

O déficit hídrico modifica a descarboxilação nas células da bainha do feixe vascular e reduz a atividade carboxilase da Rubisco em cana-de-açúcar

Daniela Fávero São Pedro Machado¹; Norma Magalhães Erismann¹;
Yolanda Eugênia Álamo Gabrine Boza¹; Rose Marry A. Gondim-Tomaz²;
Eduardo Caruso Machado^{1,3,*}; Rafael Vasconcelos Ribeiro³

¹Centro de Biosistemas Agrícolas e Pós Colheita, Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, SP, Brasil.

²Centro de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, SP, Brasil.

³Laboratório de Fisiologia de Plantas Cultivadas, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Autor-correspondente:

eduardocarusomachado@gmail.com

Palavras-chave: *Saccharum spp.*; C₄; mecanismo de descarboxilação; déficit hídrico.

Submetido em: 05/02/24.

Aceito em: 04/06/2024.

DOI: <https://doi.org/10.20396/bioe.v2i00.18641>.

Resumo: Neste trabalho testou-se a hipótese de que o estresse hídrico reduz a fotossíntese da cana-de-açúcar impondo limitações de origem estomática e mesofílica e modificando a via de descarboxilação nas células da bainha do feixe vascular. Para tanto se mediu as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila a, a atividade das enzimas envolvidas na descarboxilação e na fixação do CO₂ na fotossíntese – fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP-ME), enzima málica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD-ME) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Com a redução do potencial hídrico foliar devido à baixa disponibilidade de água, houve redução na assimilação de CO₂, na condutância estomática, na transpiração e na eficiência do uso da água, bem como na eficiência fotoquímica do fotossistema II. A descarboxilação de CO₂ na cana-de-açúcar ocorreu com a participação das três descarboxilases; todavia, a atividade PEPCK foi mantida sob estresse hídrico, enquanto as atividades da NADP-ME e NAD-ME foram reduzidas. A Rubisco teve sua atividade diminuída sob estresse hídrico, enquanto que a PEPC não foi afetada. Após o período de reidratação do substrato, as plantas recuperaram-se atingindo valores de fotossíntese muito próximos dos apresentados em plantas bem hidratadas. Como conclusão, a fotossíntese em cana-de-açúcar sob deficiência hídrica é limitada pela disponibilidade de substrato devido ao fechamento estomático, assim como pela menor atividade fotoquímica e menor atividade da Rubisco. O déficit hídrico também evidenciou a flexibilidade do mecanismo de descarboxilação de CO₂ nas células da bainha do feixe vascular, com aumento da contribuição relativa da enzima PEPCK.

INTRODUÇÃO

O estresse hídrico é uma das causas mais importantes de diminuição da produtividade agrícola e os efeitos da limitação hídrica sobre a fotossíntese têm sido estudados frequentemente (GHANNOUM, 2009). No entanto, ainda existem resultados conflitantes, pois alguns investigadores relatam que o fechamento dos estômatos é a principal razão para o declínio na fotossíntese (SHARKEY e SEEMANN 1989), enquanto outros sugerem que fatores não estomáticos ou metabólicos são mais importantes para o declínio na fotossíntese (DU et al., 1996; GHANNOUM, 2009). Há também relatos de que tanto fatores estomáticos, como não estomáticos ou metabólicos estão envolvidos no controle da fotossíntese (WISE et al., 1990). Com o declínio da hidratação das folhas, o fechamento parcial dos estômatos pode ou não reduzir a taxa de assimilação de CO₂, dependendo das condições ambientais. Isto acontece porque o mecanismo concentração de CO₂ é capaz de saturar a fotossíntese C₄ sob concentrações intercelulares de CO₂ relativamente baixas. Sob deficiência hídrica mais acentuada a resposta passa por uma fase mista, isto é, ocorrem limitações estomáticas e não estomáticas. Em condições severas, a fotossíntese é reduzida essencialmente pela limitação metabólica.

Os principais limitantes não estomáticos da fotossíntese incluem a queda da condutância do mesófilo e a redução da atividade de enzimas fotossintéticas de carboxilação, de descarboxilação e de regeneração de fosfoenolpiruvato (DU et al., 1996; GHANNOUM, 2009). Em plantas C₄ como a cana-de-açúcar, o CO₂ é inicialmente fixado via fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) nas células do mesófilo, produzindo um ácido de quatro carbonos que é transportado para as células da bainha do feixe vascular (BFV) (FURBANK, 2011). A fixação de CO₂ ocorre inicialmente nos cloroplastos das células do mesófilo foliar através da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), onde é produzido oxalacetato (OAA), que é convertido em malato e se difunde para as células da BFV. Nas células da BFV o malato é descarboxilado resultando em CO₂ que é refixado através da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) no ciclo de C₃. As plantas C₄ podem ser classificadas com base nas enzimas que atuam na descarboxilação dos ácidos de quatro carbonos: NADP-málica (NADP-ME); NAD-málica (NAD-ME); e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). O subgrupo do qual a cana-de-açúcar faz parte é o NADP-ME, no qual a enzima málica é dependente de NADPH e a descarboxilação do ácido C₄ ocorre no cloroplasto das

células da *BFV*. O segundo grupo é o da *NAD-ME*, no qual a enzima málica é dependente de NADH e a descarboxilação do ácido ocorre na mitocôndria das células da *BFV*. No terceiro grupo a descarboxilação é realizada pela *PEPCK* e ocorre predominantemente no citoplasma das células da *BFV* (GHANNOUM, 2009; VON CAEMMERER e FURBANK, 2003; FURBANK, 2011). O piruvato resultante da descarboxilação do malato retorna ao mesófilo e com gasto de *ATP* é utilizado na síntese de fosfoenolpiruvato (*PEP*), o aceptor inicial de CO_2 .

