

THALINE MARTINS PIMENTA

**ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE PLANTAS DE TOMATE
ASSOCIADOS À INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DE GIBERELINAS E À
ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal,
para obtenção do título de Magister
Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P644a
2017 Pimenta, Thaline Martins, 1992-
Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de tomate
associados à inibição da biossíntese de giberelinas e à elevada
concentração de dióxido de carbono / Thaline Martins Pimenta. –
Viçosa, MG, 2017.
ix, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.30-35.

1. Tomate. 2. Tomate - Fisiologia vegetal. 3. Plantas -
Anatomia. 4. Hormônios vegetais. 5. Dióxido de carbono na
atmosfera. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia
Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 635.642

THALINE MARTINS PIMENTA

**ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE PLANTAS DE TOMATE
ASSOCIADOS À INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DE GIBERELINAS E À ELEVADA
CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

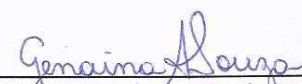
APROVADA: 17 de fevereiro de 2017.



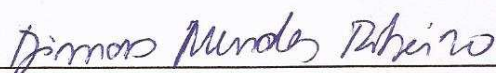
Ana Ermelinda Marques



Agustin Zsögön



Genaina Aparecida de Souza
(Coorientadora)



Dimas Mendes Ribeiro
(Orientador)

Aos meus pais, André e Ana,

**Por todo amor, carinho, dedicação,
exemplo, incentivo e por cumprirem
o dom divino de ser Pai e Mãe.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal pelo suporte para a realização do trabalho e pelo crescimento profissional e pessoal proporcionado.

À Capes pela concessão da bolsa.

Ao professor Dimas Mendes Ribeiro pela orientação, incentivo, disposição e bom humor sempre.

Aos meus coorientadores Edgard Augusto por todo conhecimento e sugestões para o enriquecimento do trabalho, e em especial a Genaina Aparecida de Souza pela amizade, ideias, conselhos e apoio desde os tempos de iniciação científica.

Ao professor Agustin e a Ana Marques pela participação na banca e sugestões ao trabalho.

Meus agradecimentos ao Samuca, Willian, Martielly, Vitor, Rodrigo e Suzy pelas suas contribuições.

Ao professor Raimundo pelo cafezinho de todos os dias.

Obrigada aos companheiros de laboratório Lucas, Karla, Rafael, Nilo, Ricardo e em especial ao Fred pela colaboração durante os experimentos e análises. Obrigada à Lúbia da iniciação científica sempre disposta a ajudar com zelo e paciência. Aos amigos que o mestrado me deu de presente: a Cileimar pelo carinho e por dividir todas as horas de estudo e alegrias; a Roberta, a Tássia e aos meninos da anatomia. Obrigada a todos pela amizade e que ela perdure além Viçosa.

Aos funcionários da Fisiologia: Luciene, Carlos Raimundo, Gabriel, Reginaldo e Toninho.

Meu eterno agradecimento aos meus pais, Ana e André, pelo exemplo de honestidade, amor, perseverança, por serem meu porto seguro agora e sempre.

À minha irmã e melhor amiga pelo carinho e apoio mesmo a mais de 1000 km de distância.

Ao Diego pelo amor, cuidado, paciência e incentivo em todos os momentos.

À Deus pelo dom da vida.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

THALINE MARTINS PIMENTA, filha de José André Pimenta e Ana Regina Martins Pimenta, nasceu em 12 de agosto de 1992, em Ponte Nova (Minas Gerais, Brasil). Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa (MG) no ano de 2010, onde participou de estágios e bolsas de iniciação científica na EPAMIG e Laboratório de Anatomia Vegetal (DBV). Graduiu-se Engenheira Agrônoma em janeiro de 2015 e em março do mesmo ano, iniciou os estudos do curso de mestrado em Fisiologia Vegetal na mesma universidade, com ênfase em regulação do desenvolvimento em plantas, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	3
2.2 Quantificação dos parâmetros morfológicos.....	3
2.3 Fluorescência e trocas gasosas.....	4
2.4 Quantificação de metabólitos	5
2.5 Características anatômicas.....	6
2.6 Delineamento experimental e análise estatística	7
3 RESULTADOS	7
4 DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
MATERIAL SUPLEMENTAR	36

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A = taxa de assimilação líquida de CO_2

AFE = área foliar específica

C_a = concentração ambiente de CO_2

C_i = concentração intercelular de CO_2

DE = densidade estomática

E = transpiração foliar

ETR = taxa de transporte de elétrons

F_0 = fluorescência inicial

F_m = fluorescência máxima

$FSII$ = fotossistema II

F_v = fluorescência variável

F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do $FSII$

NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímica

PAC = paclobutrazol

P_R = taxa de fotorrespiração da rubisco

qP = coeficiente de extinção fotoquímica

R_n = taxa de respiração no escuro

TCR = taxa de crescimento relativo

RESUMO

PIMENTA, Thaline Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de tomate associados a inibição da biossíntese de giberelinas e à elevada concentração de dióxido de carbono.** Orientador: Dimas Mendes Ribeiro. Coorientadores: Edgard Augusto de Toledo Picoli e Genaina Aparecida de Souza.

A giberelina é um hormônio chave no crescimento e desenvolvimento das plantas e ambos os processos envolvem divisão e expansão celular, os quais são sensíveis a elevada concentração de dióxido de carbono (CO_2) no ambiente. Ainda que os efeitos gerais promovidos por giberelinas sejam conhecidos, o seu papel na determinação do crescimento sob concentração de CO_2 elevada são pouco explorados. Nesse contexto, buscou-se compreender o papel das giberelinas no crescimento de plantas de tomate tratadas com paclobutrazol (PAC) cultivadas sob concentração de CO_2 ambiente ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). O tratamento com PAC em CO_2 ambiente promoveu a redução da biomassa total, da taxa de crescimento relativo (TCR) e da área foliar, possivelmente promovido pela redução na taxa de assimilação líquida de carbono (A) e na respiração (R_n), além de menores níveis de carboidratos nas folhas. A anatomia do caule apresentou redução na expansão celular e menor comprimento das células do parênquima medular. Sob concentração de CO_2 elevada, o efeito do PAC no crescimento das plantas de tomate foi revertido. Nesse ambiente, a A , R_n e os níveis de carboidratos foram aumentados. A anatomia da folha e do caule foram semelhantes às das plantas controle, com maior tamanho das células. Em conclusão, a concentração de CO_2 elevada foi essencial para acoplar o metabolismo primário à promoção da expansão celular e crescimento das plantas sob inibição da biossíntese de giberelinas.

ABSTRACT

PIMENTA, Thaline Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Anatomical and physiological aspects of tomato plants associated with the inhibition of gibberellin biosynthesis and the high concentration of carbon dioxide.** Adviser: Dimas Mendes Ribeiro. Co-advisers: Edgard Augusto de Toledo Picoli and Genaina Aparecida de Souza.

Gibberellin is a key hormone in plant growth and development and both processes involve cell division and expansion, which are sensitive to high carbon dioxide concentration (CO_2) in the environment. Although the general effects promoted by gibberellins are known, their role in determining growth under high CO_2 concentration is poorly explored. In this context, the aim of this work was to understand the role of gibberellins in the growth of paclobutrazol-treated tomato plants (PAC) grown under ambient ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ air) and elevated CO_2 ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ air) concentration. The treatment with PAC at ambient CO_2 promoted the reduction of the total biomass, relative growth rate (TCR) and leaf area, possibly promoted by the reduction in the rate of carbon assimilation (A) and respiration (R_n), besides lower levels of carbohydrates in leaves. The anatomy of the stem showed reduction in the cellular expansion and shorter length of the cells of the medullar parenchyma. At elevated CO_2 concentration, the effect of PAC on the growth of tomato plants was reversed. In this condition, the A , R_n and carbohydrate levels were increased. Leaf and stem anatomy were similar to those of control plants, with larger cell sizes. In conclusion, elevated CO_2 concentration was essential to couple the primary metabolism to promotion of cell expansion and plant growth under inhibition of gibberellin biosynthesis.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento das plantas envolvem divisão e expansão celular, processos sensíveis a elevada concentração de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico (Masle, 2000; Taylor et al., 2003; Luomala et al., 2005). A giberelina é um hormônio chave que tem papel essencial no crescimento de plantas, como na germinação de sementes, expansão foliar, alongamento do caule e abertura floral (Gonzalez et al., 2012; Cheng et al., 2015; Li et al., 2015; Zhou et al., 2016). O estímulo ao crescimento das plantas promovido pelas giberelinas envolve mudanças tanto na divisão como na expansão das células (Richards et al., 2001; Gonzalez et al., 2012). Ainda que os efeitos gerais promovidos pelas giberelinas sejam conhecidos, o seu papel na determinação do crescimento sob concentração elevada de CO₂ é pouco explorado.

Em laboratório, resultados interessantes foram obtidos quando plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com paclobutrazol (PAC), um inibidor da biossíntese de giberelinas, foram mantidas sob concentração elevada de CO₂. O PAC promoveu redução de aproximadamente 50 % na área foliar, massa fresca e massa seca de plantas mantidas à concentração ambiente de CO₂ (380 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) (Ribeiro et al., 2012a, 2012b). Entretanto, os efeitos inibitórios do PAC foram completamente revertidos quando as plantas foram mantidas sob elevada concentração de CO₂ (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Assim, a ação das giberelinas no crescimento das plantas sob concentração elevada de CO₂ constitui um campo importante de investigação, devido ao papel dessa classe de hormônios no controle do crescimento e desenvolvimento das plantas (Richards et al., 2001; Davière e Achard, 2013). Resultados interessantes também foram encontrados por Wang et al. (2015) estudando o papel das giberelinas em plantas de cenoura, onde os tratamentos com PAC e ácido giberélico (GA₃) alteraram parâmetros morfológicos, estrutura anatômica e a regulação de genes relacionados às vias de biossíntese de giberelinas. Enquanto GA₃ restringiu o crescimento das raízes, plantas tratadas com PAC tiveram um incremento no peso fresco e no diâmetro das raízes.

As rotas de biossíntese e sinalização das giberelinas têm sido intensivamente estudadas em *Arabidopsis* (Yamaguchi, 2008; Hedden e Sponsel, 2015). O passo inicial na biossíntese das giberelinas envolve a conversão do geranylgeranyl-difosfato

a ent-copalil-difosfato que em seguida é convertido a ent-caureno. As enzimas que catalisam essas reações são a ent-copalil-difosfato sintase e ent-caureno sintase, respectivamente (Hedden e Thomas, 2016). Reações subsequentes catalisadas pela enzima ent-caureno oxidase produz o ácido ent-caurenoico e GA₁₂, a partir do ent-caureno (Helliwell et al., 2001; Yamaguchi, 2008). No passo final da rota de biossíntese das giberelinas, GA₁₂ é convertida em GA₄ pela oxidação do C-20 e C-3 pela enzima GA 20-oxidase (GA20ox) e GA3-oxidase (GA3ox), respectivamente (Olszewski et al., 2002; Hedden e Sponsel, 2015).

O nível de giberelinas ativas nas plantas pode, também, ser regulado pela ação de enzimas envolvidas no seu catabolismo (Hedden e Thomas, 2016). Assim, a superexpressão de genes que codificam a proteína GA2-oxidase evita o acúmulo em excesso do hormônio nas plantas (Hedden e Thomas, 2016). Além disso, o nível de giberelinas ativas pode ser mantido via regulação negativa dos genes de sua biossíntese, por exemplo, GA20ox e GA3ox (Yamaguchi, 2008). As giberelinas promovem o crescimento das plantas ao induzir a degradação da proteína DELLA repressora do crescimento (Hedden e Thomas, 2016). A ligação das giberelinas aos receptores GID promovem a interação do receptor com a proteína DELLA, ocorrendo subsequente poliubiquitinação da DELLA via E3 ubiquitina-ligase SCF^{SLY1} e eventual destruição da DELLA via proteassomo 26S (Achard et al., 2009). Em geral, a proteína DELLA inibe o crescimento das plantas pela redução da proliferação celular (taxa de divisão celular) e taxa de expansão (Achard et al., 2009; Gonzalez et al., 2012).

