



VIVIANE CRISTINA DE OLIVEIRA

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUTUAÇÃO
DE DISCOS FOLIARES EM CANA-DE-AÇÚCAR**

LAVRAS – MG

2015

VIVIANE CRISTINA DE OLIVEIRA

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUTUAÇÃO DE DISCOS FOLIARES
EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - Mestrado Profissional, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Lisete Chamma Davide

Coorientadora

Dra. Anne-Marrie Kuijpers

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Viviane Cristina de.

Adaptação da técnica de flutuação de discos foliares em cana-de-
açúcar / Viviane Cristina de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2015.

52 p. : il.

Dissertação(mestrado profissional)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Fotossínteses. 3. Estresse hídrico. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

VIVIANE CRISTINA DE OLIVEIRA

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUTUAÇÃO DE DISCOS FOLIARES
EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - Mestrado Profissional, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de julho de 2015.

Dr. José Airton Rodrigues Nunes UFLA

Dra. Cynthia de Oliveira

Dra. Lisete Chamma Davide
Orientadora

LAVRAS – MG

2015

Dedico e Ofereço

A Deus, razão de tudo o que sou e que faço.

Ao meu noivo Ricardo pelo amor, apoio, companheirismo, suporte emocional e sacrifícios.

A minha prima irmã Vanessa pelo incentivo para a realização deste trabalho e em tudo que faço na minha vida.

Aos meus pais, pelo amor em que fui criada e educada.

Certamente sem vocês essa conquista seria mais difícil ou inexistente

Obrigada, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras - UFLA pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - Mestrado Profissional- que possibilitou que em meio a nossa vida profissional pudéssemos ter a oportunidade de ampliar nosso conhecimento e área profissional.

À Empresa Centro de Tecnologia Canavieira pela oportunidade da realização deste trabalho.

A minha orientadora Lisete Chamma Davide pela paciência entre as diferentes propostas de projetos e mudanças que ocorreram durante minha trajetória no mestrado e pelas orientações, ensinamentos e realização deste projeto.

A minha Coorientadora Anne-Marie Kuijpers pela oportunidade, suporte, confiança e credibilidade para a idealização deste trabalho.

À amiga Luciane Gauer, peça fundamental por mais essa conquista na minha vida.

Ao Paul Moore por compartilhar sua sabedoria e me ajudar a levantar as hipóteses que me levaram a desenvolver e concluir este projeto.

Ao Éder pelas ideias, sugestões, orientações e incentivo.

Às amigas Raquel e Marcela que me ajudaram na realização desse trabalho. Obrigada pelo, incentivo, paciência, conforto e pela nossa amizade.

À Patrícia, Ingrid, Erick e Flávia, amigos que sempre me incentivaram e torceram pelo meu sucesso. Apesar da distância vocês continuam fazendo parte dos meus dias.

As minhas parceiras e amigas Ana Rizzato, Maria Luiza e Maria Stella que desde o início estão comigo nesta jornada. Obrigada pelas nossas risadas,

pelas nossas longas e intensas horas de estudos e contribuição durante este período do mestrado.

Às amigas, Layra, Mayra e Verusca pelo incentivo e ajuda sempre que necessário, pelos ensinamentos e orientações.

Ao meu professor de Inglês Ivan Peron que dedicou várias das nossas aulas para entender a complexa reação da fotossíntese.

À minha prima Giovana que sempre que necessário esteve ao meu lado.

À Edjane e ao Markus, estatísticos incríveis, que me ajudaram a desfrutar do uso da estatística e assim encontrar as respostas para as hipóteses deste projeto.

Ao Silvio pela disponibilidade das plantas e ainda pelas explicações sobre desenvolvimento vegetal e as fases do melhoramento genético.

Meus sinceros agradecimentos

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) produzida hoje é resultado de diversas melhorias genéticas feitas nos programas de melhoramento genético de plantas. Entre os objetivos dos programas de melhoramento, atualmente o foco está em obter variedades com potencial de se adaptar a regiões caracterizadas pelo longo período de estresse hídrico. A fase de avaliação nos programas é de extrema importância, pois permite, através de critérios de avaliação bem definidos, obter dados consistentes, aumentando a confiabilidade dos resultados para subsidiar no *screening* e avanço das variedades para novas etapas dentro dos programas. Porém, os métodos de avaliação utilizados para identificar plantas tolerantes ou suscetíveis ao estresse hídrico possuem algumas desvantagens como: alto custo, inviabilidade de implementação de estrutura requerida na metodologia e especificidades da cultura como a altura, que limita o período de avaliação em determinados locais. Muitas vezes esses fatores não foram contemplados dentro de um projeto o que acaba inviabilizando o uso dessas metodologias. Sendo assim, uma opção prática e de baixo custo é a técnica de flutuação de discos foliares utilizada para medir a capacidade fotossintética. O objetivo deste trabalho foi estudar a aplicabilidade e adaptação da técnica de flutuação de discos foliares em cana-de-açúcar na variedade comercial CTC15 no início das fases do programa de melhoramento. Inicialmente foi testada a aplicabilidade da técnica e posteriormente, experimentos foram realizados para adaptação da técnica considerando fatores requeridos no metabolismo fotossintético C₄, ao qual a cana pertence. A técnica também foi aplicada em plantas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) da variedade *Savoy*, espécie de metabolismo fotossintético C₃, para validação da técnica e controle dos experimentos. O delineamento experimental para os três experimentos realizados foi o inteiramente casualizado, sendo que para o experimento de adaptação da técnica, o qual apresentou resultado, foi utilizado o delineamento fatorial 3 x 2 (temperaturas de 10 - 20°C, 20 - 35°C e 35 - 45°C na intensidade luminosa de 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 74 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os dados foram avaliados pela “análise de sobrevivência”, com procedimento de Kaplan-Meier para avaliar a resposta de cada fator testado e depois foi feita uma análise multifatorial utilizando o método de Cox Proportional Hazards Regression Analyses (função *coxph*). A técnica apresentou aplicabilidade para a variedade de cana-de-açúcar após adaptação dos procedimentos utilizando-se temperaturas de 20 - 35°C e 35 - 45°C e intensidade luminosa de 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, condições específicas para metabolismo C₄.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. *Saccharum* ssp.. Estresse hídrico. Fotossíntese. Melhoramento genético.

ABSTRACT

The sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) produced nowadays is the result of several genetic improvements made by means of breeding programs. Among the objectives of these programs, one of the most important is obtaining varieties capable of adapting to regions with long periods of drought. The evaluation phase is of extreme importance, given that it allows us to obtain consistent data by using well established evaluation criteria, thus, increasing the reliability of the results and, consequently, assisting in screening and other stages of the program. However, the evaluation methods available for identifying plants tolerant or susceptible to drought present some disadvantages, such as high cost, unfeasible implementation and crop specificities (eg height). These are limiting points for the evaluations in some of the regions. These facts are frequently not included in the project, making the use of these methodologies impracticable. Therefore, one easy and low cost technique that can be applied is the leaf roll floating methodology, used for evaluating the photosynthetic capability of the plant. The objective of the present work was to study the applicability and adaptation of the floating leaf discs technique for the commercial sugarcane variety CTC 15, during the initial phases of the breeding program. First, we tested the applicability of the technique, later, experimenting to achieve a protocol adaptation focusing on C₄ photosynthetic systems, the metabolic pathway for sugarcane. The technique was also tested on spinach plants (*Spinacea oleracea*), a C₃ photosynthetic system plant, validation and as experiment control. The experimental design used for all three experiments was completely randomized. For the protocol adaptation experiment, with positive result, we used a 3 x 2 full factorial design (temperature range of 10 - 20°C, 20 - 35°C e 35 - 45°C, and light intensity of 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 74 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The collected data were evaluated by survival rates, using the Kaplan-Meier procedure for analyzing the response of each tested factor. Subsequently, we performed a multifactorial analysis using the Cox Proportional Hazards Regression Analyses (coxph function). After protocol adaptation, the tested technique showed to be applicable for this sugarcane genotype in the temperature ranges of 20-35°C and 35-45°C, and light intensity of 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which are specific conditions for C₄ plants.

Keywords: Sugarcane. *Saccharum officinarum*. Drought stress. Photosynthesis. Genetic improvement.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Áreas de produção de cana-de-açúcar no Brasil16
Figura 2	Numeração das folhas de cana-de-açúcar segundo o sistema de Kuijper27
Figura 3	Discos foliares infiltrados com solução de bicarbonato de sódio (como fonte de CO ₂). A solução preenche os espaços intercelulares e os discos foliares afundam. Pela reação de fotossíntese, O ₂ é produzido e fica retido nos tecidos que tendem a flutuar.....30
Figura 4	Procedimentos da técnica de discos foliares flutuantes. Discos foliares de 6 mm de diâmetro de <i>Spinacia oleracea</i> (A); os discos são infiltrados com bicarbonato de sódio (B); vácuo aplicado onde os discos tendem a afundar na solução (C); discos foliares expostos a luz (D); os discos começam a flutuar indicando a ocorrência de fotossíntese (E); Controle recipiente com água (F)36
Figura 5	Resposta de flutuação dos discos foliares dos experimentos com diferentes intensidades luminosas. (A e B) considerando intensidade luminosa (DFFFA) 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (A) flutuação de discos foliares em <i>Spinacia oleracea</i> (B) não houve flutuação de discos foliares em <i>Saccharum</i> spp.. (C e D) considerando intensidade (DFFFA) 108 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com lâmpadas de LED, (C) <i>Spinacia oleracea</i> novamente apresentou flutuação dos discos foliares e (D) <i>Saccharum</i> spp. não apresentou flutuação dos discos foliares39

Figura 6	Exemplo de análise inicial realizada com cada fator testado através do procedimento Kaplan-Meier. Análise realizada com a espécie <i>Saccharum</i> spp. considerando a intensidade luminosa (DFFFA) $74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avaliando o comportamento de flutuação dos discos para diferentes temperaturas.....	40
Figura 7	Análise multifatorial da flutuação dos discos foliares considerando cana-de-açúcar e espinafre (espécies <i>Saccharum</i> spp. e <i>Spinaceae oleracea</i>) nas condições testadas de intensidade luminosa e temperatura durante 10 minutos de observação	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tratamentos de diferentes temperaturas e intensidades luminosas testadas entre as espécies <i>Saccharum</i> spp. e <i>Spinacea oleracea</i>33
Tabela 2	Análise multifatorial avaliando o efeito dos fatores experimentais sobre a flutuação41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Cana-de-açúcar: importância e o melhoramento genético	15
2.2	Fotossíntese: metabolismo C₃ e C₄	20
2.3	A influência dos fatores ambientais nos sistemas C₃ e C₄	23
2.3.1	Efeitos da temperatura	23
2.3.2	Efeitos da intensidade luminosa	24
2.3.3	Influência da concentração de CO₂ na fotossíntese	25
2.4	As diferenças da morfologia e da anatomia foliar entre os metabolismos fotossintéticos	26
2.5	Estresse hídrico e métodos de avaliação	27
2.6	Técnica de flutuação de discos foliares	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e apresentou grande expansão nas últimas três décadas do século XX. A cana é uma cultura de importância mundial, não apenas para a produção de açúcar e álcool, mas também como uma das culturas bioenergéticas (PINCELLI, 2010; SILVA, 2010).

