e requerem menor quantidade de nitrogênio para sustentar uma determinada taxa de fotossíntese líquida. Como resultado, plantas C4 têm maiores taxas de fotossíntese com menor conteúdo de nitrogênio foliar em alta luz. Isso explica a grande eficiência do uso de nitrogênio (NUE) dessas plantas em ambientes quentes e com alta luminosidade (SAGE, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, R.H. Agronomic implications of C4 photosynthesis. *In: C4 Plant Biology*. San Diego: Academic Press. 1999. 616p.
- CARMO-SILVA, A. E.; POWERS, S. J.; KEYS, A. J.; ARRABAÇA, M. C.; PARRY, M. A. J. Photorespiration in C4 grasses remains slow under drought conditions. **Plant, Cell and Environment**, v.31, p. 925–940. 2008.
- EDWARDS, G. E.; FRANCESCHI, V. R.; VOZNESENKAYA, E. V. Single cell C4 photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 173–196. 2004.
- EHLERINGER, J. R.; CERLING, T. E.; HELLIKER, B. R. C4 photosynthesis, atmospheric CO₂ and climate. **Oecologia** v. 112, p. 285–299. 1997.
- FOYER, C. H.; FERRARIO-MÉRY, S.; NOCTOR, G. Interactions between carbon and nitrogen assimilation. *In: Lea, P. J.; Morot-Gaudry, J. F. (eds) Plant Nitrogen*, p. 237-254. Springer: Berlin. 2001.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Photosynthetic nitrogen assimilation. *In: Foyer, C. H.; Noctor, G. (eds) Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism*, p. 1-22. Kluwer: Dordrecht. 2002.
- GHANNOUM, O.; VON CAEMMERER, S.; ZISKA, L. H.; CONROY, J. P. The growth response of C4 plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 931–942. 2000.
- GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v.103, p.635–644, 2009.
- GLASSOP, D.; ROESSNER, U.; BACIC, A.; BONNETT, G. D. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant Cell Physiology**, p.573–84. 2007.
- GOLDENBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p.808–810. 2007.
- GRANTZ, D.A.; MEINZER, F.C. Regulation of transpiration in field-grown sugarcane. Evaluation of the stomatal response to humidity with the Bowen ratio technique. **Agriculture and Forest Meteorology**. 53, 169–183. 1991.
- HATCH, M. D.; SLACK, C. R. Photosynthesis by sugar-cane leaves—a new carboxylation reaction and pathway of sugar formation. **Biochemical Journal**, v. 101, p. 103–111. 1966.
- HATCH, M. D.; SLACK, C. R. Participation of phosphoenolpyruvate synthetase in photosynthetic CO₂ fixation of tropical grasses. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 120, 224–422. 1967.

- IBRAHIM, D. G.; GILBERT, M. E.; RIPLEY, B. S.; OSBORNE, C. P. Seasonal differences in photosynthesis between the C3 and C4 subspecies of *Alloteropsis semialata* are offset by frost and drought. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, p. 1038–1050. 2008.
- INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v.92, p. 185–202. 2005.
- INMAN-BAMBER, N. G.; BONNETT, G. D.; SMITH, D. M.; THORBURN, P. J. Sugarcane Physiology: Integrating from cell to crop to advance sugarcane production. **Field Crops Research**, v. 92, p. 115-117. 2005.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE**. 2007.
<http://www.ipcc.ch>. Accessed 25 October 2007.
- KELLOG, E. A. *Phylogenetic aspects of the evolution of C4 photosynthesis*. In: **C4 Plant Biology**. San Diego: Academic Press. 1999. 616p.
- KUMAR, P. A.; PARRY, M. A. J.; MITCHELL, R. A. C.; AHMAD, A. ; ABROL, Y. P. Photosynthesis and Nitrogen-Use Efficiency. In: Foyer, C. H.; Noctor, G. (eds) **Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism**, p. 1-22. Kluwer: Dordrecht. 2002.
- LEAKEY, A. D. B.; URIBELARREA, M.; AINSWORTH, E. A.; NAIDU, S. L.; ROGERS, A.; ORT, D. R.; LONG, S. P. Photosynthesis , Productivity , and Yield of Maize Are Not Affected by Open-Air Elevation of CO₂ Concentration in the Absence of Drought. **Plant Physiology**, v. 140, p. 779-790. 2006.
- LEAKEY, A. D. B. Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C 4 crops for food and fuel. **Proc. R. Soc. B**, v. 276, p. 2333–2343. 2009.
- LEWIS, E.; NOCTOR, G.; CAUSTON, D.; FOYER, C. H. Regulation of assimilate partitioning in leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 507-517. 2000.
- LONG, S. P.; AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A.; ORT, D. R. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 591–628. 2004.
- LOPES, M, S.; ARAUS, J. L.; VAN HEERDEN, P. D. R.; FOYER, C. H. Enhancing drought tolerance in C4 crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3135–3153. 2011.
- MARKELZ, R. J. C.; STRELLNER, R. S.; LEAKEY, A. D. B. Impairment of C4 photosynthesis by drought is exacerbated by limiting nitrogen and ameliorated by elevated [CO₂] in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 3235–3246. 2011.
- MCCORMICK, A. J.; WATT, D. A. CRAMER, M. D. Supply and demand : sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 357–364, 2009.
- MOORE, P. H.; MARETZKI, A. Sugarcane. In: E. Zamski & A.A. Schaffer (eds.), **Photoassimilate distribution in plants and crops**. Marcel Dekker. New York, USA. pp. 643-669. 1996.

- NAYYAR, H.; GUPTA, D. Differential sensitivity of C₃ and C₄ plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 106–113. 2006.
- OSMOND, C. B. Beta-carboxylation during photosynthesis in *Atriplex*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 141, p. 197–199. 1967.
- PACE, G. M.; VOLK, R. J.; JACKSON, W. A. Nitrate Reduction in Response to CO₂-Limited Photosynthesis: Relationship to Carbohydrate Supply and Nitrate Reductase Activity in Maize Seedlings. **Plant Physiology**, v. 92, p. 286-292. 1990.
- PETERHANSEL, C.; MAURINO, V. G. Photorespiration redesigned. **Plant Physiology**, v. 155, p. 49–55. 2011.
- PRASAD, P. V. V.; VU, J. C. V.; BOOTE, K. J.; ALLEN, L. H. Enhancement in leaf photosynthesis and up-regulation of Rubisco in the C₄ sorghum plant at elevated growth carbon dioxide and temperature occur at early stages of leaf ontogeny. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 761–769. 2009.
- RIPLEY, B.; FROLE, K.; GILBERT, M. Differences in drought sensitivities and photosynthetic limitations between co-occurring C₃ and C₄ (NADP-ME) Panicoid grasses. **Annals of Botany** v. 105, p. 493–503. 2010.
- SAGE, R. F. *Why C₄ photosynthesis?* In: **C₄ Plant Biology**. San Diego: Academic Press. 1999. 616p.
- SAGE, R. F.; WEDIN, D. A.; LI, M. *The biogeography of C₄ photosynthesis: Patterns and controlling factors*. In: **C₄ Plant Biology**. San Diego: Academic Press. 1999. 616p.
- SAGE, R. F. The evolution of C₄ photosynthesis. **New Phytologist** v. 161, p.341–370. 2004.
- SCHEIBLE, W. R.; GONZÁLES-FONTES, A.; LAUERER, M.; MÜLLER-RÖBBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, v. 9, p. 783-798. 1997.
- SOMERVILLE, C.; YOUNGS, H.; TAYLOR, C.; DAVIS, S. C.; LONG, S. P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science** 329, 790–792. 2010.
- SOUZA, A. P. D. E.; GASPAR, M.; SILVA, A. E.; ULIAN, E. C.; WACLAWOVSKY, A. J.; NISHIYAMA, M. Y.; SANTOS, R. V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, G. M.; BUCKERIDGE, M. S. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, p. 1116-1127. 2008.
- STITT, M.; MU, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 959–970. 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2008. 819p.

VASIL'EV, S.; BRUCE, D. Optimization and evolution of light harvesting in photosynthesis: the role of antenna chlorophyll conserved between photosystem II and photosystem I. **Plant Cell** 16: 3059–3068. 2004.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Dados e cotações - estatística, <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>, (01 janeiro 2010).

VON CAEMMERER, S.; FURBANK, R. Modelling C4 photosynthesis. *In: C4 Plant Biology*. San Diego: Academic Press. 1999. 616p.

VU, J. C. V.; ALLEN, L. H. Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C4 sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 107-116. 2009.

WANG, L.; PETERSON, R. B.; BRUTNELL, T. P. Regulatory mechanisms underlying C4 photosynthesis. **New Phytologist**. Tansley Review, 2011.

WATLING, J. R.; PRESS, M. C.; QUICK, W. P. Elevated CO₂ induces biochemical and ultra-structural changes in leaves of the C4 cereal sorghum. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1143–52. 2000.

WELBAUM, G.E.; MEINZER, F.C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. **Plant Physiology**. v. 93, p. 1147–1153. 1990.

CAPÍTULO 2

FOTOSSÍNTESE DE DUAS CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTAS A DÉFICIT HÍDRICO SEVERO E RECUPERAÇÃO

Fotossíntese de Duas Cultivares de Cana-de-Açúcar Expostas ao Déficit Hídrico Severo e Recuperação

Marcio de Oliveira Martins¹; Milton Costa Lima Neto¹; Ana Karla Moreira Lobo¹; Joaquim Albenisio Gomes da Silveira^{1*}

¹Laboratório de Metabolismo de Plantas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará.

* Autor correspondente

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas de duas cultivares de cana-de-açúcar, IAC SP 94-2094 e IAC SP 95-5000, submetidas a déficit hídrico. Para tanto, foi realizado um experimento em casa de vegetação utilizando plantas de cana-de-açúcar com sete meses de idade. Os tratamentos aplicados foram controle, com irrigação diária; estresse, com suspensão de irrigação durante cinco dias; e recuperação, plantas do tratamento estresse reirrigadas diariamente por dois dias. O estresse aplicado foi capaz de afetar fortemente as trocas gasosas, com fechamento estomático nas duas cultivares, levando a fortes reduções de transpiração (90%) e assimilação de CO₂ (86%). Entretanto, a pressão parcial interna de CO₂ foi elevada em até cinco vezes. Dessa forma, a eficiência de carboxilação foi levada a zero nas duas cultivares, mas a eficiência de uso de água foi mais afetada na cultivar sensível do que na tolerante. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foram afetados, mas de maneira reversível exceto o quenching não-fotoquímico na cultivar tolerante, que manteve-se elevado mesmo após recuperação. O potencial hídrico da cultivar tolerante mostrou maior plasticidade ao ser mais reduzido no estresse mas com plena recuperação quando as plantas foram reirrigadas. A matéria seca das raízes foi reduzida a metade após o estresse, refletindo na redução maior (46%) observada nesta cultivar na matéria seca total. Com relação as atividade enzimáticas, a cultivar tolerante teve maior atividade de PEPcase no estresse, mas a atividade de Rubisco não foi alterada. Na cultivar sensível, não houve alteração na atividade de PEPcase enquanto que a atividade de Rubisco foi reduzida em 40% no estresse mas com total recuperação. A quantidade de PEPcase indicada por uma SDS-PAGE foi aumentada no estresse mas com maior incremento na cultivar tolerante, com padrão semelhante na quantidade de rubisco. Em conclusão, podemos afirmar que as duas cultivares estudadas

possuem reações distintas em relação ao estresse hídrico e que a tolerância da cultivar IAC SP 94-2094 possivelmente está na maior fotoproteção indicada pelo NPQ e maior atividade e quantidade de PEPcase, permitindo melhor resposta em períodos de seca.

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; Seca; Relações hídricas; Assimilação de CO₂; Fotoquímica.

INTRODUÇÃO

A baixa disponibilidade de água é o principal fator ambiental que limita o crescimento da planta e rendimento em todo o mundo (FLEXAS et al., 2006). Culturas são frequentemente sujeitas a períodos de déficit hídrico do solo e da atmosfera durante seu ciclo de vida. Além disso, as alterações previstas para o cenário climático de todo o mundo nos próximos anos sugerem um aumento da extensão e do número das zonas áridas e semi-árido (IPCC, 2007) e compreender como as culturas respondem à seca (mesmo que moderadamente) pode ter um papel central para melhorar o desempenho e a eficiência do uso da água (CHAVES et al., 2009).

Respostas das plantas ao déficit hídrico são bastante complexas. Seca pode induzir uma redução na condutância estomática, que é considerada uma reação precoce e uma maneira eficiente para reduzir a perda de água, mas, por outro lado, que limita a difusão de CO₂ para as folhas para a fotossíntese (LAWLOR; CORNIC, 2002). McDowell et al. (2008) relatam menor assimilação de carbono causada pela seca induzida pelo fechamento dos estômatos pode resultar em uma privação de carbono como uma consequência de uma demanda contínua do metabolismo dos carboidratos e esse processo pode ser agravado quando o estresse hídrico é combinado com outra forma de estresse (calor, por exemplo). Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) é a principal enzima da fotossíntese e tem um papel central para carboxilar a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) usando CO₂ atmosférico. Sob estresse hídrico, a atividade e/ou quantidade desta enzima pode ser alterada, resultando em diminuição da fotossíntese (PARRY et al., 2002).

Dessa forma, pesquisas relativas a fotossíntese de plantas sob estresse se fazem importantes. No presente trabalho, duas cultivares de cana-de-açúcar, IACSP 94-2094, considerada tolerante, e IAC SP95-5000, considerada sensível a estresse hídrico, foram submetidas a um tratamento de suspensão de irrigação por cinco dias e recuperação de três

dias. As duas cultivares reduziram as trocas gasosas por meio da redução na condutância estomática, induzindo uma menor fotossíntese líquida. Entretanto, a cultivar tolerante apresentou maior atividade de PEPcase e maiores níveis de proteínas de carboxilação, PEPcase e Rubisco. Essas características aliadas a maior quenching não-fotoquímico dessa cultivar podem ser a resposta para a maior tolerância à déficit hídrico quando em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado após sete meses do plantio, utilizando gemas fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas-IAC/SP, em condições de casa de vegetação, com temperatura média de 30 °C (± 4 °C) e umidade relativa média de 60% ($\pm 10\%$), em vasos de 10L preenchidos com mistura de areia lavada:húmus:vermiculita na mesma proporção (v/v 1:1:1). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial 3 x 2, sendo três tratamentos de irrigação (Controle – irrigado diariamente; Estresse – suspensão da irrigação durante cinco dias; e Recuperação – reirrigado após a suspensão da irrigação durante três dias) e duas cultivares (IACSP 94-2094 e IACSP 95-5000), com quatro repetições cada. A fluorescência da clorofila foi utilizada como parâmetro para definição da duração do experimento, ou seja, quando houve diferença significativa na eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) entre os tratamentos controle e estresse, a suspensão de irrigação terminou e iniciou-se a recuperação. Dessa forma, a suspensão de irrigação durou cinco dias e a recuperação, três.

Durante o período experimental, foram avaliados diariamente às 10h a assimilação de CO₂ atmosférico e as trocas gasosas (transpiração, condutância estomática e pressão parcial de CO₂). Também foram avaliadas simultaneamente parâmetros de fluorescência da clorofila (eficiência quântica potencial e atual do fotossistema II, quenching fotoquímico e não fotoquímico e a taxa aparente de transporte de elétrons). Essas avaliações foram realizadas em todas as plantas do experimento na folha +1, na porção mediana da folha e evitando a nervura central.

Ao final do experimento, foram avaliados o conteúdo relativo de água e o dano de membrana e realizado a medição do potencial hídrico às 4h (pré-dawn) e ao meio-dia. Também foram calculadas a eficiência do uso da água e a eficiência de carboxilação. Na

mesma folha utilizada nas medidas de trocas gasosas e fluorescência, foram realizadas as atividades de carboxilase do fosfoenolpiruvato (PEPcase) e carboxilase:oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco), e ainda, eletroforeses em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), para observação de modificações no perfil de proteínas.

Trocas Gasosas e Fluorescência da Clorofila *a*

As trocas gasosas foram avaliadas nos experimentos com um analisador de gás no infravermelho – IRGA modelo LI-6400 XT (LI-COR Inc., CA, EUA). Foram avaliadas a fotossíntese líquida (P_N), a condutância estomática (g_s), a transpiração foliar (E) e a pressão parcial de CO_2 (C_i). Para tanto, foi utilizada a parte mediana da folha +1, evitando-se a nervura central. Nestas medidas, a temperatura da câmara foi mantida a 28 °C, a concentração de CO_2 externa (referência) mantida a 380 ppm e a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativa (PPFD) na folha mantida em 1000 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A eficiência do uso de água foi calculada pela relação entre a fotossíntese líquida e a transpiração foliar (P_N/E) e a eficiência de carboxilação foi verificada a partir da relação entre fotossíntese líquida e pressão parcial de CO_2 (P_N/C_i).

Com um fluorômetro acoplado (LI-6400-40), foram avaliados parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Essas medidas foram realizadas por meio do método de pulso de saturação (SCHREIBER et al., 1994) nas folhas iluminadas e adaptadas ao escuro por 30 min. A intensidade e duração do pulso de saturação de luz foram de 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 0,7 s, respectivamente. A luz azul foi mantida em 10% da radiação aplicada para maximizar a abertura estomática. Os seguintes parâmetros foram medidos: eficiência quântica máxima do fotossistema II [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$], eficiência quântica efetiva do fotossistema II [$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$], quenching fotoquímico [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$], quenching não fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] e fluxo atual de fótons para o fotossistema II [$ETR = (\Delta F/F_m' \times \text{PPFD} \times 0,4 \times 0,85)$]. Para ETR, 0,4 foi usado como fração da energia de excitação distribuída para o PSII e 0,85 como fração de luz absorvida pelas folhas. O F_m e F_o são, respectivamente, fluorescência máxima e mínima de folhas adaptadas ao escuro e, F_m' e F_s , são respectivamente, fluorescência máxima e em equilíbrio dinâmico e F_o' é a fluorescência mínima após iluminação com vermelho-distante de folhas expostas a luz (GENTY et al., 1989; SCHREIBER et al., 1994; SILVA et al., 2010).

Conteúdo Relativo de Água e Dano de Membrana

Para avaliar o conteúdo relativo de água (CRA), por ocasião das coletas, das folhas utilizadas na medição de trocas gasosas foram retirados 10 discos de mesmo diâmetro e pesados para obtenção da massa fresca (MF). Em seguida, estes discos foram imersos em 20 mL de água deionizada por 24h a 4°C no escuro. Logo após, foram novamente pesados para obtenção da massa túrgida (PT). Depois, estes discos foram levados à estufa a 65 °C com circulação forçada de ar por três dias e pesados para obtenção do peso seco. Em seguida, o CRA foi obtido a partir da fórmula $CRA = [(PF-PS)/(PT-PS)] \times 100$.

O dano de membrana (DM) foi estimado a partir do vazamento de eletrólitos utilizando seis discos obtidos da mesma folha utilizada para a medida do RWC. Esses discos foram imersos em 10 mL de água deionizada por 8h. Em seguida, a condutividade elétrica dessa suspensão foi medida (C1). Logo após, o material foi levado a banho-maria a 100 °C durante 1 h e, após resfriamento, foi feita nova medição de condutividade elétrica (C2). Para obtenção do DM, as medidas foram inseridas na fórmula $DM = (C1/C2) \times 100$.

