

KARLA GASPARINI DOS SANTOS

**AÇÃO DE GIBERELINAS NO DESENVOLVIMENTO DO TOMATEIRO
ASSOCIADA À ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE CO₂**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

S237a
2017 Santos, Karla Gasparini dos, 1986-
Ação de giberelinas no desenvolvimento do tomateiro
associada à elevada concentração de CO₂ / Karla Gasparini dos
Santos. – Viçosa, MG, 2017.
x, 93f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tomate. 2. Hormônios vegetais. 3. Plantas - Mutação.
4. Dióxido de carbono atmosférico. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 635.642

KARLA GASPARINI DOS SANTOS

**AÇÃO DE GIBERELINAS NO DESENVOLVIMENTO DO TOMATEIRO
ASSOCIADA À ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE CO₂**

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

APROVADA: 14 de março de 2017.

João Henrique Frota Cavalcanti

Lázaro Eustáquio Pereira Peres

Wagner Luiz Araújo

Agustín Zsögön
(Coorientador)

Dimas Mendes Ribeiro
(Orientador)

*À minha mãe Rosangela, por todo amor,
carinho, compreensão, suporte e apoio.*

*Dedico à você a conclusão dessa
etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, apoio e educação durante todos os momentos.

Ao meu irmão Joaquim, por toda ajuda e pelos momentos de descontração nas horas de tensão.

Ao meu irmão Thiago, pelo suporte à toda a família durante a realização desse sonho.

Ao Arthur, agradeço pela paciência, pelo carinho e por confiar em mim nos momentos em que mais estava desacreditada.

Ao professor Dimas M. Ribeiro, agradeço imensamente pela orientação nesse último ano, pela confiança e por tornar possível a realização desta tese em tão pouco tempo.

Aos professores Agustín Zsögön e Wagner L. Araújo pela amizade, conversas, sugestões ao projeto e pela participação na defesa.

Ao professor Lázaro Eustáquio Pereira e ao Dr. João Henrique Frota Cavalcanti por terem aceitado o convite para participar da arguição oral da tese e pelas contribuições ao trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos meus amigos do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de plantas, o laboratório mais unido da Fisiologia Vegetal! Obrigada pelo acolhimento, pela amizade, pelo carinho e por toda ajuda com o experimento. Aos amigos do Laboratório de Fisiologia molecular de Plantas, Carlinha, Emanuel, Jessenia, Juliene e Suzy. Em especial aos meus amigos de curso e vida Luna, Fernanda, Giuliana Mireli, Rodrigo e Vitor por compartilhar dos melhores e piores momentos nesses

quatro anos. À Analu e Olga Maria, pela melhor família que Viçosa poderia me presentear.

E principalmente agradeço a Deus pela minha vida, pelas minhas conquistas e pelo meu futuro.

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

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A = taxa de assimilação líquida de carbono

ABA = ácido abscísico

AFE = área foliar específica

ATP = adenosina trifosfato

BR = brassinosteróide

Ca = cálcio

C_a = clorofila a

C_b = clorofila b

C_c = concentração de CO_2 no sítio carboxilação

C_i = concentração intercelular de CO_2

CO_2 = dióxido de carbono

Cu = cobre

DAG = dias após a germinação

ETR = taxa de transporte de elétrons

Fe = ferro

F_0 = fluorescência inicial

F_m = fluorescência máxima

FMC = fração de massa caulinar

FMF = fração de massa foliar

FMR = fração de massa radicular

FSII = fotossistema II

F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do FSII

GA = giberelina

g_s = condutância estomática

G6PDH = glicose 6 fosfato desidrogenase

$J_{\max}$ = taxa máxima de transporte de elétrons

K = potássio

Mg = magnésio

Mn = manganês

MS = massa seca

NAD = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímico

P = fósforo

PAC = paclobutrazol

PDK1 = piruvato desidrogenase cinase 1

PGI = fosfoglicoisomerase

R_D = taxa de respiração no escuro

R_L = Taxa de respiração na luz

R_p = fotorrespiração

RFA= radiação fotossinteticamente ativa

S = enxofre

TCA = ciclo dos ácidos tricarboxílicos

TCR = taxa de crescimento relativo

$V_{\max}$ = velocidade máxima de carboxilação

Zn = zinco

RESUMO

DOS SANTOS, Karla Gasparini. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Ação de giberelinas no desenvolvimento do tomateiro associada à elevada concentração de CO₂**. Orientador: Dimas Mendes Ribeiro. Coorientador: Agustín Zsögön

O aumento de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera durante as últimas décadas tem despertado crescente interesse na função desse gás no crescimento e desenvolvimento das plantas. Apesar da conhecida associação entre concentração de CO₂ elevada e o crescimento das plantas, seus efeitos na regulação do metabolismo primário coordenado pelas giberelinas (GA) são, ainda, pouco conhecidos. Neste trabalho, procuramos compreender o papel da concentração de CO₂ elevada em plantas de tomate com reduzido nível de GA em diferentes estádios de crescimento. Para isso planta mutante *gib-1* e plantas tratadas com o inibidor da biossíntese de GAs, paclobutrazol (PAC) foram submetidas à concentração de CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. A inibição do crescimento pelo reduzido nível de GA foi revertida quando as plantas foram submetidas à concentração de CO₂ elevada aos 21 dias após a germinação. O estímulo da A e o aumento nos níveis de carboidratos contribuem para o estímulo do crescimento sob concentração de CO₂ elevada mesmo sob deficiência de GAs. A capacidade da concentração de CO₂ elevada em restaurar o crescimento das plantas é um reflexo da flexibilidade metabólica dessas plantas diante de uma situação que estimule o crescimento. Contudo, este estímulo pode estar restrito a uma fase do crescimento/desenvolvimento das plantas, visto que, quando submetidas á concentração de CO₂ elevada aos 35 DAG, plantas controle e com reduzido nível de GAs não alteraram seu crescimento.

