

Estudo fisiológico e anatômico de diferentes segmentos da folha +1 de cana-de-açúcar submetida a diferentes concentrações de nitrogênio

Pesquisadora responsável: Dra. Lucia Mattiello

Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) possui metabolismo fotossintético C4, sendo caracterizada, principalmente, por sua capacidade de acumular altas concentrações de sacarose (em torno de 0,7 M) em seus colmos maduros (Moore, 1995), tornando-a uma das mais importantes plantas cultiváveis do planeta para a produção de bioetanol. Devido a isso, grande parte dos estudos focalizou primariamente o crescimento vegetativo dos colmos de cana-de-açúcar durante a maturação dos entrenós acumuladores de sacarose (Lima et al., 2001; Carson et al., 2002; Casu et al., 2007). Contudo, estudos que visam o mesmo nível de informação para o desenvolvimento da folha, consideradas excelentes ferramentas de estudo para o estabelecimento da função fotossintética, são inexistentes e o conhecimento do assunto limita-se às enzimas e reações bioquímicas que ocorrem durante a fotossíntese C4.

Os mecanismos que permitem o desenvolvimento de um órgão e determinam sua função são alvos de interesse biológico (Pick et al., 2011). As folhas das gramíneas são excelentes sistemas para o estudo do estabelecimento do metabolismo C4, porque apresentam um gradiente de desenvolvimento celular ao longo da lâmina foliar, sendo as células basais indiferenciadas e imaturas e as da ponta mais maduras e especializadas (Majeran et al., 2010; Sharpe et al., 2011). Neste aspecto, a espécie mais estudada é o milho, em que há diversos trabalhos que descrevem a diferenciação transcriptômica e proteômica ao longo da lâmina foliar (Majeran et al., 2010; Wang et al., 2014).

Apesar dos fatores intrínsecos envolvidos no desenvolvimento foliar, alguns nutrientes podem apresentar um papel importante em tal processo. O nitrogênio é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas. O balanço deste elemento afeta a fotossíntese, produção e translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento de folhas e raízes, sendo a primeira, o órgão vegetal mais afetado (Ryle et al., 1979; Taiz & Zieger, 2004). Além disso, o conteúdo de N nas folhas é importante para manter altas taxas de fotossíntese (Sinclair e Horie, 1989).

Com base nos resultados obtidos no projeto auxílio coordenado pela Dra. Lucia Mattiello (CTBE), foi observado que o conteúdo de N aumenta ao longo da folha +1 em plantas mantidas em condições normais de crescimento, ou seja, sem nenhuma aplicação diferencial de N. De todos os segmentos, a ponta foi a que apresentou maior concentração. Este comportamento levantou questionamentos em relação de como o N pode estar envolvido no

estabelecimento da fotossíntese e nos fatores fisiológicos e anatômicos que colaboram para este processo, em plantas que respondem de forma diferente a esse elemento.

Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo, verificar a influência do N nos principais parâmetros fisiológicos e anatômicos envolvidos no processo de estabelecimento do metabolismo fotossintético ao longo da folha+1 de cana-de-açúcar. Quanto às análises de anatomia, pretende-se utilizar as técnicas de microscopia de campo claro e eletrônica de transmissão, com o intuito de observar o tamanho do feixe vascular, distância entre feixes, tamanho médio de células, número e tamanho dos cloroplastos presentes nas células do mesófilo e da bainha do feixe vascular e a espessura da parede (camada de suberina) nas células da bainha vascular, para correlacionar tais observações com a influência do N na capacidade fotossintética C4 presente em folhas de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Material vegetal, manejo nutricional e tratamento com N

De acordo com os resultados de uma análise prévia de eficiência e uso de N (EUN), serão utilizados dois genótipos tidos como contrastantes a aplicação de N (RB97-5375 Responsivo e Eficiente e RB93-7570 Não responsivo e Eficiente). Após sete dias do transplante, será realizada a aplicação dos macro e micronutrientes, na forma de solução nutritiva. O nitrogênio será aplicado em duas doses distintas, sendo: 1) 10 e 2) 270 mg de N por Kg de areia, na forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e parceladas em três aplicações com intervalo de 15 dias. O delineamento experimental utilizado será o inteiramente casualizado.