O metabolismo das giberelinas é particularmente sensível a fatores do ambiente e ao estágio de desenvolvimento das plantas (Fleet e Sun, 2005; Hedden e Thomas, 2016). Estímulos ambientais tais como luz e temperatura regulam a expressão de alguns genes envolvidos na sua biossíntese e sinalização (Stavang et al., 2007; Devière e Achard, 2013), afetando conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das plantas. O aumento de CO₂ na atmosfera durante as últimas décadas tem despertado um crescente interesse na função desse gás como um sinal do ambiente envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Apesar da conhecida associação entre concentração elevada de CO₂ e o crescimento em plantas, as vias regulatórias que conectam o controle hormonal do crescimento com a assimilação de carbono são, ainda, pouco conhecidas. Assim, este trabalho objetivou analisar o efeito da concentração elevada de CO₂ no metabolismo primário de plantas

de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Santa Clara) crescendo em solo suplementado com PAC. Propôs-se ainda investigar se o efeito da concentração elevada de CO₂ na anatomia da folha e do caule é resultado ou é fortemente modulado por mudanças simultâneas nos níveis de giberelinas nas plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Santa Clara) foram semeadas em bandejas plásticas preenchidas com substrato comercial (Tropstrato HT Hortaliças). Transcorridos 15 dias após a semeadura, as mudas foram transferidas para vasos de polietileno de 3,5 L de capacidade contendo substrato comercial e receberam adubação de plantio de 5,0 g por vaso de N-P-K (20-5-20), e uma adubação de cobertura durante o estágio vegetativo das plantas. Dois dias após o transplante, correspondente ao estágio de aparecimento do primeiro par de folhas verdadeiras, 20 ml de água (controle) ou 20 ml de suspensão de PAC (1 mM) foram distribuídos na superfície do substrato com o auxílio de uma pipeta graduada. Dois dias após ao tratamento com PAC, as plantas foram transferidas para câmaras de topo aberto (1,6 m diâmetro e 1,8 m altura) montadas em casa de vegetação e suplementadas com CO₂ à concentração de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ar (ambiente) e 750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ar (elevada). A irrigação das plantas nas câmaras de topo aberto foi feita diariamente, de forma a manter-se o substrato próximo à capacidade de campo. Três cultivos independentes crescidos em diferentes épocas foram avaliados. A variação diária global da intensidade de luz, temperatura e déficit de pressão de vapor (VPD) durante a condução dos experimentos, em cada câmara de topo aberto, foram apresentados na figura S1 (Material Suplementar).

2.2 Quantificação dos parâmetros morfológicos

O comprimento do terceiro entrenó e da folha do terceiro nó foram mensurados a cada dois dias. O crescimento foi descrito pela seguinte função sigmoide:

$$f(t) = A / (1 + \exp \{ - [(t - t_0) / b] \})$$

onde A é a diferença entre os valores máximos e mínimos de crescimento, t_0 é o tempo quando o crescimento é máximo e b é o crescimento máximo. Para calcular as taxas de crescimento, a diferencial da função sigmoideal foi determinada:

$$d/dt f(t) = A \exp(-\{(t - t_0) / b\}) / [b (1 + \exp\{- (t - t_0)/b\})^2]$$

O crescimento final da folha e do entrenó foram calculados como a assíntota superior (A) da curva sigmoideal. O momento de ocorrência do ponto limite na faixa do limiar superior da curva indicou quando a folha e o entrenó atingiram 95% do crescimento final. O pico da primeira derivada da curva corresponde à taxa máxima de crescimento ocorrida no valor zero da segunda derivada.

A altura das plantas, tomada do nível do solo até o nó apical superior, foi também mensurada a cada dois dias. Ao final de cada experimento (13 dias de suplementação com CO₂ em câmaras de topo aberto), as plantas foram separadas em caule, folhas e raízes. A área foliar total foi determinada usando medidor de área foliar (Li-Cor Model 3100 Area Meter, Lincoln, NE, USA). As raízes foram lavadas com água sobre uma peneira com malha de 0,5 mm. Os órgãos das plantas foram secos em estufa de circulação forçada, a 70 °C, até atingir peso constante. Posteriormente, o peso seco das folhas, caules e raízes foi determinado. Com os dados de massa seca e área foliar foram calculados as seguintes características de crescimento: biomassa total, razão parte aérea/raiz, taxa de crescimento relativo da biomassa (TCR) e área foliar específica (AFE).

2.3 Fluorescência e trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), a concentração subestomática de CO₂ (C_i), a taxa transpiratória (E) e os parâmetros de fluorescência foram medidos entre 9:00 e 11:00 h, sob radiação fotossinteticamente ativa equivalente à do ambiente (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com um analisador de gases infravermelho (LI 6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA). A concentração de CO₂ de referência foi de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ de ar para as plantas em atmosfera ambiente de CO₂ e de 750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ de ar para as plantas sob concentração de CO₂ elevada. A fluorescência inicial (F_0) foi obtida via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade de (0,03 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Em seguida, um pulso de luz saturante de 1.000 μmol

(fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com duração de 0,8 s, foi aplicado para determinar a fluorescência máxima emitida (F_m). Procedeu-se a determinação da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR), conforme descrito por Maxwell e Johnson (2000). A respiração no escuro (R_n) foi quantificada utilizando-se o mesmo equipamento descrito anteriormente, após duas horas do término do período de luz. A taxa de fotorrespiração da rubisco (P_R) foi determinada conforme descrita por Valentini et al. (1995). Para a determinação das trocas gasosas foram utilizadas duas folhas de 10 plantas. As medidas foram efetuadas sob umidade relativa 50-60 % e temperatura 26-31 °C, correspondente ao topo das câmaras.

2.4 Quantificação de metabólitos

As amostras do terceiro entrenó e da folha do terceiro entrenó foram coletadas no meio do período de luz e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80 °C, até análise. Uma fração das amostras (30 mg) liofilizada foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se na fração solúvel em etanol, os níveis de glicose, frutose, sacarose e aminoácidos totais (Ferne et al., 2001). Na fração insolúvel, determinaram-se os níveis de amido e proteína total (Ferne et al., 2001). Glicose, frutose e sacarose foram determinadas usando-se um ensaio de substrato enzimático contínuo (Cross et al., 2006). Para determinação de amido, o precipitado da extração etanólica foi solubilizado por aquecimento a 95 °C em 0,1 M NaOH. Em seguida, adicionou-se 70 μl de solução de ácido acético (1 M) às amostras, e o conteúdo de amido foi determinado como equivalentes de glicose (Hendriks et al., 2003).

O conteúdo de aminoácidos totais foi quantificado de acordo com Gibon et al. (2004). Em uma microplaca adicionou-se 25 μL do extrato etanólico, 25 μL de etanol 70 %, 50 μL de tampão citrato pH 5,2 acrescidos de ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100 μL de ninhidrina 1% (p/v) em metanol 70 % (v/v), em cada poço. A microplaca foi incubada no escuro por 20 min a 95 °C e centrifugada por 15 s a 12800 g. Posteriormente, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação de aminoácidos totais foi feita uma curva de calibração utilizando leucina como padrão, às concentrações de 0; 0,04; 0,06; 0,20; 0,40 e 1,00 mM.

Para a determinação de proteína total foi utilizado a técnica de Bradford (1976), com algumas modificações (Ramagli e Rodriguez, 1985). Uma série de solução de albumina soro-bovina (BSA) diluída com o tampão de extração foi utilizada como padrão para quantificação das proteínas. As proteínas foram quantificadas em um leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA), a 595 nm.

A determinação de clorofilas totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Porra et al. (1989), a partir de 25 µL do extrato diluído em 145 µL de acetona 80 % (v/v).

2.5 Características anatômicas

Seções foliares retirados da região mediana da folha do terceiro nó e seções do caule do terceiro entrenó foram fixadas em FAA₅₀ (90:5:5) por 48 h e estocados em etanol 70 % (Johansen, 1940). Em seguida, o material vegetal foi incluído em metacrilato (Historesin-Leica), seguindo as recomendações do fabricante. O material foi seccionado transversalmente (folha e caule) e longitudinalmente (caule) em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964) e montado sob lamínula com resina sintética (Permount®). As imagens das análises estruturais foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

Nas imagens obtidas foram efetuadas medições em 10 campos distintos de cada amostra por meio do software Image-Pro[®] Plus (version 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA). As características anatômicas das folhas de plantas controle e plantas tratadas com PAC foram examinadas avaliando-se as espessuras da lâmina foliar, parênquimas paliçádico e lacunoso, epiderme nas faces abaxial e adaxial, além da área dos espaços intercelulares. As características anatômicas do caule de plantas controle e plantas tratadas com PAC foram examinadas avaliando-se o diâmetro do entrenó, área da seção transversal das células e número das células do parênquima medular, procurando compreender se a inibição da biossíntese de giberelinas afetou a expansão / divisão celular. Além disso foram avaliadas a área da seção transversal dos

elementos de vaso do xilema, o número de vasos do xilema e o comprimento das células do parênquima medular.

Para determinação da densidade estomática foram utilizados folíolos centrais de folha totalmente expandida, que foram diafanizadas por meio de metanol 95% (v/v) por 48 h, seguido por ácido láctico 100%. As amostras foram acondicionadas em banho-maria a temperatura de 95° C, até que as lâminas foliares apresentassem aspecto totalmente translúcido (Zsögön et al., 2015). Os cortes foram montados em lâminas de vidro, e as imagens das epidermes adaxial e abaxial foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision. As imagens obtidas no microscópio foram digitalizadas e armazenadas, para medições no programa Image-Pro Plus versão 4.5.

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental dos experimentos de análise de metabólitos foi composta por 30 mg de material vegetal, por reação, com seis repetições, por tratamento. Para os experimentos relacionados ao crescimento de plantas, a unidade experimental foi composta por dez repetições, constituída de duas plantas cada. As características morfoanatômicas da folha e caule foram avaliadas em cinco repetições amostradas de dez plantas diferentes. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$), e as diferenças entre as médias examinadas pelo teste de Tukey em nível de 5 % de probabilidade. Todos os dados foram analisados usando-se o software SPSS 11.0 (Statistical Package for the Social Science, Inc., Chicago, IL, USA).

3 RESULTADOS

A dinâmica do crescimento da terceira folha e do terceiro entrenó das plantas controle e tratadas com PAC cultivadas sob condição ambiente ou de elevada concentração de CO₂ ajustou-se a uma função sigmoidal (Figura 1A, B). Por outro lado, o crescimento em altura das plantas de tomate controle e tratadas com PAC

cultivadas sob ambiente ou elevada concentração de CO₂ ajustou-se a uma função de primeiro grau (Figura 1C). O PAC promoveu redução significativa no crescimento da terceira folha e do terceiro entrenó bem como na altura total das plantas de tomate mantidas a concentração de CO₂ ambiente (Figura 1A-C). Um comportamento completamente diferente para o crescimento da folha, entrenó e altura total surgiu quando as plantas de tomate tratadas com PAC foram cultivadas sob concentração de CO₂ elevada. Neste contexto, os efeitos inibitórios do PAC foram revertidos quando as plantas foram mantidas sob concentração de CO₂ elevada (Figuras 1A-C).

O tratamento com PAC reduziu o comprimento final da terceira folha (52 %) e do terceiro entrenó (54 %), em plantas crescidas sob concentração de CO₂ ambiente. Entretanto, os efeitos inibitórios do PAC foram revertidos quando as plantas foram mantidas sob concentração de CO₂ elevada (Figura 2A, B). Sob concentração de CO₂ ambiente, o tratamento das plantas de tomate com PAC promoveu redução da taxa máxima de expansão da terceira folha e do terceiro entrenó, em comparação aos seus respectivos controles. Claramente, houve um aumento significativo na taxa máxima de expansão da terceira folha e do terceiro entrenó em plantas tratadas com PAC cultivadas em concentração de CO₂ elevada (Figura 2C, D). O tratamento das plantas com PAC não alterou o tempo de máxima expansão da folha e do entrenó das plantas de tomate cultivadas tanto em concentração de CO₂ ambiente quanto elevada, em comparação aos seus respectivos controles (Figura 2E, F). A duração da expansão da terceira folha permaneceu estável nas plantas de tomate tratadas com PAC mantidas tanto em concentração de CO₂ ambiente e elevada (Figura 2G). No entanto, a duração da expansão do terceiro entrenó aumentou em 25 % em plantas tratadas com PAC e cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente, mas não em plantas tratadas com PAC mantidas em concentração de CO₂ elevada, em comparação com os seus respectivos controles (Figura 2H).