Determinação do Potencial hídrico

O potencial hídrico foliar foi medido utilizando uma câmara de pressão de Scholander. Foi utilizada a mesma folha onde foram realizadas as medidas com o IRGA/Fluorômetro. A folha foi cortada próxima a base, inserida na câmara com a nervura central para o lado externo e uma pressão era aplicada na câmara. Uma vez que era verificada a saída de água no xilema, o valor da pressão era anotado. Esse valor representa a tensão da água no xilema e é considerado como o potencial hídrico foliar, apresentado em MPa. Essa medição foi realizada às 4h da manhã (pré-dawn), para equilíbrio entre o potencial do solo e da planta, e ao meio-dia, para medição quando houver o máximo estresse e eliminar possíveis interferentes ambientais.

Atividades de PEPcase e Rubisco

No final do experimento, a folha +2 foi coletada e, descartando pontas e a nervura central, imediatamente congelada em nitrogênio líquido e levada para freezer a -80 °C. A extração de proteínas foi realizada com amostras de folhas maceradas usando um almofariz e pistilo a frio na proporção de 200 mg para 1 mL de meio de extração. Após centrifugação a 14000g durante 30 min, o sobrenadante foi recolhido e utilizado nas atividades enzimáticas.

Todas as etapas de extração foram realizadas a baixas temperaturas (4 °C). A quantidade de proteína no extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Para a atividade de PEPcase, o meio de extração foi EDTA 2 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1 mM e PVP-40 1% dissolvidos em Tris-HCl 50 mM pH 7,8. A atividade de PEPcase foi medida após a extinção de NADH pela diminuição da absorbância em 340 nm utilizando o coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,23$) (DEGL'INNOCENTI et al., 2002) com pequenas modificações. A atividade foi realizada em um meio de reação mantido a 32°C contendo NaHCO_3 10 mM, NADH 0,3 mM, MgCl_2 5 mM e MDH 33nkat (1 U.A. = 16,67 nkat) dissolvidos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8 e extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de fosfoenolpiruvato (PEP) 20 mM. A atividade enzimática foi medida pelo decaimento da absorbância a 340 nm até 300 s.

Para a atividade de Rubisco, o meio de extração foi de bicina-NaOH 100 mM pH 8,0, ditioneitol (DTT) 1 mM, albumina de soro bovino (BSA) 0,1%, polivinilpirrolidona (PVP-40) 1,5%, ácido n-amino capróico 3,3 mM, benzamida 0,7 mM, MgCl_2 20 mM, EDTA 1 mM e NaHCO_3 150 mM. A atividade foi medida espectrofotometricamente pela taxa de oxidação de NADH a 340 nm (SAGE et al, 1988; REID et al, 1997). O tampão de ensaio foi mantido a 25°C e consistia em bicina 100 mM pH 8,0, KHCO_3 25 mM, MgCl_2 20 mM, ATP 3,5 mM, fosfocreatina 5 mM, 80 nkat de desidrogenase G-3-P, 80 nkat de 3-fosfoglicerato fosfoquinase, 80 nkat de creatina fosfoquinase e NADH 0,25 mM. Para atividade inicial, o extrato foi adicionado em 900 μL de tampão de ensaio e a reação foi iniciada com a adição de RuBP 0,5 mM. Para atividade total, o extrato foi incubado a 25°C com o meio de reação por 15 minutos, para a ativação completa de Rubisco na solução de ensaio. Em seguida, foi adicionada RuBP 0,5 mM para início da reação. Nas duas situações, o decaimento da absorbância do NADH foi acompanhado por 300s a 340 nm e o cálculo da concentração foi realizado por meio do coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,23$).

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)

As proteínas foram extraídas a partir de amostras de folhas com um tampão de extração fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 contendo ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) 1 mM e separadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Quantidades iguais de proteína (30 μg) foram adicionadas em cada poço. A porcentagem do gel principal foi de 10%, corado com

Coomassie Brilliant Blue ao final da corrida. A partir do marcador molecular, as proteínas de interesse foram identificadas.

Análise Estatística

O desenho experimental continha três tratamentos (Controle, estresse e recuperação) e duas cultivares (IACSP 94-2094 e IACSP 95-5000) com quatro repetições, perfazendo um grau de liberdade de 23 ($n=24$). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

RESULTADOS

A assimilação de CO_2 atmosférico foi fortemente afetada pelos tratamentos hídricos aplicados. No entanto, não houve diferenças entre as cultivares. Nas condições de estresse, a fotossíntese líquida (P_N) foi reduzida 93% e 95%, nas cultivares tolerante e sensível, respectivamente. Após a recuperação, a cultivar tolerante tinha atingido o nível do controle enquanto que a sensível foi 12% menor do que as plantas irrigadas (Fig. 1A). A transpiração foliar (E) foi semelhante ao comportamento de P_N , com forte redução (86% e 85% na cultivar tolerante e sensível, respectivamente). Na recuperação, ambas as cultivares foram completamente recuperadas ao nível do controle (Fig. 1B). Provavelmente, as mudanças na E foram uma consequência da condutância estomática (g_s), que foi reduzida de 90% e 87% na cultivar tolerante e sensível, respectivamente, com recuperação completa após reirrigação (Fig. 1C). Com as reduções do P_N , concentração intercelular de CO_2 foi aumentada cerca de 3,25-e 5,6 vezes na cultivar tolerante e sensível, respectivamente, e, ao mesmo modo, foram reduzidos ao nível de controle após a recuperação (Figura 1D).

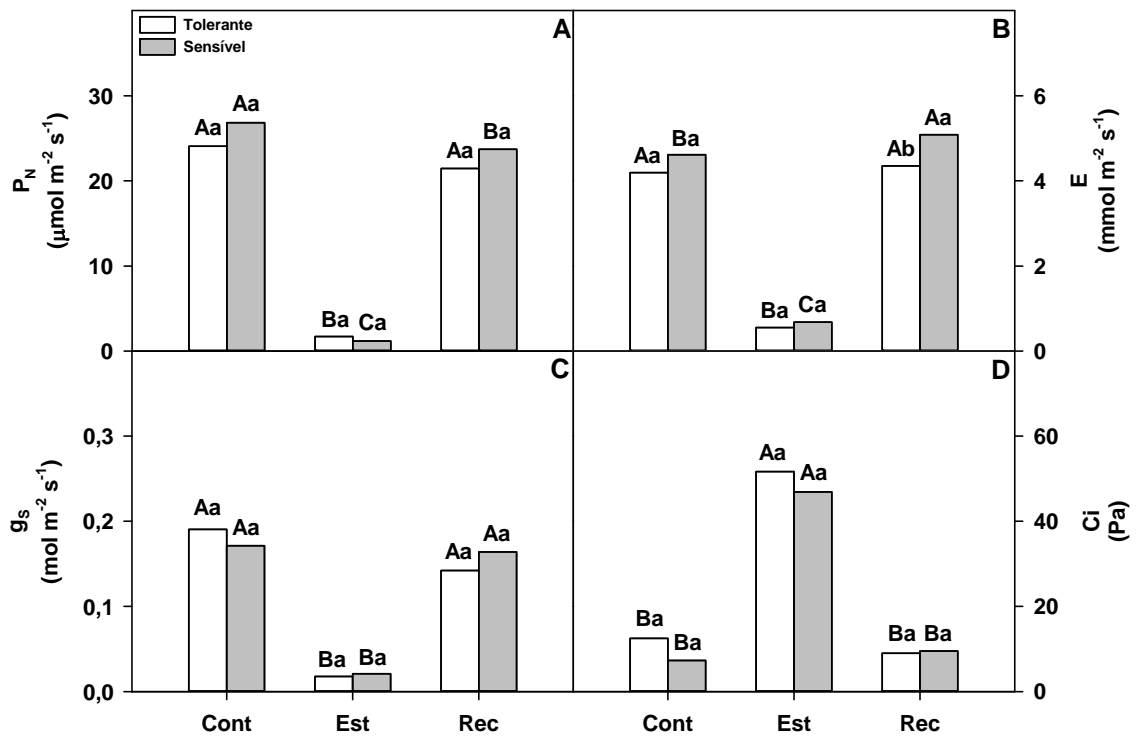


Figura 1: Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (B), condutância estomática (C) e pressão parcial de CO_2 (D) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0,05$).

O uso eficiente da água e a eficiência de carboxilação foram fortemente afetadas pelo estresse aplicado. As cultivares apresentaram diferenças marcantes nas respostas ao estresse. A eficiência de utilização de água foi reduzida em 50% no estresse na cultivar tolerante enquanto a sensível foi diminuída em 75%. Além disso, a cultivar tolerante retornou ao nível de controle no tratamento de recuperação, mas as plantas sensíveis mostraram apenas uma recuperação parcial (Fig. 2A). Nas condições irrigadas, a eficiência de carboxilação foi duas vezes mais elevada na cultivar sensível. Quando o estresse foi aplicado, ambas as cultivares perderam essa eficiência completamente. No entanto, na recuperação, a cultivar tolerante retornou para o nível de controle, enquanto a sensível foi recuperada apenas 70% a partir da eficiência da carboxilação inicial (Fig. 2B).

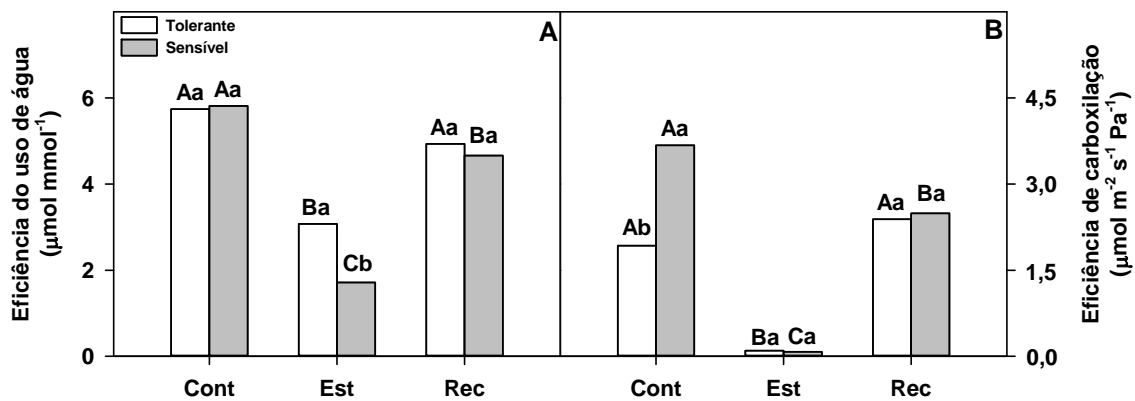


Figura 2: Eficiência do uso da água (A) e eficiência de carboxilação (B) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0,05$).

A eficiência quântica efetiva do PSII ($\Delta F/F_m'$) não mostrou diferença entre as cultivares em condições irrigadas. No tratamento de estresse, ambas as cultivares estudadas foram reduzidas cerca de 80%. Na recuperação, a cultivar tolerante recuperou quase três vezes do que o estresse, enquanto que a sensível recuperou 5 vezes as das plantas estressadas (Fig. 3A). A eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) não apresentaram diferenças nas plantas irrigadas, mas no tratamento de estresse, a cultivar tolerante foi bem menor do que sensível. Ambos os tratamentos recuperaram os valores de F_v/F_m após reirrigação (Fig. 3B).

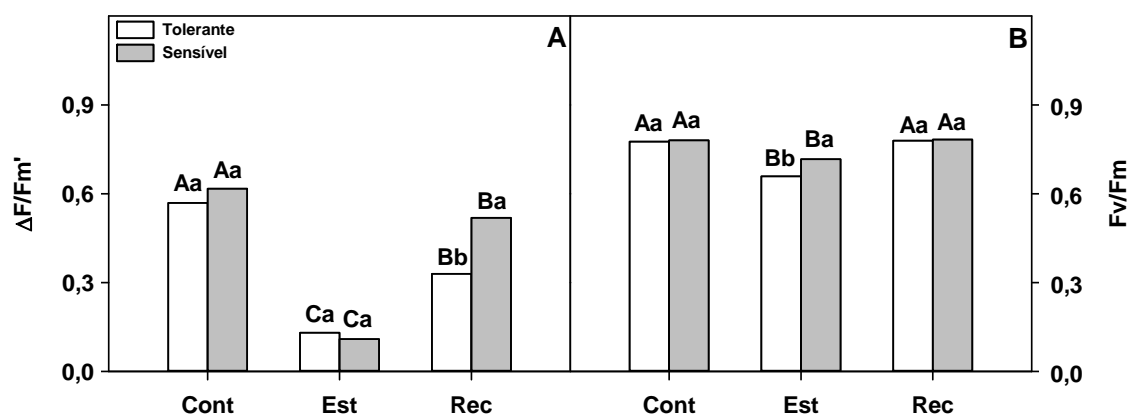


Figura 3: Eficiência quântica efetiva (A) e potencial (B) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0,05$).

As cultivares não apresentaram diferenças na fotoquímica (qP) entre os tratamentos controle e estresse, reduzindo cerca de 50%. Na recuperação, a cultivar tolerante recuperou apenas 50% enquanto que as plantas sensíveis recuperaram-se completamente (Fig. 4A). No quenching não-fotoquímico (NPQ), ambas as cultivares aumentaram cerca de 4 vezes no tratamento de estresse. No entanto, após a recuperação, apenas a cultivar tolerante manteve um elevado nível de NPQ (2,102), enquanto que a cultivar sensível voltou aos valores de controle (Fig. 4B). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi semelhante entre as cultivares nas condições de controle e estresse. Por outro lado, a cultivar tolerante recuperou somente 50% do controle, enquanto a um sensível recuperou quase 82% (Fig. 4C).

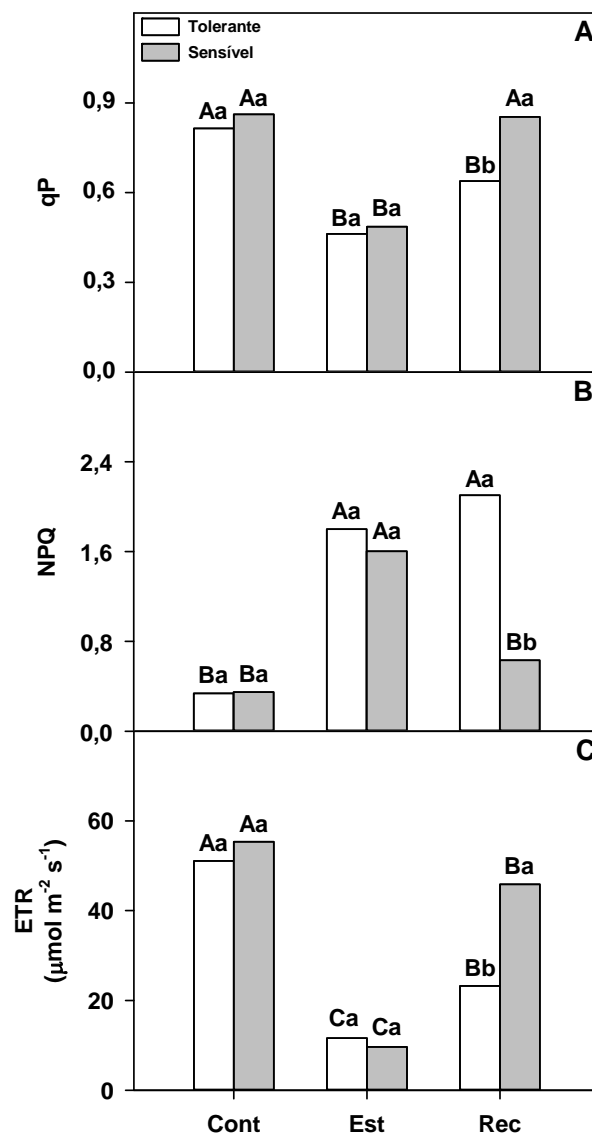


Figura 4: Quenching fotoquímico (A) e não-fotoquímico (B) e taxa de transporte de elétrons (C) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0,05$).

O teor relativo de água (RWC) apresentou pequenas alterações de forma semelhante entre as duas cultivares. O RWC nas plantas estressadas diminuiu cerca de 17% e, na recuperação, aumentou aos níveis do controle. O vazamento de eletrólitos em folhas não apresentou variações entre as cultivares e, entre os tratamentos, as mudanças foram pequenas, embora estatisticamente diferentes. O potencial de água (Ψ_w) pré-dawn na cultivar tolerante foi reduzido em 90% no tratamento de estresse, mas, na recuperação, ele voltou para o valor de controle. Em contrapartida, a cultivar sensível apresentou menor redução no tratamento de estresse, mas não se recuperou após reirrigação, mantendo o mesmo valor das plantas estressadas. Quando o Ψ_w foi medido ao meio-dia, os resultados foram semelhantes, mas com valores mais negativos (Tabela 1).

Tabela 1: Conteúdo relativo de água (CRA), dano de membrana (DM), potencial hídrico pré-dawn e ao meio-dia de plantas irrigadas (controle), suspensão de irrigação por cinco dias (estresse) e recuperação em condições irrigadas por três dias (recuperação).

		CRA	DM	Ψ_w pre-dawn	Ψ_w ao 12h
		(%)	(%)	(-MPa)	(-MPa)
	Controle	94,1 Aa	10,9 Aa	0,11 Aa	0,45 Aa
Tolerante	Estresse	76,1 Ba	13,4 Ba	0,93 Bb	1,43 Bb
	Recuperação	85,9 ABa	12,4 ABa	0,21 Aa	0,60 Aa
	Controle	90,4 Aa	10,7 Aa	0,09 Aa	0,48 Aa
Sensível	Estresse	77,3 Ba	13,9 Ba	0,50 Ba	0,92 Ba
	Recuperação	90,3 Aa	12,5 ABa	0,45 Bb	0,78 Bb

*Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0,05$).

A atividade de PEPcase foi mais responsiva ao estresse na cultivar tolerante. Nesta cultivar, o estresse aplicado aumentou a atividade dessa enzima em 40% e retornou ao nível normal após a reirrigação. Na cultivar sensível, não houve alterações na atividade de PEPcase durante stress e recuperação (Fig. 5A). A atividade de Rubisco foi alterada diferentemente de acordo com a cultivar. A tolerante não apresentou redução significativa no estresse mas, na recuperação, houve uma redução de 60%. No entanto, a cultivar sensível teve redução na atividade de Rubisco de 40% e, na recuperação, houve completa retomada da atividade ao nível do controle (Fig. 5B). O estado de ativação não foi alterado na cultivar tolerante com o estresse mas, na recuperação, houve uma redução de 70%. A cultivar sensível aumentou o

estado de ativação da Rubisco em 100%. Na recuperação houve uma redução de 30% em relação ao momento do estresse mas, ainda 20% maior que o controle (Fig. 5C).

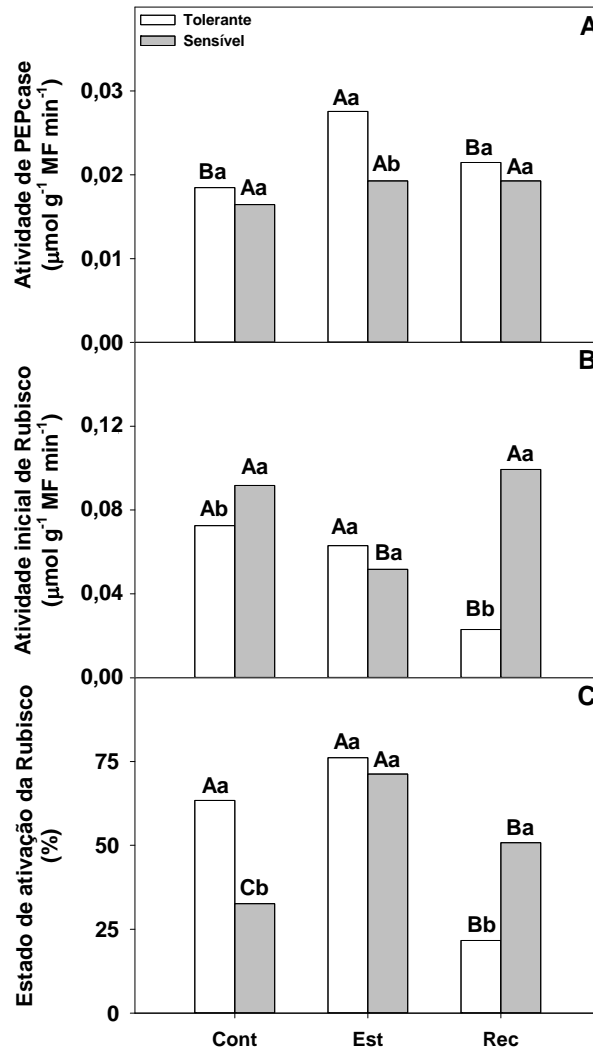


Figura 5: Atividade de PEPcase (A), atividade inicial de Rubisco (B) e estado de ativação de Rubisco (C) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos dentro da mesma cultivar e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares dentro das mesmas condições de irrigação pelo teste t ($P < 0,05$).