Devido ao interesse global e à alta demanda pelos seus produtos para atender o mercado está sendo necessário expandir o seu cultivo para novas regiões, porém essas novas regiões são áreas caracterizadas por longos períodos de estresse hídrico, sendo esse estresse ambiental um dos fatores que mais impacta na produção da cana-de-açúcar (SILVA; SOARES; LANDELL, 2008).

Uma das opções para amenizar os problemas ocasionados pelo estresse hídrico é realizar o plantio de novas variedades, proveniente dos programas de melhoramento genético, com potencial de se adaptarem a essas novas regiões caracterizadas pelo estresse hídrico.

Algumas metodologias são utilizadas para avaliar a resposta das plantas diante da limitação da água e assim identificar variedades que sejam tolerantes ou suscetíveis ao estresse hídrico, sendo algumas das metodologias a fluorescência da clorofila, medição da temperatura da folha e avaliação de parâmetros fisiológicos como de troca gasosas (CLAYES; INZÉ, 2013; SILVA et al., 2007). O uso de determinadas metodologias disponíveis atualmente apresenta algumas desvantagens como: o alto custo dos equipamentos, inviabilidade na implementação da estrutura para aplicar a metodologia e a própria especificidade da cultura como exemplo a altura das plantas que pode inviabilizar as avaliações em locais de cultivo como em estufas, comprometendo assim o término das avaliações.

Uma opção que apresenta um baixo custo e praticidade na sua aplicação é a técnica de flutuação de discos foliares. A funcionalidade desta técnica é baseada na reação fotossintética, utilizando no procedimento fatores envolvidos no metabolismo fotossintético como concentração de CO₂, temperatura e intensidade luminosa (STEUCEK; HILL, 1985; WICKLIFF; CHASSON, 1964).

Essa técnica pode ser utilizada com diferentes objetivos, entre eles, a possibilidade de medir capacidade fotossintética de plantas que passaram pelo processo de transgenia e supostamente possuem genes de tolerância ao estresse hídrico. No caso da cana-de-açúcar, a funcionalidade desta técnica será de grande importância nas avaliações realizadas no início da fase do melhoramento genético para identificar plantas que sejam tolerantes ou suscetíveis ao estresse hídrico. Seu emprego poderá agregar mais resultados que permitirão comparar e estudar a resposta dessas plantas com outros resultados que serão realizados durante as demais fases do programa e assim contribuir para futuras tomadas de decisões no *screening* de variedades nos projetos de seca.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi testar a aplicabilidade e adaptação da técnica de flutuação de discos foliares na cultura de cana-de-açúcar para medir a capacidade fotossintética das plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cana-de-açúcar: importância e o melhoramento genético

A cana-de-açúcar é semi-perenética de climas tropicais e subtropicais. Inicialmente foi descrita por Linneu em 1753, que a classificou como *Saccharum officinarum*, posteriormente outras formas de classificações foram feitas. Seguindo a classificação botânica APGIII (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009), a cana-de-açúcar pertence à família *Poaceae*, gênero *Saccharum*, cujas espécies são *S.officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinensis*, *S. barberi* e *S. robustum*, *S. arrundinaceum*, *S. bengalense*, *S.edule*, *S. procerum* e *S. rorennae*.

Originária da Nova Guiné, a cana-de-açúcar foi levada ao Sul da Ásia sendo primeiramente utilizada em forma de xarope. O primeiro relato do seu uso como açúcar em forma sólida é datado no ano de 500 na Pérsia (SEGATO; PINTO; NOBREGA, 2006).

No Brasil, a cana foi introduzida em 1515 por Martin Afonso de Souza que trouxe mudas da Ilha da Madeira. A primeira espécie introduzida no Brasil foi a *S. officinarum* L., reconhecida como cana nobre ou tropical devido às características de porte elevado, colmo grosso, alto teor de açúcar e pouco teor de fibras, onde foi cultivada durante os três primeiros séculos da colonização (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2008).

Neste mesmo período da colonização somente a variedade Creoula, Crioula ou Mirim foi mencionada, porém, devido a sua suscetibilidade a várias doenças começou a apresentar problemas em seu cultivo. Em meados de 1810 esta variedade foi substituída pela cana Caiana considerada uma variedade mais produtiva e rica em sacarose que proporcionou ganhos significativos para a indústria açucareira no Brasil (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS;

LANDELL, 2008). Devido ao surgimento de problemas fitossanitários foi necessária a busca por novas variedades através de contínuos cruzamentos entre as espécies, o que ocasionou o surgimento dos programas de melhoramento (BARBOSA; SILVEIRA, 2012; DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2008). A cana-de-açúcar hoje comercialmente utilizada, produto desses diversos cruzamentos interespecíficos, é identificada cientificamente como *Saccharum* spp.

A produção de cana-de-açúcar ocupa uma das maiores áreas de cultivo concentrada nas regiões Sudeste e Nordeste (Figura 1), (PINCELLI, 2010; UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2015).

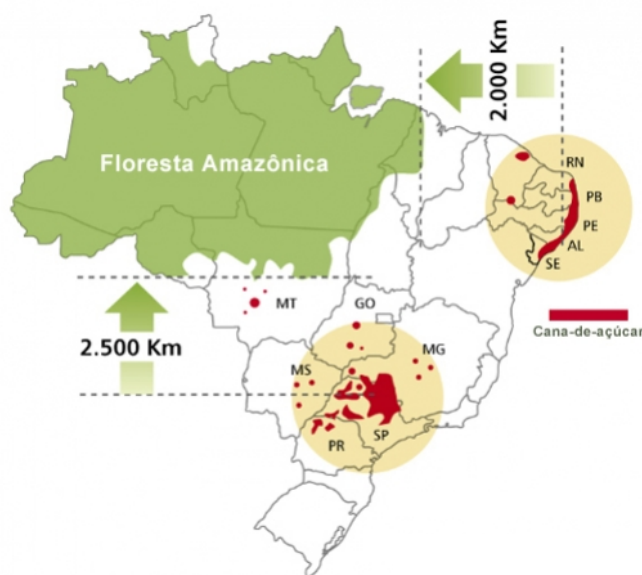


Figura 1 Áreas de produção de cana-de-açúcar no Brasil

Fonte: União da Indústria da Cana-de-açúcar (2015).

O principal uso da cana-de-açúcar é como matéria-prima para a produção de açúcar, álcool etílico proveniente da fermentação do açúcar, sendo

uma opção energética no mundo do petróleo e como subproduto para a cogeração de energia elétrica a partir da queima do bagaço (SANDOVAL; SENÔ, 2010; SCARAMUCCI et al., 2006).

O interesse global na cultura de cana-de-açúcar tem aumentado nos últimos anos devido ao seu impacto econômico, sendo o Brasil o maior produtor de cana do mundo com cerca de 7,5 milhões de hectares cultivados (CHEAVEGATTI-GIANOTTE et al., 2011).

Devido ao interesse e à alta demanda pela cultura, é necessária a expansão da sua produção, porém seu cultivo está se expandindo para regiões caracterizadas por áreas de pastagens degradadas com solos menos férteis, com baixa capacidade de retenção de água e com longos períodos de estresse hídrico (CARVALHO; FURTADO, 2013).

O estresse hídrico é o principal fator responsável pela redução da produtividade dos cultivares, influenciando de forma negativa no desenvolvimento dos cultivos agrícolas podendo ocasionar maior ou menor impacto conforme a fase fenológica da planta (MACHADO et al., 2009; PIMENTEL, 2004).

Segundo Segato, Pinto e Nobrega (2006), o ciclo fenológico da cana-de-açúcar necessita de ciclos com períodos quentes e úmidos para brotar, emergir e perfilhar e outros relativamente secos ou de frio para maturar e obter uma colheita rentável. Fatores ambientais adversos a estas condições podem alterar o ciclo fenológico da cultura, por exemplo, à ocorrência de estresse hídrico em qualquer um dos quatro estádios fenológicos, pode causar alterações no desenvolvimento da planta, no crescimento e na taxa de fotossíntese (DIOLA; SANTOS, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013; TERAMOTO, 2003).

Conforme mostram os dados no Quadro 1, desde o ano de 2008 até o ano de 2014 em várias regiões do Brasil há relatos de perda na produtividade da

cultura de cana-de-açúcar devido ao período de seca, onde foi registrada a ocorrência de chuva abaixo da expectativa.