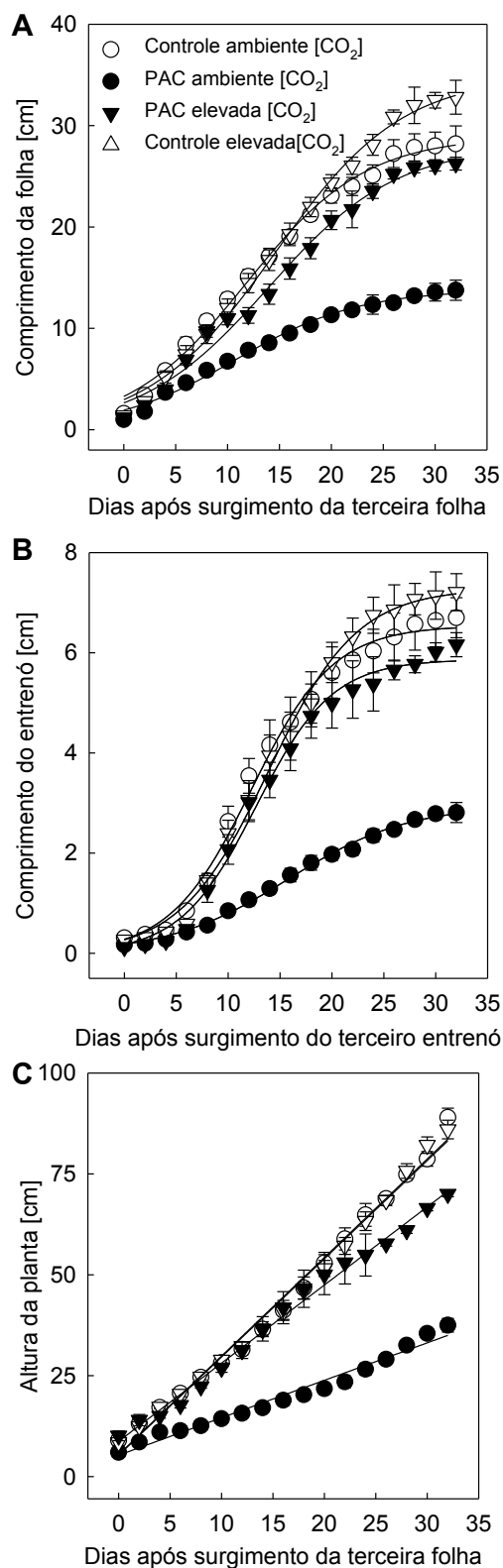


Figura 1. Alterações no crescimento de plantas de tomate promovidas pelo tratamento com PAC, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. O crescimento da folha (A) e do entrenó (B) foi descrito pela função sigmoidal $y = A / (1 + \exp \{- [(x - x_0) / b]\})$. O crescimento das plantas em altura (C) foi descrito pela equação $y = ax + b$. Médias \pm erro padrão, n = 10.

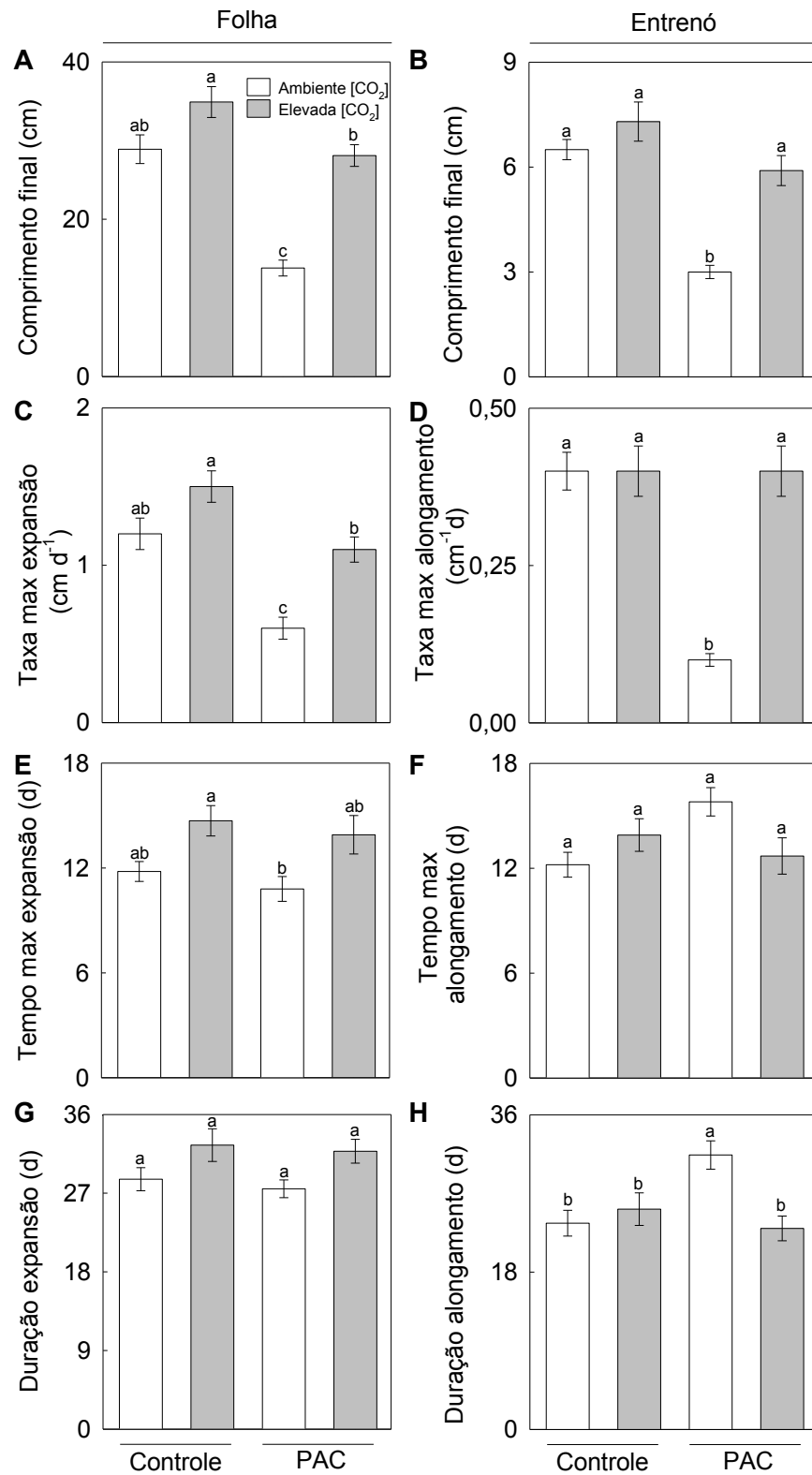


Figura 2. Efeito do PAC sobre o crescimento da terceira folha e do terceiro entrenó de plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias \pm erro padrão, n = 10.

A partir da análise do crescimento das plantas foi observado que o PAC promoveu redução significativa na biomassa total (56 %), razão parte aérea/ raiz (34 %) e área foliar (72 %) das plantas de tomate mantidas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3A-C). Por outro lado, o tratamento com PAC não reduziu a razão parte aérea/ raiz das plantas mantidas sob concentração de CO₂ elevada (Figura 3B). Além disso, a biomassa total e a área foliar das plantas tratadas com PAC foi um pouco menor 25 % e 24 %, respectivamente, quando comparadas com as plantas do controle (Figura 3A, C). O tratamento das plantas com PAC reduziu a massa seca radicular das plantas de tomate cultivadas tanto em concentração de CO₂ ambiente quanto elevada, em comparação com os seus respectivos controles (Figura 3D). Entretanto, o número de folhas se manteve estável em plantas expostas à solução de PAC em ambas concentrações de CO₂ (Figura 3E). Os efeitos do PAC na inibição da taxa de crescimento relativo das plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente foram completamente revertidos quando as plantas foram cultivadas sob concentração de CO₂ elevada (Figura 3F). Adicionalmente, o PAC causou uma redução significativa na área foliar específica (38 %) e massa seca caulinar (67 %) de plantas de tomate mantidas sob concentração de CO₂ ambiente, em relação ao controle (Figura 3G, H). Entretanto, a redução da área foliar específica e da massa seca caulinar das plantas tratadas com PAC não foi completamente revertida sob concentração de CO₂ elevada. Neste contexto, o PAC promoveu uma redução de 18 % e 55 % na área foliar específica e na massa seca caulinar das plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ elevada (Figura 3G, H).

O PAC promoveu redução significativa na A (20 %) das plantas de tomate mantidas sob concentração de CO₂ ambiente, em comparação com as plantas do controle (Figura 4A). Claramente, houve aumento significativo na A e na Ci tanto em plantas do controle e tratadas com PAC cultivadas sob concentração de CO₂ elevada, em comparação com as plantas de tomate mantidas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 4A, B). O tratamento com PAC reduziu NPQ (33 %), R_n (30 %) e P_R (30 %) em plantas crescidas sob concentração de CO₂ ambiente, mas não em plantas cultivadas sob elevada concentração de CO₂ (Figuras 4C-E). Sob concentração de CO₂ ambiente foi observado um pequeno aumento em ETR nas plantas tratadas com PAC (Figura 4F). Entretanto, sob concentração de CO₂ elevada, ETR avaliado em plantas

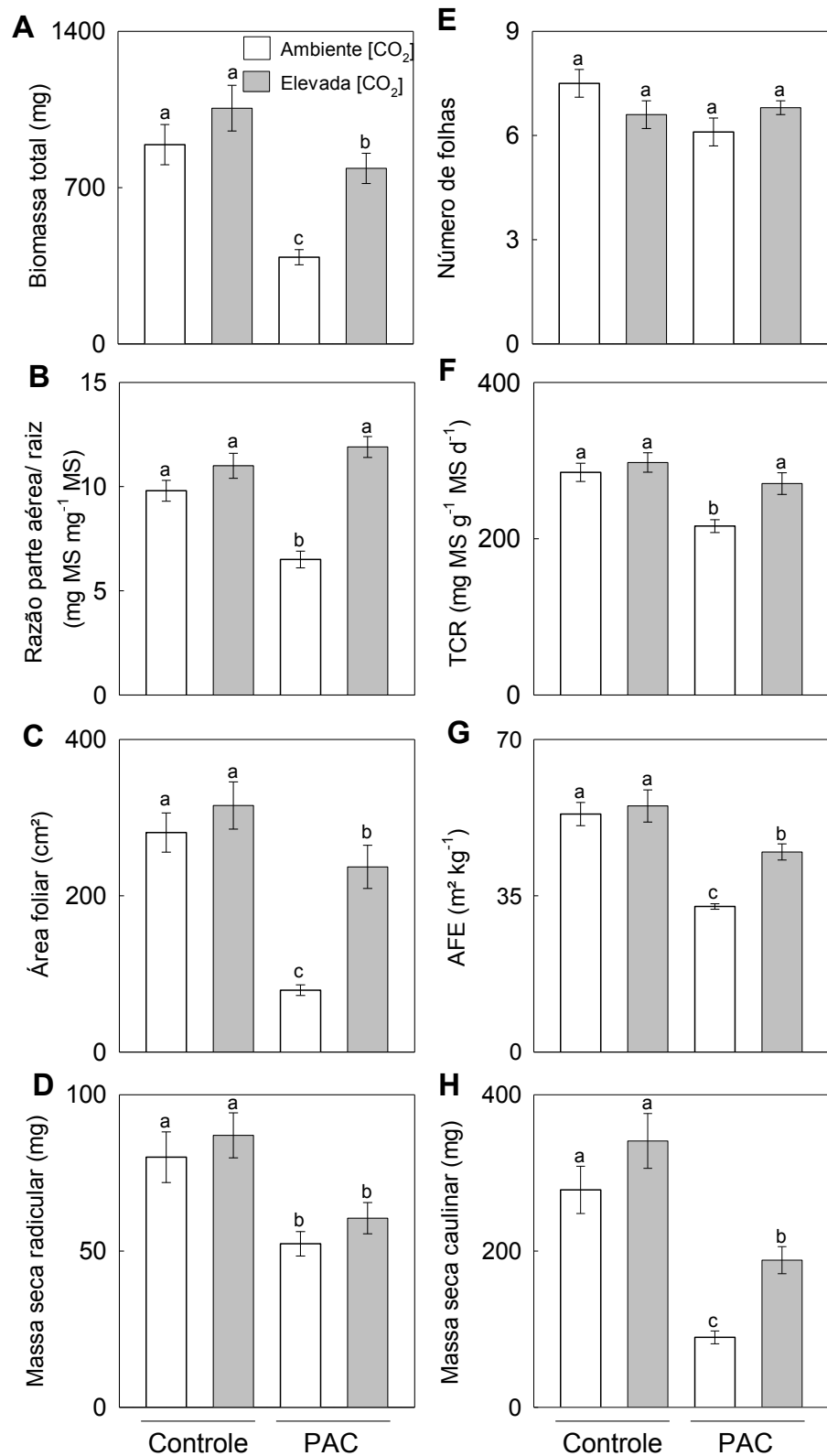


Figura 3. Análise do crescimento de plantas de tomate tratadas com PAC sob concentração de CO₂ ambiente e elevada (A-H). TCR, taxa de crescimento relativo; AFE, área foliar específica. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias ± erro padrão, n = 14.

tratadas com PAC foram estatisticamente iguais aos das plantas do controle (Figura 4F). Nas plantas tratadas com PAC, a C_i/C_a , F_v/F_m , E bem como o qP foram iguais estatisticamente aos das plantas do controle, tanto sob concentração de CO_2 ambiente e elevada (Figura 4G-J). Os níveis de clorofilas totais aumentaram em 34 % em plantas tratadas com PAC e cultivadas sob concentração de CO_2 ambiente em comparação com as plantas do controle (Figura 4K). Já sob concentração de CO_2 elevada, os níveis de clorofilas totais em plantas tratadas com PAC permaneceram estáveis em relação ao controle (Figura 4K).