ABSTRACT

DOS SANTOS, Karla Gasparini. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march 2017. **Action of gibberellins in tomato plants development associated with high concentration of CO₂**. Adviser: Dimas Mendes Ribeiro. Co-adviser: Agustín Zsögön

The increase of carbon dioxide (CO₂) in the atmosphere during the last decades has aroused interest in the function of this gas in the growth and development of plants. Despite the known association between high CO₂ concentration and plant growth, its effects on the regulation of primary metabolism coordinated by gibberellins (GA) are still poorly understood. In this work, we aimed to understand the role of high concentration of CO₂ in tomato plants with reduced GA content at different stages of growth. For this purpose, *gib-1* mutant and plants treated with paclobutrazol (PAC), GA biosynthesis inhibitor, were submitted either to ambient (400 µmol CO₂ mol⁻¹ ar) and to elevated (750 µmol CO₂ mol⁻¹ ar) CO₂ at 21 and 35 days after germination (DAG). Inhibition of growth by the low GA content was reverted by elevated CO₂ concentration at 21 DAG. The stimulation of A and the increase in carbohydrate levels contribute to the growth in elevated CO₂ concentration, even under low GA regime. The ability of the elevated CO₂ concentration to restore the plant growth is a reflection of the metabolic flexibility in face of a situation that stimulates growth. However, the growth stimulation is restricted to a stage of plant growth / development, since plants with low GA content submitted to elevated concentration of CO₂ at 35 DAG did not alter their growth.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1.	Material vegetal e condição de cultivo	7
2.2.	Quantificação de parâmetros morfológicos	9
2.3.	Avaliação das características anatômicas da folha	9
2.4.	Trocas gasosas	10
2.5.	Análises bioquímicas	12
2.6.	Perfil metabólico	14
2.7.	Quantificação de nutrientes foliar	15
2.8.	Delineamento experimental e análise estatística	16
3.	RESULTADOS	16
3.1.	Efeito da concentração de CO₂ elevada em tomateiro deficiente em giberelinas	16
3.1.1.	<i>Concentração de CO₂ elevada modifica o crescimento do tomateiro deficiente na produção de giberelinas</i>	16
3.1.2.	<i>A Deficiência de giberelinas afeta a organização das células do mesofilo em tomateiro</i>	18
3.1.3.	<i>Concentração de CO₂ elevada modifica os parâmetros fotossintéticos em resposta às giberelinas</i>	20
3.1.4.	<i>Efeito da concentração de CO₂ elevada no metabolismo primário do tomateiro em resposta às giberelinas</i>	23
3.1.5.	<i>Efeito da concentração de CO₂ elevada no nível de macro e micronutrientes foliar de plantas de tomate</i>	36
3.2.	Avaliação da janela de resposta à concentração de CO₂ elevada associada às giberelinas	39
3.2.1.	<i>Influência da idade da planta em resposta a concentração de CO₂ elevada.</i>	39
3.2.2.	<i>Efeito da concentração de CO₂ elevada nos parâmetros de trocas gasosas em resposta a idade das plantas deficiente na biossíntese das giberelinas ..</i>	44
3.2.3.	<i>Efeito da concentração de CO₂ elevada no metabolismo do nitrogênio em resposta a idade das plantas deficiente na biossíntese das giberelinas</i>	50
3.2.4.	<i>Efeito da concentração de CO₂ elevada nos níveis de açúcares e amido em resposta a idade das plantas deficiente na biossíntese das giberelinas</i>	52

4. DISCUSSÃO	57
4.1. Efeito da concentração de CO₂ elevada em tomateiro deficiente em giberelinas	57
4.1.1. <i>Crescimento e disponibilidade de recursos</i>	57
4.1.2. <i>A concentração de CO₂ elevada modifica a anatomia foliar do mutante gib-1 favorecendo a fotossíntese</i>	63
4.1.3. <i>Alteração nos parâmetros de trocas gasosas</i>	64
4.1.4. <i>A concentração de CO₂ elevada é capaz de reprogramar parte do metabolismo primário em resposta às giberelinas</i>	67
4.2. Avaliação da janela de resposta a concentração de CO₂ elevada associada às giberelinas	71
4.2.1. <i>A ação da concentração de CO₂ elevada é restrita a idade do tomateiro.....</i>	71
4.2.2. <i>Efeito da concentração de CO₂ nas trocas gasosas e metabolismo primário em diferentes estádios de desenvolvimento do tomateiro</i>	75
5. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
MATERIAL SUPLEMENTAR	90

1 INTRODUÇÃO

O aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO₂) está entre os principais fatores que tendem a influenciar as chamadas mudanças climáticas globais. A partir do período industrial até o ano de 2014, a concentração atmosférica de CO₂ aumentou de 280 para 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e, dependendo de futuras emissões, a concentração pode exceder valores de 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, a partir da segunda metade do século XXI, provavelmente acompanhado por aumento de 3,7 a 4,8°C na temperatura (IPCC 2014).

A alteração na concentração atmosférica de CO₂ afeta processos biológicos fundamentais nas plantas e pode alterar o crescimento e a produtividade. De forma geral, a concentração de CO₂ elevada aumenta as taxas fotossintéticas, diminui a fotorrespiração e consequentemente exerce um efeito positivo no crescimento, acúmulo de biomassa e na produtividade; tais efeitos são visualizados principalmente em plantas C3 (Ainsworth e Rogers, 2007; Wu et al., 2007; Ainsworth, 2008; Booker et al., 2009; Hoegy et al., 2010). Além disso, a redução na condutância estomática (g_s) sob concentração de CO₂ elevada, que poderia limitar a taxa de fixação de CO₂, promove uma melhora na eficiência do uso da água (Leakey et al., 2009), beneficiando o crescimento, principalmente no contexto atual onde períodos de seca tendem a se estender. Diante desses fatos, a concentração de CO₂ elevada é considerada um fator positivo para a produtividade agrícola e com isso tem despertado um crescente interesse sobre os mecanismos de regulação desse gás no desenvolvimento das plantas.

O crescimento das plantas envolve divisão e expansão celular (Vanhaeren et al., 2016). A disponibilidade de carboidratos é um dos fatores capaz de modular esses processos, no qual açúcares exercem papel fundamental como molécula

sinalizadora e/ou metabólito utilizado (Wang e Ruan, 2013). A concentração de CO₂ elevada é percebida pelas plantas e exerce estímulo na divisão e expansão celular (Masle, 2000; Luomala et al., 2005; Taylor et al., 2005), e, o aumento na produção e disponibilidade de carboidratos, pode estar relacionado a esses processos nesta condição. Sinais do ambiente como alteração na concentração de CO₂, podem modular as respostas de crescimento das plantas através de alterações nas concentrações de fitohormônios e dessa forma controlar a partição de fotoassimilados entre os tecidos dreno (Hartig e Beck, 2006). As alterações hormonais não somente influenciam as respostas adaptativas ao ambiente, mas também afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas (Albacete et al., 2008).