Ano	Região	(%) Perda de produtividade	Chuva (mm H ₂ O) /% expectativa chuva
2008	São Paulo	6.3% --- (Castro, 2008)	420 / 49%
2010	Zona da Mata (Pernambuco)	40% --- (Cavalcanti, 2010)	300 / 50%
2012	Alagoas	20% --- (Sindaçucar, 2012)	774 / 48.6%
2012	Pernambuco	35% --- (Camarotto, 2012)	629 / 50.7%
2013	Paraíba	31% --- (Silva, 2013)	0 / 58.7%
2013	Zona da Mata	25% --- (Brasilagro, 2013)	821 / 48.7%
2014	Ribeirão Preto (Estado SP)	15% --- (Palhares, 2014)	480 / 51.6%

Quadro 1 Perda de produtividade de cana-de-açúcar nas regiões do Brasil ocasionado por período de seca

Fonte: Gentile et al. (2015).

A continuidade da expansão do cultivo da cana-de-açúcar de forma produtiva no Brasil depende do uso tecnológico para desenvolver variedades que se adaptem aos solos e às condições climáticas das novas regiões (CARVALHO; FURTADO, 2013). Sendo assim, uma opção para contornar os problemas ocasionados pelo estresse hídrico nessas regiões é a utilização de genótipos com capacidade de se adaptarem com condições de deficiência hídrica (SINGH; REDDY, 1980).

Novas variedades portadoras de genes capazes de expressar alta produtividade, melhor qualidade, alta adaptabilidade e variedades que sejam resistentes ou tolerantes a fatores adversos podem ser provenientes dos programas de melhoramento de plantas (NOBREGA; DORNELAS, 2006).

A utilização do melhoramento genético para obtenção de novas variedades de cana-de-açúcar é bastante antiga. A domesticação da cana tem sido relatada desde sua origem na Nova Guiné, onde o principal objetivo era buscar variedades que apresentassem maior teor de sacarose. A importância do melhoramento genético a partir de 1880 foi creditada pelo surgimento de inúmeras doenças. Com a necessidade de diminuir os problemas fitossanitários foram utilizados cruzamentos interespecíficos envolvendo *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi* e *S. sinense* (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2008), que ocasionou uma significativa alteração no ideotipo varietal. Plantas que antes não apresentavam capacidade de perfilhamento passaram a perfilhar, como também passaram a apresentar grande habilidade de brotação após o seu corte. Colmos que apresentavam diâmetro excessivo e baixo teor de fibra passaram a apresentar média espessura, com valores médios e altos de fibra (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2008; REAME, 2013).

O melhoramento genético tem contribuído nos últimos 30 anos para o aumento na produção de cana-de-açúcar (CHEAVEGATTI-GIANOTTE et al., 2011). Programas de melhoramento possibilitam obter novo cultivar, entre diferentes culturas, que apresente maior produtividade, com resistência a pragas e doenças e também atendendo às necessidades e interesses dos agricultores e consumidores (RAMALHO et al., 2010).

Atualmente entre os objetivos dos programas de melhoramento devem ser considerados os efeitos da mudança climática para desenvolver novas variedades que apresentem potencial de suportarem temperaturas mais elevadas e serem mais resistentes ao estresse hídrico (CARVALHO; FURTADO, 2013).

2.2 Fotossíntese: metabolismo C₃ e C₄

De modo geral através da fotossíntese as plantas convertem energia luminosa em energia química que é utilizada para a síntese de carboidratos que são usados na manutenção das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Existem dois tipos de metabolismos fotossintéticos, o metabolismo C₃ e C₄. A diferença de denominação de C₃ e de C₄ está relacionada com o número de átomos de carbono que se encontra no primeiro produto estável da fixação do CO₂ (PIMENTEL, 1998; WANG; CZEDIK-EYSENBERG; MERTZ, 2014). Nas plantas C₃ o primeiro produto da cadeia assimilatória da fotossíntese é o 3-fosfoglicerato (3-PGA), uma molécula com três carbonos (KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014). Enquanto que nas plantas C₄, o sistema fotossintético produz uma molécula de quatro carbonos, o oxaloacetato (GHANNOUM, 2009).

A rota fotossintética do metabolismo C₃ ocorre nas células do mesófilo e basicamente ocorrem em três estágios, carboxilação, redução e regeneração. O ciclo inicia com a carboxilação, quando a enzima ribulose-1,5-bifosfato, a RUBISCO, forma duas moléculas de 3-fosfoglicerato sendo este o primeiro produto estável do Ciclo de Calvin. Então no estágio de redução, o 3-fosfoglicerato é reduzido em carboidratos de 3 carbonos (triosesfosfato). Posteriormente, ocorre a redução da ribulose-1, 5-bifosfato por uma série de reações que é regenerada para a assimilação contínua de CO₂ (TAIZ; ZEIGER, 2013; RAVEN et al., 2007).

A enzima RUBISCO também possui uma atividade de oxigenase, processo conhecido como fotorrespiração onde as moléculas de O₂ e CO₂ competem entre si pelo mesmo substrato ribulose-1,5-bifosfato (OGREN, 1984). Então a enzima RUBISCO tanto pode fixar o CO₂ atmosférico quanto o O₂. Na fotorrespiração fixando o O₂ forma 1-fosfoglicerato e 2-fosfoglicolato. O fosfoglicolato em altas quantidades acaba sendo prejudicial para a planta se

tornando tóxico para as células. As plantas então por uma série de reações convertem o fosfoglicolato em 3-fosfoglicerato, ou seja, o primeiro produto estável do ciclo de Calvin, recuperando 75% do C que entram na fotorrespiração (MOORE; BOTHA, 2014; KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O metabolismo fotossintético C_4 é um sistema derivado da rota fotossintética C_3 , que ocorreu durante o processo evolutivo, sendo C_3 o mecanismo mais antigo de fotossíntese presente nas primeiras plantas terrestres (HOHMANN-MARRIOT; BLANKENSHIP, 2011; SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011).

Em vários gêneros vêm sendo descobertas espécies chamadas de intermediárias, ou seja, espécies que apresentam características intermediárias entre o sistema fotossintético C_3 e C_4 . Essas espécies intermediárias são caracterizadas pela anatomia foliar Kranz e apresentam limitação de fotorrespiração (RAVEN et al., 2007). A existência de fotossíntese do tipo C_4 em células de algumas plantas com metabolismo C_3 sugere que são poucas as modificações necessárias para a evolução da fotossíntese C_4 através do metabolismo C_3 . Essa evidência indica a evolução do metabolismo C_4 pela rota C_3 , através da regulação e especificidade de tecido e das enzimas, tornando esses mecanismos ativos no sistema C_4 sendo antes inativos no sistema C_3 (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O ciclo fotossintético C_4 basicamente ocorre em três estágios. No primeiro estágio ocorre fixação do CO_2 pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) nas células do mesófilo, formando o malato que posteriormente é transportado das células do mesófilo para a bainha do Kranz, onde ocorre a descarboxilação dos ácidos C_4 . No segundo estágio, ocorre a redução do CO_2 em carboidrato através do ciclo de Calvin e no terceiro estágio, o ácido pirúvico ou alanina, formada durante a descarboxilação, volta à célula do

mesofilo onde ocorre a regeneração do acceptor CO_2 fosoenolpiruvato (LOPES, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Uma das vantagens das plantas C_4 em relação às C_3 é que o mecanismo C_4 é concentrador de CO_2 , fazendo com que seja maior que a concentração de O_2 , que limita a fotorrespiração, a qual não é aparente. Isso ocorre porque o CO_2 fixado pela via C_4 é bombeado do mesofilo para dentro das células de bainha do Kranz, mantendo uma alta razão de CO_2 em relação a O_2 no sítio da RUBISCO, favorecendo a carboxilação da Ribulose 1,5 bifosfato (LOPES, 2003). Além disso, o ciclo de Calvin e a fotorrespiração, estando localizado no interior da bainha do Kranz, qualquer CO_2 liberado pela fotorrespiração para o exterior do mesofilo pode ser refixado pela via C_4 , evitando a perda de CO_2 por esse processo (fotorrespiração) (LOPES, 2003).

A cana-de-açúcar é uma espécie que pertence ao metabolismo fotossintético C_4 . Plantas que possuem o metabolismo C_4 são caracterizadas por apresentarem maiores taxas fotossintéticas, captação do CO_2 atmosférico, eficiência do uso da água e do uso do nitrogênio, apresentando adaptabilidade a altas temperaturas e intensidades luminosas (RIBEIRO, 2012; SEGATO; PINTO; NOBREGA, 2006). Devido a estas características a cana-de-açúcar é uma espécie ideal para ser cultivada em regiões tropicais (MOORE; BOTHA, 2014).

Foram Hatch e Slack (1966) que iniciaram a descoberta da rota C_4 quando observaram uma alta concentração de malato e aspartato nas folhas de cana-de-açúcar após o processo fotossintético, identificando que a cana-de-açúcar fixa o CO_2 em um ácido orgânico de 4 carbonos, o malato, nas células do mesofilo das folhas, o qual é transportado para as células da bainha, onde ocorre o ciclo de Calvin.

Portanto, é devido ao fato de plantas com metabolismo C_4 , como a cana-de-açúcar, possuírem duas enzimas distintas, a RUBISCO e a PEPcase, que

auxiliam na fixação do CO₂, as células da bainha KRAZ, onde ocorre a concentração de CO₂ e a fotorrespiração limitada, que essas plantas são consideradas mais resistentes diante de altas irradiâncias ou de altas temperaturas (DIOLA; SANTOS, 2012; KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014).

2.3 A influência dos fatores ambientais nos sistemas C₃ e C₄

Conforme mencionado por Lopes (2003) a fotossíntese depende de fatores externos, como concentração de CO₂ e O₂, disponibilidade de água e de nutrientes, temperatura e luz além dos fatores intrínsecos às plantas como tamanho, forma e idade das folhas. Os fatores externos podem influenciar negativamente o desenvolvimento das plantas, por exemplo, o desenvolvimento da cana-de-açúcar depende dos fatores climáticos, portanto, variações de temperatura, disponibilidade de água e intensidade de luz influenciam no desenvolvimento da cultura e podem intervir no sistema fotossintético podendo impactar na sua produtividade (KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014; SILVA, 2010).