A via C_4 funciona como um sistema de bombeamento bioquímico que concentra o CO_2 nas células da *BFV*, de tal forma, a saturar eficazmente o sítio da *Rubisco* com CO_2 e inibir a fotorrespiração (LUNN e FURBANK, 1999), que em plantas C_3 é responsável por uma perda substancial de eficiência fotossintética. Pesquisas sugerem que a divisão dos três tipos de descarboxilação não é rigidamente determinada, assim há possibilidade de mais de uma rota existir simultaneamente dependendo da espécie e das condições ambientais (FURBANK, 2011, SHARWOOD et al., 2014, SALES et al., 2018; CACETO et al., 2019). Quando a principal via de descarboxilação é através de *PEPCK*, a maior parte do *OAA* é convertida em *PEP* pela *PEPCK* com consumo de *ATP*, produzido na mitocôndria da *BFV*. Os rendimentos quânticos teóricos e medidos na via *PEPCK* são maiores do que na via *NADP-ME* devido a síntese de *ATP* nas mitocôndrias das células da bainha do feixe vascular e retorno direto do *PEP* às células do mesófilo sem gasto extra de *ATP* (VON CAEMMERER e FURBANK, 2003; FURBANK, 2011; BELLASIO e GRIFFITHS, 2014a; SALES et al., 2018).

No presente trabalho, tem-se o objetivo de avaliar os efeitos da deficiência hídrica sobre as trocas gasosas, reações fotoquímicas e enzimas de carboxilação e de descarboxilação em cana-de-açúcar, determinando as principais limitações induzidas pelo déficit hídrico e avaliando a flexibilidade do mecanismo de descarboxilação nesta condição ambiental.

MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Mudas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cv. IACSP95-5000 com dois meses de idade foram transplantadas para vasos com capacidade para 12 litros, contendo terra como substrato. A cultivar IACSP95-5000 foi escolhida por ter produtividade agrícola elevada em ambientes com boa disponibilidade hídrica, contribuir para a safra de inverno e primavera e ter alta aceitação entre os canavicultores (LANDELL e BRESSIANI, 2008). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, onde receberam irrigação diária e aplicações parceladas de nutrientes, totalizando por vaso: 25,7 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 7,5 g MAP; 10,32 g KCl; 3,0 g MgSO_4 ; 0,24 g H_3BO_3 ; 0,29 g MnSO_4 ; 24 mg CuSO_4 ; 24 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4(\text{H}_2\text{O})$; 0,12 g ZnSO_4 ; e 0,30 mg Fe-EDTA (6% Fe). Aos cinco meses de idade as plantas foram submetidas à deficiência hídrica. As plantas referência (Ref) foram irrigadas diariamente, fazendo-se a reposição da água evapotranspirada (determinada pela pesagem dos vasos) e mantendo-se o substrato próximo à capacidade máxima de retenção de água. A deficiência hídrica (DH) foi imposta pela suspensão da rega até que a capacidade máxima de retenção de água do substrato

chegasse a 30%, pelo período de 15 dias. O 15º dia de suspensão da rega foi considerado como deficiência hídrica máxima (DH_{max}). Após esse período de DH, o substrato foi reidratado e a recuperação (Rec) das plantas foi avaliada após 6 dias, isto é, no 21º dia do experimento.

Foram instalados sensores para a medição da temperatura do ar (Tar, °C) e da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante o período experimental. Esses sensores foram ligados a um registrador multicanal modelo CR1000 (Campbell, North Logan UT, EUA), onde os dados foram armazenados a cada 20 minutos.

ASSIMILAÇÃO DE CO_2 E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

Foram realizadas medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a entre as 9h00 e 10h00, por meio de um analisador de gases por infravermelho (LI-6400XT, LICOR, Lincoln NE, EUA) integrado com uma câmara de fluorescência modelo 6400-40F (LICOR, Lincoln NE, EUA). As medidas foram realizadas na primeira folha totalmente expandida e com lígula aparente (folha +1), no terço médio do limbo, sob DFFFA de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As medidas de assimilação de CO_2 e de fluorescência da clorofila a foram realizadas no início do experimento, no 5º e 15º dias sob déficit hídrico, e 6 dias após a reirrigação (21º dia). Durante as medidas de trocas gasosas, a temperatura do ar variou entre 30 e 35 °C. As variáveis medidas em relação às trocas gasosas foram: assimilação de CO_2 (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 (Ci, $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Calculou-se a eficiência do uso da água (EUA) pela razão A/E (MACHADO et al., 2009). As variáveis analisadas em relação à fluorescência da clorofila a foram: fluorescência mínima (F_o) e máxima (F_m) medidas após adaptação ao escuro (30 min); fluorescência no estado de equilíbrio dinâmico (F'), mínima (F_o') e máxima (F_m') medidas após adaptação à luz (MAXWELL e JOHNSON, 2000). Com base nesses sinais, foram estimadas a eficiência quântica máxima do fotossistema II [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$] e a eficiência operacional do FSII [$F_q'/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m'$] (BAKER, 2008). Estimou-se também a extinção não fotoquímica da fluorescência: $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

POTENCIAL DA ÁGUA NA FOLHA

No momento de máximo déficit hídrico (15º dia, DH_{max}) e na fase de recuperação das plantas (21º dia, Rec), foram realizadas medidas do potencial hídrico na folha (ψ_w , MPa) às 13h00, com uma câmara de pressão modelo 3005 (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara CA, EUA), segundo método proposto por Kaufmann (1968).

ATIVIDADE DA RIBULOSE-1,5-BISFOSFATO CARBOXILASE/OXIGENASE (*RUBISCO*, EC 4.1.1.39)

Para a obtenção do extrato e a determinação da atividade enzimática, aproximadamente 100 mg de folhas foram macerados com nitrogênio líquido e 2% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVPP) em um almofariz previamente resfriado. O material resultante foi homogeneizado por 2 min em 0,5 mL de tampão Bicina-NaOH 100 mM (pH 7,8)

contendo EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e leupeptina 10 μ M (adaptado de SCALES et al., 2014; SHARKEY et al., 1986). Uma alíquota de 900 μ L de meio de reação contendo Bicina-NaOH 100 mM (pH 8,0), $NaHCO_3$ 10 mM, $MgCl_2$ 20 mM, adenosina trifosfato (ATP) 3,5 mM, fosfocreatina 5 mM, NADH 0,25 mM, 4,80 U.A. de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12), 4,8 U.A. de 3-fosfoglicerato fosfoquinase (EC 2.7.2.3) e 4,8 U.A. de creatina fosfoquinase (EC 2.7.3.2) foi incubada a 25 °C. Após incubação, o meio de reação foi transferido para cubeta de quartzo e adicionou-se em seguida 70 μ L de extrato enzimático, diluído 5 vezes, e a reação foi iniciada adicionando-se 30 μ L de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) 0,5 mM (concentração final na cubeta). A oxidação de NADH foi acompanhada por 5 minutos em espectrofotômetro a 340 nm (adaptado de REID et al., 1997; SAGE et al., 1988).