O estímulo do crescimento das plantas promovido pelas giberelinas (GAs) também envolve mudanças na divisão e expansão celular (Richards et al., 2001). A disponibilidade de carboidratos governa o metabolismo das GAs, assegurando que os processos relacionados ao crescimento prossigam com níveis adequado de carbono (Paparelli et al., 2013). Enquanto os efeitos gerais promovidos pelas GAs são conhecidos, o seu papel na determinação do crescimento sob concentração de CO₂ elevada não está, ainda, bem caracterizado. A concentração de CO₂ elevada aumentou o conteúdo de GA em *Ginkgo biloba* L. (Li et al., 2002), *Arabidopsis thaliana* (Teng et al., 2006) e *Populus* (Liu et al., 2014). Apesar dos indícios da atuação das GAs no crescimento das plantas expostas a concentração de CO₂ elevada, evidências recentes têm sugerido que o aumento no crescimento induzido por alto CO₂ pode estar parcialmente desacoplado dos efeitos das GAs (Ribeiro et al., 2012). Neste contexto, o paclobutrazol (PAC), um inibidor da biossíntese das GAs, promoveu uma redução de aproximadamente 50% na área foliar, massa fresca e massa seca de plantas de *Arabidopsis thaliana* mantidas sob concentração de CO₂

ambiente, contudo os efeitos inibitórios do PAC foram completamente revertidos quando as plantas foram mantidas sob concentração de CO₂ elevada (Ribeiro et al., 2012). Foi também observado que nas condições experimentais de alto CO₂ (750 µmol CO₂ mol⁻¹ ar), as mudanças na expressão de genes relacionados às GAs foram pouco expressivas quando comparadas à condição de concentração de CO₂ ambiente. Esses resultados indicam que o efeito da concentração de CO₂ no crescimento da planta pode ser independente das mudanças transcricionais de genes relacionados às GAs e, que outros fatores podem contribuir para o aumento no crescimento (Ribeiro et al., 2012).

A rota de biossíntese e sinalização das GAs têm sido intensivamente estudadas em *Arabidopsis thaliana* (Hedden e Phillips, 2000; Olszewski et al., 2002; Yamaguchi, 2008; Hedden e Sponsel, 2015). O *ent*-caureno é produzido nos plastídeos, principalmente através da via do metileritritol fosfato. A conversão do *ent*-caureno em GAs bioativas envolve sucessivas oxidações por mono-oxigenases P450 e dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato (2-OG) (Hedden e Thomas, 2016) (Figura 1). O nível de GAs bioativas é negativamente regulado pela GA2-oxidase (Martin et al., 1999), que transcricionalmente é induzida por elevado nível de GAs (Thomas et al., 1999; Elliott et al., 2001). Além disso, os níveis de GAs podem ser controlados via regulação negativa dos genes da biossíntese, por exemplo, GA20-oxidase e GA3-oxidase (Yamaguchi, 2008). Em adição aos mecanismos homeostáticos que controlam os níveis de GAs nas plantas, o metabolismo das GAs é particularmente sensível a fatores do ambiente e ao estágio de desenvolvimento das plantas (Sun e Gubler, 2004; Fleet e Sun, 2005). Sinais do ambiente, tais como, luz e temperatura regulam a expressão de alguns genes envolvidos na biossíntese e sinalização das GAs (Kamiya e Garcia-Martinez, 1999; Stavang et al., 2007) e

consequentemente afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas. As GAs estimulam o crescimento vegetal ao induzir a degradação da proteína DELLA, repressora do crescimento (Hedden e Thomas, 2016). A ligação entre GA e seu receptor GID1 promove a associação do receptor com a proteína DELLA, ocorrendo a poliubiquitinação de DELLA via E3 ubiquitina-ligase SCF^{SLY1} que consequentemente leva a degradação de DELLA via proteassomo 26S (Achard et al., 2009). A proteína DELLA inibe o crescimento das plantas, de maneira geral, pela redução da taxa de divisão e expansão celular (Achard et al., 2009; Gonzalez et al., 2012).

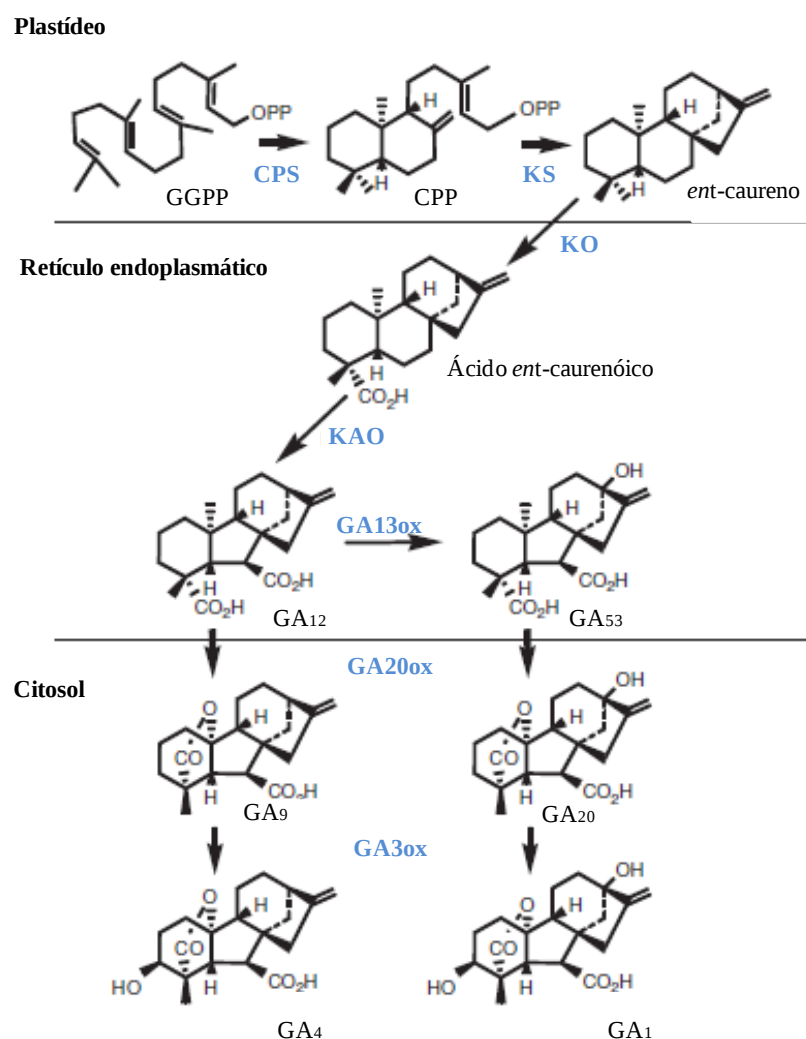


Figura 1. Biossíntese de GAs a partir da conversão de geranilgeranil difosfato (GGPP) à *ent*-copalil-difosfato (CPP), indicando o compartimento celular. Em azul

as enzimas ent-copalil difosfato (CPS), ent-caureno sintase (KS), ent-caureno oxidase (KO), ácido ent-caurenóico sintase (KAO), GA 13-oxidase (GA13_{OX}), GA 20-oxidase (GA20_{OX}) e GA 3-oxidase (GA3_{OX}). Modificado de Hedden e Thomas (2016).