Na SDS-PAGE, a cultivar tolerante aumentou o conteúdo de proteína de PEPcase cerca de 140% no tratamento do estresse. Na recuperação, este incremento foi reduzido em 41%, mas ainda 46% maior do que o nível de controle. O cultivar sensível alterou o conteúdo de PEPcase no tratamento de estresse cerca de 72%, mas diminuiu para a recuperação do nível inicial (Fig. 6). O conteúdo de Rubisco apresentou um padrão similar. Na cultivar tolerante, houve aumento de 168% no tratamento do estresse, mas reduzida para o nível de controle na

recuperação. O tratamento de estresse alterou na cultivar sensível (39%), mas sobre a recuperação, houve uma diminuição do conteúdo de tratamento de controle (Fig. 7).

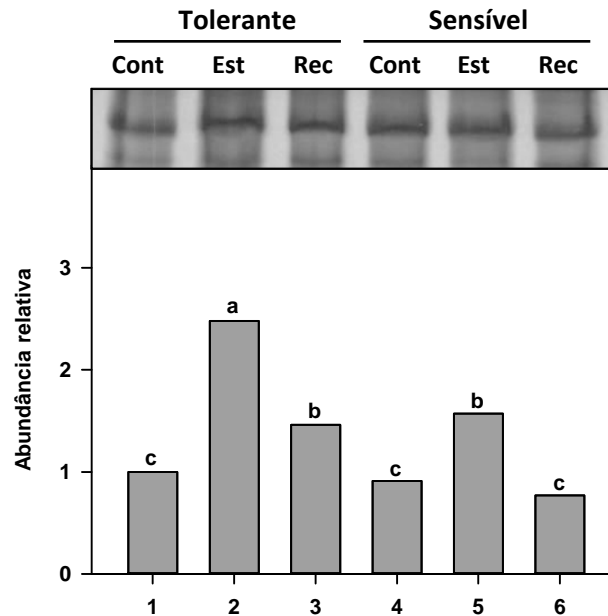


Figura 6: SDS-PAGE e abundância relativa de PEPcase (100 kDa) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre teste de Tukey ($P < 0,05$).

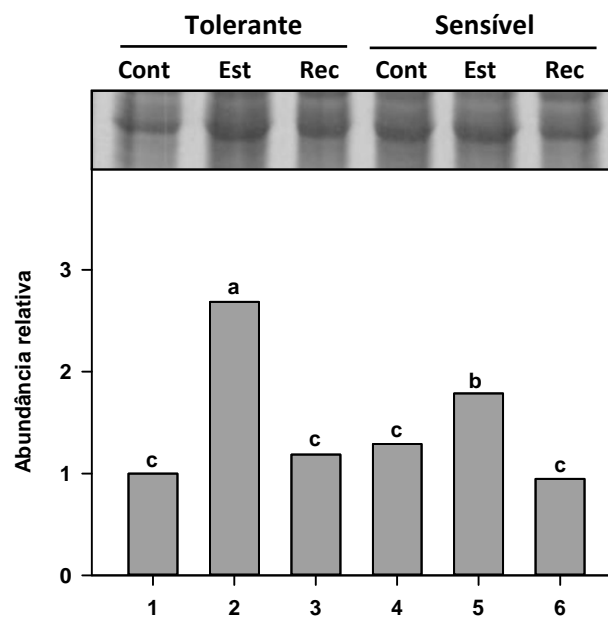


Figura 7: SDS-PAGE e abundância relativa de Rubisco (52 kDa) de plantas irrigadas (Cont), suspensão de irrigação por cinco dias (Est) e recuperação em condições irrigadas por três dias (Rec). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre teste de Tukey ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Durante o período de estresse hídrico, as plantas adotam medidas para enfrentar ou tolerar o estresse que lhes é aplicado. Uma alternativa bastante utilizada é a redução na condutância estomática, causada pelo fechamento total ou parcial dos estômatos. Segundo Inmam-Bamber e Smith (2005), a cana-de-açúcar tem uma regulação muito forte dos estômatos e essa regulação tem grande efeito quando as plantas são submetidas a um estresse causado por déficit hídrico. Na figura 1, observa-se que as duas cultivares utilizadas neste estudo reduziram a abertura estomática a níveis muito baixos, alterando toda a dinâmica de trocas gasosas, em consequência da severidade dos tratamentos. Como resultado, a transpiração foliar e a assimilação de CO₂ atmosférico reduziram da mesma forma. Entretanto, houve um acúmulo na concentração de CO₂ intercelular (Fig. 1D), que, segundo Lawlor e Cornic, (2002), é um indício que a fotossíntese está sendo limitada não só por fatores estomáticos, como também por fatores bioquímicos. Essas modificações resultaram em alterações na eficiência do uso da água, onde a cultivar tolerante mostrou maior eficiência, entretanto, a eficiência de carboxilação foi reduzida para níveis quase nulos nas duas cultivares.

A redução na fotossíntese causada pelo fechamento estomático refletiu em parâmetros fotoquímicos como a eficiência quântica efetiva do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) (Fig. 3A), que mede a eficiência atual na passagem de elétrons para a fotossíntese. Mas essa modificação não foi suficiente para causar grandes problemas nos fotossistemas, como mostrado pela pequena redução no valor da eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (Fig. 3B). Esse último parâmetro mostra a integridade das membranas dos tilacóides e das proteínas que formam os fotossistemas, indicando que o estresse aplicado não foi suficiente para causar uma fotoinibição crônica e sim, no máximo, uma fotoinibição dinâmica e reversível (MURCHIE e NYIOGI, 2011). O qP e ETR tiveram comportamento semelhante ao $\Delta F/F_m'$ indicando que houve realmente uma inibição reversível onde, quando recuperadas, as plantas mostraram retomada nesses parâmetros, sendo mais evidenciada na cultivar sensível. Entretanto, o NPQ teve um expressivo aumento nas plantas estressadas e somente na cultivar tolerante, manteve-se elevado ainda na recuperação. Segundo Lawlor e Tezara (2009), o NPQ é uma forma de dissipação de energia muito utilizada quando tem-se energia em excesso que não está sendo aproveitada fotoquimicamente e é um recurso muito utilizado em plantas sob estresse.

Como resultado do estresse hídrico aplicado, as duas cultivares tiveram o conteúdo relativo de água reduzido, mas não houve aumento tão expressivo no dano de membrana indicado pelo vazamento de eletrólitos. Entretanto, o potencial hídrico das folhas, tanto pré-dawn quanto ao meio-dia, teve redução bastante significativa durante o período de estresse, principalmente na cultivar tolerante. Isso é uma indicação da capacidade desta cultivar continuar absorvendo água mesmo durante o período de deficiência hídrica (Tab. 1). A redução do potencial hídrico ao meio-dia em cana-de-açúcar é conhecida, causada principalmente pelo aumento na transpiração (INMAN-BAMBER et al., 2005). Aliado a isso, algumas espécies consideradas tolerantes usam a redução do potencial hídrico como forma de continuar absorvendo água em solos com potencial hídrico mais negativo.

Durante o experimento, houve grandes modificações nas enzimas responsáveis pela captura e assimilação do CO₂ atmosférico para posterior utilização na síntese de carboidratos. Em se tratar de uma planta C₄, a PEPcase é a primeira enzima a absorver o CO₂ da atmosfera e transformá-lo em um composto estável para o transporte dentro do mesófilo. As duas cultivares mostraram comportamento diferenciado no que diz respeito a atividade dessa enzima, onde a cultivar tolerante aumentou a atividade durante o período de déficit hídrico e a cultivar sensível não mostrou qualquer alteração (Fig. 6A). Esse padrão também foi observado na expressão dessa proteína. A cultivar tolerante teve um aumento substancial na quantidade dessa proteína enquanto que a cultivar sensível aumentou a expressão de PEPcase de maneira menos expressiva (Fig. 7). Gong et al., (2011) encontraram padrão semelhante na atividade de PEPcase em relação à deficiência hídrica e explicaram que o aumento na atividade dessa enzima pode ser uma resposta a redução estomática causada pela restrição hídrica.

Quando o CO₂ chega às células da bainha do feixe, ele é utilizado pela Rubisco para carboxilar a ribulose-1,5-bifosfato. Na cultivar tolerante, não houve qualquer alteração na atividade ou no estado de ativação da Rubisco entre os tratamentos controle e estresse mas, na recuperação, esses dois parâmetros foram bastante reduzidos (Fig. 6B-C). Entretanto, houve um aumento na expressão dessa proteína, provavelmente como um mecanismo compensatório para a baixa atividade. A cultivar sensível mostrou uma redução na atividade de Rubisco durante o período de estresse apesar do estado de ativação ter sido aumentado. Geralmente, a Rubisco de plantas C₄ apresenta tolerância com relação à deficiência hídrica, mantendo sua atividade em níveis iniciais de estresse, como relatado por Carmo-Silva et al., (2010), que

verificaram manutenção da atividade de Rubisco em três espécies C4 sob deficiência hídrica moderada.

Dessa forma, conclui-se que as duas cultivares tem respostas diferenciadas após o período de estresse e recuperação a qual foram expostas. A cultivar considerada tolerante tem maior eficiência do uso de água durante o estresse e maior NPQ na recuperação, o que lhe conferiria maior proteção na fase fotoquímica da fotossíntese. A diferença no potencial hídrico e massa seca provêm maior capacidade de tolerar períodos de déficit hídrico. Por fim, a maior atividade e expressão de PEPcase, lhe permite atravessar períodos de estresse momentâneos de maneira mais eficaz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARMO-SILVA, A. E.; KEYS, A. J.; ANDRALOJC, P. J.; POWERS, S. J.; ARRABAÇA, M. C.; PARRY, M. A. J. Rubisco activities, properties, and regulation in three different C4 grasses under drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2355–2366, 2010.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551-560. 2009.
- DEGL'INNOCENTI, E.; GUIDI, L.; SOLDATINI, G. F. Effect of chronic O₃ fumigation on the activity of some Calvin cycle enzymes in two poplar clones. **Photosynthetica**, v. 40, p. 121-126, 2002.
- FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; BOTA, J.; GALMES, J.; HENKLE, M.; MARTINEZ-CANELLAS. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. **New Phytologist**, v. 172, p. 73–82. 2006.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 990, p. 87–92, 1989.
- GONG, C.; BAI, J.; DENG, J.; WANG, G.; LIU, X. Leaf anatomy and photosynthetic carbon metabolic characteristics in *Phragmites communis* in different soil water availability. **Plant Ecology**, v. 212, p. 675–687. 2011.
- INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185–202, 2005.
- IPCC. 2007. Technical Summary. In: Solomon S, Qin D, Manning M et al., eds. Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275–294, 2002.
- LAWLOR, D. W.; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, v. 103, p.561–579, 2009.

LOPES, M. S.; ARAUS, J. L.; VAN HEERDEN, P. D. R.; FOYER, C. H. Enhancing drought tolerance in C4 crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 3135–3153, 2011.

MCDOWELL, N.; POCKMAN, W. T.; ALLEN, C. D.; BRESHEARS, D. D.; COBB, N.; KOLB, T.; PLAUT, .; SPERRY, J.; WEST, A.; WILLIAMS, D. G.; YEPEZ, E. A. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? **New Phytologist**, v. 178, p. 719–739. 2008.

MURCHIE, E. H.; NIYOGI, K. K. Manipulation of Photoprotection to Improve Plant Photosynthesis. **Plant physiology**, v. 155, p. 86–92. 2011.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; KHAN, S.; LEA, P. J.; KEYS, A. J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, v. 89, p. 833–839. 2002.

REID, C. D.; TISSUE, D. T.; FISCUS, E. L.; STRAIN, B. R. Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 398-404, 1997.

SAGE, R. E.; SHARKEY, T D.; SEEMANN, J. R. The in vivo response of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation state and the pool sizes of photosynthetic metabolites to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris* L. **Planta**, v. 174, p. 407-416, 1988.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E. D.; CALDWELL, M. M. (Eds.). **Ecophysiology of photosynthesis**. Berlin: Springer, 1994. (Ecological Studies, 100) p. 49-70.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, v. 74, p. 1130-1137, 2010.

CAPÍTULO 3

*EFFICIENT ANTIOXIDATIVE PROTECTION AND PHOTOSYSTEM II PRESERVATION
DURING WATER DEFICIT CONTRIBUTE TO CO₂ ASSIMILATION AFTER RECOVERY IN
SUGARCANE*

Efficient Antioxidative Protection and Photosystem II Preservation during Water Deficit Contribute to CO₂ Assimilation after Recovery in Sugarcane

Marcio de Oliveira Martins¹; Milton Costa Lima Neto¹; Ana Karla Moreira Lobo¹; Aurenívia Bonifácio de Lima¹; Joaquim Albenisio Gomes da Silveira^{1*}

¹Laboratory of Metabolism of Plants, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará.

* Correspondent Author

ABSTRACT

The objective of this study was physiologically evaluate sugarcane plants exposed to water stress and note possible oxidative stress triggered. For this, three months old sugarcane plants were submitted to drought periods, five days each and recovery, with reirrigation for three days. Relative water content was slightly reduced and completely recovered but there was a strong reduction in total dry mass and a biomass allocation to roots after stress and recovery. The water stress applied caused remarkable reductions in stomatal conductance, leaf transpiration and net photosynthesis, with partial recovery, reflecting in a lower water use efficiency and carboxylation efficiency. V_{pmax} and V_{pr} , obtained from P_N/C_i curve, were also reduced after stress but it were recovered after reirrigation, as well as α , P_{Nmax} and Θ , obtained from $PPFD/P_N$ curve. The photochemical parameters show transient modifications, completely reversed by the recovery. The activities of PEPcase and Rubisco did not show modifications but there was increase in relative amount of PEPcase and Rubisco activation state. The water stress applied increased the lipid peroxidation and H₂O₂ content, inducing increases in activities in SOD and APX, mainly Fe-SOD and thylakoidal APX. At last, sugars profile was altered in the stressed plants, with increases of hexoses and decrease of starch content in leaves. Taken together, the results indicate that the water stress applied was enough to trigger antioxidative defense in sugarcane in order to protect against ROS.

Keywords: *Saccharum* spp.; Water deficit; Photosynthesis; Oxidative stress.

INTRODUCTION

The low water availability is the main environmental factor limiting plant growth and yield worldwide (Flexas et al., 2006). Crops are frequently subject to periods of soil and atmospheric water deficits during their life cycles. Furthermore, the provided changes to climatic scenario around the world at the next years suggest an increase in the extension and the number of the arid and semi-arid areas (IPCC, 2007) and understanding how crops respond to drought (even moderate) can play a central role to improve the plant performance and the water use efficiency (Chaves et al., 2009).

Plant responses to water deficit are quite complex. Drought can induce reduction in stomatal conductance, which is considered an early reaction and an efficient way to reduce water loss in water deficit condition but, in the other hand, it limits CO₂ diffusion into the leaves to the photosynthesis (Lawlor and Cornic, 2002). McDowell et al. (2008) reported that lower carbon assimilation caused by drought-induced stomatal closure might results in a carbon starvation as a consequence from a continued metabolic demand of carbohydrates and this process can be exacerbated when the water stress is combined with other stress (e.g. heat). Under water stress, the activity and/or the amount of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) can be altered, resulting in lower efficiency in the photosynthesis (Parry et al., 2002).

The impairment in the biochemical phase of photosynthesis can indirectly result in production of oxygen reactive species (ROS) as a consequence of energy excess at the photosynthetic electron transport (PET) chain (Foyer and Shigeoka, 2011). Plants exposed to water deficit can reduce the stomatal aperture, reducing the assimilation of CO₂ atmospheric. This way, there is an energy excess generated by the constant light absorbed by the leaves. The resulting over-reduction of photosystems II and I (PSII e PSI) can be capable to induce ROS generation (e. g. superoxide radical, hydrogen peroxide etc.) (Apel and Hirt, 2004). These ROS can damage the cellular compartments and need to be removed in a short-term period. In plants there are enzymatic and non-enzymatic systems to scavenge these harmful ROS (Apel and Hirt, 2004). Superoxide dismutase (SOD - E.C. 1.15.1.1) and ascorbate peroxidase (APX - E.C. 1.11.1.1) are the first line of defense in extinguish superoxide radical (O₂^{•-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂), respectively (Foyer and Shigeoka, 2011). In the chloroplasts, Fe-SOD and Cu/Zn-SOD are the two isoforms which convert superoxide to hydrogen peroxide (Alscher et al., 2002). In sequence, stromal (sAPX) and thylakoidal

(tAPX) APX remove the H_2O_2 using ascorbate as an electron donor producing H_2O (Shigeoka et al., 2002).

In C4 plants, it is believed that oxidative stress does not have a great importance in cellular metabolism. Unlike the C3, C4 plants have some characteristics which become more resistance to water stress and more water use efficiency, such as a well-defined bundle sheath, two carboxylation pathways involving phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPcase) in Rubisco in bundle sheaths cells and negligible photorespiration (Sage, 1994; Nayyar and Gupta, 2006). In despite of these characteristics, some works have invested in studying the antioxidative defense in C4 plants. Uzilday et al. (2012) compared two species, one C3 and another C4, under drought conditions and verified the same antioxidative response at a similar level. Surprisingly, Stepien and Globus (2005) founded a better antioxidative apparatus in maize, a C4 species, compared with wheat, a C3 species, when submitted to salt stress. Although the remarkable results, antioxidative responses to abiotic stresses in C4 species remains unclear, due to the lack of studies concerning that subject.

In this study, we exposed sugarcane plants to moderate water stress and verified the CO_2 assimilation, photochemistry and possible antioxidative responses. The plants exhibited a finely coordinated system to avoid oxidative damage caused by ROS formation. These responses were more pronounced in chloroplasts, evidenced by Fe-SOD and tAPX isoforms, presented in these organelles. Thus, we can conclude, that in despite of sugarcane to be a C4 plant, there is an active and organized system to avoid oxidative stress under water stress.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material and Experimental Design

Plants were obtained from gems sent by Agronomic Institute of Campinas/IAC (Campinas, SP, Brazil). It was utilized a cultivar considered drought tolerant (cv. IACSP 94-2094). The gems were sterilized with sodium hypochlorite 2% and germinated in plastic pots filled with a mixture of washed sand and vermiculite (1:1 v/v). During the germination and seedling establishing, the pots were daily moistened with distilled water. After one month, the plants were transferred to 8 L pots (one plant per pot) filled with a mixture of washed sand:vermiculite:humus (1:1:1 v/v). In these pots, plants were daily irrigated with distilled water and weekly irrigated with half-strength Hoagland's solution (Hoagland and Arnon,

1950). Plants were grown at greenhouse conditions with temperature and humidity varying between 28/35°C and 40/80%, respectively and maximum active photosynthetically photons flux density (PPFD) of 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

After three months of growth, the following treatments were applied: Control, daily irrigated; Stress, irrigated to field capacity each five days and; Recovery, plants from stress treatment returned to control conditions for three days. Each treatment contained four replicates. The experimental period was 18 days, with three irrigation cycles of five days in the stress treatment (pots irrigated up to field capacity each five days), followed by three days in the recovery treatment.