ATIVIDADE DA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE (PEPC, EC 4.1.1.31)

Para a obtenção do extrato enzimático, aproximadamente 100 mg de folhas foram macerados com nitrogênio líquido e 2% de PVPP (p/v) em almofariz previamente resfriado. O pó fino resultante da maceração foi homogeneizado por 2 min com 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo EDTA 1 mM e PMSF 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado na determinação. A atividade enzimática foi determinada de acordo com Degl'Innocenti, Guidi e Soldatini (2002). Em um microtubo foi adicionado 800 μ L de meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), $MgCl_2$ 5 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, 1,98 U.A. de desidrogenase málica (MDH, EC 1.1.1.37) e NADH 0,3 mM, sendo a solução incubada a 30 °C. Após a incubação, o meio de reação foi transferido para cubeta de quartzo e se adicionou em seguida 100 μ L de extrato enzimático. A reação foi então iniciada adicionando-se 100 μ L de fosfoenolpiruvato 4 mM (concentração final na cubeta). A oxidação de NADH foi acompanhada por 3 minutos em 340 nm.

As atividades das enzimas PEPC e Rubisco foram expressas em μ mol $m^{-2} s^{-1}$ e as medidas foram realizadas no máximo déficit hídrico (15° dia de suspensão da irrigação, DH_{max}) e após 6 dias da reidratação do substrato (Rec). A relação PEPC/Rubisco foi também avaliada.

ATIVIDADE DA ENZIMA NAD-MÁLICA (NAD-ME, EC 1.1.1.39)

O extrato enzimático foi obtido com aproximadamente 200 mg de folhas macerados com nitrogênio líquido e 2% de PVPP. O material resultante foi homogeneizado com 1,0 mL de tampão MES-NaOH (pH 6,5) contendo $MnCl_2$ 5 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, triton x-100 0,05%, glicerol 20% e PMSF 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 min a 4 °C. Para a atividade enzimática, 800 μ L de meio de reação composto por tampão MES-NaOH 50 mM (pH 6,5), NAD 4 mM, DTT 5 mM, $MnCl_2$ 10 mM e 10 U.A. de MDH (EC 1.1.1.37) foi incubado a 25 °C. Após incubação, o meio de reação foi transferido para uma cubeta de quartzo e se adicionou em seguida 100 μ L de extrato enzimático diluído 5 vezes, a reação foi iniciada pela adição de 100 μ L de L-malato 10 mM

(concentração final na cubeta) (TRONCONI et al., 2005). O aumento da absorbância foi acompanhado por 4 min em 340 nm. Este aumento foi atribuído à descarboxilação do L-malato pela NAD-ME (CHAPMAN e HATCH, 1977). A atividade da NAD-ME foi expressa em μ mol $m^{-2} s^{-1}$. As medidas foram realizadas nos mesmos dias das enzimas de carboxilação.

ATIVIDADE DA ENZIMA NADP-MÁLICA (NADP-ME, EC 1.1.1.40)

A obtenção do extrato enzimático foi realizada como descrito para a atividade da PEPC. Para a determinação da atividade enzimática, 800 μ L do meio de reação composto por Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 10 mM e NADP 0,5 mM foram incubados a 30 °C. Após a incubação, o meio de reação foi transferido para cubeta de quartzo e foi adicionado 100 μ L de extrato enzimático diluído 5 vezes, a reação foi iniciada com a adição de 100 μ L de L-malato 4 mM (concentração final na cubeta). O aumento da absorbância foi acompanhado por 2 min em 340 nm (MAURINO et al., 1997; BORSANI et al., 2009). A atividade da NADP-ME foi expressa em μ mol $m^{-2} s^{-1}$. As medidas foram realizadas nos mesmos dias das enzimas de carboxilação.

ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASE (PEPCK, EC 4.1.1.49)

Para obtenção do extrato enzimático, aproximadamente 200 mg de folhas foram macerados com nitrogênio líquido e 2% de PVPP. O pó fino resultante da maceração foi homogeneizado com 1,0 mL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) contendo EDTA 2 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $MnCl_2$ 5 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol 20%, ascorbato 0,5%, PMSF 1 mM e triton-x 100 0,5%. O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado nas análises. Para a determinação da atividade enzimática 800 μ L de meio de reação, composto por tampão HEPES-NaOH 100 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 2 mM, $MnCl_2$ 1 mM, ATP 2 mM, ADP 0,4 mM, NADH 0,35 mM, 5 U.A. de lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) e 2 U.A. de piruvato quinase (EC 2.7.1.40), foram incubados a 30 °C. Após a incubação, o meio de reação foi transferido para uma cubeta de quartzo, adicionou-se 100 μ L de extrato enzimático diluído 10 vezes e a reação foi iniciada pela adição de 100 μ L de oxalacetato 0,5 mM (concentração final na cubeta). A oxidação de NADH foi acompanhada por 2 min em 340 nm (MARTÍN et al., 2011). A atividade da PEPCK foi expressa em μ mol $m^{-2} s^{-1}$. As medidas foram realizadas nos mesmos dias das demais enzimas.

As atividades das enzimas NAD-ME, NADP-ME e PEPCK foram expressas em μ mol $m^{-2} s^{-1}$ e as medidas foram realizadas no máximo déficit hídrico (15° dia de suspensão da irrigação, DH_{max}) e após 6 dias da reidratação do substrato (Rec).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com parcelas subdivididas no tempo, sendo as causas de variação o regime hídrico (irrigado e deficiência hídrica) e o tempo. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias provenientes de quatro repetições. Quando encontradas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Durante o período de imposição da deficiência hídrica, as condições ambientais foram adequadas para o crescimento da cana-de-açúcar, com a temperatura média do ar variando entre 25 e 29°C e a intensidade luminosa chegando a DFFFA de 1200 mmol m⁻² s⁻¹.