Embora a disponibilidade de ferramentas genômicas tenha auxiliado na elucidação da função fisiológica de vários genes regulados pelas GAs (Yamaguchi, 2008), estudos sobre o efeito das GAs no metabolismo energético e no crescimento das plantas é, ainda, escasso. Apesar disso, alguns estudos têm gerado resultados bastante interessantes. Jan et al. (2006) observaram que as GAs modulam a atividade mitocondrial da piruvato desidrogenase por regular a expressão da piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1), que subsequentemente controlaria o crescimento de plantas de arroz. Tal fato levou os autores a sugerirem que as GAs afetariam o metabolismo primário no ponto de entrada do ciclo do ácido tricarboxílico. Plantas transgênicas de *Populus*, com ganho de função de DELLA, apresentaram metabolismo celular completamente distinto das plantas do tipo selvagem (Busov et al., 2006). O aumento no crescimento radicular dessas plantas foi acompanhado por mudanças no perfil metabólico das raízes que indicou aumento na taxa respiratória nos mutantes com ganho de função de DELLA. Por outro lado, Ribeiro et al. (2012) verificaram que os baixos níveis de GAs em plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com PAC foram capazes de desacoplar o crescimento da disponibilidade de carbono. Uma análise dos resultados descritos acima leva a uma visão pontual de como as GAs poderiam estar controlando o metabolismo e consequentemente o crescimento e desenvolvimento das plantas, contudo, ainda existe uma grande lacuna sobre o papel global das GAs na regulação desses processos. Ademais, apesar da conhecida associação entre concentração de CO₂ elevada e o crescimento das plantas, as vias

regulatórias que conectam o controle hormonal do crescimento com a assimilação de carbono ainda são pouco conhecidas e exploradas.

O mutante *gib-1* em tomateiro apresenta redução no conteúdo de GAs devido à mutação no locus *gib-1* que codifica a enzima *ent*-copalil difosfato sintase. A utilização de uma espécie de interesse agrônômico, com reduzido conteúdo de GA, pode ser uma ferramenta valiosa para abordar os possíveis mecanismos de associação entre GAs e concentração elevada de CO₂ através de análise do crescimento e metabolismo dessas plantas. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou (i) analisar o efeito da concentração de CO₂ elevada no metabolismo primário de tomateiro *Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker, pelo acompanhamento dos níveis de metabólitos e do crescimento das plantas; (ii) investigar se o efeito da concentração de CO₂ elevada na alocação e partição de carboidratos e no crescimento é resultado, ou é fortemente modulado por redução no conteúdo de GAs, (iii) investigar se o efeito da concentração de CO₂ elevada na anatomia da folha é modulado pelo conteúdo de GAs e (iv) avaliar o efeito da concentração de CO₂ elevada em diferentes estádios de crescimento das plantas de tomate (21 e 35 dias após a germinação). Para isso, tomateiro da cultivar Moneymaker (denominadas de selvagem –WT- neste trabalho como referência à planta controle), mutante *gib-1* e plantas tratadas com o inibidor da biossíntese de GAs, paclobutrazol (PAC) foram cultivadas em concentração ambiente (400 µmol CO₂ mol⁻¹ ar) e elevada de CO₂ (750 µmol CO₂ mol⁻¹ ar). Os parâmetros morfológicos, trocas gasosas, características anatômicas bem como o perfil metabólico foram avaliados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condição de cultivo

Sementes do tomateiro *Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker e sementes do mutante *gib-1* (gentilmente fornecidas por M. Koornneef, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany) foram escarificadas por leve fricção entre duas lixas d'água nº 150. Após escarificação, as sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 10 minutos, e lavadas extensivamente com água destilada. Em seguida, as sementes foram secas com papel absorvente e transferidas para placas de Petri (15 cm de diâmetro), contendo, ao fundo, duas camadas de papel de filtro Whatman nº 1 e 15 mL de água destilada. A germinação das sementes foi conduzida em câmara de crescimento noite/dia (tipo BOD, Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), sob fotoperíodo de 12/ 12 horas (dia/noite), temperatura 25/ 16°C (dia/noite), umidade relativa $65 \pm 5 \%$ e intensidade de luz durante o período luminoso de $100 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após sete dias, as plântulas foram transferidas para vasos de plástico de 3,5 L contendo substrato comercial e receberam adubação de 5 g de N-P-K (4-14-8), por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15'W), Viçosa, Minas Gerais. A irrigação foi realizada diariamente até a drenagem, para manutenção da umidade do substrato dos vasos.

Para o experimento utilizando PAC, as sementes de *S. lycopersicum* cv Moneymaker foram germinadas e cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Dois dias antes de serem submetidas ao tratamento com suplementação em CO₂, 20 mL de água destilada (controle) ou 20 mL de suspensão de PAC (1 mM) foram distribuídos na superfície do substrato com auxílio de uma pipeta.

Os vasos contendo 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 transferência para as câmaras ocorreu em duas idades diferentes das plantas, aos 21 e 35 dias após a germinação (DAG), com permanência de 21 dias sob suplementação com CO₂ (Figura 2).