O PAC reduziu os níveis de glicose (54%), frutose (56%), sacarose (34%) e amido (49%) em folhas de plantas cultivadas sob concentração de CO_2 ambiente, em relação ao controle. Entretanto, os níveis de glicose, frutose, sacarose e amido permaneceram estáveis nas plantas tratadas com PAC, em comparação com os das plantas do controle que crescem sob concentração de CO_2 elevada (Figura 5A-D). O PAC reduziu significativamente os níveis de glicose (56 %) do caule das plantas de tomate mantidas sob concentração de CO_2 ambiente. Além disso, os níveis de glicose do caule das plantas tratadas com PAC em elevada concentração de CO_2 foi menor (24 %), quando comparado ao controle (Figura 5E).

Os níveis de frutose foram iguais estatisticamente no caule das plantas tratadas com PAC, tanto em plantas cultivadas em concentração de CO_2 ambiente quanto em concentração de CO_2 elevada (Figura 5F). Ademais, observou-se um aumento significativo nos níveis de sacarose (53 %) e amido (56 %) no caule das plantas tratadas com PAC e cultivadas sob concentração de CO_2 ambiente, mas não no caule das plantas tratadas com PAC mantidas em concentração de CO_2 elevada, em comparação com os seus respectivos controles (Figura 5G, H).

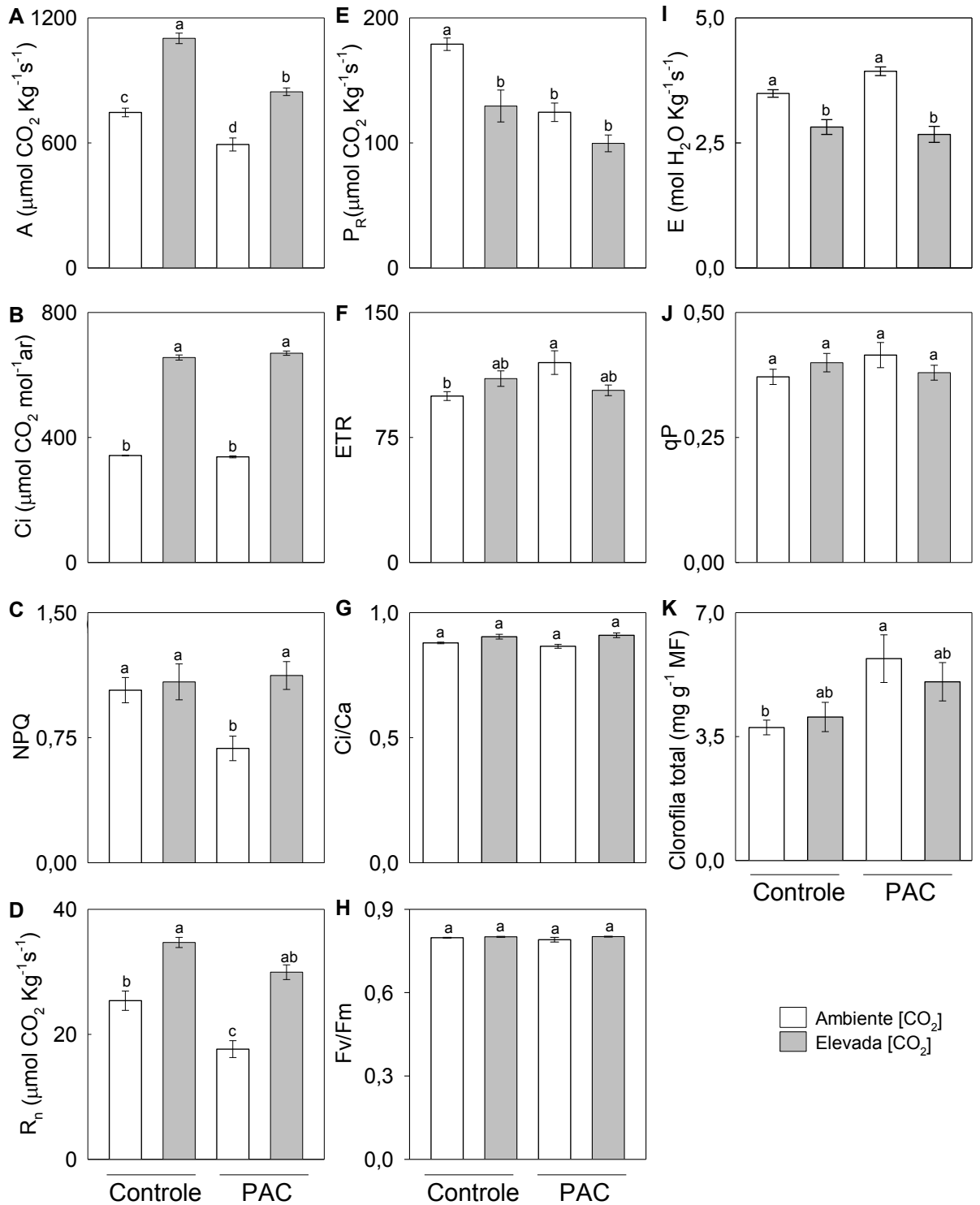


Figura 4. Trocas gasosas e fluorescência em plantas de tomate tratadas com PAC, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada (A-K). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias \pm erro padrão, n = 8.

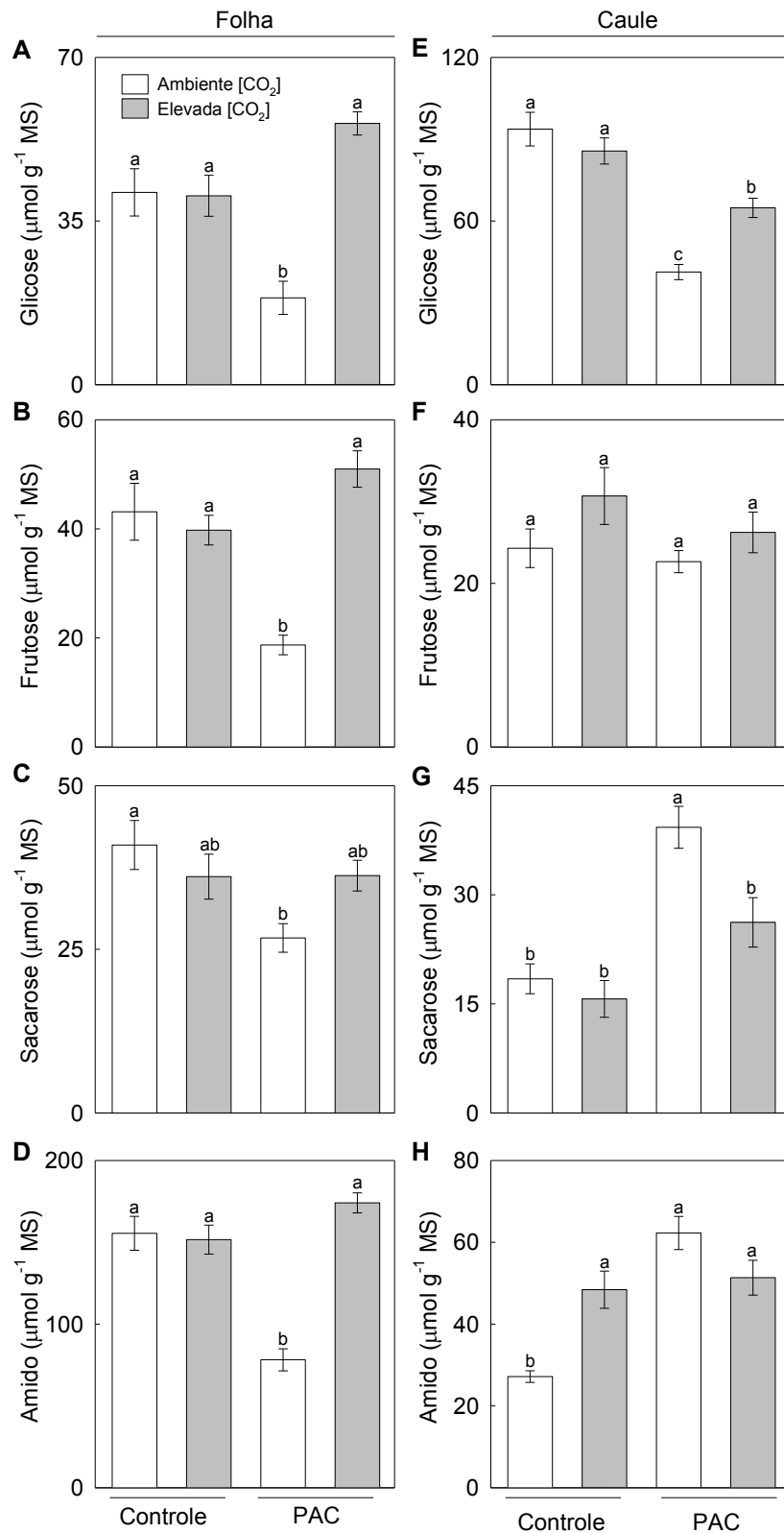


Figura 5. Níveis de metabólitos nos tecidos da folha (A-D) e do caule (E-H) de plantas de tomate tratadas com PAC, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias ± erro padrão, n = 6.

Os níveis de proteína total e aminoácidos não foram significativamente afetados nas folhas das plantas de tomate tratadas com PAC mantidas tanto sob concentração de CO₂ ambiente e elevada, quando em comparação com os seus respectivos controles (Figuras 6A, B). Sob concentração de CO₂ ambiente, os níveis de proteína total aumentaram no caule das plantas tratadas com PAC, em comparação com o controle. Entretanto, os níveis de proteína não diferiram estatisticamente entre si no caule das plantas tratadas com PAC e cultivadas sob concentração de CO₂ elevada (Figura 6C). Os níveis de aminoácidos foram iguais estatisticamente no caule das plantas tratadas com PAC, tanto em plantas cultivadas em concentração de CO₂ ambiente quanto em concentração de CO₂ elevada (Figura 6D).

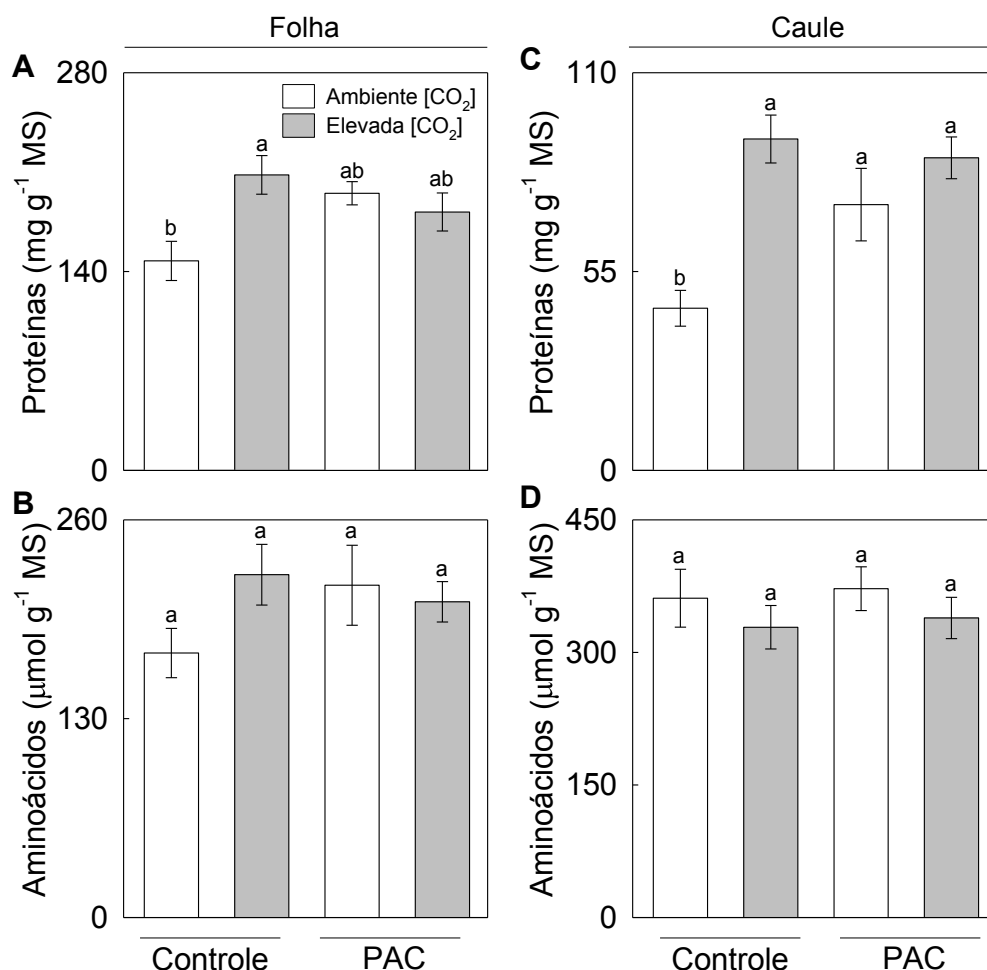


Figura 6. Níveis de proteína e aminoácidos nos tecidos da folha (A, B) e do caule (C, D) de plantas de tomate tratadas com PAC, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias ± erro padrão, n = 6.