Após 15 dias de suspensão da rega, o potencial hídrico da folha (ψ_w) foi reduzido significativamente nas plantas sob déficit hídrico, chegando a -2,1 MPa (Figura 1). Após 6 dias de reidratação do substrato, ψ_w aumentou significativamente, mas esse intervalo de tempo não foi suficiente para a recuperação total (Figura 1). A redução de ψ_w foi acompanhada pela redução da fotossíntese, da condutância estomática, da transpiração e da eficiência do uso da água nas plantas sob déficit hídrico (Figura 2A, B, D e E). Após o período de reidratação, as plantas recuperaram-se atingindo valores muito próximos dos apresentados pelas plantas irrigadas (Figura 2A, B, D e E). A concentração intercelular de CO₂ se manteve constante praticamente em todos os dias de medidas, entretanto as plantas sob déficit hídrico apresentaram maior Ci durante o máximo estresse se comparadas às plantas irrigadas (Figura 2C).

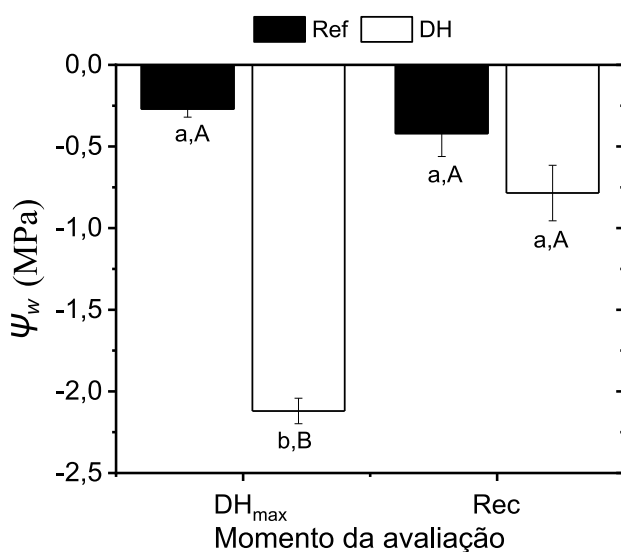


FIGURA 1. Potencial hídrico (ψ_w) em folhas de cana-de-açúcar mantidas hidratadas (Ref) e submetidas ao déficit hídrico (DH). As medidas foram realizadas após 15 dias de suspensão da rega (DH_{max}) e 6 dias após a reidratação do substrato (Rec). Letras minúsculas comparam os momentos de avaliação (DH_{max} vs. Rec) sob o mesmo regime hídrico e as letras maiúsculas os tratamentos (Ref vs. DH) em um dado momento. Valores médios (n=4) comparados pelo teste de Tukey (p<0,05).

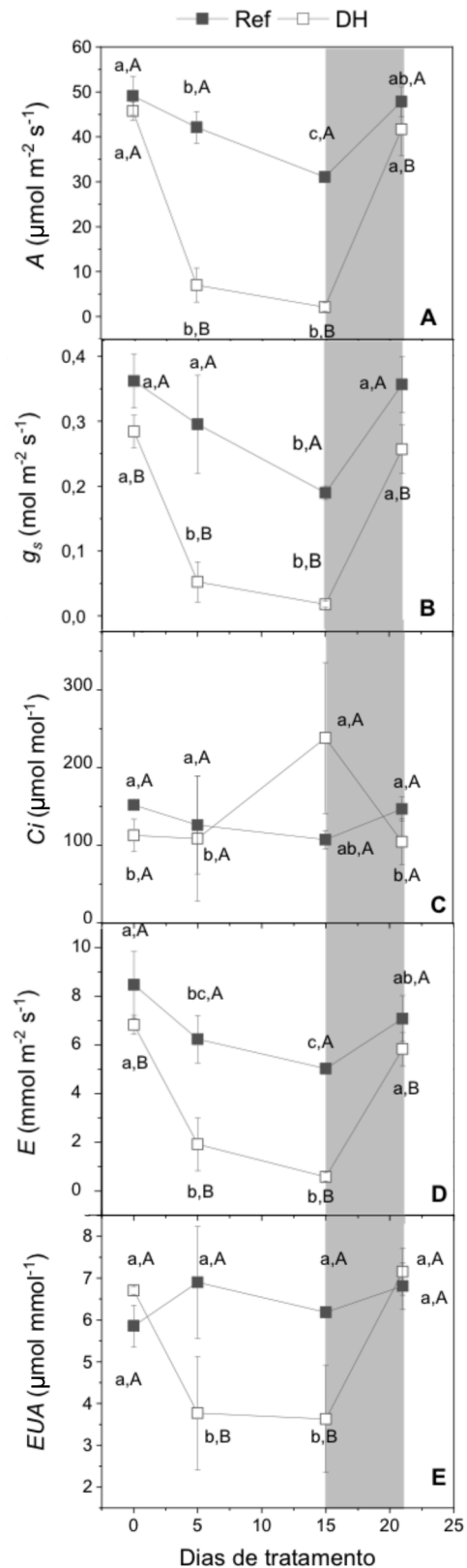


FIGURA 2. Variação da assimilação de CO₂ (A, em A), condutância estomática (g_s , em B), concentração intercelular de CO₂ (C_i , em C), transpiração (E, em D) e eficiência do uso da água (EUA, em E) de cana-de-açúcar mantidas bem hidratadas (Ref) ou submetidas ao déficit hídrico (DH) pela suspensão da rega por 15 dias. No 15º dia o substrato foi reidratado e a recuperação (área cinza) das plantas avaliada após 6 dias. Letras minúsculas comparam os momentos de avaliação (0, 5, 15 e 21 dias) sob o mesmo regime hídrico e as letras maiúsculas os tratamentos (Ref vs. DH) em um dado momento. Valores médios (n=4) comparados pelo teste de Tukey (p<0,05).