2.3.1 Efeitos da temperatura

A temperatura é um dos fatores que influencia no sistema fotossintético das plantas podendo ser tanto um fator limitante quanto estimulante (GUERRA et al., 2014).

Kluge, Tezotto-Uliana e Silva (2014) descrevem que a temperatura ótima considerada para plantas com sistema fotossintético C₃ é de 20 - 30°C e para plantas C₄ a temperatura ótima para a fotossíntese é de 30 - 35°C.

As temperaturas elevadas acima do considerado característico para cada cultura podem afetar diferentes processos metabólicos, como inibição da fotossíntese, inibição da síntese proteica, inativação de enzimas e das membranas celulares (GHOSH et al., 1989). Conforme citado por Guerra (2013), em temperatura elevada os estômatos tendem a se fechar, interrompendo o processo da fotossíntese. Períodos relativamente longos que apresentem temperaturas superiores a 34°C podem ocasionar danos às culturas agrícolas.

As baixas temperaturas também influenciam o sistema fotossintético das plantas devido à redução da atividade enzimática da RUBISCO e a instabilidade da enzima PEPcase do ciclo C₄. A cana-de-açúcar quando cultivada a uma temperatura de 10° C pode ter sua taxa fotossintética reduzida em até 20% devido à alta demanda de energia necessária para ativação enzimática (DU; NOSE; WASANO, 1999; GUERRA, 2013).

A cana-de-açúcar sofre influências das variações climáticas durante todo o seu desenvolvimento exigindo condições favoráveis e que sejam específicas à cultura para o seu cultivo e produção, principalmente no que se refere à temperatura. Para cada estágio do seu desenvolvimento a temperatura ótima é diferente, estando seu desenvolvimento diretamente relacionado com o fator temperatura (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2008; PIMENTEL, 1998).

2.3.2 Efeitos da intensidade luminosa

A intensidade de luz necessária para o desenvolvimento das plantas com metabolismos C₃ e C₄ é diferente. Em condições naturais, as plantas com metabolismo fotossintético C₃ se adaptam a ambientes sombreados, enquanto que as plantas com metabolismo fotossintético C₄ conseguem se desenvolver

melhor em altas intensidades luminosas (KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014).

Moore e Botha (2014) realizaram um estudo para comparar o ponto de saturação de intensidade luminosa entre a mandioca, metabolismo fotossintético C₃ (*Manihot esculanta* cv. BGM1721) e cana-de-açúcar, metabolismo fotossintético C₄, usando o híbrido RB835486. Como resultado a cana-de-açúcar apresentou um ponto de saturação luminoso próximo de 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ enquanto que a mandioca apresentou um ponto de saturação próximo a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em condições naturais as intensidades luminosas são descritas como a pleno sol com aproximadamente 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e na sombra, com aproximadamente de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nos dias nublados a intensidade é de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A anatomia foliar e o movimento dos cloroplastos nas folhas são responsáveis por controlar a absorção de luz para a fotossíntese, sendo que a quantidade de luz e de CO₂ determinam a resposta fotossintética das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.3.3 Influência da concentração de CO₂ na fotossíntese

A assimilação de CO₂ também é um dos fatores que influencia no crescimento e desenvolvimento das plantas (PIMENTEL, 1998). As plantas apresentam diferentes respostas mediante as concentrações de CO₂, sendo que algumas plantas respondem melhor que outras às altas concentrações, dependendo do seu metabolismo fotossintético (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008).

Plantas C₃ apresentam um desempenho elevado com o aumento do CO₂, pois ocorre uma redução na fotorrespiração devido à afinidade da enzima Rubisco pelo CO₂ (TAIZ; ZEIGER, 2013). Esse aumento do CO₂ estimula a fotossíntese, enquanto que em uma baixa concentração a fotossíntese é limitada.

Sendo assim, as plantas C_3 apresentam um benefício com o aumento da concentração de CO_2 . Já as plantas C_4 , devido à estratégia de concentração de CO_2 , podem obter boa taxa fotossintética mediante menores disponibilidades de CO_2 atmosférico (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.4 As diferenças da morfologia e da anatomia foliar entre os metabolismos fotossintéticos

As folhas de cana-de-açúcar são alternadas e conectadas ao caule, sendo uma folha por internó. As folhas são numeradas conforme o “sistema de Kuijiper”, segundo o qual aquela que apresenta a primeira aurícula visível no topo da planta, onde se encontram as folhas mais jovens é denominada folha +1, que representa a primeira folha completamente desenvolvida do ponto de vista fisiológico. As folhas mais velhas e seus respectivos nós recebem numeração crescente, sendo a +2 e +3 as folhas mais novas que estão direcionadas ao ponteiro. A gema apical recebe numeração 0, -1 e -2 (Figura 2) (CHEAVEGATTI-GIANOTTE et al., 2011; DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2008).

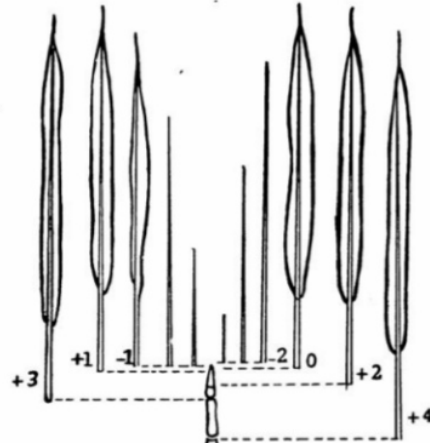


Figura 2 Numeração das folhas de cana-de-açúcar segundo o sistema de Kuijper

Fonte: Rodrigues (1995).

Taiz e Zeiger (2013) explicam que existem diferenças anatômicas das folhas entre as plantas C_3 e as plantas C_4 , sendo que as plantas com metabolismo C_3 possuem como tipo principal as células do mesofilo e plantas com metabolismo C_4 possuem as células do mesofilo e bainha Kranz.

A concentração do CO_2 em plantas C_4 é resultado tanto da assimilação do CO_2 pela atividade da enzima PEPcase quanto pela modificação estrutural das suas folhas que são diferentes das plantas C_3 (KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014; MOORE; BOTHA, 2014).

2.5 Estresse hídrico e métodos de avaliação

Dentre os fatores abióticos, o estresse hídrico é considerado aquele que mais acarreta danos à produção de cana-de-açúcar, principalmente nas regiões onde a seca acontece de forma prolongada como nas regiões do centro sul do Brasil (SILVA; SOARES; LANDELL, 2008).

Conforme citado por Taiz e Zeiger (2013), o estresse hídrico é um fator externo que causa influência negativa sobre uma planta. As plantas possuem mecanismos de defesa ao estresse, sendo de tolerância e prevenção, onde o mecanismo de tolerância é destinado a proteger as células ao estresse hídrico elevado, quando o mecanismo de prevenção é insuficiente para sanar danos nesse nível de estresse (CLAYES; INZÉ, 2013). Já o mecanismo de prevenção tem como objetivo equilibrar absorção de água e perda de água, melhorando o crescimento das raízes, limitando abertura estomática e diminuindo o crescimento de ramos e das folhas (CLAYES; INZÉ, 2013).

A água está envolvida em vários processos metabólicos da planta, sendo um importante substrato para as reações celulares e nas reações envolvidas no processo de fotossíntese, como a abertura e fechamento dos estômatos (PIMENTEL, 2004). Sendo assim, o déficit de água pode provocar várias alterações nos processos fisiológicos das plantas, como alteração na temperatura da folha e fechamento dos estômatos e diminuição na área e no número de folhas, o que limita a fotossíntese (PIMENTEL, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em cana-de-açúcar, o estresse hídrico pode acarretar danos como alterações na altura, no número de folhas verdes, no comprimento e na largura das folhas e em vários processos envolvidos no metabolismo fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2013), sendo os efeitos mais típicos a mudança na coloração da folha e o enrolamento progressivo das folhas (PIRES; ARRUDA; SAKAY, 2008).

Para amenizar o problema de estresse hídrico nos cultivares é necessário o uso de tecnologias agrícolas, bem como do melhoramento genético para obtenção de variedades tolerantes em ambientes propícios à seca (CARVALHO; FURTADO, 2013; SINGH; REDDY, 1980).

No que diz respeito ao melhoramento genético, o sucesso do programa depende de vários fatores, dentre eles, a escolha adequada dos genitores,

instalação de experimentos com boa precisão e métodos e períodos de avaliação efetivos(CARVALHO; FURTADO, 2013).

Alguns estudos utilizando técnicas para avaliar o efeito da planta sob limitação de água estão sendo feitos. Silva et al. (2007) realizaram um estudo onde testaram três métodos não destrutivos para avaliar a taxa de fotossíntese em cana-de-açúcar. São eles: os métodos de fluorescência da clorofila, conteúdo da clorofila e a temperatura da folha. O objetivo do trabalho foi estudar parâmetros fisiológicos para identificar genótipos tolerantes ou não tolerantes ao estresse hídrico. Os resultados indicaram que os métodos de fluorescência da clorofila e conteúdo da clorofila são rápidos e não destrutivos, ideais para detectar a tolerância à seca em genótipos de cana-de-açúcar. No entanto, os mesmos são caros e o acesso aos equipamentos exige amplo e árduo treinamento.

Outras metodologias vêm sendo aplicadas para esses estudos de tolerância à dessecação em plantas como: exposição das plantas em situações extremas de estresse hídrico durante um período até a sua murcha e após reidratação, avalia-se a resposta sob essa condição, método de avaliação realizado por choque osmótico e avaliação de parâmetros fisiológicos, como técnica de flutuação de discos foliares para medira capacidade fotossintética (CLAYES; INZÉ, 2013; WICKLIFF; CHASSON, 1964).