O PAC modificou a anatomia foliar das plantas de tomate mantidas sob concentração de CO₂ ambiente, pois as células do parênquima paliçádico mostraram-se mais diferenciadas e justapostas nas plantas tratadas com PAC sob concentração de CO₂ ambiente, em comparação ao controle (Figura 7A, B). Entretanto, os efeitos do PAC na anatomia foliar foram revertidos nas plantas sob concentração de CO₂ elevada (Figura 7C, D).

A espessura da epiderme nas faces abaxial e adaxial, bem como a espessura do parênquima paliçádico não foram significativamente afetadas pelo tratamento com PAC em plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente e elevada, comparadas aos respectivos controles (Figura 8A-C). Sob concentração de CO₂ ambiente, a espessura do parênquima lacunoso, a espessura total da folha e a densidade estomática tanto na face abaxial quanto adaxial da epiderme aumentaram nas plantas tratadas com PAC, em comparação ao seu respectivo controle (Figura 8D-G). Entretanto, a espessura do parênquima lacunoso, a espessura total da folha bem como a densidade estomática tanto na face abaxial quanto adaxial da epiderme não foram afetadas em plantas tratadas com PAC e cultivadas sob concentração de CO₂ elevada em relação ao controle (Figura 8D-G). O PAC reduziu os espaços intercelulares das folhas das plantas de tomate cultivadas tanto sob concentração de CO₂ ambiente (65 %) quanto elevada (20 %) (Figura 8H).

Ademais, o tamanho das células da nervura central bem como o tamanho do feixe vascular foi fortemente reduzido pelo tratamento com PAC em folhas das plantas cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente, mas não sob concentração de CO₂ elevada (Figura 9A-D).

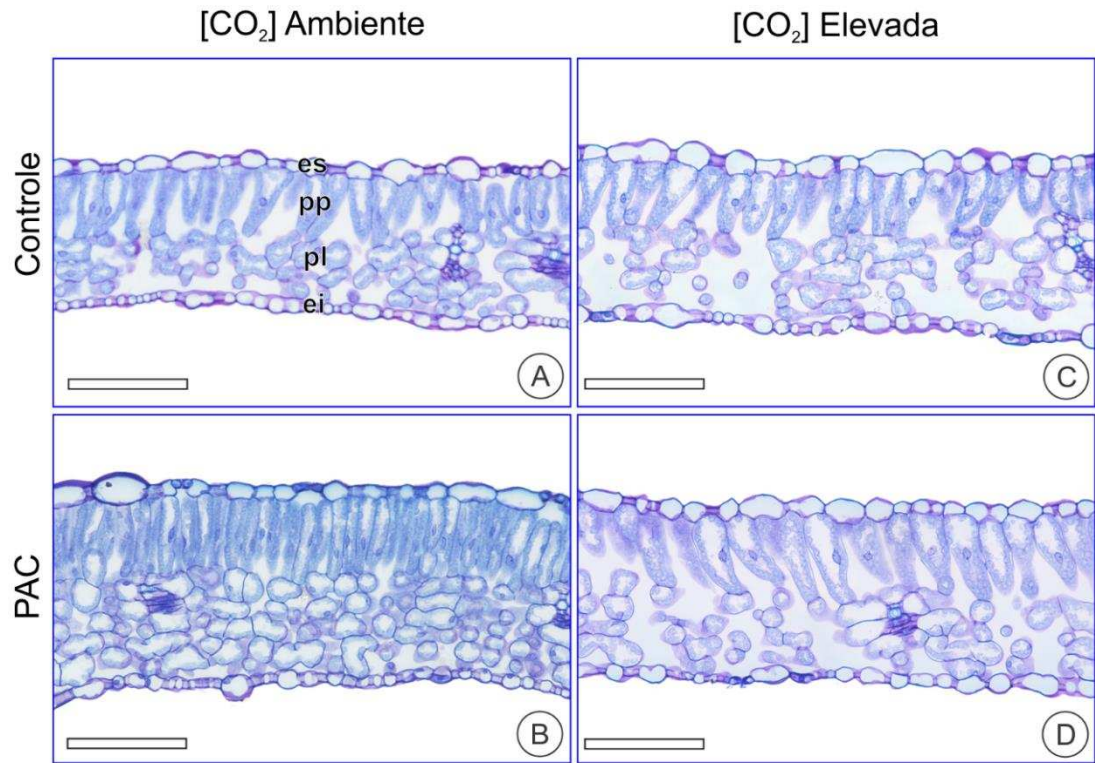


Figura 7. Efeito do PAC sobre a anatomia foliar de plantas de tomate, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. es, epiderme superior; pp, parênquima paliçádico; pl, parênquima lacunoso; ei, epiderme inferior. Barras: 100 µm.

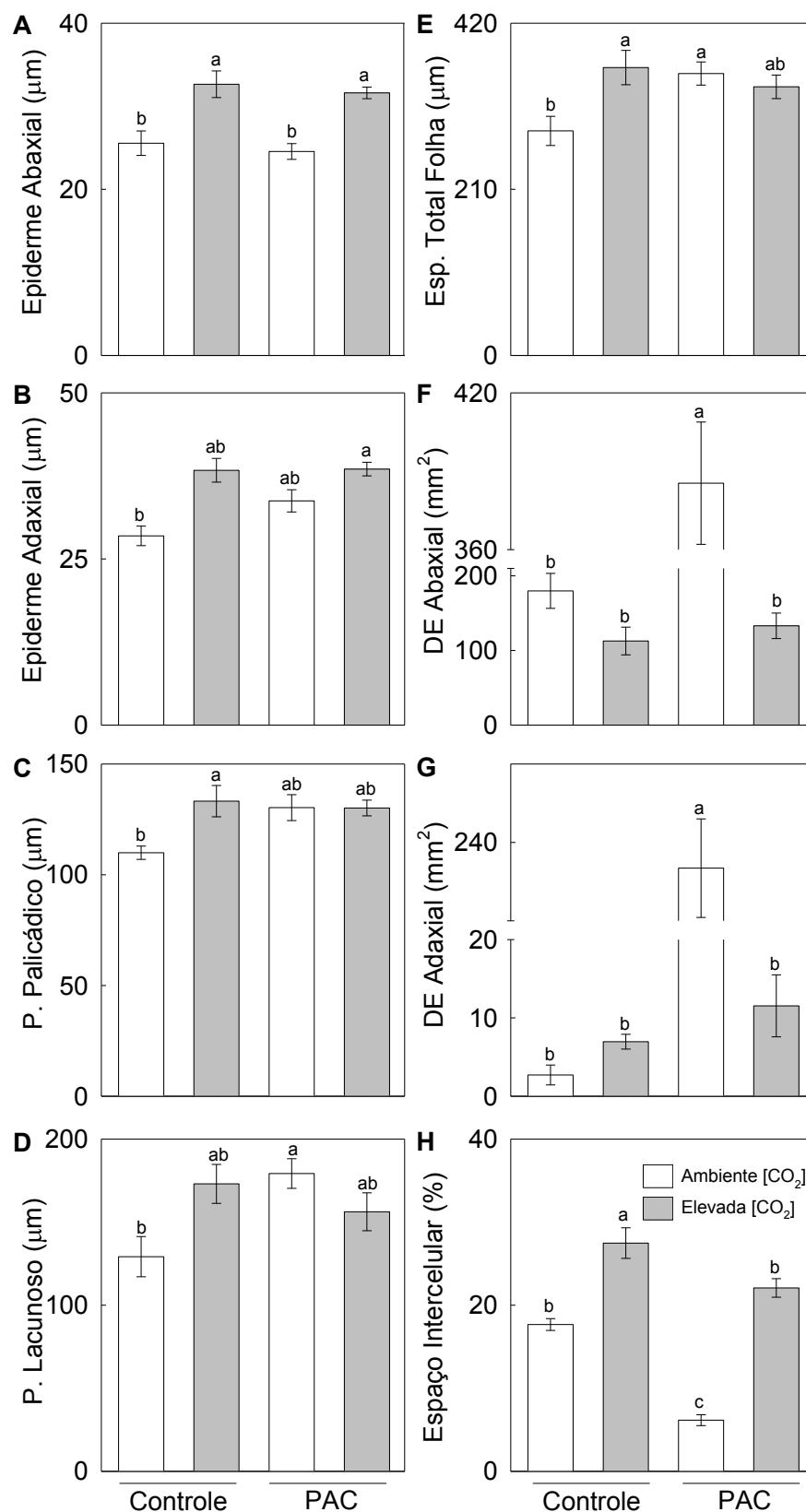


Figura 8. Parâmetros anômicos da folha de plantas de tomate tratadas com PAC, sob concentração de CO_2 ambiente e elevada (A-H). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias \pm erro padrão, n = 5.

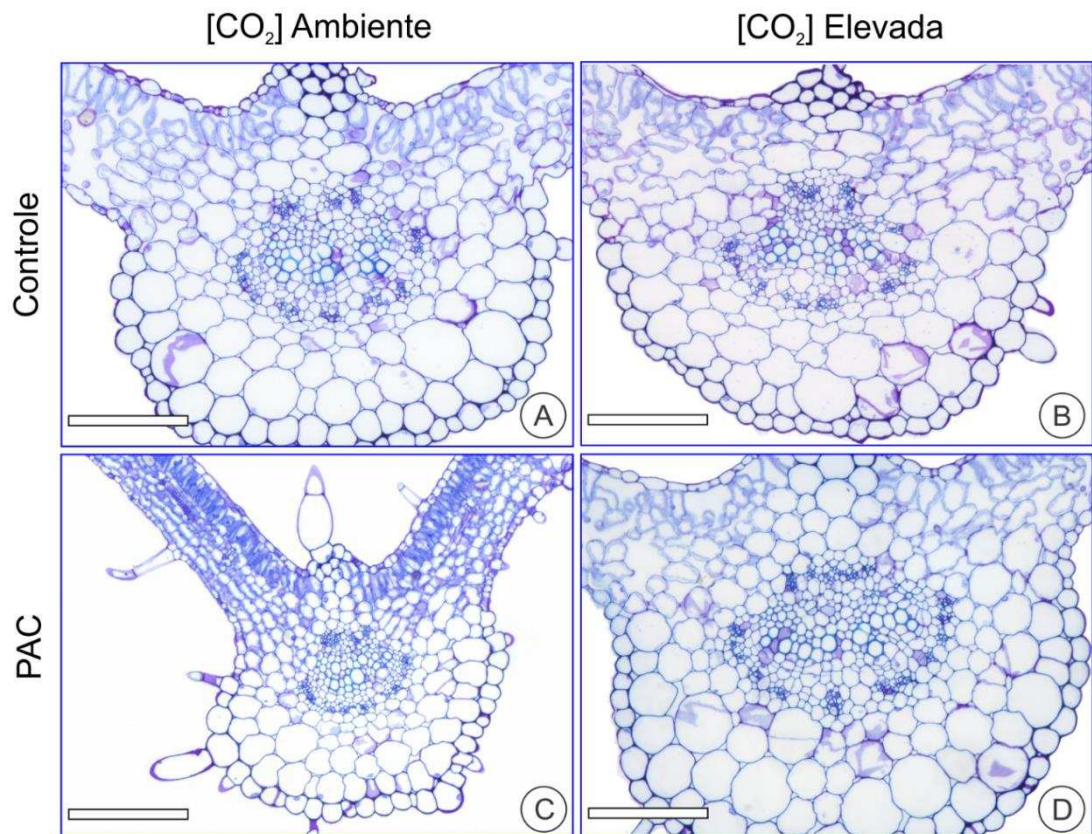


Figura 9. Efeito do PAC na anatomia da nervura da folha de plantas de tomate, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. Barras: 200 μm.