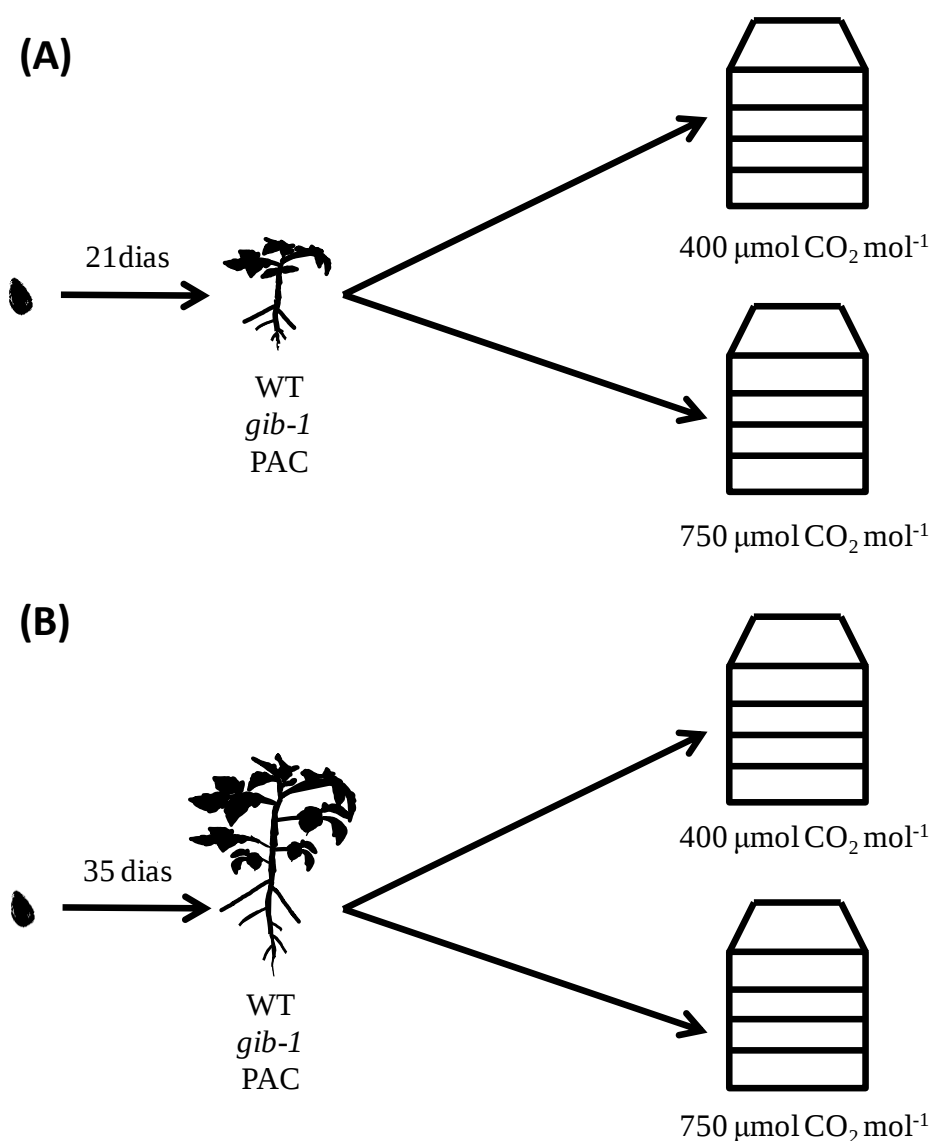


Figura 2. Esquema de condução dos experimentos desde o semeio das sementes até a transferência para as câmaras de CO₂. (A) Suplementação em CO₂ aos 21 dias após a germinação; (B) Suplementação em CO₂ aos 35 após a germinação. WT refere-se às plantas do tipo selvagem, *gib-1* ao mutante com extrema deficiência na biossíntese de GAs e PAC às plantas tratadas com paclobutrazol, um inibidor da biossíntese de GAs.

2.2 Quantificação de parâmetros morfológicos

A altura das plantas foi tomada a cada dois dias fazendo a medição do nível do solo até o nó apical superior. Ao final do experimento (21 dias com suplementação com CO₂ em câmaras de topo aberto), as plantas foram coletadas e divididas 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). O número de folhas foi contabilizado e as raízes foram lavadas com água sobre uma peneira com malha de 0,5 mm. Os tecidos vegetais foram colocados em estufa de circulação forçada a 70°C, até atingirem massa constante; e posteriormente pesados. A partir da massa seca dos órgãos foi calculada a biomassa total, fração de massa caulinar (FMC) (g de massa seca caulinar g⁻¹ de biomassa seca total), fração de massa foliar (FMF) (g de massa seca foliar g⁻¹ de biomassa seca total) e fração de massa radicular (FMR) (g de massa seca radicular g⁻¹ de biomassa seca total). Também foi calculada a taxa de crescimento relativo (TCR) e área foliar específica (AFE), conforme Hunt (1982).

2.3 Avaliação das características anatômicas da folha

O estudo anatômico foi realizado em plantas do tipo selvagem e mutantes *gib-1* submetidas à suplementação com CO₂ com 21 DAG. As características anatômicas foram avaliadas com base na espessura da lâmina foliar, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e epiderme abaxial e adaxial.

Discos foliares foram retirados da porção mediana da terceira folha e fixados com FAA50 (Formaldeído, Ácido acético glacial e Álcool 50%) durante 48 horas e então estocados em etanol 70% (Johansen, 1940). Em seguida, o material vegetal foi incluído em metacrilato (Historesin-Leica), segundo as recomendações do fabricante.

O material foi seccionado transversalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA) com 5µm de espessura, corado com azul de toluidina, pH 4,0, por 10 minutos (O'Brien et al., 1964) para metacromasia e montado sob lamínula com resina sintética (Permout®). As imagens da análise estrutural foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

2.4 Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), concentração subestomática de CO₂ (C_i), e os parâmetros de fluorescência foram medidos entre 8:00-12:00 horas, utilizando para isso um analisador de gases a infravermelho (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, USA), com fluorômetro acoplado (Li-6400-40; Li-Cor Inc.). As medições foram realizadas sob radiação fotossinteticamente ativa equivalente à do ambiente (500 µmol fótons m⁻² s⁻¹) e pressão parcial de CO₂ de 40 Pa. A concentração de CO₂ de referência foi de 400 µmol CO₂ mol⁻¹ ar para as plantas em concentração de CO₂ ambiente e 750 µmol CO₂ mol⁻¹ ar para plantas sob concentração de CO₂ elevada. As folhas foram aclimatadas à luz actínica (1000 µmol fótons m⁻² s⁻¹) durante 60 s, a fim de se obter a fluorescência transiente (F_s), seguida por um pulso de luz saturante (8000 µmol fótons m⁻² s⁻¹, 0,8 s) para estimar a fluorescência máxima à luz (F_m) e, por último, um pulso de luz vermelho-distante foi aplicado para obtenção da fluorescência mínima após aclimação à luz actínica (F_0). A eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) foi estimada a partir da razão entre a fluorescência variável e a

fluorescência máxima $F_v/F_m = (F_m/F_0)/F_m$ (Lima et al., 2002). O rendimento quântico efetivo foi determinado como $\phi\text{PSII}=(F_m' - F_s)/F_m'$ de acordo com Genty et al. (1989). A taxa de transporte de elétrons (ETR- *Electron transport rate*) foi então calculada a partir da equação $\text{ETR}=\phi\text{PSII}\times\beta\times\alpha\times\text{RFA}$, onde β reflete o particionamento dos pacotes de energia entre os fotossistemas I e II, α a absorbância da folha e RFA a radiação fotossinteticamente ativa (Genty et al., 1989).

A respiração no escuro (R_D) foi quantificada utilizando-se o mesmo equipamento utilizado para medir os parâmetros descritos acima, com adaptação das folhas no escuro por no mínimo 2 hora após o término do período de luz. Em posse de R_D os valores de respiração no claro (R_L) foram estimados de acordo com (Lloyd et al., 1995) onde $R_L=[0.5 - 0.05\ln(\text{RFA})]\times R_D$. A taxa de fotorrespiração (R_p) das plantas foi estimada através da equação $R_p=1/12[\text{ETR} - 4(A+R_L)]$ de acordo com (Valentini et al., 1995).