2.6 Técnica de flutuação de discos foliares

A técnica de flutuação de discos foliares com solução de bicarbonato de sódio é utilizada para medir a capacidade fotossintética de forma indireta e pode ser realizada para avaliações com diferentes objetivos. Wickliff e Chasson (1964) indicam a utilização da técnica para substituir técnicas como espectrofotometria ou o método manométrico, sendo estas de alto custo e, muitas vezes, inviáveis. Sendo assim, a técnica utilizando a solução de

bicarbonato de sódio para mensurar a taxa de fotossíntese pode ser uma alternativa, uma vez que é relativamente simples, prática e econômica.

Estudos para mensurar a capacidade fotossintética, usando tecidos de folhas, talo ou caule que foram submetidos à solução de bicarbonato e expostos à intensidade luminosa de $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram realizados em algumas espécies como *Beta vulgaris* (beterraba), *Ficus elastica* (falsa seringueira), *Glycine max* (soja), *Nicotiana tabacum* (tobacco), *Zea mays* (milho) e *Solanum lycopersicum* (tomate) (WICKLIFF; CHASSON, 1964).

Basicamente, a técnica consiste em infiltrar tecido verde da planta em uma solução de bicarbonato de sódio utilizada como fonte de CO_2 . Quando o tecido verde infiltrado com a solução de bicarbonato é exposto à luz, esse tende a flutuar devido à reação da fotossíntese. Nesta reação, o oxigênio é produzido preenchendo os espaços intercelulares, fazendo com que o tecido verde flutue para a superfície da solução (Figura 3).

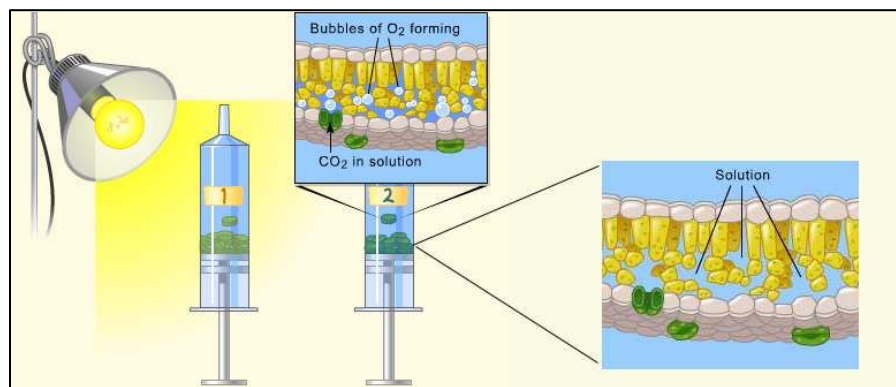


Figura 3 Discos foliares infiltrados com solução de bicarbonato de sódio (como fonte de CO_2). A solução preenche os espaços intercelulares e os discos foliares afundam. Pela reação de fotossíntese, O_2 é produzido e fica retido nos tecidos que tendem a flutuar

Fonte: Steucek e Robert (1985).

Steucek e Hill (1985) sugerem utilizar folhas da espécie *Spinacea oleracea* (espinafre) como garantia e sucesso da funcionalidade da técnica ou ainda folhas frescas que apresentam rápido crescimento. O tempo médio para que ocorra a reação está relacionado com as condições que foram utilizadas no experimento em relação à intensidade luminosa, temperatura, concentração de CO₂ e tipo de vegetais, sendo que o tempo pode ter uma variação de 60 a 500 segundos para o material flutuar (WICKLIFF; CHASSON, 1964).

A avaliação da capacidade fotossintética utilizando a técnica de flutuação dos discos foliares basicamente é feita utilizando um cálculo através de um índice ET₅₀, que significa o tempo efetivo em que ocorreu 50% de flutuação dos discos foliares, onde através desse índice é possível calcular a quantidade de discos que estão realizando fotossíntese (STEUCEK; HILL, 1985).

De modo geral a técnica pode ser utilizada para mensurar a capacidade fotossintética, porém as condições para a condução dos experimentos assim como as condições e tipo de material vegetal utilizado na técnica pode necessitar de adequações para a sua aplicabilidade (STEUCEK; HILL, 1985; WICKLIFF; CHASSON, 1964).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A variedade de cana-de-açúcar utilizada nos experimentos foi a CTC15, variedade de interesse comercial devido à sua adaptabilidade a ambientes com baixo potencial produtivo e que apresenta maior tolerância à seca e resistência à broca.

Foram realizados três experimentos: (i) experimento de validação e aplicabilidade da técnica, e para a validação foi utilizada a espécie *Spinacea oleracea* com a variedade *Savoy* (espinafre) e para aplicabilidade da técnica foi utilizada a espécie *Saccharum* spp., variedade CTC15 (cana-de-açúcar); (ii) experimento para adaptação da técnica na espécie *Saccharum* spp. variedade CTC15 *S. officinarum* testando altas intensidades luminosas e (iii) experimento ainda de adequação da técnica para *S. officinarum* testando diferentes condições com altas intensidades luminosas e diferentes temperaturas.

O primeiro experimento para a validação da técnica foi realizado utilizando a espécie *Spinacea oleracea* da variedade *Savoy* com dois meses de cultivo, utilizando-se discos foliares de aproximadamente 6 mm de folhas frescas, ou seja, folhas que não estavam desidratadas, murchas ou danificadas. A técnica foi aplicada e validada conforme os procedimentos descritos em Fox e Shillcock (1999) sendo este um procedimento adaptado para técnica de flutuação de discos foliares para a espécie *Spinacea oleracea*. Seguindo os mesmos procedimentos do experimento de validação a técnica foi aplicada na espécie *Saccharum* spp. variedade CTC15 para avaliar a aplicabilidade da técnica na cultura. Em todos os experimentos realizados com a espécie *Saccharum* spp. foram retirados discos foliares de aproximadamente 6 mm de diâmetro provenientes de plantas de primeiro ciclo (cana planta) com 4 meses de idade. Especificamente os discos foram recortados da folha M0 a fim de padronizar os experimentos e também porque esta folha possui tecido jovem com alta taxa

fotossintética. Nesse primeiro experimento (validação e aplicabilidade) os experimentos foram realizados a uma temperatura ambiente de aproximadamente 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e com intensidade luminosa, com a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 11,67 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, exceto os que variaram a temperatura e a taxa de intensidade luminosa.

No segundo experimento, sendo este experimento de adequação da técnica para a espécie *Saccharum* spp., foi testado o fator intensidade luminosa (DFFFA) de 54 e de 108 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As condições em que o experimento foi realizado era de temperatura ambiente de aproximadamente 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). No terceiro experimento, também experimento de adaptação da técnica para *Saccharum* spp., foram testadas maiores intensidades luminosas que as testadas no segundo experimento em conjunto com diferentes temperaturas, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Tratamentos de diferentes temperaturas e intensidades luminosas testadas entre as espécies *Saccharum* spp. e *Spinacea oleracea*

Espécie	Temperatura	Intensidade Luminosa*
	$^\circ\text{C}$	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>S pinacea oleracea</i> <i>variedade Savoy</i>	10 – 20	2000
	20 – 35	74
	35 – 45	
<i>Saccharum</i> spp. <i>variedade</i> <i>CTC15</i>	10 – 20	2000
	20 – 35	74
	35 – 45	

*Intensidade Luminosa: (DFFFA) 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, incidência direta da luz solar; e (DFFFA) 74 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, intensidade luminosa captada da sombra.

As diferentes temperaturas foram obtidas da seguinte maneira: frascos para o tratamento de 10 - 20°C foram mantidos em recipiente com gelo durante a fase de exposição à luz e a solução de bicarbonato de sódio foi mantida em refrigerador antes de ser utilizada no experimento. Já para o tratamento com temperatura de 35 - 45°C a solução de bicarbonato foi aquecida. Os experimentos foram realizados entre 12h00min às 15h00min a pleno sol. Durante o experimento a intensidade luminosa foi monitorada com luxímetro marca Equitherm lux 813-A e a temperatura com termômetros digitais Jprolab SH113.

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada experimento. Em todos os experimentos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado – DIC com três repetições (recipientes contendo 10 discos foliares). Para os primeiros experimentos de aplicabilidade e validação da técnica, em cada repetição foram utilizados três recipientes contendo 10 discos foliares para cada espécie, *Saccharum* spp. e *Spinaceae Oleracea*. O mesmo delineamento foi feito para o segundo experimento, sendo este de adequação da técnica para a espécie *Saccharum* spp.

O terceiro experimento ainda de adequação da técnica para a espécie *Saccharum* spp., foi composto do arranjo fatorial: 2 (espécies) x 3 (temperaturas) x 2 (intensidade luminosas) sendo realizado este delineamento devido às características apresentadas nos resultados deste experimento. Os dados do experimento 3 foram organizados de tal forma a indicar o tempo (minuto) para o evento flutuação de cada um dos discos. A análise de dados deste tipo se encaixa no que é comumente denominado de “análise de sobrevivência” (KLEINBAUM; KLEIN, 2012). Neste contexto, duas informações sobre cada disco são relevantes: (a) um parâmetro binário indicando se o disco flutuou (valor = 1) ou permaneceu submerso no intervalo de observação (neste caso os 10 minutos após o início da submersão; valor = 0); (b) o instante (minuto) em que foi detectada a flutuação. Os discos que não

flutuaram não indicam uma informação precisa sobre o tempo de flutuação, mas indicam que a flutuação não ocorreu no intervalo estipulado. Os dados sobre estes discos são denominados de censurados e recebem o valor de 10 minutos. Os dados definidos foram analisados por funções definidas no pacote “survival” (THERMEAU, 2014) do ambiente de análise de dados e representação gráfica R (R CORE TEAM, 2014). Inicialmente a resposta de cada fator (espécie, temperatura e intensidade luminosa) foi avaliada para todas as condições fixas dos demais fatores usando o procedimento de Kaplan-Meier (função `survfit`) sendo o mais indicado para esta análise porque o seu conjunto de premissas é facilmente atendido. A análise multifatorial foi feita aplicando o procedimento “Cox Proportional Hazards Regression Analysis” (função `coxph`). Este procedimento assume que os riscos relativos entre os tratamentos sob avaliação são constantes ao longo do período de estudo (1 a 10 minutos). Dois eventos que ocorrem no mesmo instante são denominados de amarrados no contexto da análise de sobrevivência. Nos cálculos é preciso lidar com estes eventos amarrados. Para a presente análise utilizou-se o método exato (variável “method” da função `coxph` com valor “exact”).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento de validação da técnica feito com a espécie *Spinaceae oleracea* foi possível observar a flutuação de 100% dos discos foliares nas três repetições realizadas, validando assim a técnica (Figura 4). No entanto, ao se utilizar os mesmos procedimentos nas mesmas condições de intensidade luminosa e temperatura para *Saccharum* spp. não ocorreu a flutuação dos discos foliares. Nestes experimentos não foram realizadas análises estatísticas com os dados obtidos (no caso para o experimento de validação), pois como variável resposta foi adotado, a princípio, o critério de flutuação ou não flutuação dos discos foliares.