A inibição da biossíntese de giberelinas (tratamento com PAC) alterou a anatomia do caule de plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente, mas não em plantas mantidas sob concentração de CO₂ elevada, em comparação aos seus respectivos controles (Figura 10). O PAC reduziu a área das células do parênquima medular (60 %) e a área dos vasos do xilema (61 %) bem como o diâmetro do entrenó (25 %) e o comprimento (53 %) das células do entrenó em comparação com as plantas do controle sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 11A-D). Entretanto, os efeitos inibitórios do PAC foram revertidos quando as plantas foram mantidas sob concentração de CO₂ elevada. Em adição, o PAC aumentou o número de células do parênquima medular do caule (63 %), em plantas sob concentração de CO₂ ambiente, mas não em plantas sob concentração de CO₂ elevada, em comparação com os seus respectivos controles (Figura 11E). O número de elementos de vasos do xilema do caule manteve-se inalterado nas plantas de tomate tratadas com PAC, tanto em plantas cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente quanto sob concentração de CO₂ elevada (Figura 11F).

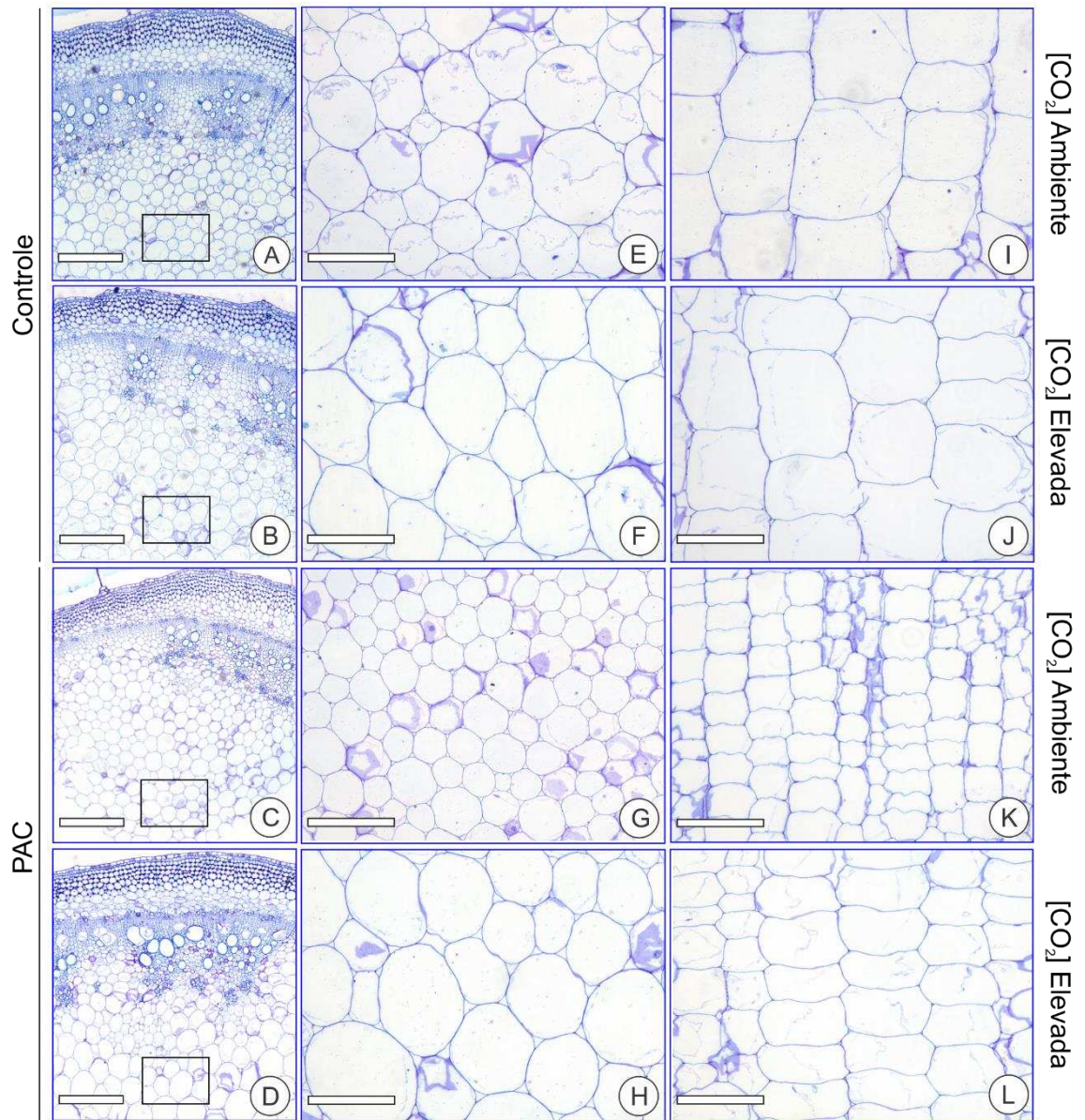


Figura 10. Parâmetros anatômicos do caule de plantas de tomate tratadas com PAC, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. A-H transversal; I-L longitudinal; E-L mostram o detalhe do parênquima medular destacado pelos quadros de A-D. Barras: A-D, 400 μm; E-L, 100 μm.

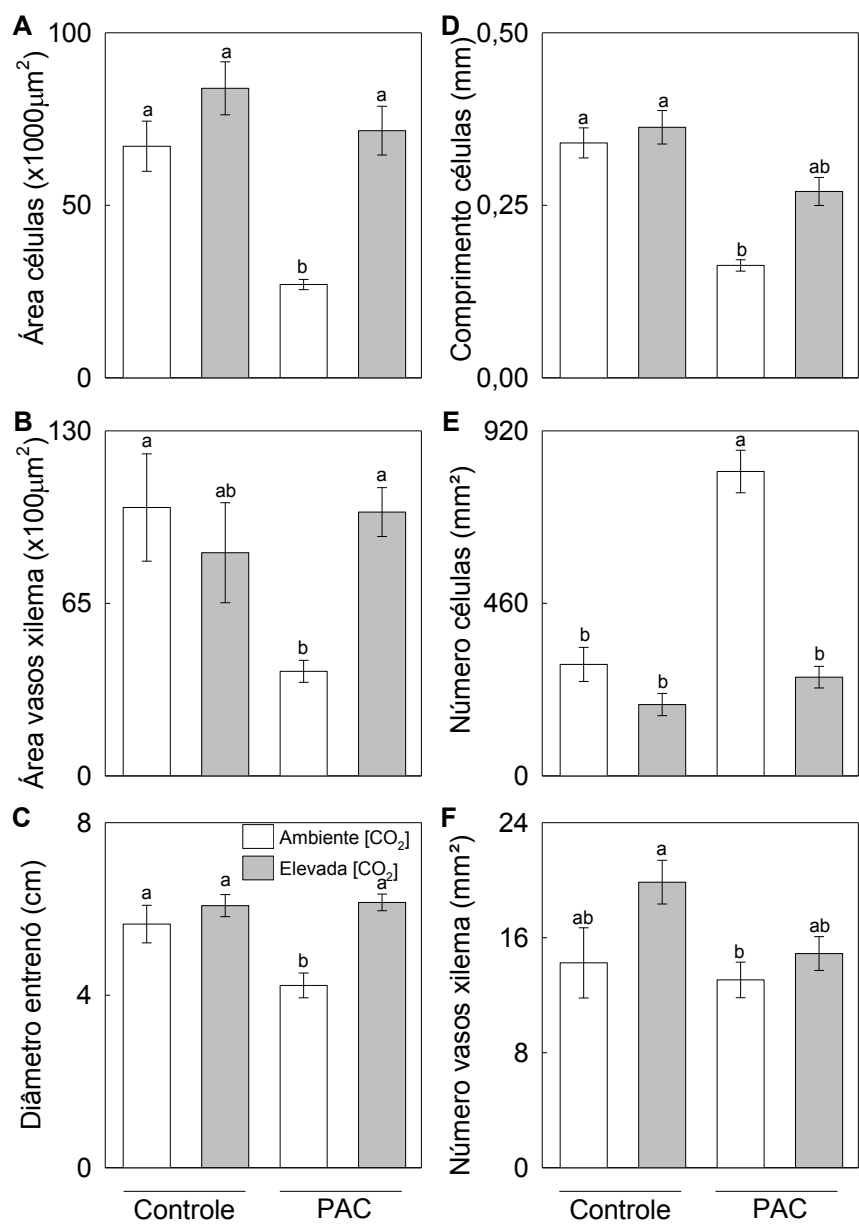


Figura 11. Parâmetros anatômicos do caule de plantas de tomate tratadas com PAC, sob concentração de CO₂ ambiente e elevada. Área das células do parênquima medular (A), área dos vasos do xilema (B), diâmetro do entrenó (C), comprimento das células do parênquima medular (D), número de células do parênquima medular por mm² (E), número de vasos do xilema por mm² (F). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias ± erro padrão, n = 5.

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeito da elevada concentração de CO₂ no crescimento das plantas em resposta a inibição da biossíntese de giberelina

O efeito da inibição da biossíntese de giberelinas por PAC no crescimento das plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente foi revertido pela concentração de CO₂ elevada (Figura 1). O que pode ser observado pelos maiores comprimentos de folha, entrenó, a recuperação da taxa de crescimento relativo e aumento da biomassa total das plantas tratadas com PAC sob concentração de CO₂ elevada (Figura 3). De forma semelhante, a aplicação de ácido giberélico (GA₃) em plantas de *A. thaliana* crescidas em solo suplementado com PAC, também reverteu o efeito da inibição do crescimento, nesse caso, aumentando a área da roseta das plantas (Ribeiro et al., 2013). Em plantas de tomate observamos o mesmo efeito, a concentração de CO₂ elevada promoveu o alongamento do caule e expansão das folhas em plantas tratadas com PAC (Figura 1). Segundo Ribeiro et al. (2012b), a concentração de CO₂ elevada não afeta significativamente a expressão de genes relacionados a biossíntese e sinalização das giberelinas quando comparados a concentração de CO₂ ambiente, indicando que esse efeito de reversão pelo CO₂ ocorre de forma independente de mudanças transcricionais de genes associados as giberelinas.

A ação fisiológica do PAC se dá por este ser um inibidor da enzima ent-caureno oxidase, que catalisa a conversão do ent-caureno a ácido ent-caurenóico na rota de biossíntese das giberelinas (Hedden e Thomas, 2016). Desta forma, a aplicação do PAC em plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente influenciou de forma negativa a expansão celular e o alongamento dos tecidos, favorecendo especialmente a redução da biomassa total e da área foliar, além de outras variáveis de crescimento (Figura 3). O papel dos hormônios na regulação das vias metabólicas relacionadas ao crescimento em resposta à concentração de CO₂ elevada não é bem conhecida (Ribeiro et al., 2012; Zavala et al., 2013). A concentração de CO₂ elevada pode promover o acúmulo de ácido salicílico (Zavala et al., 2013) e brassinosteróides (Jiang et al., 2012b), enquanto parece reduzir os níveis de jasmonatos e etileno (Vaughan et al., 2014). Essa ação do CO₂ na indução de genes associados a síntese de diversos hormônios pode ser a razão pela qual o enriquecimento da

atmosfera com CO₂ possivelmente mitigou a ação do PAC. Por exemplo, sua ação sobre a síntese dos brassinosteróides pode favorecer um aumento da fotossíntese pelo aumento da eficiência da carboxilação e uma melhoria do sistema antioxidante em *Solanum lycopersicum*, além de seu papel na divisão e expansão celular (Ogwen et al., 2008; Jiang et al., 2012a; Schröder et al., 2014). Aumentos nos níveis de ácido indol-3-acético (AIA), também foram encontrados em *Pinus tabulaeformis*, enquanto houve queda nas concentrações de ácido abscísico (ABA) (Li et al., 2011). Além disso, os níveis de transcritos de genes relacionados a síntese ou transporte de auxina e citocinina aumentaram sob concentração de CO₂ elevada (Huang e Xu, 2015).

4.2 Efeito da concentração de CO₂ elevada no metabolismo das plantas de tomate em resposta a inibição da biossíntese de giberelina

Nesse estudo, observamos que a inibição da biossíntese de giberelinas e a concentração de CO₂ elevada alteraram fortemente o metabolismo celular. Nesse contexto, alguns estudos têm mostrado que a concentração de CO₂ elevada pode provocar mudanças não apenas no metabolismo primário mas também na composição dos metabólitos secundários dos tecidos das plantas (Lavola et al., 2013; Xu et al., 2015). Plantas de tomate tratadas com PAC e mantidas sob concentração de CO₂ ambiente apresentaram redução de A e R_n, que, possivelmente, contribuiu para redução no crescimento das plantas (Figura 4). A restrição em A sob tratamento com PAC pode ser explicada pela redução da área foliar, tendo menor área para interceptação de luz, além disso o espessamento das folhas pode ter impedido que parte da luz alcançasse as células inferiores do parênquima (Figuras 4, 8). Ademais, recentes estudos tem demonstrado a ocorrência de mudanças transcricionais em um grande número de genes envolvidos na fotossíntese, parede celular, divisão de cloroplastos e divisão celular após o tratamento com giberelina, mostrando o importante papel desse hormônio na regulação da fotossíntese (Xie et al., 2016).