As eficiências quânticas potencial e operacional do fotossistema II abaixaram durante o déficit hídrico, recuperando os valores semelhantes à referência após a reidratação (Figura 3). Considerando as avaliações realizadas no máximo déficit hídrico e na recuperação, as plantas submetidas à deficiência hídrica apresentaram maior coeficiente de extinção não-fotoquímica quando comparadas às plantas irrigadas (Figura 4).

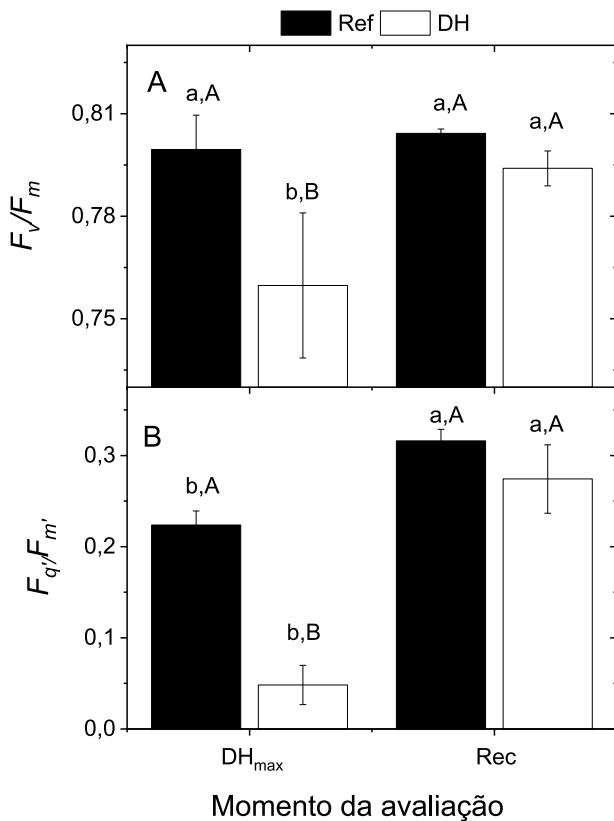


FIGURA 3. Eficiência quântica máxima (F_v/F_m , em A) e operacional (F_q/F_m' , em B) do fotossistema II em plantas de cana-de-açúcar mantidas hidratadas (Ref) e submetidas ao déficit hídrico (DH). As medidas foram realizadas após 15 dias de suspensão da rega (DH_{max}) e 6 dias após a reidratação do substrato (Rec). Letras minúsculas comparam os momentos de avaliação (DH_{max} vs. Rec) sob o mesmo regime hídrico e as letras maiúsculas os tratamentos (Ref vs. DH) em um dado momento. Valores médios (n=4) comparados pelo teste de Tukey (p<0,05).

Independente da avaliação e do regime hídrico, não foram observadas alterações da atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (Figura 5A). No entanto, ocorreu decréscimo da atividade da *Rubisco* sob deficiência hídrica e a atividade da mesma aumentou e atingiu valores similares aos da referência após a reidratação (Figura 5B). O déficit hídrico aumentou a razão *PEPC/Rubisco* em cana-de-açúcar e esse efeito foi revertido pela reidratação das plantas, que apresentaram valores similares entre os tratamentos após 6 dias de irrigação (Figura 5C). Fato relevante é que as três enzimas de descarboxilação foram ativas em cana-de-açúcar, que sob deficiência hídrica apresentou decréscimo na atividade da *NAD-ME* e da *NADP-ME* quando comparadas à referência (Figuras 5D e 6). No entanto, não foi observada alteração significativa da atividade da *PEPCK* sob déficit hídrico (Figura 5D) e assim a contribuição relativa da *PEPCK* na descarboxilação foi aumentada. Após a

recuperação, as atividades das enzimas de descarboxilação foram semelhantes entre as plantas referência e as que passaram por déficit hídrico (Figuras 5D e 6).

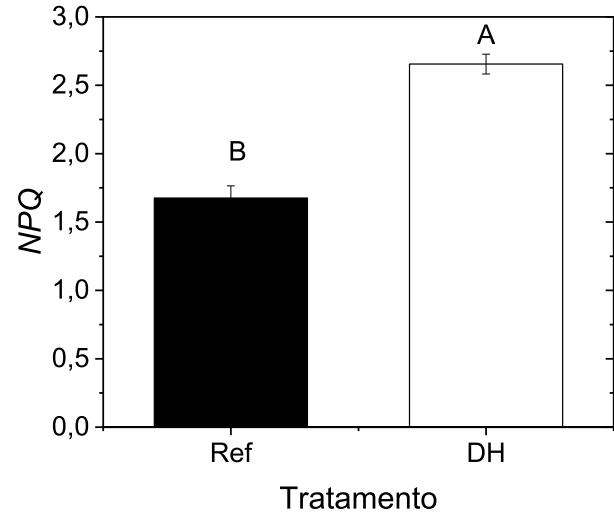


FIGURA 4. Coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ) de plantas de cana-de-açúcar mantidas hidratadas (Ref) e submetidas ao déficit hídrico (DH). Não foram encontradas diferenças significativas induzidas pelo momento de avaliação e os dados foram agrupados. Letras maiúsculas comparam os tratamentos (Ref vs. DH). Valores médios (n=8) comparados pelo teste de Tukey (p<0,05).

DISCUSSÃO

O fechamento estomático decorrente da restrição hídrica é associado ao baixo ψ_w (Figuras 1 e 2B) pode ser motivado pela perda de turgor foliar e também pelo aumento da concentração de ácido abscísico (ABA) nas folhas (ASLAM et al., 2022; VESELOVA et al., 2005). A redução de g_s junto com a inibição do crescimento foliar constituem as primeiras respostas das plantas à seca (MACHADO et al., 2009). De fato, sob estresse hídrico a fotossíntese em plantas C_4 reduz primeiramente devido ao fechamento estomático e em seguida pela redução das atividades da *Rubisco* e da *PEPC* (GHANNOUM et al., 2014).