Gas Exchange Measurements and Chlorophyll *a* Fluorescence

Each irrigation cycle, gas exchange and chlorophyll fluorescence were measured immediately before the water addition in the substrate using an Infra-red gas analyzer – IRGA LI-6400XT (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). The net photosynthesis (P_N), stomatal conductance (g_s), intercellular CO_2 partial pressure (C_i) and leaf transpiration (E) were measured with photosynthetic photons flux density (PPFD) at 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature at 28 °C and humidity at 60%. Water use efficiency (WUE) was calculated as a ratio of P_N to E (Vu and Allen Jr., 2009) and carboxylation efficiency (CE) was designed as a ratio of P_N to C_i (Sato et al., 2010). At the same time, with the fluorescence chamber (LI-6400-40) coupled to the IRGA, the following chlorophyll parameters were measured: actual quantum efficiency of photosystem II [$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$], photochemical quenching [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$] and apparent electron transport rate [$ETR = ((F_m' - F_s)/F_m') \times \text{PPFD} \times 0.4 \times 0.85$]. After 30 min in dark conditions, potential quantum efficiency of photosystem II [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$] and the non-photochemical quenching [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] were measured. The relative excess energy (EXC) was calculated as $EXC = [(F_v/F_m) - (\Delta F/F_m')]/(F_v/F_m)$. For evaluation of ETR, 0.4 was used as the fraction of excitation energy distributed to PSII in C4 plants and 0.84 as the fraction of incoming light absorbed by the leaves and PPFD is the photosynthetic photon flux density. The F_m and F_o are, respectively, maximum and minimum fluorescence of dark-adapted leaves; F_m' and F_s are, respectively, maximum and steady-state fluorescence in the light-adapted state, and F_o' is minimum fluorescence after far-red illumination of the previously light exposed leaves (Genty et al., 1989; Schreiber et al., 1994; Silva et al., 2010).

The P_N/C_i and P_N/PPFD curves were performed at the end of the experiment in each treatment utilizing the same leaf used on the other measurements. The P_N/C_i curve was

performed varying the CO₂ concentration at the chamber (400, 300, 200, 100, 50, 0, 400, 400, 600, 800 and 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) and was realized with 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of PPFD. The P_N/PPFD curve was performed varying the PPFD from 2000 to 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and CO₂ was used at atmospheric partial pressure (38 Pa). The temperature at the IRGA chamber was maintained in 28 °C. The generated parameters from fitting curves were V_{pmax}, carboxylation maximum rate of PEPcase and V_{pr}, regeneration maximum rate of PEP from P_N/Ci curve and α , quantum efficiency, P_{Nmax}, maximum photosynthesis and Θ , light curve convexity, from the P_N/PPFD curve (Lieth and Reynolds, 1987; von Caemmerer and Furbank, 1999)

PEPcase and Rubisco Activities

At the end of the experiment, the +2 leaf was collected, discarding tips, central vein, immediately frozen in liquid nitrogen and taken to -80 °C freezer. Protein extraction was carried out by retting of leaf samples in a fine powder using a mortar and a pestle with cold extraction medium (1 mM EDTA in 100 mM K-phosphate buffer pH 7.0). After centrifugation at 14000g for 30 min, supernatant was collected and utilized in the enzymatic activities. All extraction stages were carried out at low temperatures (4 °C). Protein amount at the extract was determined by Bradford's method (1976).

The PEPcase activity was determined using an extract described above. PEPcase activity was measured following the NADH extinction by the decrease in absorbance in 340 nm (Degl'innocenti et al., 2002) with minor modifications. PEPcase activity was assayed in a reaction mixture containing 10 mM NaHCO₃, 0.3 mM NADH, 5 mM MgCl₂ and 33 nkat MDH dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 and enzyme extract. The reaction was started by addition of 20 mM phosphoenolpyruvate (PEP). The enzyme activity was measured by the decrease in absorbance at 340 nm over 300 s.

The Rubisco activity was determined using the same extract used to PEPcase activity. Rubisco activity was measured spectrophotometrically by rate of NADH oxidation at 340 nm (Sage et al., 1988; Reid et al., 1997). The assay buffer consisted by 100 mM bicine pH 8.0, 25 mM KHCO₃, 20 mM MgCl₂, 3.5 mM ATP, 5 mM phosphocreatine, 80 nkat G-3-P dehydrogenase, 80 nkat 3-phosphoglyceric phosphokinase, 80 nkat creatine phosphokinase and 0.25 mM NADH. To initial activity, the extract was added in 900 μL of assay buffer and the reaction was initiated with addition of 0.5 mM RuBP. To total activity, extract was incubated at 25 °C in the assay buffer by 15 minutes, to complete activation of Rubisco in the assay solution. Thus, it was additioned 0.5 mM RuBP to start the reaction. In both situations,

absorbance reduction of NADH was followed by 300s in 340 nm and the calculation was performed using the molar absorption coefficient ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.23$).

SDS-PAGE and Western Blot

Proteins were extracted from fresh leaf samples with a 100 mM K-phosphate extraction buffer pH 7.0 containing 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and separated by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Equal amounts of protein (30 μg) were added in each lane. The percentage of main gel was 10%, with two identical gels in each running. The first gel was stained with coomassie brilliant blue and the second one was used to western blot. Denatured proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane (Towbin et al., 1979). Polypeptide detection was performed using specific antibodies against PEPcase and Rubisco proteins (obtained from Agrisera). Firstly, membranes were blocked overnight with 2% non-fat milk in saline Tris-HCl buffer (100 mM Tris-HCl pH, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20). Then, the membrane with transferred proteins was incubated with the primary antibody for 3h. After the incubation with the primary antibody, secondary antibodies, conjugated with phosphatase alkaline, were incubated with the membrane for 1h. Finally, the protein was revealed by the addition of a BCIP/NBT solution. All the procedure was realized according manufacturer's manual (Agrisera).

Lipid Peroxidation and H₂O₂ Content

Lipid peroxidation was measured using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in accordance with Cakmak and Horst (1991), with minor modifications described by Rosa et al. (2010). The TBARS concentration was calculated using the absorption coefficient of 155 mM cm^{-1} and the results expressed as nmol malondialdehyde (MDA)-TBA g fresh weight (FW)⁻¹. Hydrogen peroxide content was measured by the titanium tetrachloride method according to Brennan and Frenkel (1977). Fresh leaf samples were macerated with liquid N₂ in presence of 5% (w/v) TCA, centrifuged at 12000g (4 °C) and the supernatant was immediately used for H₂O₂ determination. The measurement was performed after reaction of the titanium reagent with hydrogen peroxide and formation of the hydroperoxide-titanium complex. The hydrogen peroxide content was calculated from a standard curve and measured at 415 nm. The results were expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$.

Activities of Antioxidant Enzymes

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) and catalase (CAT, 1.11.1.6) activities were measured. SOD zymogram was made in order to separate the SOD isoforms presented in the plant cell and APX activity was also performed in thylakoidal fraction (tAPX).

The SOD activity was determined by inhibition of blue formazane production by means of the NBT photoreduction. SOD activity was measured by adding leaf extract to a mixture containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM L-methionine, 2 μ M riboflavin, and 75 μ M *p*-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) in the dark. The reaction was carried out under illumination (30 μ mol photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 25 °C for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm (Giannopolotis and Ries, 1977). One SOD activity unit (U) was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50% of the NBT photoreduction and the activity was expressed as U $\text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Beauchamp and Fridovich, 1971).

The APX activity was measured following the ascorbate oxidation (Nakano and Asada 1981) with minor modifications. APX activity was assayed in a reaction mixture containing 0.5 mM ascorbate and 0.1 mM EDTA dissolved in 100 mM K-phosphate buffer pH 7.0 and enzyme extract. The reaction was started by adding of 30 mM H_2O_2 . The enzyme activity was measured by the decrease in absorbance at 290 nm, 25 °C over 300 s. the APX activity was expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$.

The CAT activity was measured following the oxidation of H_2O_2 at 240 nm. CAT activity was determined after the reaction of the enzymatic crude extract in the presence of 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0) containing 20 mM H_2O_2 . The reaction took place at 30°C, with monitoring of the absorbance at 240 nm over 300 s (Havir and Mchale, 1987). The CAT activity was calculated according to the molar extinction coefficient of H_2O_2 (36 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) and expressed $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$.

SOD zymogram was performed with the same extract used to electrophoresis and western blotting. Initially proteins were realized by PAGE in native conditions. Equal amounts of protein (10 μ g) were added in each lane. After separation, SOD activity was performed according Beauchamp and Fridovich's method (1971). The gels were incubated with 2 mM NBT by 15 min, washed with distilled water and incubated again, in light absence,

in 100 mM K-potassium buffer pH 7.0 containing 28 mM TEMED and 10% riboflavin by 15 min. After this incubation the gels were washed again and exposed to light ($30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) to induce the photochemical reaction. The differentiation of SOD isoforms was performed with previous incubation of gel in 100 mM K-phosphate buffer by 15 min containing 5 mM H_2O_2 or 2 mM KCN (Martinez et al., 2001). Cu/Zn-SOD and Fe-SOD are sensitive to H_2O_2 , Fe-SOD is resistant to KCN and Mn-SOD is resistant to both (Scandalios, 1993). After previous incubation, gels were revealed conform described above.

The fractionation of the thylakoids was performed according method described by Danna et al. (2003). To tAPX activity, fresh leaves were frozen in liquid N_2 , ground, and mixed with 50 mM MES/KOH buffer pH 7.0 containing 40 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1% (w/v) PVP-40 and 1 mM ascorbate. 0.1% (v/v) Triton X-100 was added to the mixture, and tubes were gently mixed for 15 min at 4°C . For thylakoid isolation, leaf homogenates were centrifuged at 3000g for 10 min, the pellet was washed and centrifuged again at 3000g for 10 min, and tAPX activity was measured in the pellet without addition of Triton X-100. The tAPX activity followed the same methodology used to APX activity described by Nakano and Asada (1981) with minor modifications. At the same extract, proteins and chlorophyll content were measured by the method of Bradford (1976) and Lichtentaler and Wellburn (1983), respectively.

Carbohydrates, Relative Water Content and Biomass Determination

Glucose (glu), fructose (fru) and sucrose (suc) were determined utilizing enzymatic method coupled to NADH formation monitored at 340 nm (Sigma's test kits, Sigma-Aldrich). For the extraction, lyophilized material (leaves or stalks) with distilled water were taken to 70°C to extract glu, or 60°C to extract fru and suc, for 1h. Starch from leaves was extracted using 30% (v/v) HClO_4 after extraction of soluble sugars with a solution of methanol, chloroform and water (12:5:3 v/v). After extraction, starch was determined using method described by Dubois et al. (1956). At the end of the experiment, plants were collected and the material was taken to a 60°C to reach constant weight. The relative water content (RWC) was performed, from the relation among fresh, turgid and dry mass of leaves according to Silveira et al. (2009). The dry matter of plants, divided in leaves, stalk and roots, was utilized to calculate the biomass allocation, utilizing total mass as 100% (Martins et al., 2010).

Statistical Analysis

The experimental design contained three treatments (Control, Stress and Recovery), with four replicates, performing a degree of freedom of 11 (n=12). The data were analyzed by ANOVA and the differences were verified by Tukey's Test ($P<0.05$).

RESULTS

The relative water content in leaves was slightly reduced with moderate water stress leading to a strong reduction on dry matter and biomass allocation to roots

Sugarcane plants were submitted to a moderate water stress and recovery. In order to verify how this stress altered the plant development, relative water content (RWC) in leaves, dry matter and biomass allocation were determined at the end of the experiment (Table 1). The RWC was slightly changed in stress treatment, showing a small reduction comparing to the well-watered plants but, after rehydration, the RWC showed strong capacity to recuperation. Biomass allocation showed a remarkable decrease in leaf dry matter (29% in stress and 46% in recovery). Stalk dry matter remained at the control level in the stress and was slightly reduced after recovery (22%). In order to compensate the losses in leaves, biomass was allocated to roots, increased in 36% in recovery (Table 1).

Table 1: Relative water content (RWC) in leaves and biomass allocation of leaves, stalk and roots from well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments in leaves, stalks or roots by Tukey test ($P<0.05$).

		Control	Stress	Recovery
RWC in leaves (%)		83.1 B	77.3 C	94.3 A
Biomass allocation (%)	Leaves	18.1 A	12.9 B	9.9 C
	Stalk	37.4 A	37.7 A	29.6B
	Roots	44.5 B	49.4 B	60.5 A

Moderate water deficit causes strong stomatal closure reflecting lower photosynthesis but with partial recovery when plants were re-watered

In order to examine the consequences of water deficit in the atmospheric CO₂ assimilation and gas exchange, these parameters were evaluated at the end of the three

watering cycles and after the recovery (Fig. 1). Net photosynthesis (P_N) was equally reduced among the three periods, with reduction of 95% (Fig. 1A). This reduction in P_N can be partially explained by the stomatal conductance (g_s) which was reduced in 90% (Fig. 1B). The reduction in g_s affected the leaf transpiration (E), reduced in 82% at the third period (Fig. 1D). The CO_2 partial pressure (C_i) was 2.6-fold higher in stressed plants (Fig. 1C). All parameters were partially retrieved at the re-watered plants. P_N was 10-fold higher, g_s was 3.5-fold higher and E was 2.3-fold higher comparing with the stressed plants (Fig. 1A, B and D). When the P_N was partially retrieved, the C_i was consumed, showing reduction of 90% when compared with the stressed plants and 67% comparing with the control conditions (Fig. 1C).

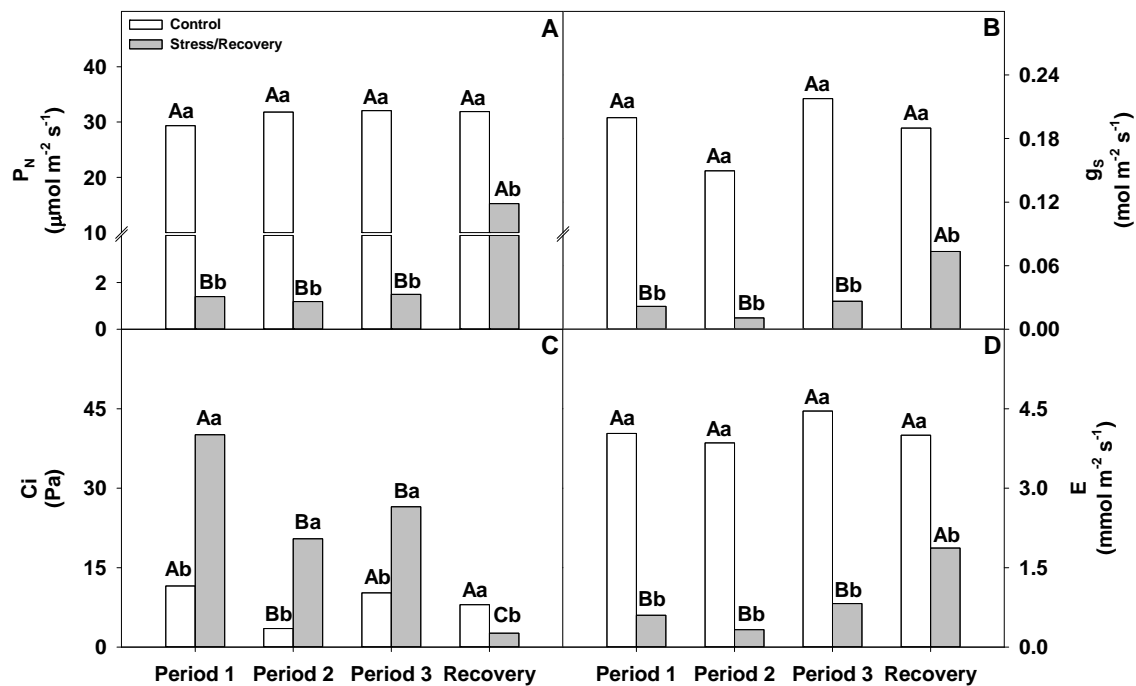


Figure 1: Net photosynthesis (A), stomatal conductance (B), intercellular CO_2 partial pressure (C) and leaf transpiration (D) in well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery for 18 days. Each period has five days and the recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P < 0.05$).

These modifications in the CO_2 assimilation and gas exchange reflect changes in the water use efficiency (WUE) and the carboxylation efficiency (CE) (Fig. 2). The WUE was reduced by 75% at the final period of water deficit (Fig. 2A). The CE was strongly reduced (98%) at the third period of stress, reflecting the reduction in P_N and increase in C_i (Fig. 2B). At the recovery, both WUE and CE were retrieved to the control level, as a consequence of the increase in E and decrease in C_i , respectively (Fig. 2).

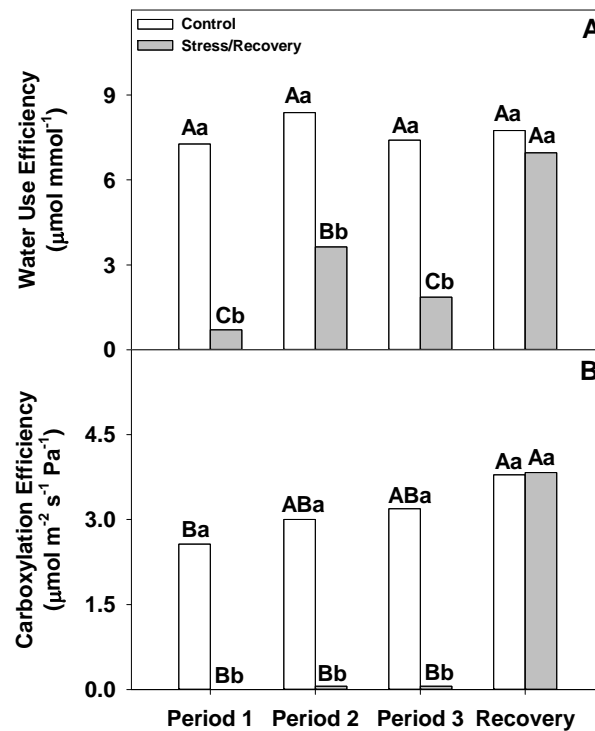


Figure 2: Water use efficiency (A) and carboxylation efficiency (B) in well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery by 18 days. Each period has five days and recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P < 0.05$).

The parameters estimated from P_N/C_i and $P_N/PPFD$ response curves were changed with moderate water stress but this alteration was completely reversible

The maximum carboxylation rate of PEPcase (V_{pmax}) and maximum rate of regeneration of phosphoenolpyruvate (V_{pr}) were strongly reduced at the moderate water stress (70% and 37%, respectively). The quantum efficiency (α) obtained from $P_N/PPFD$ curve was 58% higher comparing with the control plants but the convexity (Θ) was 53% lower in stressed plants and the maximum photosynthetic rate (P_{Nmax}) obtained from $P_N/PPFD$ curve was reduced in 65%. In the recovery treatment, all the parameters returned to control levels (Table 2).

Table 2: Parameters obtained from P_N/C_i and $P_N/PPFD$ fitting curves. V_{pmax} , carboxylation maximum rate of PEPcase and V_{pr} , regeneration maximum rate of PEP from P_N/C_i curve and α , quantum efficiency, P_{Nmax} , maximum photosynthesis and light curve convexity (θ) from the $P_N/PPFD$ curve. Uppercase letters compares among water treatments by Tukey test ($P<0.05$).