Em concentração de CO₂ ambiente a aplicação de PAC nas plantas de tomate levou a uma forte redução dos níveis de glicose e frutose nas folhas, o que provavelmente foi utilizado para a síntese de sacarose acumulada no caule dessas plantas, devido a menor força do dreno (Figura 5). O enriquecimento com CO₂ pode acelerar o acúmulo de carboidratos importantes como açúcares, amido e intermediários da cadeia respiratória como hexose fosfato, fosfoglicerato (PGA) e fosfoenolpiruvato

(PEP), em *A. thaliana* (Watanabe et al., 2014). Aumentos na abundância de transcritos para genes envolvidos no metabolismo respiratório sob concentração de CO₂ elevada também tem sido relatados (Li et al., 2008; Wei et al., 2013; Watanabe et al., 2014). Dessa forma, o aumento da R_n em plantas controle e tratadas com PAC cultivadas sob concentração de CO₂ elevada em relação as plantas cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente pode ser atribuída a maior disponibilidade de substratos (Figuras 4, 5). A capacidade das plantas em utilizar o carbono recém assimilado na respiração pode contribuir para a prevenção do acúmulo de carboidratos e, conseqüentemente, evitar a aclimatação fotossintética (Aranjuelo et al., 2009; Li et al., 2013).

Existe um consenso de que o efeito da concentração de CO₂ elevada na fotossíntese é mais pronunciado em plantas C₃ que em C₄. Isso está associado a mudanças em vários componentes envolvidos na fixação e assimilação de carbono, como também na capacidade de transporte de elétrons ou eficiência nas reações de luz (Yu et al., 2012; Watanabe et al., 2014; Huang e Xu, 2015). Em plantas C₃, como tomate, a capacidade de carboxilação da Rubisco é facilmente aumentada sob concentração de CO₂ elevada (Huang e Xu, 2015; Xu et al., 2015). Dessa forma, a elevada concentração de CO₂ pode ter contribuído para maiores taxas fotossintéticas em plantas controle e tratadas com PAC em relação às plantas cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente e, subsequente aumento nas concentrações de metabólitos (Figuras 4, 5). Além disso, a concentração de CO₂ elevada por promover uma maior relação CO₂:O₂, pode reduzir a atividade oxigenase da Rubisco, inibindo a fotorrespiração (Tingey et al., 2003), o que foi também observado nas plantas do controle (Figura 4). Como já descrito anteriormente, o papel da elevada concentração de CO₂ sob os hormônios que afetam positivamente o crescimento vegetal, possivelmente melhorou a fotossíntese e a respiração. Além disso, a atuação dos hormônios pode ter auxiliado para o aumento de metabólitos como glicose, frutose e amido, que favoreceram o crescimento final da planta (Figuras 4, 5).

4.3 Alterações anatômicas

Os efeitos do tratamento com PAC em plantas de tomate cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente foram nítidos nas alterações anatômicas. Alguns efeitos da inibição da biossíntese de giberelinas na anatomia já foram demonstrados (Jiang et al., 2012a; Wang et al., 2015). De forma semelhante ao observado por Jiang et al. (2012a), em mutantes de *Arabidopsis* deficientes em giberelinas, observou-se um maior empacotamento das células do mesofilo em plantas de tomate tratadas com PAC e cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente em relação ao controle (Figura 7). A anatomia da folha e do caule apresentaram acentuada redução do tamanho das células (Figuras 9, 10). Como houve restrição à expansão celular pela inibição da biossíntese de giberelinas sob concentração de CO₂ ambiente, simultaneamente ocorreu um aumento no número de células nessas plantas em relação ao controle (Figura 11). Isso mostra o papel crítico das giberelinas na regulação da divisão celular, expansão celular e organização durante o crescimento e desenvolvimento foliar (Jiang et al., 2012a).

O crescimento das plantas é dirigido pela pressão de turgor das células, a qual depende da concentração citoplasmática de macromoléculas como carboidratos e aminoácidos (Geitmann e Ortega, 2009; Hamant e Traas, 2010; Robinson et al., 2013; Beauzamy et al., 2014). Tal pressão, depende do potencial osmótico das células, assim o metabolismo de carboidratos, especialmente a produção fotossintética de sacarose é importante para a divisão e expansão celular (Beauzamy et al., 2014). Segundo Huang e Xu (2015), o estímulo à expansão celular pode estar relacionado ao aumento da disponibilidade de substratos (sacarose) sob concentração de CO₂ elevada. Nas plantas de tomate tratadas com PAC e mantidas sob concentração de CO₂ elevada, houve aumento nos níveis de glicose, frutose e amido nas folhas comparadas ao mesmo tratamento sob concentração de CO₂ ambiente, o que provavelmente contribuiu para a maior expansão das células (Figura 5). Já os níveis de proteínas e aminoácidos mantiveram-se estáveis (Figura 6).

Outro aspecto interessante da anatomia foliar foi que a aplicação de PAC em plantas cultivadas sob concentração de CO₂ elevada claramente levou ao aumento dos espaços intercelulares em relação ao mesmo tratamento sob CO₂ ambiente. O que pode ter contribuído no aumento da concentração interna de CO₂ nessas plantas, levando a maiores taxas fotossintéticas e de crescimento (Figuras 3, 4, 8). Ademais, a densidade estomática de ambas as faces da epiderme foram grandemente aumentadas pela

aplicação de PAC sob concentração de CO₂ ambiente em relação ao controle (Figura 8). Entretanto, esse parâmetro não levou a maiores taxas fotossintéticas e concentração interna de CO₂, provavelmente devido a redução da percentagem de espaços intercelulares nas plantas cultivadas com PAC sob concentração de CO₂ ambiente, o que aumenta a resistência à difusão de CO₂ na folha. Dessa forma, mesmo que as plantas estivessem com os estômatos abertos, houve redução da concentração interna de CO₂ devido à resistência a passagem de CO₂ até o sítio de carboxilação da Rubisco, além de aumentar as perdas de água por transpiração, refletindo nas menores taxas de crescimento (Figuras 3, 8). De forma oposta, plantas mantidas sob concentração de CO₂ elevada apresentaram uma menor densidade estomática. Provavelmente porque nesse ambiente não necessitaram de tantos estômatos para que a entrada de CO₂ ocorresse em quantidade adequada, já que houve maior A e uma compensação na diferenciação dos tecidos nessas plantas (Figuras 4, 7, 10). Outro ponto interessante é que com o aumento da concentração de CO₂ as plantas possuem uma maior eficiência de uso da água pois conseguem reduzir as taxas transpiratórias, ou seja, diminuir a abertura estomática para a saída de água, no entanto mantendo maiores taxas fotossintéticas (Keenan et al., 2013). O que pode ser observado em plantas controle e tratadas com PAC, mostrando vantagens de plantas de tomate, assim como as demais plantas C₃, para condições futuras de ambiente com alta concentração de CO₂.

Na anatomia do caule observamos que o tratamento com PAC sob concentração de CO₂ ambiente proporcionou maior número de células do parênquima medular por área, entretanto essas células tiveram restrição a expansão (menor área de seção transversal), levando à redução do diâmetro do entrenó (Figura 11). Resultado semelhante também foi encontrado no comprimento das células, o qual foi inferior nas plantas tratadas com PAC sob concentração de CO₂ ambiente em relação ao controle, reduzindo o comprimento final do entrenó nessas plantas (Figuras 2, 11). Como descrito por Zhou et al. (2016), giberelinas possuem um importante papel na promoção do alongamento do caule em plantas, através de um regulador membro da família ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR)/AP2 (APETALA2) de duplo papel que atua inibindo a biossíntese de etileno e ativando as vias de biossíntese e sinalização de giberelinas. Outra característica que provavelmente contribuiu para a redução do alongamento do caule foi a diminuição da área dos elementos de vasos do xilema, que pode ter reduzido a eficiência no transporte de água para os tecidos em crescimento

(Cao et al., 2012). Apesar dessa redução na área dos vasos houve a tentativa de compensação pelo aumento no número de vasos do xilema diferenciados (Figura 11). Ademais, a concentração de CO₂ elevada atuou de forma diferencial na expansão e no alongamento das células do parênquima medular do caule de plantas tratadas com PAC, pois o efeito na área das células foi revertido, entretanto o comprimento foi menos estimulado (Figura 10).

5 CONCLUSÃO

O tratamento das plantas de tomate com PAC cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente reduz significativamente as variáveis de crescimento. A aplicação de PAC sob concentração de CO₂ ambiente contribui para redução de A, R_n, além de açúcares e amido nas folhas. Parâmetros anatômicos como tamanho de células, espaços intercelulares e densidade estomática também são afetados pelo PAC em concentração de CO₂ ambiente. A redução do entrenó ocorre devido ao menor comprimento das células do parênquima medular e a menor área dos elementos de vasos do xilema. Há aumento do número de células por área e restrição à expansão celular.

A concentração de CO₂ elevada reverte a inibição do crescimento das plantas de tomate tratadas com PAC. Tal efeito pode ser explicado pelas maiores taxas fotossintéticas e de respiração. O aumento dos espaços intercelulares nas folhas colaboram para as trocas gasosas. Os maiores níveis de açúcares nas folhas contribuem para a maior expansão celular. Há aumento no alongamento e no diâmetro do entrenó sob concentração de CO₂ elevada, maior comprimento e área das células do parênquima medular, além do aumento da área de elementos de vasos do xilema.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., Genschik, P.** (2009). Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Cur. Biol.* **19**: 1188–1193.
- Aranjuelo, I., Pardo, A., Biel, C., Savé, R., Azcón-Bieto, J., e Nogués, S.** (2009). Leaf carbon management in slow-growing plants exposed to elevated CO₂. *Glob. Chang. Biol.* **15**: 97–109.
- Beauzamy, L., Nakayama, N., and Boudaoud, A.** (2014). Flowers under pressure : ins and outs of turgor regulation in development. *Ann. Bot.*
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.* **72**: 248-254.
- Cao, X., Jia, J.B., Li, H., Li, M.C., Luo, J., Liang, Z.S., Liu, T.X., Liu, W.G., Peng, C.H., and Luo, Z.B.** (2012). Photosynthesis, water use efficiency and stable carbon isotope composition are associated with anatomical properties of leaf and xylem in six poplar species. *Plant Biol.* **14**: 612–620.
- Cheng, C., Jiao, C., Singer, S.D., Gao, M., Xu, X., Zhou, Y., Li, Z., Fei, Z., Wang, Y., and Wang, X.** (2015). Gibberellin-induced changes in the transcriptome of grapevine (*Vitis labrusca* × *V. vinifera*) cv. Kyoho flowers. *BMC Genomics* **16**: 128.
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol.* **142**: 1574-1588.
- Davière, J.-M. and Achard, P.** (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147-1151.
- Fernie, R.A., Roscher, A., Ratcliffe, G.R., Kruger, J.N.** (2001). Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250–263.
- Fleet, C.M., Sun, T.P.** (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 77-85.

- Geigenberger, P., Lerchl, J., Stitt, M., Sonnewald, U.** (1996). Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant Cell Environ.* **19**: 43-55.
- Gibon, Y., Usadel, B., Blaesing, O.E., Kamlage, B., Hoehne, M., Trethewey, R., Stitt, M.** (2006). Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal 20 cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biol.* **7**: R76.
- Geitmann, A. and Ortega, J.K.E.** (2009). Mechanics and modeling of plant cell growth. *Trends Plant Sci.* **14**: 467–478.
- Gonzalez, N., Vanhaeren, H., and Inzé, D.** (2012). Leaf size control: Complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci.* **17**: 332–340.
- Hamant, O. and Traas, J.** (2010). The mechanics behind plant development. *New Phytol.* **185**: 369–385.
- Hedden, P. and Sponsel, V.** (2015). A Century of Gibberellin Research. *J. Plant Growth Regul.* **34**: 740–760.
- Hedden, P. and Thomas, S.G.** (2016). The Gibberellins. *Annual Plant Reviews.* 470p.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J.** (2001). The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**: 2065-2070.
- Hendriks, J.H.M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., Geigenberger, P.** (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiol.* **133**: 838-849.
- Huang, B. and Xu, Y.** (2015). Cellular and Molecular Mechanisms for Elevated CO₂–Regulation of Plant Growth and Stress Adaptation. *Crop. Sci.* **55**: 1–20.
- Johansen, D.A.** (1940). *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book. 528p.
- Jiang, X., Li, H., Wang, T., Peng, C., Wang, H., Wu, H., and Wang, X.** (2012a). Gibberellin indirectly promotes chloroplast biogenesis as a means to maintain the chloroplast population of expanded cells. *Plant J.* **72**: 768–780.
- Jiang, Y.-P., Cheng, F., Zhou, Y.-H., Xia, X.-J., Shi, K., and Yu, J.-Q.** (2012b). Interactive effects of CO₂ enrichment and brassinosteroid on CO₂ assimilation and photosynthetic electron transport in *Cucumis sativus*. *Environ. Exp. Bot.* **75**: 98–106.