A relação *PEPC/Rubisco* foi aumentada pelo déficit hídrico (Figura 5C), em consequência da redução da atividade da *Rubisco* (Figura 5B). Esses resultados demonstram a maior sensibilidade da *Rubisco* à deficiência hídrica, se comparada à *PEPC*. Foyer e colaboradores (1998) também observaram que a *PEPC* em milho não foi afetada pela deficiência hídrica, enquanto Du e colaboradores (1996) relataram queda na atividade da *PEPC* em cana-de-açúcar sob déficit hídrico. Tal desequilíbrio pode afetar o fluxo de metabólitos entre as células do mesófilo e da *BFV* (FURBANK e LEEGOOD, 1984), tendo como possível consequência o aumento de vazamento de CO_2 das células da *BFV* para o mesófilo, reduzindo assim a eficiência quântica da assimilação de CO_2 (KROMDIJK et al., 2008; VON CAEMMERER e FURBANK, 2003). Um sistema de concentração de CO_2 eficiente em plantas C_4 é baseado na alta relação *PEPC/Rubisco* e reduzido vazamento do CO_2 liberado nas células da *BFV* (TOFANELLO et al., 2023). Em nosso estudo, há dados apenas da relação *PEPC/Rubisco*, que indica o aumento do suprimento de CO_2 para as células da *BFV* em plantas sob

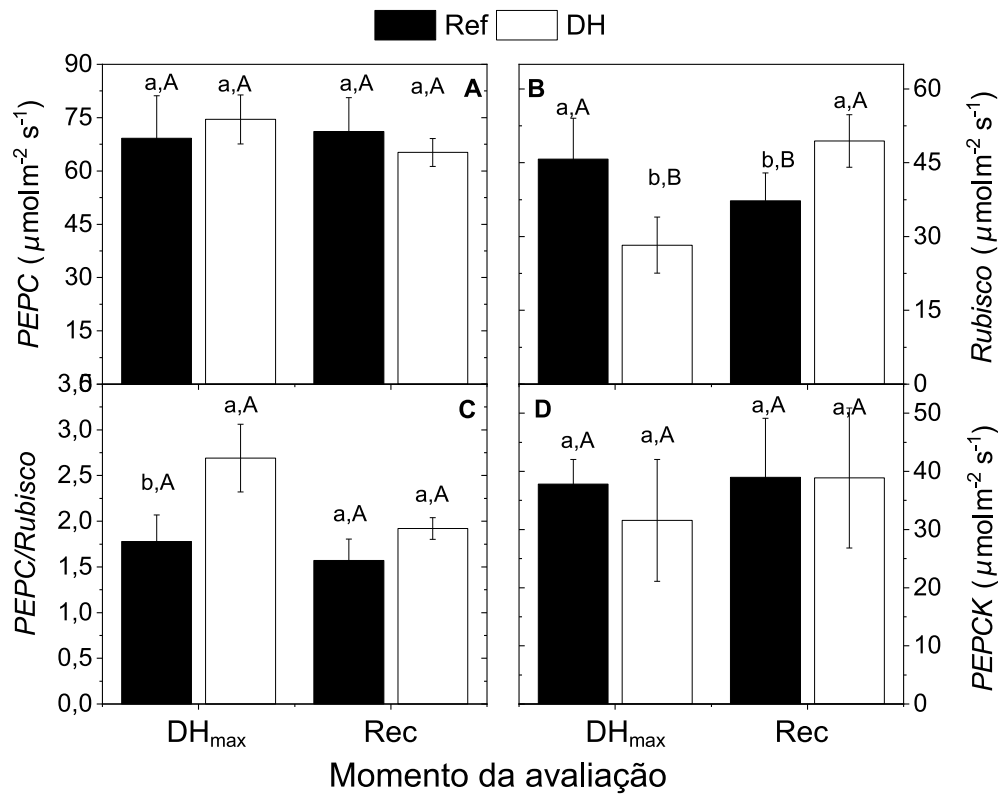


FIGURA 5. Atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (*PEPC*, em A), ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (*Rubisco*, em B), relação *PEPC/Rubisco* (em C) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PEPCK*, em D) de plantas de cana-de-açúcar mantidas hidratadas (Ref) e submetidas ao déficit hídrico (DH). As medidas foram realizadas após 15 dias de suspensão da rega (DH_{max}) e 6 dias após a reidratação do substrato (Rec). Letras minúsculas comparam os momentos de avaliação (DH vs. Rec) sob o mesmo regime hídrico e as letras maiúsculas os tratamentos (Ref vs. DH) em um dado momento. Valores médios (n=4) comparados pelo teste de Tukey <0,05).

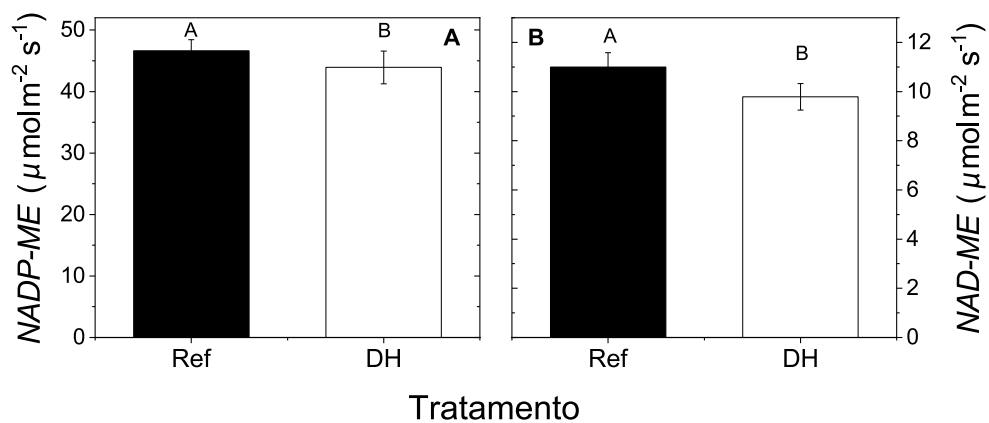


FIGURA 6. Atividades das enzimas NADP-málica (*NADP-ME*, em A) e NAD-málica (*NAD-ME*, em B) de plantas de cana-de-açúcar mantidas hidratadas (Ref) e submetidas ao déficit hídrico (DH). Não foram encontradas diferenças significativas induzidas pelo momento de avaliação e os dados foram agrupados. Letras maiúsculas comparam os tratamentos (Ref vs. DH). Valores médios (n=8) comparados pelo teste de Tukey <0,05).



déficit hídrico. Todavia, o fator limitante da fotossíntese é a redução da atividade da *Rubisco* e consequente inabilidade das plantas em refixar o CO₂ liberado pelo mecanismo de concentração de CO₂.