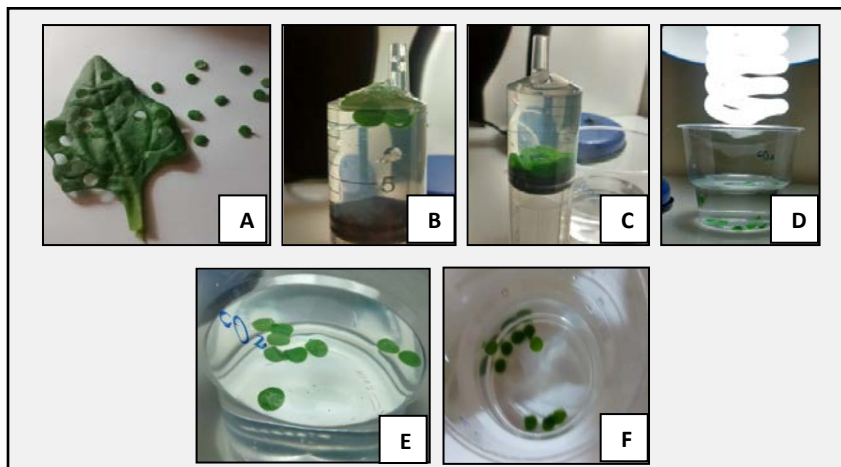


Figura 4 Procedimentos da técnica de discos foliares flutuantes. Discos foliares de 6 mm de diâmetro de *Spinacia oleracea* (A); os discos são infiltrados com bicarbonato de sódio (B); vácuo aplicado onde os discos tendem a afundar na solução (C); discos foliares expostos a luz (D); os discos começam a flutuar indicando a ocorrência de fotossíntese (E); Controle recipiente com água (F)

A técnica de flutuação de discos foliares reflete o seguinte processo: o CO₂ liberado pelo bicarbonato na solução é usado no processo da fotossíntese que, além da formação de cadeias de carbono também libera O₂. São estas moléculas de oxigênio, que ao se acumularem nos tecidos dos discos foliares causam a flutuação dos discos. A intensidade luminosa, a temperatura e o tipo de planta (C₃, no caso do *Spinacea oleracea* e C₄, no caso *Saccharum* spp.) são fatores que afetam a intensidade fotossintética (KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014). Portanto, há correlação entre fatores e o número de discos que flutuam, bem como a velocidade na qual este processo é observado. Na comparação das duas espécies, a temperatura e intensidade luminosa foram as mesmas. Assim, a ausência de flutuação na espécie *Saccharum* spp. reflete a diferença em relação à fotossíntese das espécies ou uma não compatibilidade da cana-de-açúcar para este método, que é consolidado para plantas C₃, como é o caso do espinafre.

Raven et al. (2007) e Taiz e Zeiger (2013) relatam que, em ambos os metabolismos, C₃ e C₄, ocorre a redução de CO₂ a carboidrato pelo mecanismo básico do ciclo de Calvin. Porém, os ciclos apresentam várias diferenças, como anatomia foliar, diferentes enzimas (plantas C₄ possuem duas enzimas distintas aptas à carboxilação: a PEPcase e RUBISCO, enquanto plantas C₃ possuem somente uma enzima apta à carboxilação: a enzima RUBISCO) (DIOLA; SANTOS, 2012; KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Nas condições do experimento de aplicabilidade da técnica para a espécie *Saccharum* spp. (temperatura 25°C (±2°C) e com intensidade luminosa (DFFFA) 11,67 μmol m⁻² s⁻¹) não foi observada flutuação dos discos em *Saccharum* spp. É possível que nestas condições a intensidade fotossintética na espécie *Saccharum* spp., que está adaptada a altas temperaturas e altas

intensidades luminosas, seja baixa produzindo uma quantidade insuficiente de O₂ para induzir a flutuação.

Devido às diferenças citadas entre os metabolismos fotossintéticos, esses fatores atuam em diferentes condições entre os sistemas, sendo assim, um estudo da influência destes fatores nas diferenças fisiológicas entre os sistemas fotossintéticos das espécies em questão se fez necessário para realizar os testes de adaptação do protocolo à *Saccharum* spp. considerando os fatores de intensidade luminosa e temperatura nas condições requeridas ao sistema fotossintético C₄. Estes fatores sendo intensidade luminosa foram testados no segundo experimento e ainda maiores intensidades luminosas com diferentes temperaturas em um terceiro experimento.

Portanto, no segundo experimento realizado, considerando diferentes intensidades luminosas (DFFFA) de 54 e 108 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com lâmpadas LED, observou-se que a *Spinaceae oleracea*, utilizada como controle apresentou 100% de flutuação dos discos foliares. Contrariamente, não houve flutuação para discos de *Saccharum* spp., sendo este um indicativo de que as condições testadas não foram suficientes para que ocorresse a reação de fotossíntese nos experimentos com a *Saccharum* spp. (Figura 5).

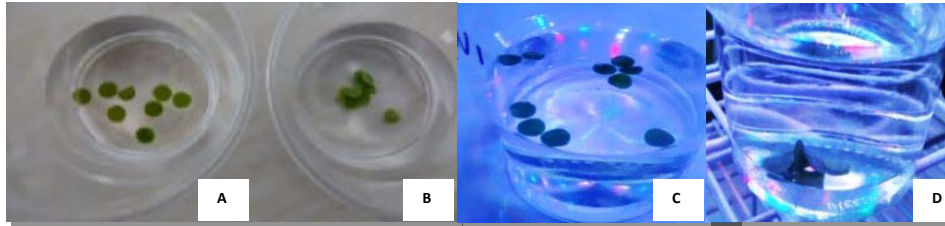


Figura 5 Resposta de flutuação dos discos foliares dos experimentos com diferentes intensidades luminosas. (A e B) considerando intensidade luminosa (DFFFA) $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (A) flutuação de discos foliares em *Spinacea oleracea* e (B) não houve flutuação de discos foliares em *Saccharum* spp.. (C e D) considerando intensidade (DFFFA) $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com lâmpadas de LED, (C) *Spinaceae oleracea* novamente apresentou flutuação dos discos foliares e (D) *Saccharum* spp. não apresentou flutuação dos discos foliares

Para o terceiro experimento de adequação da técnica testando maiores intensidades luminosas das testadas anteriormente com diferentes temperaturas, foi possível observar a flutuação dos discos foliares para *Saccharum* spp. Então primeiro foi feita uma análise para avaliar a resposta de cada fator (espécie, temperatura e intensidade luminosa) a fim de realizar uma análise exploratória dos dados. A Figura 6 mostra um exemplo desta avaliação em que é comparada a flutuação para diferentes temperaturas a que *Saccharum* spp. foi submetida com a intensidade luminosa de $74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

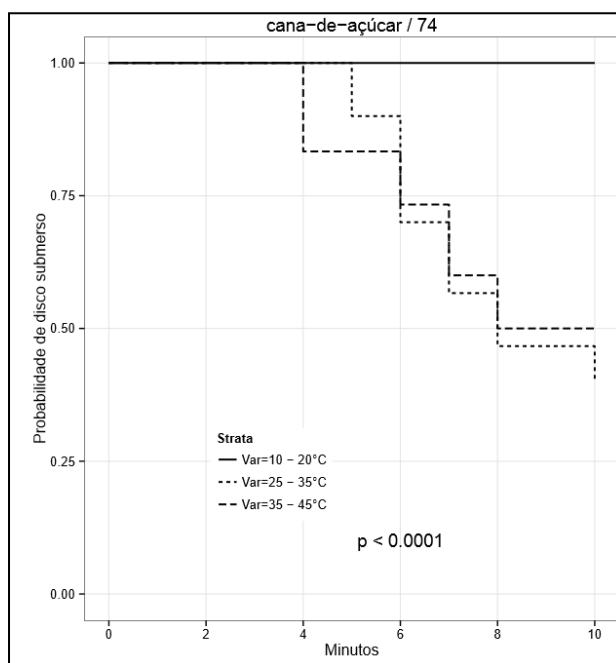


Figura 6 Exemplo de análise inicial realizada com cada fator testado através do procedimento Kaplan-Meier. Análise realizada com a espécie *Saccharum* spp. considerando a intensidade luminosa (DFFFA) $74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avaliando o comportamento de flutuação dos discos para diferentes temperaturas

Nota: Note que por uma especificidade do procedimento estatístico o eixo y do gráfico representa a probabilidade de os discos foliares não flutuarem. A conversão para a probabilidade de flutuação dos discos é imediata.