	Control	Stress	Recovery
V_{pmax} ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	304 A	90 B	287 A
V_{pr} ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	33.1 A	20.6 B	30.5 A
α (Quantum efficiency)	0.068 B	0.108 A	0.061 B
P_{Nmax} ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	48.6 A	16.7 B	43.3 A
θ (Curve convexity)	0.829 A	0.388 B	0.897 A

Sugarcane leaves showed transient modifications in photochemistry triggered by moderate water deficit

Photochemistry of sugarcane leaves was modified under moderate water deficit but this effect was completely reversed when the stressed plants were recovered (Fig. 3). Actual quantum efficiency of photosystem II ($\Delta F/F_m'$) was reduced with the water deficit in all measurement periods (73%). Nevertheless, at recovery, $\Delta F/F_m'$ was higher than control (35%) (Fig. 3A). However, the potential quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) did not show differences during the water deficit treatment (Fig. 3B).

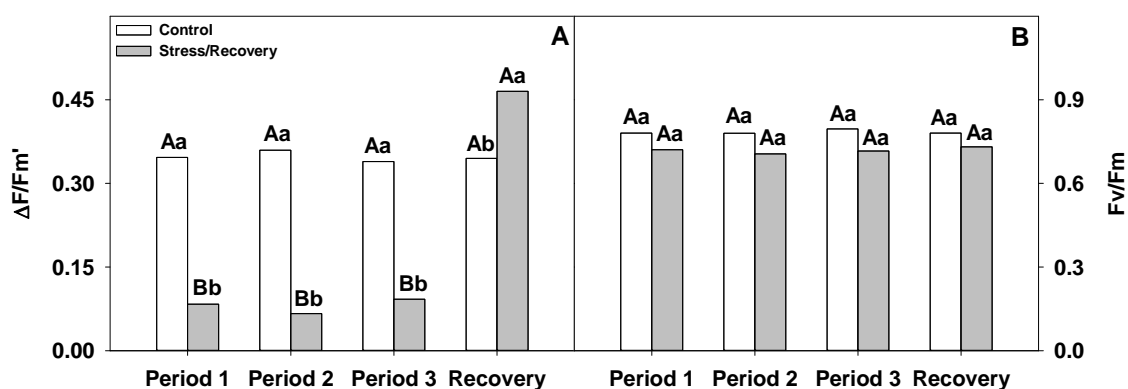


Figure 3: Actual quantum efficiency of photosystem II (A) and potential quantum efficiency of photosystem II (B) of well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery by 18 days. Each period has five days and recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P<0.05$).

Photochemical quenching (qP) was reduced in 43% in stressed plants compared with control (Fig. 4A). Non-photochemical quenching was 3-fold higher in stressed plants than in

control plants (Fig. 4B). As qP, the apparent electron transport rate (ETR) strongly decreased (73%) in stressed plants (Fig. 4C). The relative excess energy (EXC) was increased in 53% in stressed plants (Fig. 4D). At recovery treatment, qP and ETR increased 1.8- and 4-fold, respectively, exceeding the control plants in 40% to qP and 32% to ETR. NPQ was reduced to the control level when the plants were recovered. As a reflex of the $\Delta F/F_m'$, qP and ETR, EXC decreased at the recovery treatment reaching a value 36% lower than control (Fig. 4).

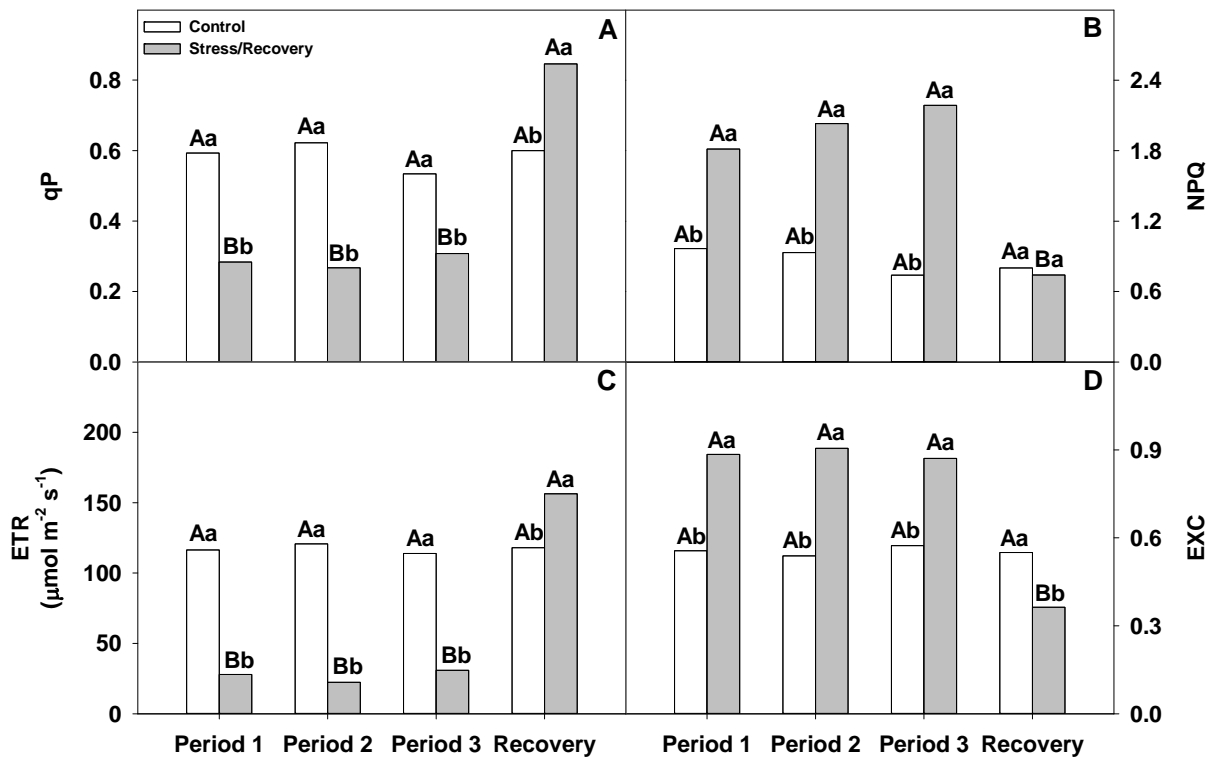


Figure 4: Photochemical quenching (A), non-photochemical quenching (B), apparent electron transport rate (C) and relative excess energy (D) of photosystem II of well-watered plants (control) and plants subjected to stress/recovery by 18 days. Each period has five days and recovery comprises three days. Capital letters compares among periods and recovery and lowercase letters compares water treatment in each period/recovery by Tukey test ($P < 0.05$).

PEPcase amount and Rubisco activation state were altered with moderate water stress but there were no changes in their activities

PEPcase activity did not change in plants exposed to stress and recovered, maintaining the same activity of the well-watered plants (Fig. 5A). However, the relative amount of PEPcase verified by the western blot was strongly modified. In the stressed plants, relative amount of PEPcase increased 69%, and, after recovery, there was an increase of 136% in

relation to stress treatment and 300% in relation to control (Fig. 5B). Rubisco activity was not altered among treatments but the activation state of this enzyme was increased in 49% in the stress treatment, returning to the initial level after recovery (Fig. 6A-B). Relative amount of Rubisco protein did not show changes among the treatments (Fig. 6C).

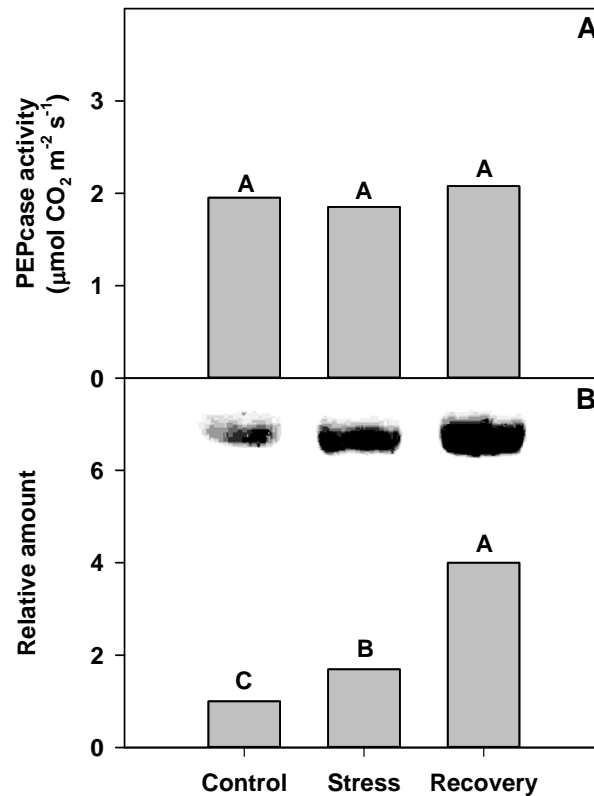


Figure 5: PEPcase initial activity (A) and band density of western blot (B) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Inset in (B) shows typical bands from an original blot of PEPcase protein, loaded on an equal protein basis. Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P < 0.05$).

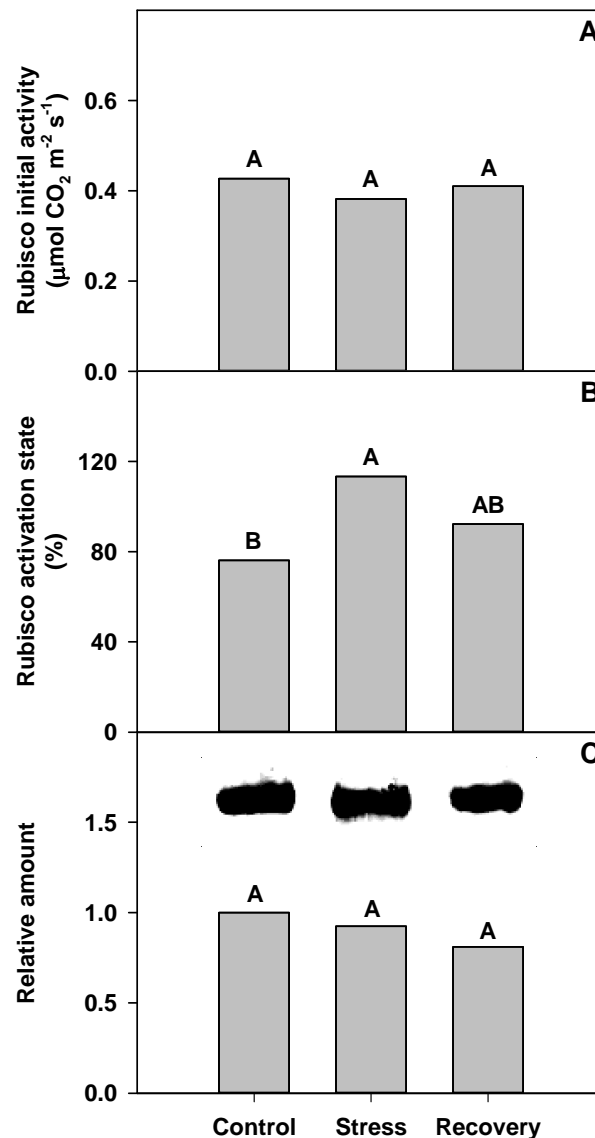


Figure 6: Rubisco initial activity (A), activation state (B) and band density of western blot (C) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Inset in (C) shows typical bands from an original blot of PEPcase protein, loaded on an equal protein basis. Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P < 0.05$).

Moderate water stress increased the lipid peroxidation and H₂O₂ content sufficiently to trigger the first line of oxidative defense

The lipid peroxidation, verified by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level, increased 38% in the stressed plants leaves and the hydrogen peroxide content was increased in 34% at the stress treatment. After recovery, lipid peroxidation and hydrogen peroxide content were maintained (Fig. 7). The SOD activity showed a slight increase (12%)

at the stress treatment but with no statistical difference ($P < 0.05$). At the recovery, the SOD activity did not change in the stressed plants but there was a significant increase after recovery (28%) compared with well-watered plants (Fig. 8A). These modifications in SOD activity can be attributed to Fe-SOD isoforms, verified by the SOD zymogram (Fig. 8B). The zymogram shows three isoforms of Fe-SOD. The first two showed increase in the stress treatment, with a slight decrease after recovery. The last one was higher in stressed plants and this increase was maintained at recovery (Fig. 8B). The APX activity increased by 23% in the stress treatment and it was maintained after recovery (Fig. 9A). This increase probably occurred due to the higher increase in the thylakoidal APX activity (142%) in stressed plants. After recovery, there was a slight decrease but it was 75% higher than the well-watered plants (Fig. 9B).

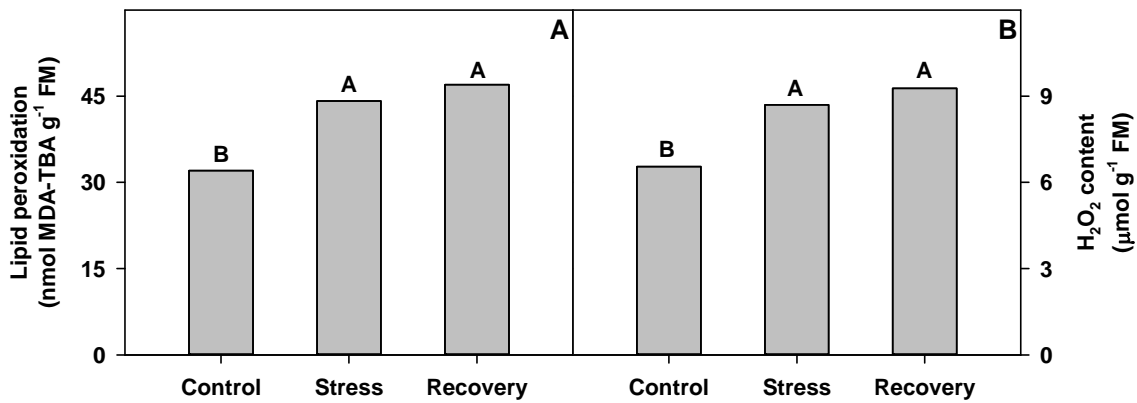


Figure 7: Lipid peroxidation (A) and H₂O₂ content (B) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P < 0.05$).

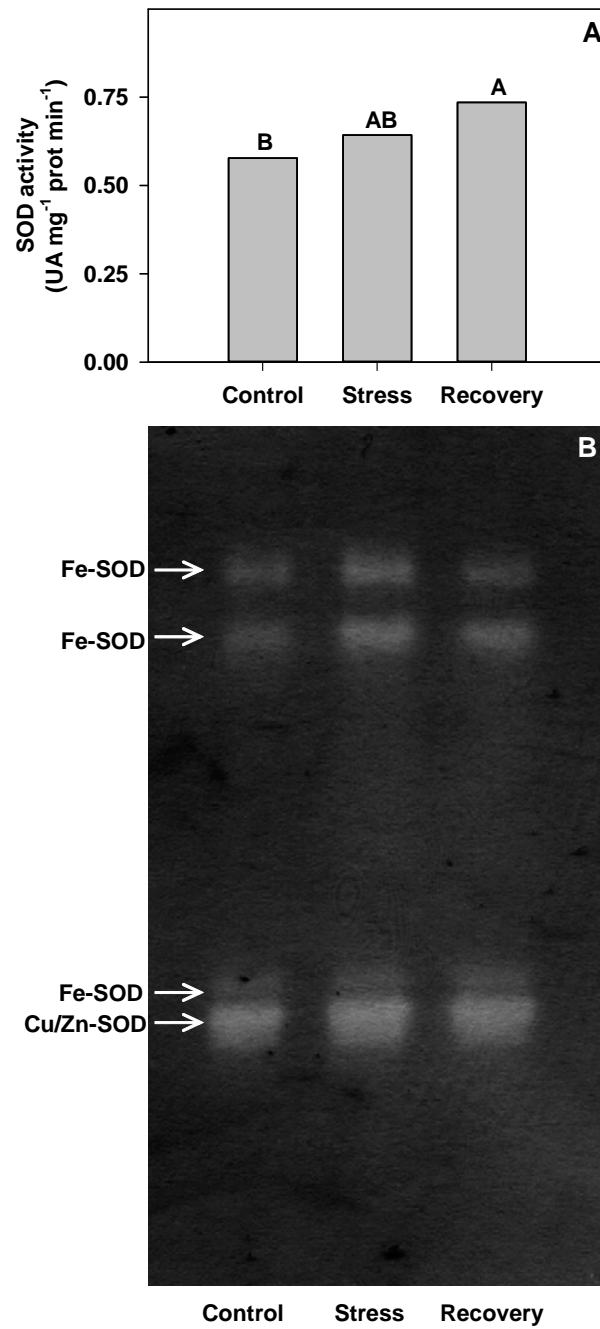


Figure 8: SOD activity (A) and SOD zymogram (B) from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P < 0.05$).

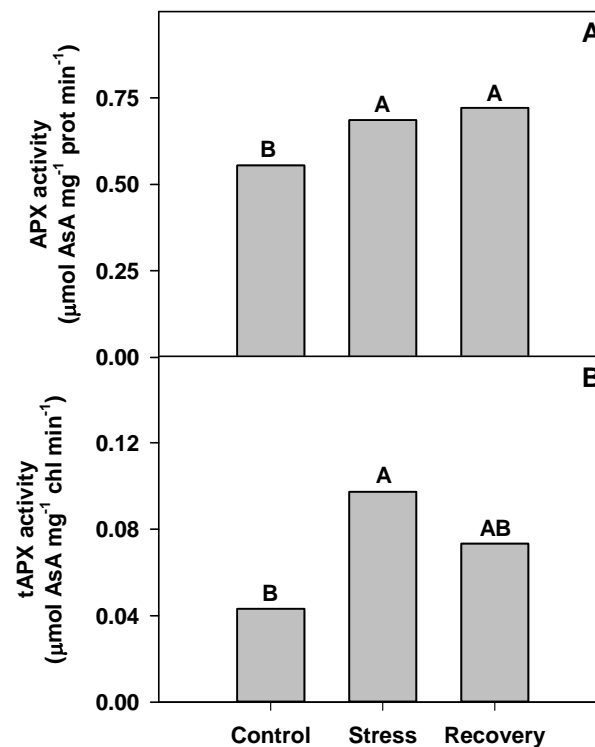


Figure 9: Total APX (A) and tAPX (B) activities from leaves of well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments by Tukey test ($P < 0.05$).

Starch degradation caused by the water stress increases the glucose and fructose levels but there were no changes in sucrose content

Glucose and fructose contents in leaves were increased at stress treatments, 261% and 161%, respectively. After recovery, these levels returned to the control baseline. In the stalk, glucose contents were not altered within the treatments. In relation to fructose content in the stalk, water stress increased 34% comparing with control, with a slight reduction (12%) in the recovery (Fig. 10A-B). Sucrose contents in leaves and stalk did not change among the treatments (Fig 10C). Starch content in stressed leaves was 15% lower than the control plants but, in the recovery, it was 42% higher than the stress treatment and 20% higher comparing with control (Fig. 10D).