O aumento do vazamento tem como consequência o aumento do custo energético da fotossíntese uma vez que houve a necessidade de duas moléculas de *ATP* para a regeneração da *PEP*, o aceptor primário do CO₂ nas células de mesofilo (FURBANK, 2011). Este aspecto seria mais uma consequência negativa da deficiência hídrica, que reduziu as atividades de *NADP-ME* e de *NAD-ME*, sem alterar a atividade da *PEPCK* (Figuras 5 e 6). A manutenção da atividade de *PEPCK* poderia favorecer o balanço energético da fotossíntese em condições limitantes (SALES et al., 2018), uma vez que o fornecimento direto de *PEP* via *PEPCK* utiliza menos energia (*ATP*) se comparado com as vias em que *NAD-ME* e *NADP-ME* predominam. Nesse último caso, a regeneração de *PEP* seria realizada por intermédio da enzima piruvato ortofosfato diquinase (*PPDK*) e utilizaria duas moléculas de *ATP* por CO₂ fixado (FURBANK, 2011).

A atividade fotoquímica é essencial para o suprimento de *NADPH* e *ATP* para as reações de fixação do CO₂ e a deficiência hídrica reduziu drasticamente essa capacidade de suprimento energético e de poder redutor em cana-de-açúcar (Figura 3). Todavia, os danos fotoquímicos ocasionados pela baixa disponibilidade de água foram revertidos após a reidratação das plantas (Figura 3) e as plantas recuperaram a capacidade de assimilação de CO₂ (Figura 2A). Um dos mecanismos fotoprotetores identificados foi o aumento da extinção não-fotoquímica da fluorescência (*NPQ*) sob déficit hídrico (Figura 4), que representa o aumento da dissipação do excesso de energia de excitação no fotossistema II pela formação de calor, uma reação fisiológica em situações de queda do uso de elétrons na fixação de CO₂ (BAKER, 2008).

Encontramos atividade das três descarboxilases *NADP-ME*, *NAD-ME* e *PEPCK* em plantas de cana-de-açúcar, independente do regime hídrico (Figuras 5D e 6). *NADP-ME* e *PEPCK* apresentaram atividades semelhantes enquanto que a *NAD-ME* apresentou uma contribuição menor para a atividade global de descarboxilação (Figuras 5D e 6), confirmando os resultados observados por Sales e colaboradores (2018) e Caceto e colaboradores (2019). Em plantas bem irrigadas, a contribuição relativa das enzimas *NADP-ME*, *PEPCK* e *NAD-ME* para a descarboxilação total foi 48%, 39% e 12%, respectivamente. Esses valores foram semelhantes aos observados sob deficiência hídrica, ou seja, 44%, 43% e 12%. Dessa forma, *PEPCK* aumentou a sua contribuição sob deficiência hídrica, passando de 39% para 43%. A flexibilidade entre as vias de descarboxilação também já foi descrita em outras espécies C₄ (FURBANK, 2011; PICK et al, 2011; BELLASIO e GRIFFITHS, 2014a,b,c; SHARWOOD et al, 2014). Apesar da *NAD-ME* apresentar a menor atividade, ela é fundamental para a via de descarboxilação da *PEPCK*. Na mitocôndria, a atividade da *NAD-ME* cataliza a descarboxilação do malato, formando piruvato e CO₂ e gerando *NADH*, o qual é utilizado para a fosforilação oxidativa. O *ATP* produzido é consumido pela *PEPCK* na reação de descarboxilação do oxalacetato à *PEP*, com liberação de CO₂ no citosol das células da *BFV* (FURBANK, 2011). Em relação a cana-de-açúcar, também há indicações indiretas a partir da expressão dos genes de *PEPCK* e de *NADP-ME* nas células da *BFV* (CALSA JR e FIGUEIRA, 2007), mas não da *NAD-ME*. A presença de mais de uma via de

descarboxilação pode ser vantajosa para a aclimação de espécies C₄ as variações das condições ambientais (FURBANK, 2011; BELLASIO e GRIFFITHS, 2014b; SHARWOOD et al., 2014; SALES et al., 2018, CACETO et al., 2019).

Os nossos resultados sugerem que a principal enzima limitadora da fixação de CO₂ sob deficiência hídrica em cana-de-açúcar é a *Rubisco* (Figura 5B). Embora ocorra uma queda significativa das atividades da *NADP-ME* e *NAD-ME*, a descarboxilação total excede à capacidade de utilização de CO₂ pela *Rubisco* em condição de déficit hídrico e assim a menor atividade desta enzima não seria motivada pela baixa concentração de CO₂ nas células da bainha do feixe vascular.

CONCLUSÃO

- 1) O processo de descarboxilação nas células da *BFV* da cana-de-açúcar – etapa fundamental do mecanismo de concentração de CO₂ em plantas C₄ – ocorre com a participação das enzimas *NADP-ME*, *NAD-ME* e *PEPCK*.
- 2) Embora o decréscimo da fotossíntese devido à deficiência hídrica tenha sido associado à redução da atividade fotoquímica e menor abertura estomática e suprimento de CO₂ nas células do mesofilo, podemos argumentar que a capacidade da *PEPC* em suprir o substrato para descarboxilação não foi comprometida. Sob deficiência hídrica e com o menor suprimento de produtos da atividade fotoquímica, como *ATP* e *NADPH*, houve uma modulação das enzimas envolvidas na descarboxilação, com redução das atividades da *NADP-ME* e *NAD-ME* e a manutenção da atividade da *PEPCK* – uma via com menor custo energético.
- 3) Assumindo que o suprimento de CO₂ para a *Rubisco* foi mantido – indicado pelo aumento da razão *PEPC/Rubisco* e pela atividade de descarboxilação total – a redução da atividade carboxilase da *Rubisco* foi a principal limitante metabólica da fotossíntese em cana-de-açúcar sob déficit hídrico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Projeto Temático 2008/57495-3), bem como a Bolsa FAPESP para DFSPM (2014/12969-9). ECM e RVR também agradecem as bolsas concedidas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, #311345/2019-0, #304295/2022-1).