Pode-se observar que a flutuação dos discos foliares para *Saccharum* spp. foi observada para as temperaturas de 25 - 35 e 35 - 45°C, mas não na temperatura de 10 - 20°C. A flutuação dos discos foliares para a temperatura de 35 - 45°C iniciou-se aos 4 minutos. Com 10 minutos apenas 60% dos discos flutuaram. Na temperatura de 20 - 35°C os discos começaram a flutuar aos 5 minutos e aos 10 minutos e 50% dos discos flutuaram. Vale notar que a alta significância do teste para o efeito da temperatura sobre a flutuação dos discos (valor $p < 0.0001$) se deve ao fato de a menor temperatura não ter resultado em

flutuação alguma. A exclusão deste nível de temperatura da análise estatística mostra que as duas outras temperaturas não influenciam a flutuação dos discos foliares de forma significativa (valor $p = 0.6010$).

A análise multifatorial (Tabela 2) do terceiro experimento foi realizada considerando todas as temperaturas. Como na temperatura de 10 - 20°C não houve flutuação dos discos foliares, a análise foi repetida excluindo esta condição. As diferenças nos resultados mostram que a ausência de flutuação impacta a interpretação dos dados nas condições em que houve flutuação.

Tabela 2 Análise multifatorial avaliando o efeito dos fatores experimentais sobre a flutuação

Fator	Valor p - Teste Coxph	
	Todos os dados	Exclusão da temperatura 10 – 20 °C
Temperatura (T)	0,0001	0,0077*
Espécie (E)	0,3881	0,0012*
Intensidade luminosa (L)	0,2364	0,9321
T x E	0,5347	0,0055*
T x L	0,0001	0,0236*
E x L	0,8376	0,0616
T x E x L	0,6312	0,0673

*Assumindo que $p < 0,05$ – É significativo, ou seja, existe diferença entre os tratamentos

Explorando os resultados da análise multifatorial apenas com os dois níveis maiores de temperatura, podemos observar que o padrão de flutuação dos discos foliares é diferente para os dois níveis de intensidade luminosa testada. Para a alta intensidade luminosa todos os discos foliares flutuam – a curva da probabilidade de flutuação atinge o máximo (1) dentro do período de observação (variando quanto ao instante do máximo dependendo da temperatura e da espécie). Na baixa intensidade luminosa, a flutuação dos discos é incompleta. A forma da curva da probabilidade de flutuação é monotonicamente crescente.

Outro ponto que se pode observar é que com alta intensidade luminosa há uma forte interação temperatura x espécie. As curvas da probabilidade de flutuação para as duas espécies são idênticas para a temperatura de 35 - 45°C. Para a temperatura de 20 - 35°C a probabilidade de flutuação dos discos foliares é antecipada para *Spinaceae oleracea* em relação à *Saccharum* spp.. Para a baixa intensidade luminosa observamos os mesmos padrões de flutuação dos discos foliares para todas as combinações espécie x temperatura. A flutuação dos discos foliares é ligeiramente mais rápida em ambas as temperaturas para *Spinaceae oleracea* quando comparada à *Saccharum* spp. (Figura 7).

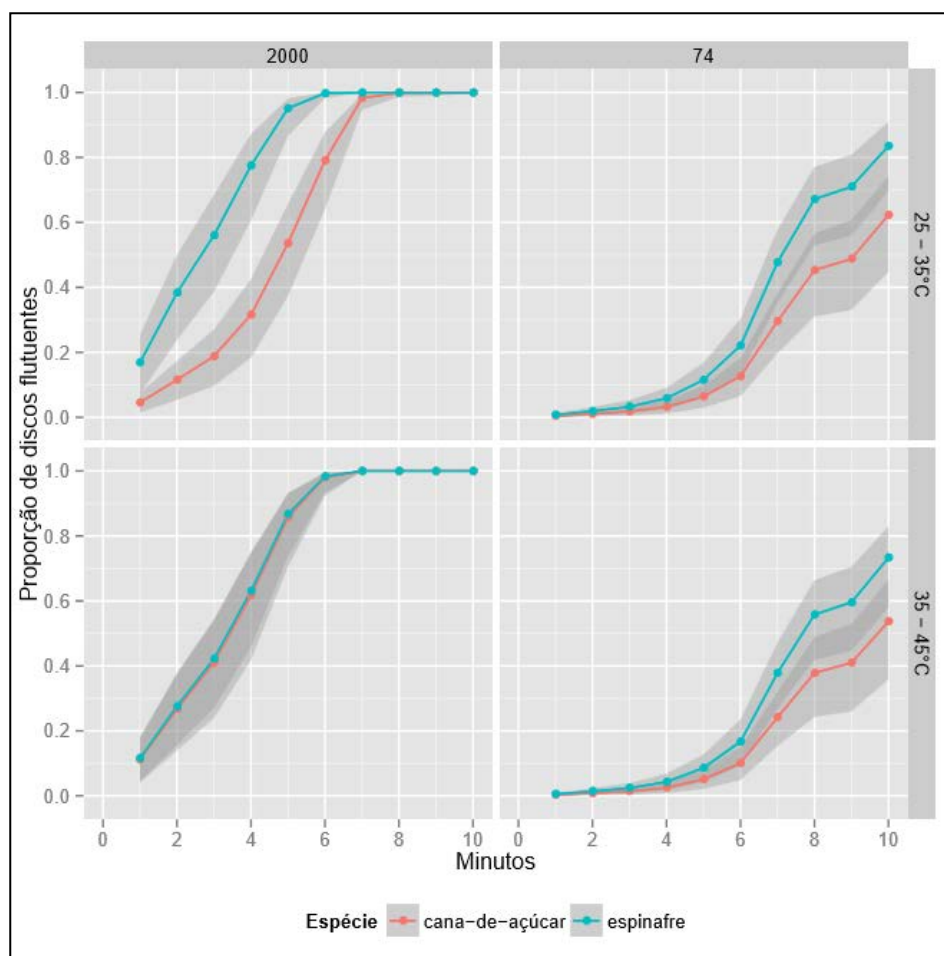


Figura 7 Análise multifatorial da flutuação dos discos foliares considerando caná-de-açúcar e espinafre (espécies *Saccharum* spp. e *Spinaceae oleracea*) nas condições testadas de intensidade luminosa e temperatura durante 10 minutos de observação

Nota: Note que os procedimentos estatísticos calculam probabilidade dos discos permanecerem submersos. Para este gráfico fizemos a transformação dos resultados para a probabilidade de flutuação dos discos foliares.

Avaliando-se o efeito dos fatores na flutuação (Figura 7) observa-se que nas condições com alta intensidade luminosa, (DFFFA) $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e com alta temperatura $35 - 45^\circ\text{C}$, ambas as espécies apresentaram 100% de

flutuação dos discos foliares no tempo observado de 10 minutos. O mesmo resultado foi observado na temperatura de 20 - 35°C com a única diferença que para a espécie *Spinaceae oleracea* o tempo de reação para a flutuação foi ligeiramente mais rápido do que para a espécie *Saccharum* spp. Na condição de menor intensidade luminosa, (DFFFA) $74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os resultados indicaram uma menor proporção de flutuação dos discos foliares em ambas as espécies, onde com 10 minutos de observação na temperatura de 20 - 35°C a espécie *Spinaceae oleracea* apresentou 80% de flutuação dos discos e a *Saccharum* spp. apresentou 60% de flutuação. Na temperatura de 35 - 45°C a espécie *Spinaceae oleracea* apresentou 70% de flutuação e para a *Saccharum* spp. somente 50% dos discos flutuaram.

Conforme podemos observar as condições com menor intensidade luminosa apresentaram uma menor proporção de flutuação de discos em ambas as temperaturas testadas quando comparadas às condições de maior intensidade. Segundo o critério sugerido pela técnica para fazer a medição da capacidade fotossintética é necessário aplicar uma fórmula utilizando o índice ET_{50} , sendo este índice o tempo efetivo em que ocorreu 50% de flutuação dos discos foliares (STEUCEK; HILL, 1985). Baseando-se nesta informação e considerando que para *Spinaceae oleracea* utilizada como controle e comparativa para as respostas dos fatores testados para *Saccharum* spp., o valor mínimo apresentado nos resultados nas condições específicas para a espécie *Spinaceae oleracea* foi de 80% de flutuação dos discos, então o critério estabelecido para avaliar a aplicabilidade da técnica em *Saccharum* spp. foi de 80% a 100% de flutuação dos discos foliares.

Os resultados também indicaram que houve diferença nos tempos iniciais para a flutuação dos discos entre as espécies, sendo que, com maior intensidade luminosa os discos apresentaram flutuação desde o primeiro minuto enquanto que com a menor intensidade os discos iniciaram a flutuação após 6

minutos. Estes dados não podem ser considerados negativos para aplicabilidade da técnica, pois conforme definido por Wickliffe e Chasson (1964), o tempo médio de flutuação dos discos pode variar de 60 a 500 segundos dependendo das condições do experimento.

De modo geral os resultados indicaram que na condição de alta intensidade luminosa e de alta temperatura obteve-se a melhor resposta para ocorrer a reação de fotossíntese para planta C_4 , ocasionando a flutuação dos discos foliares, o que vem de acordo com Kluge, Tezotto-Uliana e Silva (2014) que mencionam que plantas C_4 suportam altas irradiâncias, sendo que quanto maior a intensidade luminosa, melhor sua capacidade fotossintética.

Nestes experimentos os discos foliares foram expostos diretamente à luz solar, cuja intensidade, de acordo com Moore e Botha (2014), é de aproximadamente $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este foi um critério importante e uma opção para a realização dos experimentos para obter a alta intensidade luminosa, sendo esta a condição que apresentou melhor resultado para a flutuação dos discos para *Saccharum* spp.

Avaliando o fator temperatura, os resultados mostraram que ocorreu a flutuação dos discos foliares nas faixas de $20 - 35^\circ\text{C}$ e $35 - 45^\circ\text{C}$ para ambas as espécies, onde com 10 minutos foi possível observar 100% de flutuação dos discos. De acordo com a literatura, plantas C_3 apresentam como temperatura ótima para fotossíntese entre $20 - 30^\circ\text{C}$ e plantas C_4 entre $30 - 35^\circ\text{C}$ (KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014).