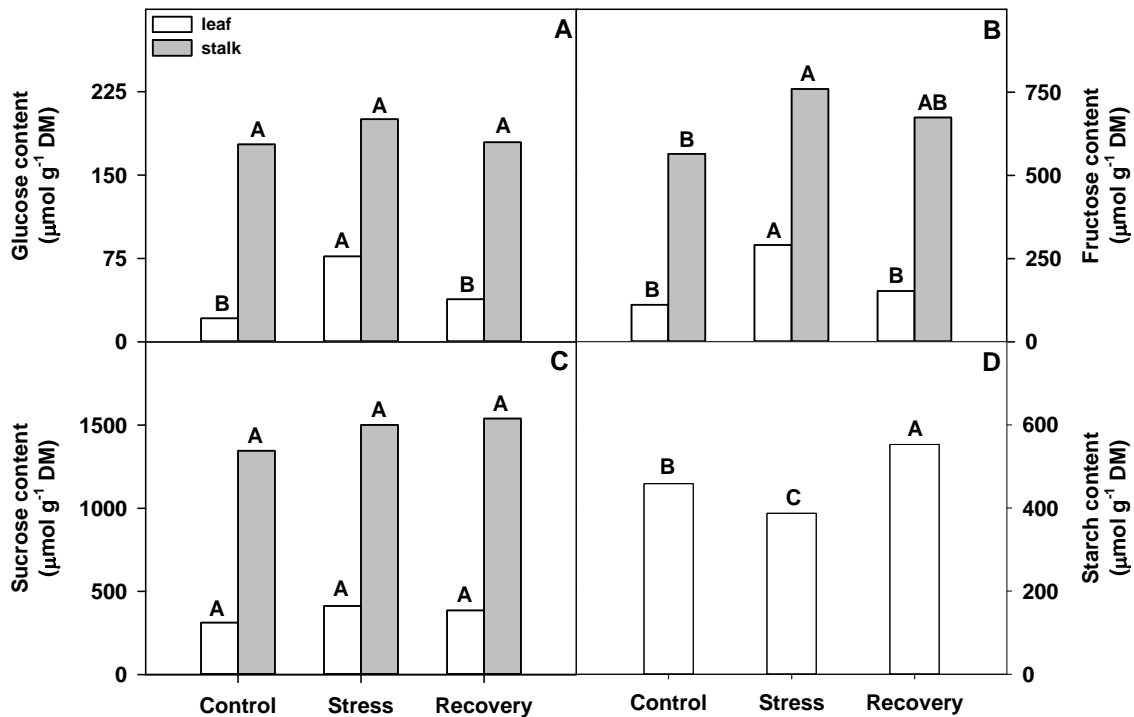


Figure 10: Glucose (A), fructose (B) and sucrose (C) contents of leaves and stalks and starch content (D) in leaves from well-watered plants (control), subjected to three cycles of irrigation (stress) or from stress treatment recovered to the control conditions for three days (recovery). Capital letters compares among water treatments in leaves or stalks by Tukey test ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Sugarcane plants (*Saccharum* spp.) from cultivar IACSP 94-2094, considered tolerant to water stress, were submitted to three drought periods of five days each, and recovery, with plants fully irrigated by three days as control treatment. Plants subjected to water deficiency showed reduction in RWC but after the recovery period, the plants were completely retrieved. Dry mass of the whole plant was strongly reduced after stress and more after recovery period. These alterations can be explained by the strong process of biomass allocation. It is evident there was a loss of shoot mass to increase root growth. Smith et al. (2005) report that the sugarcane root system has great importance in the development regulation and, when under stress, roots are preserved and utilized in the tolerance of the stress period.

Plants subjected to drought periods strongly reduced the stomatal conductance, which led to a reduction of the CO_2 assimilation and leaf transpiration. As a consequence, there was an increase in intercellular CO_2 partial pressure. After recovery period, all of these parameters

were partially retrieved (Fig. 1). Stomatal control is a remarkable characteristic of sugarcane leaves, reducing the water losses over water deficit periods (Inmam-Bamber and Smith, 2005). In despite of water economy generated by stomatal closure, the water use efficiency was also affected, mainly by the photosynthesis reduction. Nevertheless, carboxylation efficiency was reduced to zero, but with complete recovery after reirrigation (Fig. 2).

In regard to the parameters obtained from the P_N/C_i and $P_N/PPFD$ curves, we verified that the stress period was enough to cause modifications in process related to CO_2 absorption and light utilization. The V_{pmax} , utilized to verify the maximum velocity of carboxylation from PEPcase, was greatly reduced after stress periods, as the V_{pr} , which represents the regeneration velocity of phosphoenolpiruvate (PEP). However, after recovery, those parameters obtained from curves came back to control levels, indicating that modifications were reversible. These results in V_{pmax} and V_{pr} reflect the reductions in stomatal aperture, which reduces the CO_2 in the mesophyll and bundle-sheath cells. Thus, rates of PEPcase turnover and PEP regeneration were reduced by the lower substrate availability. Parameters from $P_N/PPFD$ curve showed the same pattern, with reversible reduction in the stress period, except the quantum efficiency (α), which increased during the stress but returning to the control level after recovery. This trend could be explained by the P_{Nmax} reduction and the probable preservation of the photosynthetic apparatus. This way, it is necessary low energy originated from photochemical phase to saturate the Calvin cycle, improving the quantum efficiency represented by α (Table 2).

The applied moderate water stress momentarily altered the photochemical parameters of chlorophyll *a*. This set of results shows losses in photochemical efficiency in plants under stress in order to protect the photochemical apparatus, but this reduction was transient, due to reversibility of these parameters when the plants returned to the irrigated conditions (Fig. 3 and 4). Murata et al. (2007) comment which these modifications in plants subject to stresses, e.g. water deficit, are part of a response to avoid photoinhibition and permanent damage in the photochemical structure.

Concerning to the responsible enzymes to assimilate carbon, it was observed that the moderate water stress was able to induce more expression of PEPcase and, in addition, an even higher expression after recovery, but with no changes in the activity (Fig. 5). The maintenance of the PEPcase activity in stressed plants can be explained by the loss of the sensibility of this enzyme to malate, its main inhibitor (Foyer et al., 1998). Dever et al. (1997)

reported that PEPcase has a main role in the control of CO₂ assimilation and, in consequence, in photosynthesis in C₄ plants. Nevertheless, Rubisco activity and expression were not altered but its activation state has been altered (Fig. 6).

After the stressed period, even moderate, it was verified an increase in the lipid peroxidation and hydrogen peroxide content. Thus, we can conclude which the applied stress was sufficient to generate ROS, as the H₂O₂, causing damages in the cell membranes, comproved by TBARS level, but these parameters were maintained even after recovery (Fig. 7). These modifications were enough to trigger the antioxidative defense in plants, evidenced by total activities of SOD and APX. This activity increase was more expressive in the chloroplast-localized isoforms, Fe-SOD and tAPX (Fig. 8 and 9). Alscher et al. (2002) comment that the importance of Fe-SOD is this isoform utilize superoxide as substrate generated directly at the photochemical phase of photosynthesis, avoiding possible oxidative damage in the thylakoidal membrane. Then, H₂O₂ generated is probably utilized by tAPX completing the ROS removal generated in this cell compartment, maintaining the membrane integrity to possible recovery after stress (Shigeoka et al., 2002).

In the carbohydrates content, there were not alterations even after the photosynthesis decrease (Fig. 10C). The significant changes occurred in glucose (in leaves) and fructose content (in leaves and stalk) of stressed plants. These carbohydrates increased after stress treatment but returned to control level after recovery. Probably, these changes can be associated to starch decrease, which produces monomers like glucose and fructose, increasing the content of soluble carbohydrates (Chaves et al., 2009). After recovery, these carbohydrates are metabolized again to produce starch, verified by starch content increase at the end of the experiment (Fig. 10).

Taken all together, we can conclude that moderate water stress, as applied in this study, using drought periods, is sufficient to trigger antioxidative defense in sugarcane, including the chloroplast, to protect the thylakoid membranes. These defenses protect against ROS which can be produced by the energy excess not utilized due to stomatal closure verified in plants under stress. Thus, it is verified that sugarcane, even a C₄ plant, has a highly regulated antioxidative system, which works in initial levels of oxidative stress.

REFERENCES

- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399. 2004.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** 44, 2762–2787. 1971.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248–254. 1976.
- BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide the regulation of senescence in pear. **Plant Physiology** 59, 411– 416. 1977.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid- peroxidation, superoxide-dismutase, catalase and peroxidase- activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** 83, 463–468. 1991.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551-560. 2009.
- DANNA, C. H.; BARTOLI, C. G.; SACCO, F.; INGALA, L. R.; SANTA-MARIA, G. E.; GUIAMET, J. J.; UGALDE, R. A. Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase Mutant Exhibits Impaired Electron Transport and Photosynthetic Activity. **Plant Physiology**, 132 (8), p. 2116-2125. 2003.
- DEGL'INNOCENTI, E; GUIDI, L; SOLDATINI, GF. Effect of chronic O₃ fumigation on the activity of some Calvin cycle enzymes in two poplar clones. **Photosynthetica**, v. 40 (1), p. 121-126. 2002.
- DEVER, L. V.; BAILEY, K. J.; LEEGOOD, R. C.; LEA, P. J. Control of photosynthesis in *Amaranthus edulis* mutants with reduced amounts of PEP Carboxylase. **Functional Plant Biology**, v. 24, p. 469-476. 1997.
- DUBOIS, M; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28:248–54. 1956.
- FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; HENKLE, M.; MARTÍNEZ-CAÑELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. **New Phytologist**, v. 172, p. 73-82. 2006.

FOYER, C.; VALADIER, M.; MIGGE, A.; BECKER, T. M. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology**, v. 117, p. 283-292. 1998.

FOYER, C.; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100. 2011.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.990, p.87-92, 1989.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology** 59, 309–314. 1977.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. **Plant Physiology** 84, 450–455. 1987.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil. p. 32. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, CA, USA. 1950.

Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. <http://www.ipcc.ch>. Accessed 25 October 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680–685. 1970.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275-294. 2002.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochem. Soc. Trans.** 11, 591–592. 1983.

LIETH, J.H.; REYNOLDS, J.F. The Nonrectangular Hyperbola as a Photosynthetic Light Response Model: Geometrical Interpretation and Estimation of the Parameter θ . **Photosynthetica**. p.363-366, 1987.

MARTINEZ, C. A.; LOUREIRO, M. E.; OLIVA, M. A.; MAESTRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science** 160: 505–515. 2001.

MARTINS, M. O.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; AZEVEDO NETO, A. D.; SANTOS, M. G. Crescimento de plantas jovens de nim-indiano (*Azadirachta indica* A. Juss. - Meliaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Revista Árvore**, v. 34, p. 771-779. 2010.

MCDOWELL, N.; POCKMAN, W. T.; ALLEN, C. D.; BRESHEARS, D. D.; COBB, N.; KOLB, T.; PLAUT, J.; SPERRY, J.; WEST, A; WILLIAMS, D. G.; YEPEZ, E. A. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? **New Phytologist**, v. 178, p. 719-739. 2008.

- MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1767, p. 414–421. 2007.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology** 22, 1068–1072. 1981.
- NAYYAR, H.; GUPTA, D. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 106-113. 2006.
- PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; KHAN, S.; LEA, P. J.; KEYS, A. J. Rubisco activity: Effects of Drought Stress, **Annals of Botany**, v. 89, p. 833-839. 2002.
- ROSA S.B., CAVERZAN A., TEIXEIRA F.K., LAZZAROTTO F., SILVEIRA J.A.G., FERREIRA-SILVA S.L., ABREU-NETO J., MARGIS R. & MARGIS-PINHEIRO M. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry** 71, 548–558. 2010.
- REID, C. D.; TISSUE, D. T.; FISCUS, E. L.; STRAIN, B. R. Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 398-404, 1997.
- SAGE, R. E.; SHARKEY, T D.; SEEMANN, J. R. The in vivo response of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation state and the pool sizes of photosynthetic metabolites to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris* L. - **Planta** 174: 407-416. 1988.
- SAGE, R. F. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: the gas exchange perspective. **Photosynthesis Research**, v. 39, p. 351-368. 1994.
- SATO, A. M.; CATUCHI, T. A.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, G. M. The use of network analysis to uncover homeostatic responses of a drought-tolerant sugarcane cultivar under severe water deficit and phosphorus supply. **Acta Physiologia Plantarum**, 2010.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12. 1993.
- SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (Ed.). **Ecophysiology of photosynthesis**. Springer, Berlin pp. 49-70. 1994.
- SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319. 2002.
- SILVA, E.N.; FERREIRA-SILVA, S.L.; FONTENELE, A.V.; RIBEIRO, R.V.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p.1157-1164, 2010.

SILVEIRA, J. A. G.; ARAÚJO, S. A. M.; LIMA, J. P. M.; VIÉGAS, R. A. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p.1–8. 2009.

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J. Growth and function of the sugarcane root system. Smith, D. M., Inman-bamber, N. G., & Thorburn, P. J. (2005). Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v. 92, p. 169-183. 2005.

STEPIEN, P.; KLOBUS, G. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. **Physiologia Plantarum**, v. 125, p. 31-40. 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of National Academy of Science**, USA 76: 4350–4354. 1979.

UZILDAY, B.; TURKANA, I.; SEKMENA, A. H.; OZGURA, R.; KARAKAYAB, H. C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**, v. 182, p. 59-70. 2012.

von CAEMMERER S.; FURBANK R.T. The modelling of C4 photosynthesis. In: **C4 Plant Biology** (eds R.F. Sage & R.K. Monson), pp. 173–211. Academic Press, San Diego, CA. 1999.

VU, J. C. V.; ALLEN Jr., L. H. Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C4 sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 107-116, 2009.

CAPÍTULO 4

NITRATE ASSIMILATION CONTROLS NEGATIVELY PHOTOSYNTHESIS IN SUGARCANE EXPOSED TO HIGH CO₂

Nitrate Assimilation Controls Negatively Photosynthesis in Sugarcane Exposed to High CO₂

Marcio de Oliveira Martins¹; Milton Costa Lima Neto¹; Ana Karla Moreira Lobo¹; Joaquim Albenisio Gomes da Silveira^{1*}

¹Laboratory of Metabolism of Plants, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará.

* Correspondent Author

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the physiological and biochemical changes in relation to photosynthetic processes in sugarcane subject to an ambient of high CO₂ and low nitrogen supply. For this, sugarcane plants of three months old were subjected to a nitrogen deprivation for one month and exposed to a high CO₂ ambient for seven days. At the end of experimental period, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescents were evaluated. After this, plants were collected to biochemical determinations and enzymatic activities. Net photosynthesis was reduced by high CO₂ and -N treatment and the gas exchange were also changed by both treatments. Photochemical parameters were reduced only in -N treatment but with no signal of photoinhibition. PEPcase activity and expression were strongly reduced in plants of -N treatment but only the expression was affected by high CO₂. Rubisco activity was decreased only in -N treatment with no changes in expression. NR activity and expression were decreased with high CO₂ ambient and GS activity was decreased by CO₂ but increased by -N treatment. Nitrate determinations showed accumulation in the roots, indicating impairment at the transport to shoot. The treatment of nitrogen starvation decreased amino acids, soluble proteins and total nitrogen contents. The content of sucrose was decreased in all treatments. Taken all together, the treatment of high CO₂ showed stomatal and biochemical consequences while that treatment of low nitrogen had biochemical effects. Sugarcane plants reduce the photosynthetic activity primarily by a reduction in nitrate assimilation and reduction in nitrate reductase activity, showing a strong relationship between the process of assimilation of carbon and nitrogen.

Keywords: Photosynthesis, Nitrate assimilation, *Saccharum* spp., C4 plant.

INTRODUCTION

Atmospheric concentrations of CO₂ have increased in pre-industrial times to the present day, from 270 μL L⁻¹ to 380 μL L⁻¹. These values are predicted to increase until they reach between 530 μL L⁻¹ and 970 μL L⁻¹ to the end of this century. Furthermore, the ability of oceans to absorb CO₂ from the atmosphere is being considered in the limit (Khaliwala et al., 2009). In C₃ plants, CO₂ enters the Calvin cycle directly by the action of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase:oxygenase (Rubisco). In contrast, the C₄ mechanism, CO₂ is first incorporated into organic acids of mesophyll cells. By virtue of this mechanism of CO₂ concentration, the limitations of Rubisco active site in the bundle sheath cells are reduced. Thus, an increase of atmospheric CO₂ is expected to have less impact on C₄ plants than in C₃ (Prasad et al., 2009).

A high concentration of CO₂ decreases photorespiration and initially increases photosynthesis and growth approximately 35% more in plants C₃ (Long et al., 2004). However, the increase in photosynthesis dependent of high CO₂ decreases with time (days to years), a phenomenon known as acclimation CO₂ (Paul and Foyer, 2001). This process, which involves loss of protein and Rubisco activity is largely absent in C₄ plants, where these enzymes have already been acclimated to operate under conditions of high CO₂. However, there is considerable variation in the responses of different C₄ plants to elevated CO₂ (Maroco et al., 1999; Ziska et al., 1999). Some plants have a different response to high CO₂, defined as an “acclimation”, a period with no stimulation of photosynthesis but a decrease on this process (Stitt and Krapp, 1999).

The acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ is a phenomenon that is usually more marked in nitrogen-limited plants than well-supplied plants. Riviere-Rolland et al. (1996) showed that elevated CO₂ led to a decrease of Rubisco activity and the *RbcS* transcript level in plants growing in limiting nitrogen, but not when the plants were supplied with a high supply of nitrogen. The decreased nitrogen concentration frequently observed in high CO₂ ambient indicates that nitrate uptake and assimilation often fail to keep pace with photosynthesis and growth in this ambient. Summarizing, there is a strong interaction between the nitrogen supply and the response of photosynthesis, metabolism and growth to elevated CO₂. The changes of nitrogen metabolism in high CO₂ not been studied in detail and they have not been related to our knowledge of the regulation of nitrogen uptake and its interaction with carbon metabolism processes (Stitt and Krapp, 1999).

Thus, this study was performed in order to evaluate the physiological and biochemical changes in relation to photosynthetic processes in sugarcane subject to an ambient of high CO₂ and low nitrogen supply. The high CO₂ decreased photosynthetic rates by stomatal closure and mainly by the negative effects in nitrogen assimilation, evidenced by the reduction in the activity of nitrate reductase. So, we conclude that the high CO₂ ambient results in a minor assimilation of atmospheric CO₂ and nitrogen in sugarcane.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Plants utilized in the experiments were obtained from gems sent by Agronomic Institute of Campinas/IAC (Campinas, SP, Brazil) and belong to a cultivar considered drought tolerant (cv. IACSP 94-2094). The gems were sterilized with 2% hypochlorite of sodium and germinated in plastic pots filled with a mixture of washed sand and vermiculite (1:1 v/v). During the germination and establishing pots were daily moistened with distilled water. After 20 days, the plants were transferred to 7L pots and supplied with half-strength Hoagland's solution (Hoagland and Arnon, 1950). The solution was changed weekly. Plants were grown at greenhouse conditions with temperature and humidity varying between 28/35 °C and 40/80%, respectively and active photosynthetically photons flux density (PPFD) about 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

After three months of development, nitrogen from the nutritive solution was reduced to 1 mM of nitrate in the half of the plants. In these plants, it was induced an N starvation while the others were fully supplied with nitrogen. After 20 days of N starvation, the plants were transferred to growth chamber in order to induce the CO₂ treatments. Inside the chamber, temperature and humidity varied 26/29 °C and 60/80%, respectively and the PPFD was maintained in 800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. There were two treatments of external CO₂, ambient (400 ppm) and elevated (800 ppm). The external CO₂ was monitored by a CO₂ sensor (Vaisala Oyj, Finland) installed at the growth chamber and also accompanied by the IRGA CO₂ sensor. Each external CO₂ treatment contained plants supplied with 10 mM (+N) and 1 mM (-N) of nitrate. The ammonium at the nutritive solution was maintained in 1 mM in all treatments. The experiment lasted seven days after the plants have gone to the growth chamber and contained four replicates per treatment totalizing 24 plants.