REFERÊNCIAS

- ASLAM, M. M. et al. Mechanisms of abscisic acid-mediated drought stress responses in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 1084, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23031084>.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>.



- BELLASIO, C.; GRIFFITHS, H. Acclimation to low light by C4 maize: implications for bundle sheath leakiness. **Plant, Cell and Environment**, v. 37, p. 1046-1058, 2014a. <https://doi.org/10.1111/pce.12194>.
- BELLASIO, C.; GRIFFITHS, H. The operation of two decarboxylases, transamination, and partitioning of C4 metabolic processes between mesophyll and bundle sheath cells allows light capture to be balanced for the maize C4 pathway. **Plant Physiology**, v. 164, p. 466-480, 2014b. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228221>.
- BELLASIO, C.; GRIFFITHS, H. Acclimation of C4 metabolism to low light in mature maize leaves could limit energetic losses during progressive shading in a crop canopy. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 3725-3736, 2014c. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru052>.
- BORSANI, J. et al. Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1823-1837, 2009. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp055>.
- CACEFO, V. et al. Decarboxylation mechanisms of C4 photosynthesis in *Saccharum spp.*: increased PEPCK activity under water-limiting conditions. **BMC Plant Biology**, v. 19, 144, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1745-7>.
- CALSA JR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum spp.*) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, v. 63, p. 745-762, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9121-z>.
- CHAPMAN, K. S. R.; HATCH, M.D. Regulation of mitochondrial NAD-malic enzyme involved in C4 pathway photosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 184, p. 298-306, 1977. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90354-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90354-x).
- 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. <https://doi.org/10.1023/A:1020127231198>.
- DU, Y. C. et al. Effects of water stress on carbon exchange rate and activities of photosynthetic enzymes in leaves of sugarcane (*Saccharum sp.*). **Functional Plant Biology**, v. 23, p. 719-726, 1996. <https://doi.org/10.1071/PP9960719>.
- FOYER, C. H. et al. 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. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.283>.
- FURBANK, R. T.; LEEGOOD, R. C. Carbon metabolism and gas exchange in leaves of *Zea mays* L. Interaction between the C3 and C4 pathways during photosynthesis induction. **Planta**, v. 162, p. 457-462, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF00393459>.
- FURBANK, R. T. Evolution of the C4 photosynthetic mechanism: are there really three C4 acid decarboxylation types? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 3103-3108, 2011. <https://doi.org/10.1093/jxb/err080>.
- GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, p. 103:635-644, 2009. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn093>.
- KAUFMANN, M.R. Evaluation of the pressure chamber method for measurement of water stress in citrus. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 93, p. 186-190, 1968.
- KROMDIJK, J. et al. Bundle sheath leakiness and light limitation during C4 leaf and canopy CO₂ uptake. **Plant Physiology**, v. 148, p. 2144-2155, 2008. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129890>.
- LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCÓNCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 101-155.
- LUNN, J. E.; FURBANK, R. T. Sucrose biosynthesis in C4 plants. **New Phytologist**, v. 143, p. 221-237, 1999. <https://www.jstor.org/stable/2588569>.
- MACHADO, R. S. et al. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1575-1582, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009001200003>.
- MARTÍN, M.; RIUS, S. P.; PODESTÁ, F. E. Two phosphoenolpyruvate carboxykinases coexist in the Crassulacean Acid Metabolism plant Ananas comosus. Isolation and characterization of the smaller 65 kDa form. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 646-653, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.015>.
- MAURINO, V. G. et al. NADP-malic enzyme: immunolocalization in different tissues of the C4 plant maize and the C3 plant wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 799-811, 1997. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.3.799>.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.
- PICK, T. R. et al. Systems analysis of a maize leaf developmental gradient redefines the current C4 model and provides candidates for regulation. **The Plant Cell**, v. 23, p. 4208-4220, 2011. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090324>.
- REID, C.D. et al. Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 398-404, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01014.x>.
- SAGE, R. F.; 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. <https://www.jstor.org/stable/23379276>.
- SALES, C. R. G. et al. Flexibility of C4 decarboxylation and photosynthetic plasticity in sugarcane plants under shading. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 34-42, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.027>.

SCALES, J. C.; PARRY, M. A.; SALVUCCI, M. E. A non-radioactive method for measuring Rubisco activase activity in the presence of variable ATP: ADP ratios, including modification for measuring the activity and activation state of Rubisco. **Photosynthesis Research**, v. 119, p. 355-365, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9964-5>.

SHARKEY, T. D.; SEEMANN, J. R.; BERRY, J. A. Regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changing partial pressure of O₂ and light in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 81, p. 788-791, 1986. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.788>.

SHARKEY, T. D.; SEEMANN, J. R. Mild water stress effects on carbon-reduction-cycle intermediates, ribulose bisphosphate carboxylase activity, and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. **Plant Physiology**, v. 89, p. 1060-1065, 1989. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1060>.

SHARWOOD, R. E.; SONAWANE, B. V.; GHANNOUM, O. Photosynthetic flexibility in maize exposed to salinity and shade. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 3715-3724, 2014. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1060>.

TOFANELLO, V.R. et al. Role of bundle sheath conductance in sustaining photosynthesis competence in sugarcane plants under nitrogen deficiency **Photosynthesis Research**, v. 149, p. 275-287, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00848-w>.

TRONCONI, M. A. et al. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 21-26, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.06.001>.

VON CAEMMERER, S.; FURBANK, R. T. The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. **Photosynthesis Research**, v. 77, p. 191-207, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1025830019591>.

WISE, R. R. et al. Investigation of the limitations to photosynthesis induced by leaf water deficit in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant, Cell and Environment**, v. 13, p. 923-931, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01982.x>.