Coleta dos segmentos foliares

Aproximadamente um mês após a última aplicação de N, o comprimento da folha +1 será aferido. Para a coleta dos segmentos serão calculadas as regiões nas quais as folhas serão divididas em três terços iguais e cada terço terá seu meio calculado. As amostras serão coletadas a 1cm de cada lado do meio de cada terço foliar além dos dois primeiros centímetros de cada folha, totalizando 4 segmentos por folha (Base zero, base, meio e ponta).

Coleta dos parâmetros fisiológicos

Após 30 dias da última aplicação da dose maior de N, será realizada a coleta dos dados fisiológicos (taxa fotossintética, condutância estomática, eficiência do uso da água, concentração interna de carbono e taxa de transpiração) em cada segmento foliar, com auxílio de um medidor portátil de fotossíntese (LI-6400 XT, LiCor, USA).

Preparo das amostras para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão

Para a confecção das lâminas, o material será fixado em uma série de soluções de etanol e butanol com diferentes concentrações. A inclusão em parafina será realizada em soluções gradativas de butanol e parafina, por 3 horas em cada solução a uma temperatura de 58°C. O emblocamento será realizado em pequenas caixas de papel preenchidas com parafina derretida. Os materiais serão cortados em micrótomo rotativo e os cortes colocados em lâminas histológicas, que serão coradas com Azul de Astra e Safranina, para serem observadas em microscópio de luz.

Quanto à microscopia eletrônica de transmissão, seções de 0.5 µm serão obtidas com auxílio de um ultramicrótomo e coradas com corante múltiplo Paragon. As lâminas serão acopladas sobre uma placa quente (100°C) por 30s, aproximadamente e lavadas com água destilada e secadas em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas serão tratadas com acetato de uranila e citrato de chumbo para dar início às observações no microscópio eletrônico de transmissão.

Referências Bibliográficas

- Carson, D., et al. (2002). "Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue." *Plant Science* 162(289-300).
- Casu, R. E., et al. (2007). "Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling." *Funct Integr Genomics* 7(2): 153-167.
- Lima D, Santos H, Tiné M, Molle F, Buckeridge M (2001). Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane. *Genetics and Molecular Biology*, 24:191-198.
- Majeran, W., et al. (2010). "Structural and metabolic transitions of C4 leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize." *Plant Cell* 22(11): 3509-3542.
- Moore P. (1995). Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in sugarcane stem. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22:69-80.
- Pick TR, Bräutigam A, Schlüter U, Denton AK, Colmsee C, Scholz U, Fahnenstich H, Pieruschka R, Rascher U, Sonnewald U, et al. (2011). Systems analysis of a maize leaf developmental gradient redefines the current C4 model and provides candidates for regulation. *Plant Cell*, 23:4208-4220.
- Ryle, G. J. a., C. E. Powell, and a. J. Gordon. (1979). The Respiratory Costs of Nitrogen Fixation in Soybean, Cowpea, and White Clover. 2. Comparison of the Cost of Nitrogen Fixation and the Utilization of Combined Nitrogen. *Journal of Experimental Botany* 30(114): 145–53.
- Sharpe RM, Mahajan A, Takacs EM, Stern DB, Cahoon AB (2011). Developmental and cell type characterization of bundle sheath and mesophyll chloroplast transcript abundance in maize. *Curr Genet*, 57:89-102.

Sinclair, T. and T. Horie (1989). "Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation-use efficiency: a review." *Crop Science* 29: 90-98.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2003) *Plant physiology*. 3rd Edition.

Wang L, Czedik-Eysenberg A, Mertz R, Si Y, Tohge T, Nunes-Nesi A, Arrivault S, Dedow L, Bryant D, Zhou W, et al. (2014). Comparative analyses of C4 and C3 photosynthesis in developing leaves of maize and rice.