Gas Exchange and Chlorophyll *a* Fluorescence Measurements

At the end of the experimental period, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence were measured in the youngest fully expanded leaf of each plant using an Infra-red gas analyzer, IRGA LI-6400XT (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Net photosynthesis (P_N), stomatal conductance (g_s), CO_2 partial pressure (C_i) and leaf transpiration (E) were measured with PPFD at $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature at 28°C and humidity at 60%. The CO_2 concentration at the chamber during the measurement was the same concentration of each treatment, 400 or 800 ppm. At the same time, with a fluorescence chamber coupled in the IRGA (LI-6400-40, Li-Cor), following chlorophyll *a* fluorescence parameters were measured: effective quantum efficiency of photosystem II ($\Delta F/F_m'$), photochemical quenching (qP) and apparent electron transport rate (ETR). After 30 min in dark conditions, potential quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) and non-photochemical quenching (NPQ) were measured. The relative energy excess (EXC) was calculated as $EXC = [(F_v/F_m) - (\Delta F/F_m')]/(F_v/F_m)$. All the measurements were realized according the manufacturer's instructions. P_N/C_i was calculated to estimate the carboxylation efficiency and ETR/P_N was assessed to verify a possible excess of electrons in the electron transport chain at PSII level.

PEPcase and Rubisco Activities and Western Blot

All analyses were performed using the same leaf used in gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence measurements. Leaves were collected and immediately frozen in liquid N_2 and maintained at -80°C . Leaf sections were grounded in a mortar and pestle pre-cooled. The extraction medium contained 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at $14000g$ for 25 min. The supernatant was used to determine enzyme activities and protein contents. All extraction steps were performed at 4°C .

PEPcase and Rubisco activities were determined spectrophotometrically monitoring NADH oxidation at 340 nm. To PEPcase activity, the reaction medium contained 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$, 33 nkat MDH and 0.3 mM NADH. Assays were initiated by the addition of extract and 4 mM PEP (Degl'innocenti et al., 2002). The Rubisco activity was performed after extraction (initial activity) and again following 15-min incubation at 25°C in the reaction medium (final activity). The reaction medium contained 100 mM bicine pH 8.0, 25 mM $KHCO_3$, 20 mM $MgCl_2$, 3.5 mM ATP, 5 mM phosphocreatine, 80 nkat G-3-P dehydrogenase (EC 1.2.1.12), 80 nkat 3-phosphoglyceric phosphokinase (EC 2.7.2.3), 80 nkat creatine phosphokinase (EC 2.7.3.2) and 0.25 mM

NADH. The NADH oxidation was started by adding the extract and 0.5 mM RuBP (Sage et al., 1988; Reid et al., 1997).

The same extracts to PEPcase and Rubisco activities were utilized to western blot. First of all, SDS-PAGE was performed with 10% (w/v) polyacrylamide gels according to Laemmli (1970). Equal amounts of protein (30 μ g) were added in each lane, with two identical gels in each running. The first gel was stained with coomassie brilliant blue and the second one was used to western blot. Denatured proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane (Towbin et al., 1979). Polypeptide detection was performed using specific antibodies against PEPcase and Rubisco proteins (obtained from Agrisera). Firstly, membranes were blocked overnight with 2% non-fat milk in saline Tris-HCl buffer (100 mM Tris-HCl pH, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20). Secondly, membrane with transferred proteins was incubated with the primary antibody for 3h. Thirdly, secondary antibodies, conjugated with phosphatase alkaline, were incubated with the membrane for 1h. Finally, the protein was revealed by the addition of a BCIP/NBT solution. All the procedure was realized according manufacturer's manual (Agrisera antibodies, Vännäs, Sweden).

Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase Activities

Leaf sections were grounded in a mortar and pestle pre-cooled. The extraction medium contained 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 and 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 14000g for 30min. Nitrate reductase activity (NRA) was determined according to the method by Robin (1979). The extract was incubated in a reaction mixture containing 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 0.15 mM NADH, 0.1 M KNO₃ at 30 °C for 30 min. This incubation was realized with 10 mM MgCl₂ or 15 mM EDTA in order to separate the initial or maximum activities, respectively. The reaction was stopped by addition of 1 M zinc acetate. Nitrite was determined according Snell and Snell (1949). The same extract was utilized for determination of GS activity, using hydroxylamine as substrate and the γ -glutamylhydroxamate (GGH), following method of Elliott (1955).

N-compounds and Carbohydrates Determinations

Leaf samples (or stalk and roots to nitrate determination) with deionized water were taken at 100 °C for 1h to extract the N-compounds. This extract was utilized to determinate nitrate, ammonium and amino acids contents. Nitrate determination was performed following method of Cataldo et al. (1975), utilizing salicylic acid in alkaline medium. Ammonium was

determined using the reaction of ammonium, phenol and hypochlorite (Weatherburn, 1967). Total amino acids were measured by reaction with ninhydrin according Yemm and Cocking (1955). Soluble proteins were determined by the Bradford (1976) method using bovine serum albumin (BSA) as standard. N-total in the tissue was determined according to Baethgen and Alley (1989). Photosynthetic nitrogen use efficiency (PNUE) was calculated as P_N per unit of foliar N content. Sucrose, glucose and fructose contents were determined enzymatically by Sigma's kits following manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich).

RESULTS

Photosynthesis is strongly impaired by high CO₂ partially due to reduced stomatal conductance

Net photosynthesis (P_N) is negatively affected by high CO₂ and -N treatments at the same magnitude, with a reduction of 34% and 40%, respectively. Under both treatments, there was an additive effect, resulting in a decrease of 73% (Fig. 1A). In consequence, -N plants increased the CO₂ partial pressure (C_i) in 70% and, on the high CO₂ treatment, there was a strong increase (3-fold higher). With the combined effect of high CO₂ and -N, C_i was remarkably increased, from 10.3 to 58.4 Pa (Fig 1B). Leaf transpiration (E) and stomatal conductance (g_s) were significantly modified only with high CO₂, decreasing about 50%, showing no effects with treatment of -N (Fig 1C-D).

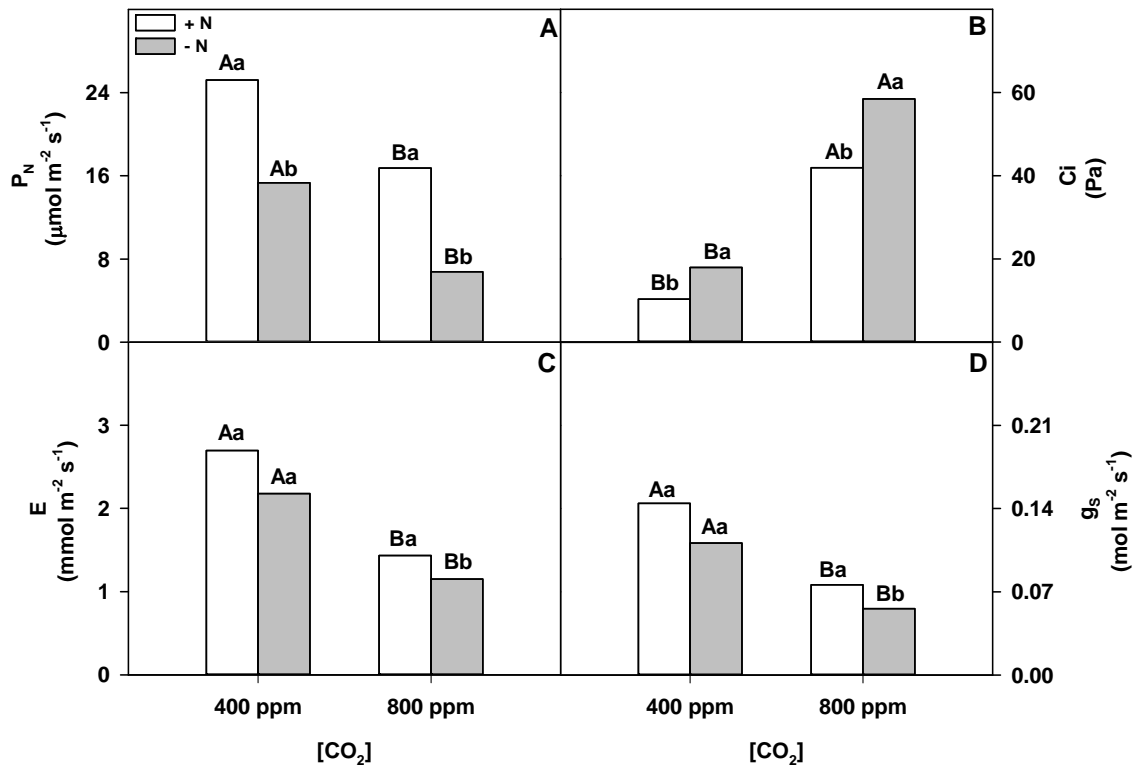


Figure 1: Net photosynthesis (A), CO₂ partial pressure (B), leaf transpiration (C) and stomatal conductance (D) of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by *t* test ($P < 0.05$).

Actual quantum efficiency ($\Delta F/F_m'$) was modified only at -N treatment, with a reduction of 32% in normal air and 40% in high CO₂, while the potential quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) did not show significant modification in any treatment. Photochemical quenching (qP) and electron transport rate (ETR) showed similar responses to $\Delta F/F_m'$. qP was reduced at -N treatment, 26% in normal air and 34% in high CO₂. At the same way, ETR was reduced in 32% and 40% in consequence of low N-supply, in the normal and high CO₂ ambient, respectively. Non-photochemical quenching (NPQ) did not change in any treatment applied. The relative energy excess (EXC) was slightly increased in -N plants, in the normal air (17%) and high CO₂ (26%). The relation between P_N and C_i (P_N/C_i) was strongly altered in all treatments. In the -N treatment, P_N/C_i was reduced in 56% in the normal air and 70% in the high CO₂ ambient. In elevated CO₂ treatment, P_N/C_i was reduced in 83%. Other relation affected was ETR/P_N, increased in 12% with -N treatment, 74% in high CO₂ treatment and, with both treatments the increase was 137% (Table 1).

Table 1: Actual ($\Delta F/F_m'$) and potential (F_v/F_m) quantum efficiency of PSII, photochemical (qP) and non-photochemical (NPQ) quenching, electron transport rate (ETR), relative energy excess (EXC), carboxylation efficiency (P_N/C_i) and ETR/P_N of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external $[CO_2]$.

	$[CO_2]$			
	400 ppm		800 ppm	
	+ N	- N	+ N	- N
$\Delta F/F_m'$	0.275 Aa	0.187 Ab	0.317 Aa	0.192 Ab
F_v/F_m	0.768 Aa	0.756 Aa	0.783 Aa	0.774 Aa
qP	0.492 Aa	0.368 Ab	0.549 Aa	0.363 Ab
NPQ	0.486 Aa	0.543 Aa	0.495 Aa	0.550 Aa
ETR	93.60 Aa	63.50 Ab	107.7 Aa	65.40 Ab
EXC	0.642 Ab	0.753 Aa	0.595 Ab	0.751 Aa
P_N/C_i	2.438 Aa	1.060 Ab	0.401 Ba	0.118 Bb
ETR/P_N	3.703 Ba	4.148 Ba	6.441 Ab	9.855 Aa

*Different capital letters indicate significant differences between external $[CO_2]$ treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external $[CO_2]$ by *t* test ($P < 0.05$).

PEPcase expression is negatively affected by high CO_2 ambient and this effect is enhanced by the low N-supply while activity and expression of Rubisco are altered only with the low N-supply treatment

PEPcase activity was not changed by the high CO_2 treatment but, in the low N-supply treatment, the activity of PEPcase was reduced in 68% and 55% at the normal air and high CO_2 ambient, respectively. Nevertheless, relative amount of PEPcase protein is quite modified. High CO_2 treatment reduced the enzyme expression in 43% and the low N-supply decreased 62%. When the plants were submitted to both treatments, there was an additive effect which reduced the relative amount of protein in 83% (Fig. 2). Initial Rubisco activity was reduced only in -N plants (about 50%) and there was a slight increase (16%) between CO_2 treatments. Rubisco activation state was increased 34% in high CO_2 treatment, reaching the full capacity. This activation state decreased 21% in low N-supply at normal air but, in high CO_2 ambient, this difference does not exist. Protein expression of Rubisco was decreased only in both treatments, with reduction of 40% in the relative amount of protein (Fig. 3).

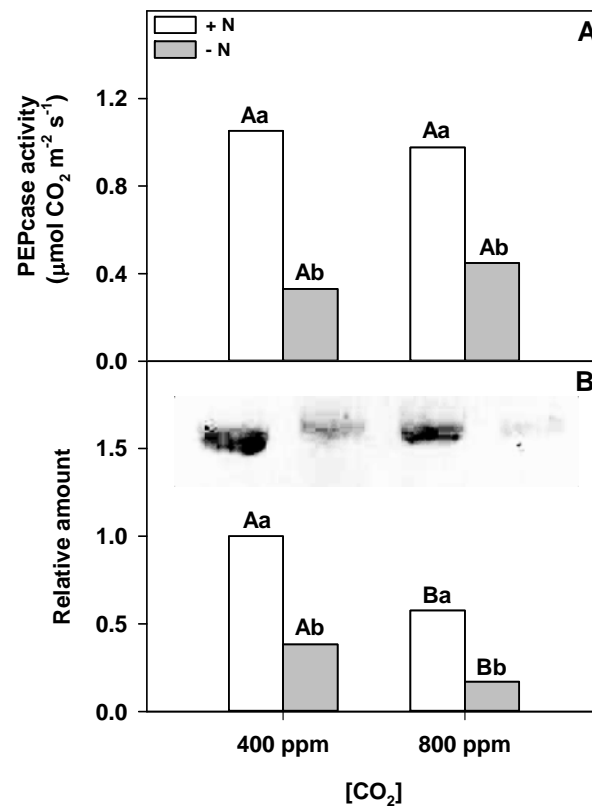


Figure 2: PEPcase activity initial (A) and band density of western blotting (B) in sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Inset in (B) shows typical bands from an original blot of PEPcase protein, loaded on an equal protein basis. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by *t* test ($P < 0.05$).

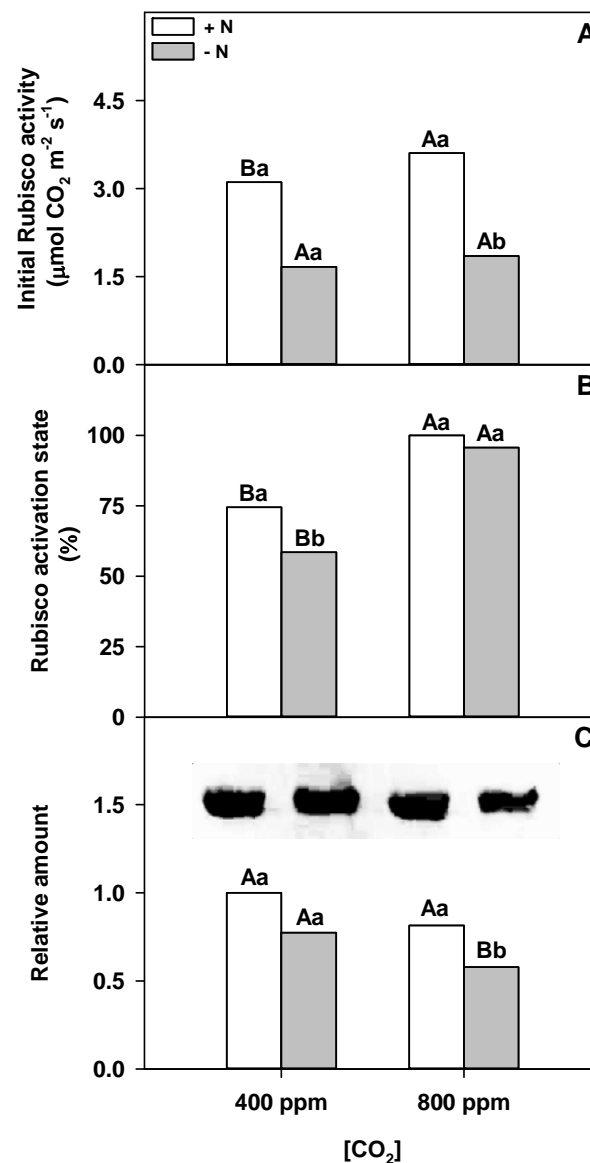


Figure 3: Rubisco initial activity (A), activation state (B) and band density of western blotting in sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Inset in (C) shows typical bands from an original blot of Rubisco protein, loaded on an equal protein basis. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by *t* test ($P < 0.05$).

High CO₂ ambient strongly decrease the activity and activation state of Nitrate reductase and slightly the activity of Glutamine synthetase

Nitrate reductase (NR) activity was reduced in 45% at high CO₂ treatment but there was not modification in low N-supply treatment. Activation state of NR was also reduced in high CO₂ (39%) but in -N plants there was a higher reduction (45%). Both treatments caused an additive effect in NR activation state, with a reduction of 57% in relation to plants in ambient air and normal N-supply (Fig. 4). High CO₂ and low N-supply reduced the ammonium

content equally (15%), with no additive effect (Fig. 5A). As NR, Glutamine synthetase (GS) activity was reduced in 28% in consequence of high CO₂ treatment. However, in low N-supply treatment, GS activity was increased in 21%, even with high CO₂ treatment (Fig. 5B).

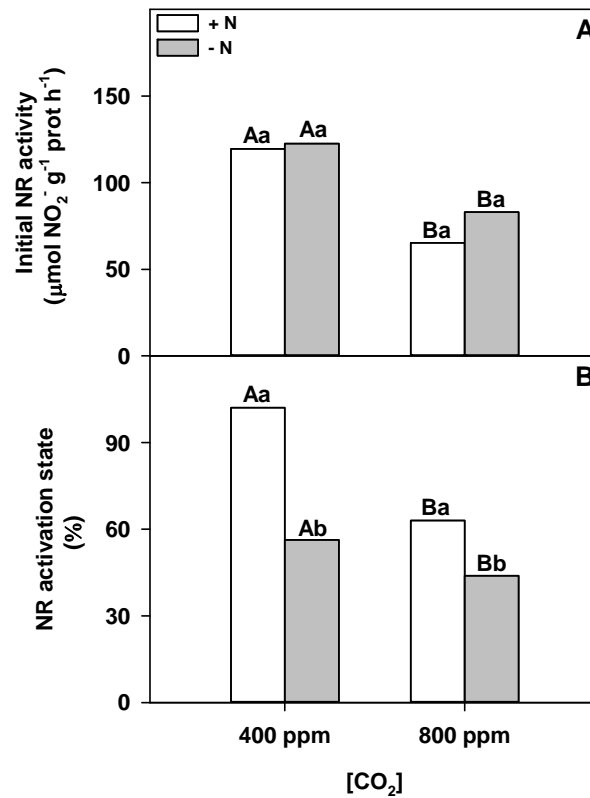


Figure 4: Nitrate reductase activity initial (A) and activation state (B) in sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by *t* test ($P < 0.05$).