- Keenan, T.F., Hollinger, D.Y., Bohrer, G., Dragoni, D., Munger, J.W., Schmid, H.P., and Richardson, A.D. (2013).** Increase in forest water-use efficiency as atmospheric carbon dioxide concentrations rise. *Nature* **499**: 324–7.
- Lavola, A., Nybakken, L., Rousi, M., Pusenius, J., Petrelius, M., Kellomäki, S., and Julkunen-Tiitto, R. (2013).** Combination treatment of elevated UVB radiation, CO₂ and temperature has little effect on silver birch (*Betula pendula*) growth and phytochemistry. *Physiol. Plant.* **149**: 499–514.
- Li, W., Yamaguchi, S., Khan, M.A., An, P., Liu, X., and Tran, L.-S.P. (2015).** Roles of Gibberellins and Abscisic Acid in Regulating Germination of *Suaeda salsa* Dimorphic Seeds Under Salt Stress. *Front. Plant Sci.* **6**: 1235.
- Li, X., Zhang, G., Sun, B., Zhang, S., Zhang, Y., Liao, Y., Zhou, Y., Xia, X., Shi, K., and Yu, J. (2013).** Stimulated leaf dark respiration in tomato in an elevated carbon dioxide atmosphere. *Sci. Rep.* **3**: 3433.
- Li, X.-M., Zhang, L.-H., Ma, L.-J., and Li, Y.-Y. (2011).** Elevated Carbon Dioxide and/or Ozone Concentrations Induce Hormonal Changes in *Pinus tabulaeformis*. *J. Chem. Ecol.* **37**: 779–784.
- Luomala, E.M., Laitinen, K., Sutinen, S., Kellomaki, S., Vapaavuori, E. (2005).** Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant Cell Environ.* **28**: 733–749.
- Masle, J. (2000).** The effects of elevated CO₂ concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. *Plant Physiol.* **122**: 1399–1415.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000).** Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. of Exp. Bot.* **51**: 659-668.
- O'Brien TP, Feder N, Mccully ME (1964)** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Ogwen, J.O., Song, X.S., Shi, K., Hu, W.H., Mao, W.H., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., and Nogués, S. (2008).** Brassinosteroids Alleviate Heat-Induced Inhibition of Photosynthesis by Increasing Carboxylation Efficiency and Enhancing Antioxidant Systems in *Lycopersicon esculentum*. *J. Plant Growth Regul.* **27**: 49–57.

- Olszewski, N., Sun, T.P., Gubler, F.** (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14** (Suppl.): S61-80.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., and Kriedemann, P.E.** (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **975**: 384–394.
- Paul, E.M.M.** (1984). The response to temperature of a leaf area in tomato genotypes. I. Cell size and number in relation to area of a leaf. *Euphytica* **33**: 347-354.
- Ramaglis, L.S., Rodrigues, L.V.** (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**: 559-563.
- Ribeiro, D.M., Araújo, W.L., Fernie, A.R., Schippers, J.H.M., and Mueller-Roeber, B.** (2012a). Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **63**: 2769–2786.
- Ribeiro, D.M., Araujo, W.L., Fernie, a. R., Schippers, J., and Mueller-Roeber, B.** (2012b). Action of gibberellins on growth and metabolism of Arabidopsis thaliana plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiol.* **160**: 1781–1794.
- Ribeiro, D.M., Mueller-Roeber, B., Schippers, J.H.M.** (2013). Promotion of growth by elevated carbon dioxide is coordinated through a flexible transcriptional network in Arabidopsis. *Plant Signal Behavior* **8**: e23356.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-Ali, T., and Harberd, N.P.** (2001). How gibberellin regulates plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 67–88.
- Robinson, S., Burian, A., Couturier, E., Landrein, B., Louveaux, M., Neumann, D., Peaucelle, A., Weber, A., and Nakayama, N.** (2013). Mechanical control of morphogenesis at the shoot apex. *J. Exp. Bot.* **64**: 4729–4744.
- Schröder, F., Lisso, J., Obata, T., Erban, A., Maximova, E., Giavalisco, P., Kopka, J., Fernie, A.R., Willmitzer, L., and Müssig, C.** (2014). Consequences of induced brassinosteroid deficiency in Arabidopsis leaves. *BMC Plant Biol.* **14**: 309.

- Stavang, J.A., Junttila, O., Moe, R., Olsen, J.E.** (2007). Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *J. Exp. Bot.* **58**: 3061-3069.
- Taylor, G., Tricker, P.J., Zhang, F.Z., Alston, V.J., Miglietta, F., and Kuzminsky, E.** (2003). Spatial and Temporal Effects of Free-Air CO₂ Enrichment (POPFACE) on Leaf Growth , Cell Expansion , and Cell Production in a Closed Canopy of Poplar 1. *Plant Physiol.* **131**: 177–185.
- Tingey, D.T., Mickane, R.B., Olszyk, D.M., Johnson, M.G., Rygielwicz, P.T., and Henry Lee, E.** (2003). Elevated CO₂ and temperature alter nitrogen allocation in Douglas-fir. *Glob. Chang. Biol.* **9**: 1038–1050.
- Valentini, R., Epron, D., De Angelis, P., Matteucci, G., Dreyer, E.** (1995). In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell Environ.* **18**: 631-640.
- Vaughan, M.M., Huffaker, A., Schmelz, E.A., Dafoe, N.J., Christensen, S., Sims, J., Martins, V.F., Swerbilow, J., Romero, M., Alborn, H.T., Allen, L.H., and Teal, P.E.A.** (2014). Effects of elevated [CO₂] on maize defence against mycotoxigenic *Fusarium verticillioides*. *Plant Cell Environ.* **37**: 2691–706.
- Wang, G., Que, F., Xu, Z., Wang, F., and Xiong, A.** (2015). Exogenous gibberellin altered morphology , anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in carrot root and shoot. *BMC Plant Biol.*: 1–12.
- Watanabe, C.K., Sato, S., Yanagisawa, S., Uesono, Y., Terashima, I., and Noguchi, K.** (2014). Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: possible relationships with respiratory rates. *Plant Cell Physiol.* **55**: 341–57.
- Wei, H., Gou, J., Yordanov, Y., Zhan, H., Thakur, R., Jones, W., and Burton, A.** (2012). Global transcriptomic profiling of aspen trees under elevated [CO₂] to identify potential molecular mechanisms responsible for enhanced radial growth. *J. Plant Res.* **126**: 305–320.
- Xie, J., Tian, J., Du, Q., Chen, J., Li, Y., Yang, X., Li, B., and Zhang, D.** (2016). Association genetics and transcriptome analysis reveal a gibberellin-responsive pathway involved in regulating photosynthesis. *J. Exp. Bot.* **67**: 3325–3338.

- Xu, Z., Jiang, Y., and Zhou, G.** (2015). Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Front. Plant Sci.* **6**: 701.
- Yamaguchi, S.** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 225-251.
- Zavala, J. A., Nability, P. D., and Delucia, E. H.** (2013). An emerging understanding of mechanisms governing insect herbivory under elevated CO₂. *Annu. Rev. Entomol.* **58**: 79–97.
- Zhou, X., Zhang, Z.-L., Yusuke, J., Qiu, K., Park, J., Nam, E.A., Lumba, S., Desveaux, D., McCourt, P., Kamiya, Y., Tyler, L., and Sun, T.** (2016). ERF11 Promotes Internode Elongation by Activating Gibberellin Biosynthesis and Signaling Pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **171**: pp.00154.2016.
- Zsögön, A., Negrini, A.C.A., Peres, L.E.P., Nguyen, H.T., and Ball, M.C.** (2015). A mutation that eliminates bundle sheath extensions reduces leaf hydraulic conductance, stomatal conductance and assimilation rates in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytol.* **205**: 618–26.

MATERIAL SUPLEMENTAR

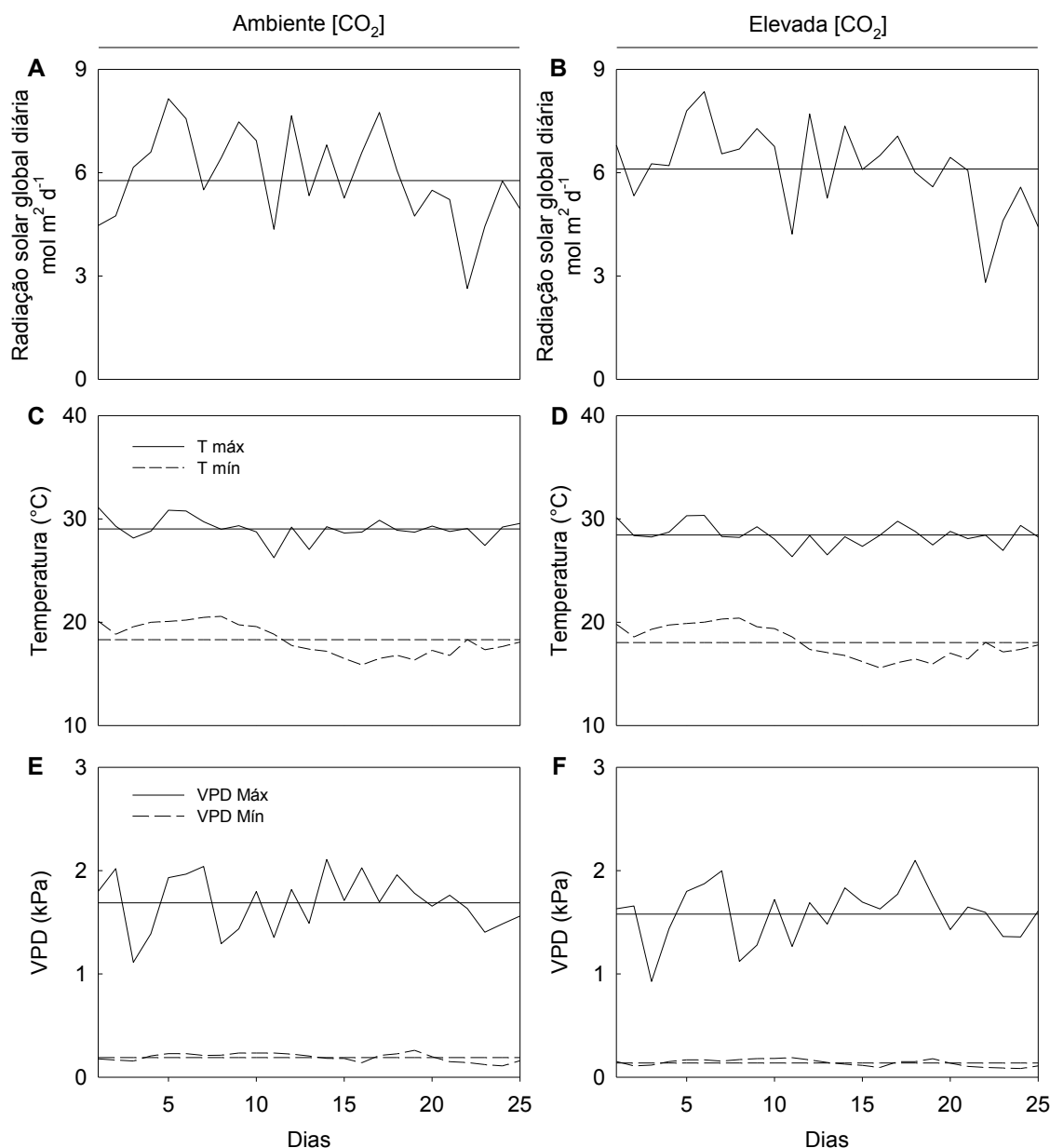


Figura S1. Variação da radiação solar global diária (A e B), temperaturas máximas e mínimas diárias (C e D) e déficit de pressão de vapor (E e G) máximos e mínimos ao longo do período de condução dos experimentos. Câmara de topo aberto suplementada com 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ (Esquerda), câmara de topo aberto suplementada com 750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ (Direita). Linhas horizontais representam as médias dos valores. Os sensores de temperatura, umidade relativa e radiação foram instalados em abrigo meteorológico dentro das câmaras de topo aberto. Todos os sensores (LICOR) foram conectados a um sistema de aquisição de dados (LI-1400, LICOR, EUA), coletando-se os dados a cada minuto e armazenando-se o valor médio a cada 30 min.