A determinação das trocas gasosas e dos parâmetros de fluorescência foi realizada em 10 plantas para cada tratamento, utilizando terceira e/ou quarta folha totalmente expandidas, contadas a partir do ápice. As medidas foram efetuadas sob umidade relativa 50-60 % e temperatura 26-31 °C, correspondente ao topo das câmaras.

As respostas de A à concentração interna de CO_2 (curva A/C_i) foram determinadas com um analisador de gases a infravermelho (Li 6400XT, Li-cor, Lincoln, USA), a 25 °C, sob 1000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (valor saturante, mas não fotoinibitório), variando-se a pressão parcial de CO_2 , de 5 a 200 Pa (Long e Bernacchi 2003; Flexas et al. 2007). A partir dessas curvas foram calculadas a taxa máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa de carboxilação máxima

limitada pelo transporte de elétrons ($J_{\max}$), conforme descritos em (Sharkey et al., 2007).

2.5 Análises bioquímicas

Amostras da região mediana do caule, terceira folha e das raízes foram coletadas no meio do período de luz, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C, até a análise. Aproximadamente 30mg do material liofilizado foi utilizado para extração seriada em etanol 98, 80 e 50%. A fração solúvel em etanol foi utilizado para a quantificação de glicose, frutose, sacarose, aminoácidos e nitrato. Na fração insolúvel, determinaram-se os níveis de amido e proteína total.

Glicose, frutose e sacarose foram determinadas por ensaio de substrato enzimático contínuo como descrito por Fernie et al. (2001). A quantificação desses açúcares foi realizada de forma indireta a partir da absorbância de NADPH, formado à medida que as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6FDH), hexocinase, fosfoglicoisomerase (PGI) e invertase foram adicionadas a reação. A quantificação foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA), a 340 nm durante o tempo necessário para que se atingisse a estabilização após adição de cada enzima.

O nível de aminoácidos totais foi determinado segundo Gibon et al. (2004). Cada reação foi composta por 25 µL de extrato etanólico (diluído 1:10), 25 µL de tampão citrato (ácido cítrico/ citrato de sódio 1 M, 0,2% de ácido ascórbico, pH 5,2) e 100 µL de ninhidrina 1% (m/v) em etanol 70%. As reações foram incubadas à 95°C por 20 minutos em ambiente sem luz e após esse período foi feita a leitura da placa a 570 nm. Para a determinação de aminoácidos totais foi feita uma curva de calibração utilizando diferentes aminoácidos como padrão.

A quantificação de nitrato foi feita seguindo os procedimentos descrito por Fritz et al. (2006). A reação enzimática foi iniciada pela adição de uma alíquota de 5 µL do extrato etanólico em um volume de reação de 150 µL, constituído de tampão fosfato de potássio, 0,1 mM (pH 7,5); NADPH 0,25 mM; e nitrato redutase 0,005 U . Depois de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, 20 µL de fenazina metanosulfato (5 mM) foram adicionados à reação e as microplacas foram incubadas, por mais 10 minutos no escuro. Em seguida foram adicionados à reação 30 µL de sulfamilamida (2 % m/v) dissolvida em H₃PO₄ (2 mM) e 30 µL de *N*-(1-naftil)-etilenodiamino dihidroclorito (0,04 % m/v). Visto que o nitrato é quantificado com base no nitrito formado através da enzima nitrato redutase, duas reações diferentes foram feitas, uma com a adição da enzima e outra sem a mesma. Através da diferença entre a absorbância das duas reações a quantidade de nitrato foi estimada. As leituras de absorbância foram feitas a em leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA) a 540 nm e a quantificação do nitrato baseada em curva padrão construída com diferentes concentrações de nitrato.

O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado de acordo com a metodologia de Bradford (1976) com modificações (Gibon et al., 2004). A concentração das proteínas presentes nas amostras foi determinada através da curva padrão realizada com diferentes concentrações de albumina soro-bovina (BSA). A quantificação foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA), a 595 nm.

A quantificação de amido foi realizada de acordo com Fernie et al. (2001) a partir do precipitado ressuspendido com KOH 0,1 M. Para esse processo, 70µL de ácido acético 1 M (-20°C) foram adicionados à solução de KOH para neutralizar a mesma. Um volume de 40 µL da solução neutralizada foi submetida à degradação do

amido pela adição das enzimas amiloglucosidase e α -amilase solubilizadas em tampão acetato 50 mM, pH = 4,9, e incubadas à 55°C, por 60 minutos. Após a incubação as amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para determinação da glicose resultante da degradação do amido. A quantificação da glicose foi realizada de forma indireta levando em consideração a quantidade de NADPH produzido após a adição de cada enzima.

Para quantificação de clorofila, aproximadamente 25 mg de caule e folhas frescas foram maceradas e em seguida adicionou-se acetona 80% com um pouco de carbonato de cálcio (aproximadamente 1%), para prevenir atividade das clorofilases. O material foi homogeneizado em vortex e deixado em repouso por 14 horas em ambiente escuro e baixa temperatura. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 10.000 *g* por 10 minutos. A partir do sobrenadante resultante foram estimados os conteúdos de clorofila. Para isso retirou-se 25 μ L do extrato acetônico e a ele adicionou-se 125 μ L de acetona 80%. As leituras de absorbância foram realizadas em leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA), a 663,2 nm para clorofila *a* e 646,8 nm para clorofila *b*, como descrito por Lichtenthaler (1987), em que:

$$C_a = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}$$

$$C_b = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$C_{a+b} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8}$$

2.6 Perfil metabólico

Para determinação do perfil metabólico foram utilizados os procedimentos descritos por Lisec et al. (2006). Aproximadamente 30 mg das amostras liofilizadas foram colocadas em tubos de 2 mL de capacidade e extraída em 750 μ L de metanol

contendo 30 μL de ribitol ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$). Após agitação vigorosa em vórtex por 10 s, as amostras foram incubadas a 70°C sob agitação (1000 g), por 15 min. Decorrido esse tempo, as amostras passaram por centrifugação a 14000 g , por 10 min, a 4°C . O sobrenadante ($500 \mu\text{L}$) foi transferido para um novo tubo e a ele adicionado $750 \mu\text{L}$ de clorofórmio (-20°C). As amostras foram agitadas em vórtex por 10 segundos e posteriormente centrifugadas a 4000 g , por 15 min, a 4°C . A camada superior (fase polar) foi recolhida em alíquotas de $100 \mu\text{L}$ e transferida para um novo tubo. Em seguida, as amostras foram secas em *speed-vac* sem aquecimento e armazenadas a -80°C . Para o processo de derivatização das amostras, adicionou-se $40 \mu\text{L}$ de hidrocloreto de metoxiamina diluídos em pirimidina (20 mg/mL) e agitou-se a 1000 g , por 2 h, a 37°C . Após esse tempo, foi adicionado $70 \mu\text{L}$ de MTSFA (N-metil-N-(trimetilsilil)- trifluoracetamida) e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) às amostras, do qual foi submetida a agitação de 1000 g , por 30 minutos, à 37°C . As amostras foram transferidas para frascos de vidro e analisadas por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrômetro de massa (CG-EM). Os cromatogramas e os espectros de massa gerados foram analisados utilizando o software TAGFINDER (Luedemann et al. 2008), a identificação e a anotação dos dados apresentados foram realizadas como descrito por Lisec et al. (2006).