No tratamento com temperatura de $10 - 20^\circ\text{C}$ não ocorreu flutuação dos discos foliares, sendo assim este tratamento foi excluído das análises estatísticas. Du, Nose e Wasano (1999) e Guerra (2013) explicam que baixas temperaturas influenciam o sistema fotossintético das plantas, ocasionando a redução na atividade da enzima RUBISCO inibindo assim a taxa fotossintética das plantas.

Diversos fatores envolvidos no metabolismo fotossintético C_4 , como presença de duas enzimas, PEPcase e RUBISCO, que suprime o processo de fotorrespiração (KLUGE; TEZOTTO-ULIANA; SILVA, 2014; LOPES, 2003), a alta atividade de carboxilação da enzima PEPcase, a anatomia foliar com células do mesofilo e bainha vascular proporcionando a concentração de CO_2 , o que então reduz a abertura dos estômatos e a perda de água (OGREN, 1984; TAIZ; ZEIGER, 2013) e a produção de ceras nas folhas (TAIZ; ZEIGER, 2013), entre outros mecanismos, faz com que plantas C_4 suportem e apresentem ótima taxa de fotossíntese diante de altas temperaturas. A anatomia especializada das folhas e a movimentação dos cloroplastos estão entre os mecanismos que resultam na capacidade de as plantas controlarem e absorverem a luz diante de altas intensidades luminosas de maneira mais eficiente e necessária para que ocorra a reação de fotossíntese (EHLERINGER; BJORKMAN; MOONEY, 1976; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Conciliar as condições específicas do mecanismo fotossintético C_4 nos procedimentos da técnica de flutuação de discos foliares foi fundamental para ocorrer a aplicabilidade da técnica em *Saccharum* spp., pois esse tipo de metabolismo apresenta uma série de diferenças na sua rota, conforme apresentado.

Uma vez definidas as condições para avaliação da capacidade fotossintética em *Saccharum* spp. por meio da técnica de flutuação de discos foliares, esta poderá ser empregada para subsidiar no screening e avanço das variedades em várias etapas em programas de melhoramento genético.

5 CONCLUSÕES

A aplicabilidade da técnica de flutuação dos discos foliares para *Saccharum* spp. deve ser utilizada seguindo as condições de alta intensidade luminosa, ou seja, $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com alta temperatura de 30 - 35°C, condições estas que são específicas para o sistema fotossintético C₄, sendo que esta temperatura e intensidade luminosa foram determinantes para a flutuação dos discos foliares.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, P. H. M.; SILVEIRA, I. C. L. Fisiologia. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologias e perspectivas**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2012. p. 313-325.
- BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. Produção de energia e produtividade: *Ricinus communis L.* x *Saccharum Officinale L.* CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: SEAGRI, 2008. 1 CD ROM.
- CARVALHO, D. A. S.; FURTADO, T. A. O melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e os desafios das mudanças climáticas globais. **Revista Gestão & Conexões**, Vitória, v. 2, n. 1, p. 22-46, jan./jun. 2013.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. "Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil". **Tropical Plant Biology**, Elmsford, v. 4, n. 1, p. 62-89, Mar. 2011.
- CLAEYS, H.; INZÉ, D. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 162, n. 4, p. 1768–1779, Aug. 2013.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana de açúcar**. Campinas: IAC, 2008. 882 p.
- DIOLA, V.; SANTOS, F. Fisiologia. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologias e perspectivas**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2012. p. 25-49.
- DU, Y. C.; NOSE, A.; WASANO, K. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species. **Plant, Cell and Environment**, Washington, v. 22, n. 3, p. 317-324, Mar. 1999.
- EHLERINGER, J.; BJORKMAN, O.; MOONEY, A. H. Leaf pubescence: effects on absorptance and photosynthesis in a desert shrub. **Science**, London, v. 192, n. 4237, p. 376-377, Apr. 1976.

FOX, M.; GAYNOR, J. J.; SHILLCOCK, J. Floating spinach disks- an uplifting demonstration of photosynthesis. **Jornal of College Science Teaching**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 210-212, 1999.

GENTILE, A. et al. et al. MicroRNAs and drought responses in sugarcane. **Frontiers of Plant Science**, New Haven, v. 6, p. 58, Feb. 2015.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 4, p. 635-644, June 2009.

GHOSH, S. et al. Thermal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in c3 and c4 plants native to hot and temperate climates. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 90, n. 4, p. 1298-1304, Aug. 1989.

GUERRA, A. et al. Efeitos da temperatura do ar na fotossíntese da cana-de-açúcar na fase inicial do desenvolvimento. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 7, p. 211-217, 2014.

HATCH, M. D.; SLACK, C. R. Photosynthesis by sugar-cane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. **The Biochemical Journal**, London, v. 101, n. 1, p. 103-110, Oct. 1966.

HOHMANN-MARRIOTT, M. F.; BLANKENSHIP, E. R. Evolution of photosyntheses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 515-548, 2011.

KLEINBAUM, D. G.; KLEIN, M. **Survival analysis: a self-learning text**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2012. 700 p.

KLUGE, R. A.; TEZOTTO-ULIANA, J. V.; SILVA, P. P. M. Aspectos fisiológicos e ambientais da fotossíntese. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 53-56, jan./fev. 2014.

LOPES, B. A. **Aspectos importantes da fisiologia vegetal para o manejo**. Viçosa: Editora da UFV, 2003. 55 p.

MACHADO, C. E.; LAGO, A. M. A. Trocas gasosas e condutância estomática em três espécies de gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 53, n. 2, p. 141-149, 1994.

MACHADO, R. C. et al. Respostas biométricas e fisiológicas ao deficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, dez. 2009.

MOORE, H. P.; BOTHA, C. F. **Sugarcane**. Oxford: John Wiley & Sons, 2014. 992 p.

NOBREGA, J. C. M.; DORNELAS, M. C. Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Prol Editora, 2006. p. 39-56.

OGREN, L. W. Photorespiration: pathways, regulation and modification. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 35, p. 415-442, June 1984.

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

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: Edur, 1998. 158 p.

PINCELLI, R. P. **Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

PIRES, R. C. M.; ARRUDA, F. B.; SAKAI, E. Irrigação e drenagem. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**: volume 1. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 631-670.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2014.

RAMALHO, A. P. R et al. **Competências em melhoramento genético de plantas no Brasil**. Viçosa: Arka, 2010. 104 p.

RAVEN, H. et al. **Biologia vegetal**. 7. ed. New York: Guanabara Koogan, 2007. 556 p.

REAME, E. C. **Breve histórico do melhoramento genético da cana-de-açúcar**. Araçatuba: Editora da Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2013. 47 p.

RIBEIRO, M. S. **Efeitos da aplicação diferencial de água no substrato sobre a capacidade fotossintética, relações hídricas e crescimento inicial em cana-de-açúcar.** 2012. 153 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacapes, 2012.

RODRIGUES, D. J. **Fisiologia da cana-de-açúcar.** Botucatu: Instituto de Biociências, 1995. 99 p.

SAGE, F. R.; CHRISTIN, A. P.; EDWARDS, E. J. The C4 plant lineages of planet Earth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3155-3169, Mar. 2011.

SANDOVAL, S. S.; SENÔ, A. C. K. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus**, Ituverava, v. 7, n. 1, p. 243-258, 2010.

SCARAMUCCI, A. J. et al. Energy from sugarcane bagasse under electricity rationing in Brazil: a computable general equilibrium model. **Energy Policy**, Surrey, v. 34, n. 9, p. 986-992, June 2006.

SEGATO, V. S.; PINTO, S. A.; NOBREGA, M. C. J. **Atualização em produção de cana-de-açúcar.** Piracicaba: CP2, 2006. 416 p.

SILVA, A. M.; SOARES, B. A. R.; LANDELL, A. G. M. Agronomic performance of sugarcane families in response to Water Stress. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 3, p. 655-661, 2008.

SILVA, M. A. et al. Use of physiological Parameters to detect differences in drought tolerance among sugarcane genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 3, p. 193-201, jul./set. 2007.

SILVA, P. B. **Aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse hídrico.** Alagoas: Editora da Universidade Federal de Alagoas, 2010. 98 p.

SINGH, S.; REDDY, S. M. Growth, yield and juice quality performance of sugarcane varieties under different soil moisture regimes in relation to drought resistance. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, p. 541-555, 1980.

STEUCEK, G. L.; HILL, R. J. Photosynthesis: I: an assay utilizing leaf disks. **The American Biology Teacher**, Reston, v. 47, n. 2, p. 96-99, Feb. 1985.

STEUCEK, G. L.; ROBERT, J. Hill and class/summer. Photosynthesis I: an assay utilizing leaf disks. **The American Biology Teacher**, Reston, v. 47, n. 2, p. 96-99, Feb. 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 918 p.

TERAMOTO, E. R. **Avaliação e aplicação de modelos de estimativa de produção de cana-de-açúcar (*Saccharum SSP.*) baseados em parâmetros do solo e do clima**. 2003. 96 p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, n. 2, p. 105-121, Oct. 2009.

THERMEAU, T. **A package for survival analysis in S_.R package version 2**. Disponível em: <URL: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>>. Acesso em: 11 mar. 2014.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Acompanhamento de Safra**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=81>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

WANG, L.; CZEDIK-EYSENBERG, A.; MERTZ, A. R. Comparative analyses of c4 and c3 photosynthesis in developing leaves of maize and rice. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, n. 11, p. 1158-1165, Nov. 2014.

WICKLIFF, J. L.; CHASSON, R. M. Measurement of photosynthesis in plant tissues using bicarbonate solutions. **BioScience**, Washington, v. 14, n. 3, p. 32-34, 1964.