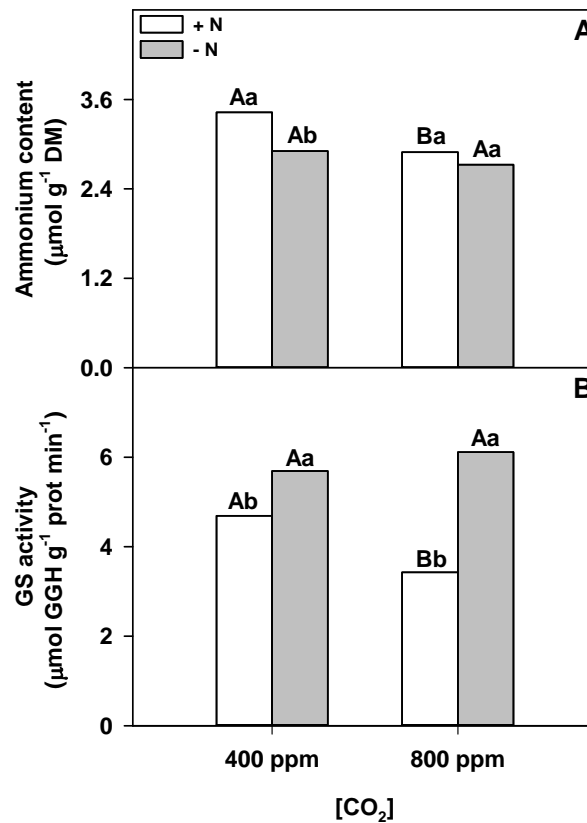


Figure 5: Ammonium content (A) and glutamine synthetase activity (B) in leaves of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different capital letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by *t* test ($P < 0.05$).

Nitrate transport from root to shoot is impaired by the high CO₂ treatment and the low N-supply causes different responses in root and shoot

Nitrate content was differently modified according the plant organ. In the leaves, this metabolite level was not altered with the high CO₂ ambient. In the normal air, nitrate content increased 47% in the low N-supply plants, maintained at the high CO₂. In the stalk, -N treatment caused a huge increase (100%) in the nitrate content, in the normal air conditions. However, this result was not observed in plants subject to high CO₂ air, with no changes by the CO₂ exposure. In roots, nitrate content was increased in 85% with the high CO₂ treatment. With the -N treatment, the nitrate content in roots was decreased in 30% at normal air and, in the high CO₂ ambient, this effect was enhanced (Fig. 6).

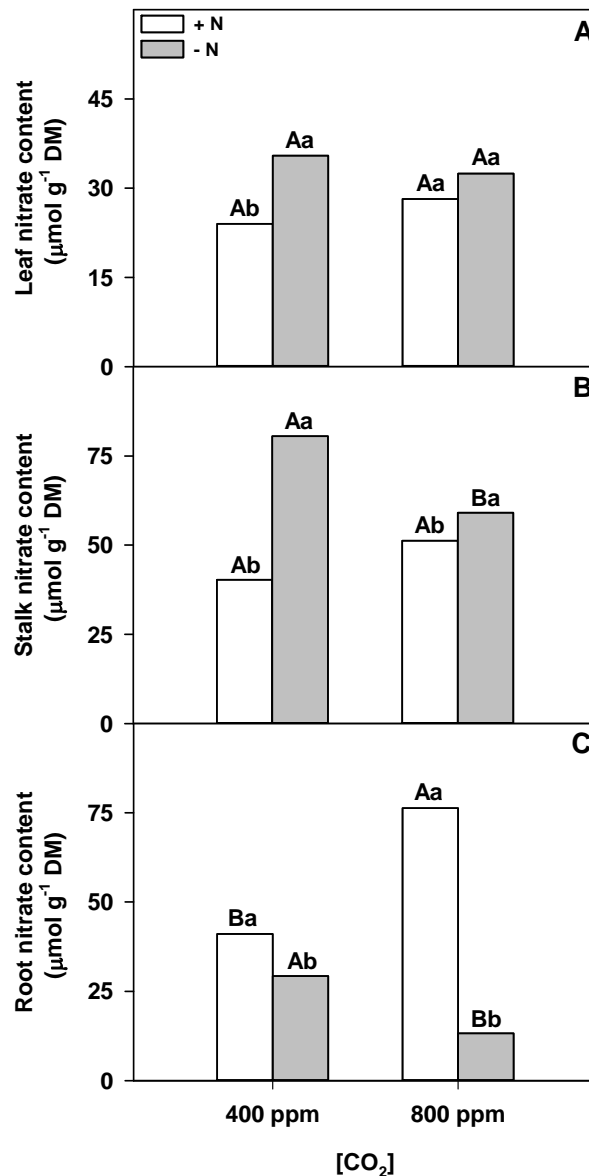


Figure 6: Nitrate content in leaves (A), stalk (B) and roots (C) of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by *t* test ($P < 0.05$).

N-amino compounds were strongly affected by the N-supply treatment and slightly decreased by the high CO₂

Amino acid content was strongly modified with the applied treatments. High CO₂ increased the amino acid level in 53% but the low N-supply treatment reduced in 48% and 41% in the normal air and high CO₂ ambient, respectively (Fig. 7A). Soluble proteins were not modified by the elevated CO₂ treatment but the -N supply decreased proteins in 42% at

any air condition (Fig. 7B). Total nitrogen in leaves decreased by treatments, 12% in low N-supply plants and 17% in plants exposed to high CO₂. At the treatment with -N supply and high CO₂ treatments the reduction in total nitrogen was 21% (Fig. 7C). Photosynthetic nitrogen use efficiency (PNUE) was altered in a similar way of P_N. PNUE decreased in 21% at elevated CO₂ treatment, 32% in the low N-supply plants and, in both treatments, PNUE was 66% lower comparing with plants of normal air and full nutrition (Fig. 7D).

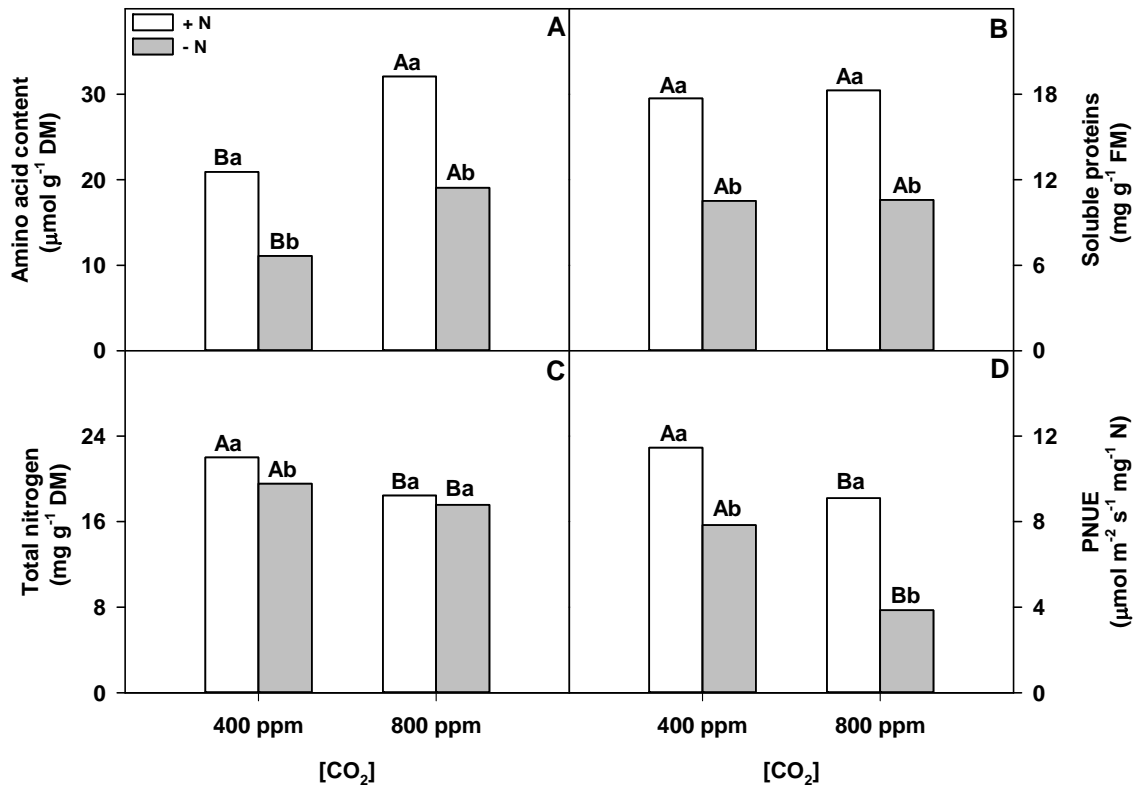


Figure 7: Amino acids (A), soluble proteins (B), total nitrogen (C) and photosynthetic nitrogen use efficiency (D) in leaves of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external [CO₂]. Different uppercase letters indicate significant differences between external [CO₂] treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external [CO₂] by *t* test ($P < 0.05$).

Sucrose content was modified with the elevated CO₂ treatment and low N-supply but there were not changes in glucose and fructose contents

Sucrose content in leaves probably changed according the alterations in photosynthesis. In high CO₂ treatment, there was a decrease of 29%. Higher decrease (38%) was observed in plants with low N-supply, either in normal air or elevated CO₂ air. There were not significant

changes in glucose and fructose contents¹ except for a slight decrease from plants with low N-supply in normal air to elevated CO₂ air (Fig. 8).

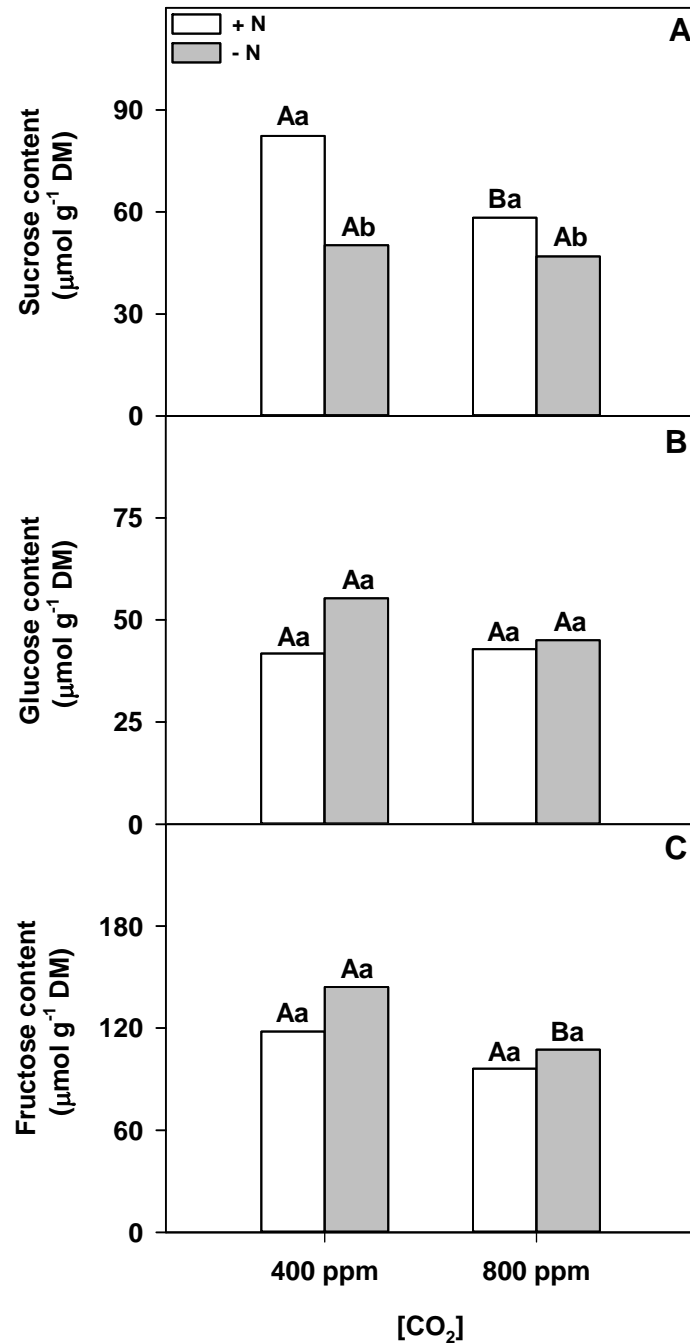


Figure 8: Sucrose (A), glucose (B) and fructose (C) content in leaves of sugarcane plants subject to high (+ N) and low (- N) nitrogen supply in normal (400 ppm) or high (800 ppm) external $[\text{CO}_2]$. Different uppercase letters indicate significant differences between external $[\text{CO}_2]$ treatments within the same N-supply and different lowercase letters indicate significant differences between N-supply treatments within the same external $[\text{CO}_2]$ by *t* test ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Plants of sugarcane were supplied with a solution of low nitrate content (1 mM) and were then placed in an ambient of high CO₂ (800 ppm). The treatment of nitrogen deprivation as high CO₂ caused changes in gas exchange, but in different ways. Low nitrogen supply reduced photosynthesis by reducing the activity of Rubisco and PEPcase while high CO₂ acted in stomatal aperture, reducing the conductance. These observations are verified in gas exchange (Fig. 1), the activities of PEPcase and western blot analysis (Fig. 2) and Rubisco (Fig. 3). Leakey (2009) confirms which the reduced stomatal conductance as a general response in C4 plants to high CO₂ but, on the other hand, there is no consensus about the photosynthetic responses of this group of plants to elevated CO₂ ambient.

The parameters obtained from the chlorophyll fluorescence showed only changes in the treatment of low supply of N whereas no changes due to the high CO₂. In P_N/C_i and ETR/P_N relations, there were major changes by CO₂-enriched ambient. In P_N/C_i, there was a great reduction, which indicates a low efficiency of carboxylation and in ETR/P_N, an increase, indicating there was excess energy in the form of electrons in the electron transport chain. These two relations indicate that in addition to stomatal limitation that occurred in the treatments, there was also a biochemical limitation of photosynthesis (Table 1). In despite of altered ETR and increased ETR/P_N, values of F_v/F_m indicate that no permanent inhibition occurred (Bota et al., 2004).

The PEPcase activity and expression were greatly reduced with treatment of low nitrogen. However, in the treatment of high CO₂, there was a significant reduction only in the expression while the activity remained unchanged (Fig. 2). With respect to Rubisco, the activity was reduced by low nitrogen but remained unchanged with the high CO₂. However, the activation state at high CO₂ was raised to the maximum, showing the activation of the enzyme stimulated by external CO₂. The Rubisco expression remained unchanged, except when the treatments of high CO₂ and low nitrogen were applied together, decreasing the protein amount (Fig. 3). Leakey et al. (2009), reported no significant changes in PEPcase and Rubisco activities in maize exposed to high CO₂, but with a great reduction in g_s, evidencing the common response in stomatal conductance reduction but with different alterations in the responsible enzymes by the carboxylation.

The key enzyme of nitrogen absorption, nitrate reductase, did not show alteration in the treatment of low-N, but this treatment was sufficient to reduce its activation state (Fig. 4A).

However, by increasing the CO₂ in the atmosphere, there was a large reduction in activity and state of activation of nitrate reductase (Fig. 4). The glutamine synthetase activity was also reduced with the increase of CO₂ but with the reduction in nitrogen supply, there was an increase in the activity.

It was observed an accumulation of nitrate in the roots of plants treated with high CO₂ (Fig. 6). This can occur due to decreases in activity of nitrate reductase, which is the main sink of nitrate, as well as by reduced transpiration flow observed in this treatment. The content of nitrogen compounds (amino acids and proteins) and total nitrogen was altered only in the treatment with low nitrogen, causing significant reductions. Coupled with this, the PNUE was also reduced with the treatment of high CO₂, reflecting reduced photosynthesis in function of treatment (Fig. 7). With respect to sugars, sucrose showed only changes with the treatments with significant reduction in exposure to high CO₂ and low supply of nitrogen (Fig. 8).

Bloom et al. (2010) reported that CO₂ enrichment inhibits nitrate assimilation and these authors proposed several hypotheses to this compartment but nothing for sure. In another more recent work, these authors (Bloom et al., 2012) reported that CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation, mainly in plants only supplied with nitrate at nutritive solution, showing growth delayed. These reports are similar with the results showed here and our findings confirms the hypothesis that plants cultivated in high CO₂ ambient has lower nitrogen assimilation, even though C4 plants.

Evaluating the results together, we observed that the treatment of high CO₂ has consequences for the stomatal (Fig. 1) and biochemical performance (Fig. 2 e 4). The treatment with low nitrogen works mainly under biochemical approach, evidenced by the low activity and expression of PEPcase (Fig. 2). These changes show a picture that, under short-time exposure to high CO₂, sugarcane plants reduce the photosynthetic activity primarily by a reduction in nitrate assimilation and reduction in nitrate reductase activity, showing a strong relationship between the process of assimilation of carbon and nitrogen.

REFERENCES

- BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, p. 961–969. 1989.
- BLOOM, A. J.; BURGER, M.; ASENSIO, J. S. R.; COUSINS, A. B. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science*, v. 328, p. 899-903. 2010.
- BLOOM, A. J.; ASENSIO, J. S. R.; RANDALL, L.; RACHMILEVITCH, S.; COUSINS, A. B.; CARLISLE, E. A. CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C₃ but not C₄ plants and slows growth under nitrate in C₃ plants. **Ecology**, v. 93, p. 355–367, 2012.
- BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist**, v. 162, p. 671–681. 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CATALDO, J. M.; HAROOM, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- DEGL'INNOCENTI, E.; GUIDI, L.; SOLDATINI, G. F. Effect of chronic O₃ fumigation on the activity of some Calvin cycle enzymes in two poplar clones. **Photosynthetica**, v. 40, p. 121-126, 2002.
- ELLIOTT, W. H. Glutamine synthesis. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 337-342. 1955.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: University of California - California Experimental Station. **Circular 347**, p. 1-39, 1950.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEAKEY, A. D. B. Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C₄ crops for food and fuel. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 276, p. 2333-43. 2009.
- LONG, S. P.; AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A.; ORT, D. R. Rising atmospheric carbon dioxide: plants face the future. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 591–628. 2004.
- KHATIWALA, S.; PRIMEAU, F.; HALL, T. Reconstruction of the history of anthropogenic CO₂ concentrations in the ocean. **Nature**, v. 462, p. 346–349. 2009.
- MAROCO, J. P.; EDWARDS, G. E.; KU, M. S. B. Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. **Planta**, v. 210, p. 115–125. 1999.

PAUL, M. J.; FOYER, C. H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1381-1400. 2001.

PRASAD, P. V. V.; VU, J. C. V.; BOOTE, K. J.; ALLEN Jr., L. H. Enhancement in leaf photosynthesis and upregulation of Rubisco in the C₄ sorghum plant at elevated growth carbon dioxide and temperature occur at early stages of leaf ontogeny. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 761-769. 2009.

REID, C. D.; TISSUE, D. T.; FISCUS, E. L.; STRAIN, B. R.: Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 398-404, 1997.

RIVIERE-ROLLAND, H.; CONTARD, P.; BETSCHE, T. Adaptation of pea to elevated atmospheric CO₂: Rubisco, PEPcarboxylase and chloroplast phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphate nutrition. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, p. 109–117. 1996.

ROBIN, P. Etude de quelques conditions d'extraction de la nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de maïs. **Physiologie Végétale**, v. 17, p. 45-54, 1979.

SAGE, R. E.; SHARKEY, T D.; SEEMANN, J. R.: The in vivo response of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation state and the pool sizes of photosynthetic metabolites to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris* L. – **Planta**, v. 174, p. 407-416, 1988.

SNELL, F. D.; SNELL, C. T. **Colorimetric methods of analysis**. New York: Van Nostrand, v. 2, 1949. 793p.

STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition : the physiological and molecular background. **Plant Cell and Environment**, v. 22, p. 583-621. 1999.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Procedures of National Academy Science**, v. 71, p. 4607–4611. 1979.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971-974. 1967.

YEMM, E. W.; COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

ZISKA, L. H.; SICHER, R. C.; BUNCE, J. A. The impact of elevated carbon dioxide on the growth and gas exchange of three C₄ species differing in CO₂ leak rates. **Plant Physiology**, v. 105, p. 74–80. 1999.