2.7 Quantificação de nutrientes foliares

Amostras de folhas foram secas em estufa de circulação forçada à 65°C , até atingirem peso constante. Posteriormente, as folhas foram trituradas em moinho do tipo Willey (CINELAB CE-430; 8 lâminas, 1725 rpm , peneira de 20 mesh). Para quantificação de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn as amostras foram submetidas a

digestão nitro-perclórica (65% e 70%), seguido de análise em um espectrofotômetro de emissão ótica em plasma induzido (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 3000 DV).

2.8 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). 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, a unidade experimental foi composta por dez repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P < 0.05$) e as diferenças entre as médias foram examinadas pelo teste t em nível de 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram analisadas utilizando o software SPSS (Statistical Package for the Social Science, Inc., Chicago, IL, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da concentração de CO₂ elevada em tomateiro deficiente em giberelinas

3.1.1 Concentração de CO₂ elevada modifica o crescimento do tomateiro deficiente na produção de giberelinas

O mutante *gib-1*, extremamente deficientes na biossíntese de GAs, apresentou redução significativa no acúmulo de biomassa (78%) e comprimento do caule (77%) em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3A, B). As variáveis do crescimento FMC, área foliar, FMF, AFE e TCR apresentaram redução de aproximadamente 52, 89, 22, 39 e 53%, respectivamente, no mutante *gib-1* em relação às plantas do tipo selvagem cultivadas sob concentração

de CO₂ ambiente (Figura 3C-G). Em adição, a FMR apresentou um aumento significativo apenas no mutante *gib-1* mantidas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3H).

Nas plantas do tipo selvagem cultivadas sob concentração de CO₂ elevada foi observado um aumento significativo na biomassa total (40%), comprimento do caule (49%) e FMC (29%), quando comparado às plantas do tipo selvagem mantidas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3A-C). O cultivo do mutante *gib-1* em concentração de CO₂ elevada reverteu a maioria dos parâmetros de crescimento avaliados. As plantas mutantes cultivadas sob concentração de CO₂ elevada não apresentaram diferenças na biomassa total, área foliar, FMF, AFE, TCR e FMR, quando comparado com as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3A-H). Exceção a essas variáveis de crescimento, os valores de comprimento do caule e FMC foram ainda inferiores no mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ elevada, quando comparado com as plantas do tipo selvagem mantidas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3B, C). Entretanto, foi possível observar um aumento expressivo no comprimento dos entrenós no mutante *gib-1* cultivado sob concentração de CO₂ elevada em relação ao mutante mantido sob concentração de CO₂ ambiente. Em adição, a FMR das plantas mutante cultivadas sob concentração de CO₂ elevada foi reduzida em relação às plantas mutantes sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3H). Cabe ainda salientar que não houve alteração no número de folhas entre o mutante *gib-1* e as plantas do tipo selvagem tanto sob concentração de CO₂ ambiente quanto elevada (Figura 3I).

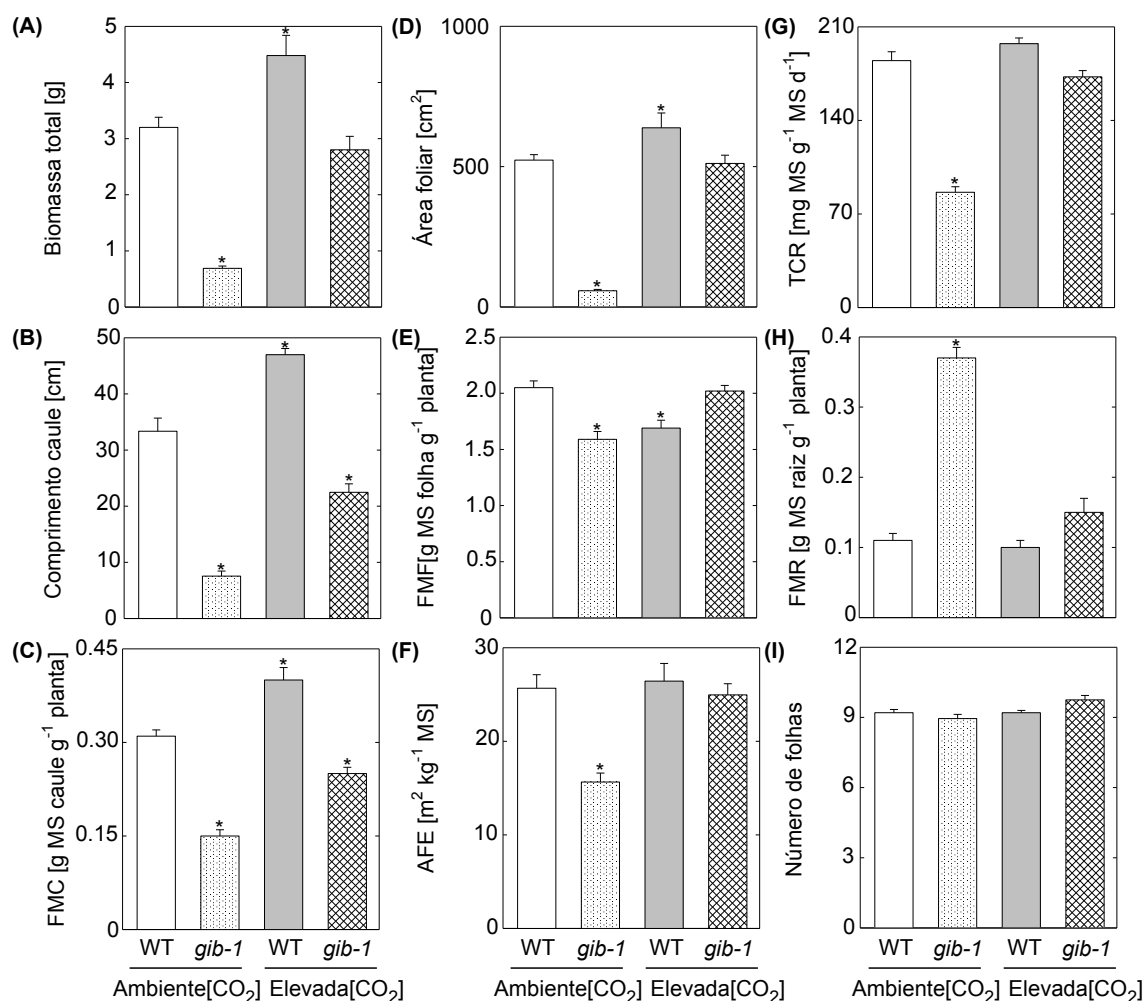


Figura 3. Análise de crescimento do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada de CO_2 ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). Biomassa total (A). Comprimento caule (B). FMC, fração de massa caulinar (C). Área foliar (D). FMF, fração de massa foliar (E). AFE, área foliar específica (F). TCR, taxa crescimento relativo (G). FMR, fração de massa radicular (H). número de folhas (I). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO_2 ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições $\pm$ erro da média.

3.1.2 A Deficiência de giberelinas afeta a organização das células do mesofilo em tomateiro

Sob concentração de CO_2 ambiente, a deficiência de GAs no mutante *gib-1* alterou a anatomia, quando comparado com as plantas do tipo selvagem (Figura 4A, B). Entretanto, os efeitos da redução dos níveis de GAs na anatomia foliar do mutante *gib-1* foram revertidos quando as plantas foram cultivadas sob concentração

de CO₂ elevada (Figura 4C, D). O aumento na espessura foliar total (35%) observada no mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 5A) foi promovido pelo aumento na espessura do parênquima paliçádico (18%) e lacunoso (62%) (Figura 5B, C). O aumento mais expressivo na espessura do parênquima lacunoso refletiu na redução da razão entre parênquima paliçádico e lacunoso (PP:PL) no mutante sob concentração de CO₂ ambiente, quando comparado com as plantas do tipo selvagem sob a mesma condição (Figura 5D). A deficiência de GAs no mutante não refletiu em alteração na espessura da epiderme da face adaxial e abaxial sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 5E, F). Exceto a espessura da epiderme abaxial que sofreu uma leve redução, todos os outros parâmetros foliares avaliados foram revertidos sob concentração de CO₂ elevada, quando comparado com as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 5A-F). Esses resultados sugerem um papel comum das GAs e da concentração de CO₂ elevada em regular o arranjo e espessura das células do mesofilo foliar em plantas de tomate.

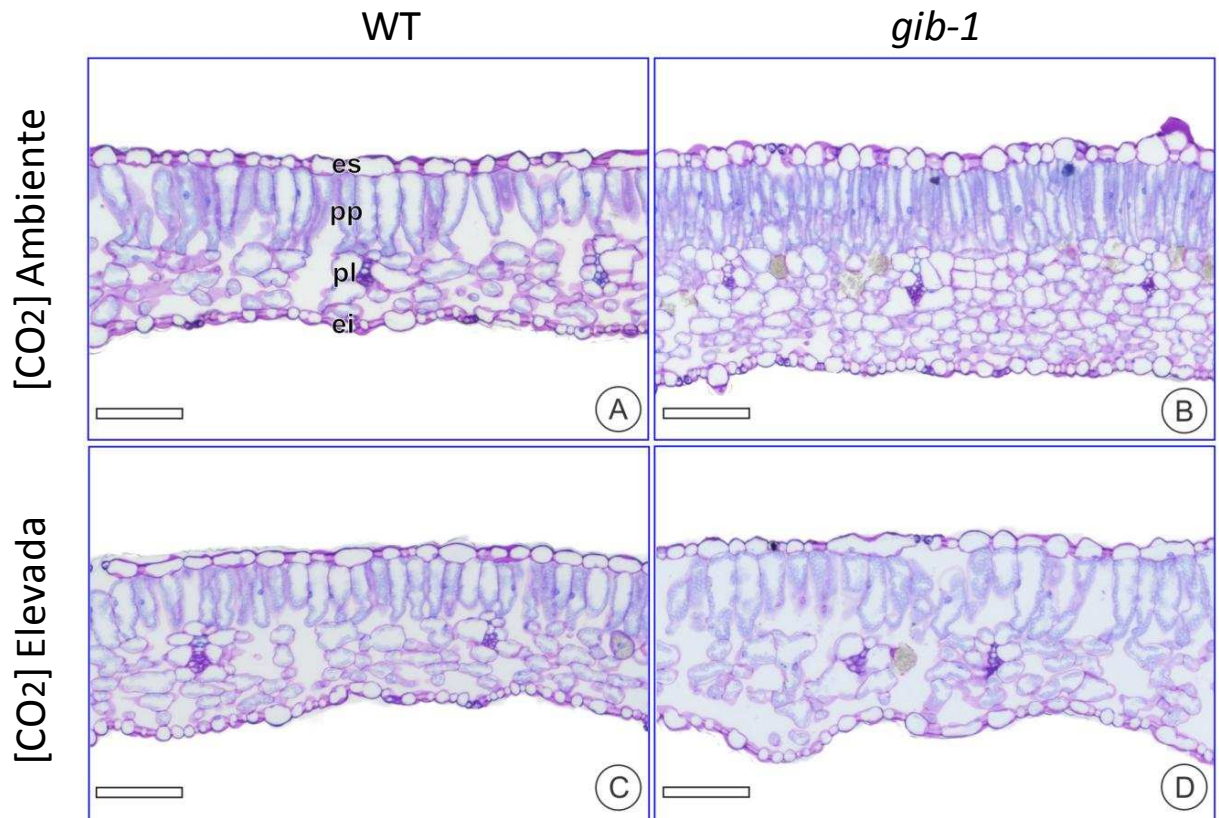


Figura 4. Efeito da deficiência de GAs na anatomia foliar do tomateiro sob concentração ambiente ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada de CO_2 ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). Secção de folha de plantas do tipo selvagem sob concentração de CO_2 ambiente (A). Secção de folha do mutante *gib-1* sob concentração de CO_2 ambiente (B). Secção de folha de plantas do tipo selvagem sob concentração de CO_2 elevada (C). Secção de folha do mutante *gib-1* sob concentração de CO_2 elevada (D). ES, epiderme superior; PP, parênquima paliçádico; PL, parênquima lacunoso; ei, epiderme inferior. Barras: $100 \mu\text{m}$.

3.1.3 Concentração de CO_2 elevada modifica os parâmetros fotossintéticos em resposta às giberelinas

Em condição de CO_2 ambiente, foi possível verificar que no mutante *gib-1* ocorreu redução na fotossíntese (A) (45%), respiração noturna (R_D) (52%), taxa máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) (45%), taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons (J_{max}) (37%), fotorrespiração (R_P) (41%) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (44%), em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO_2 ambiente (Figura 6A-F). Ademais, a concentração interna de

CO₂ (C_i) permaneceu estável tanto em plantas do tipo selvagem e mutante cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 6G).

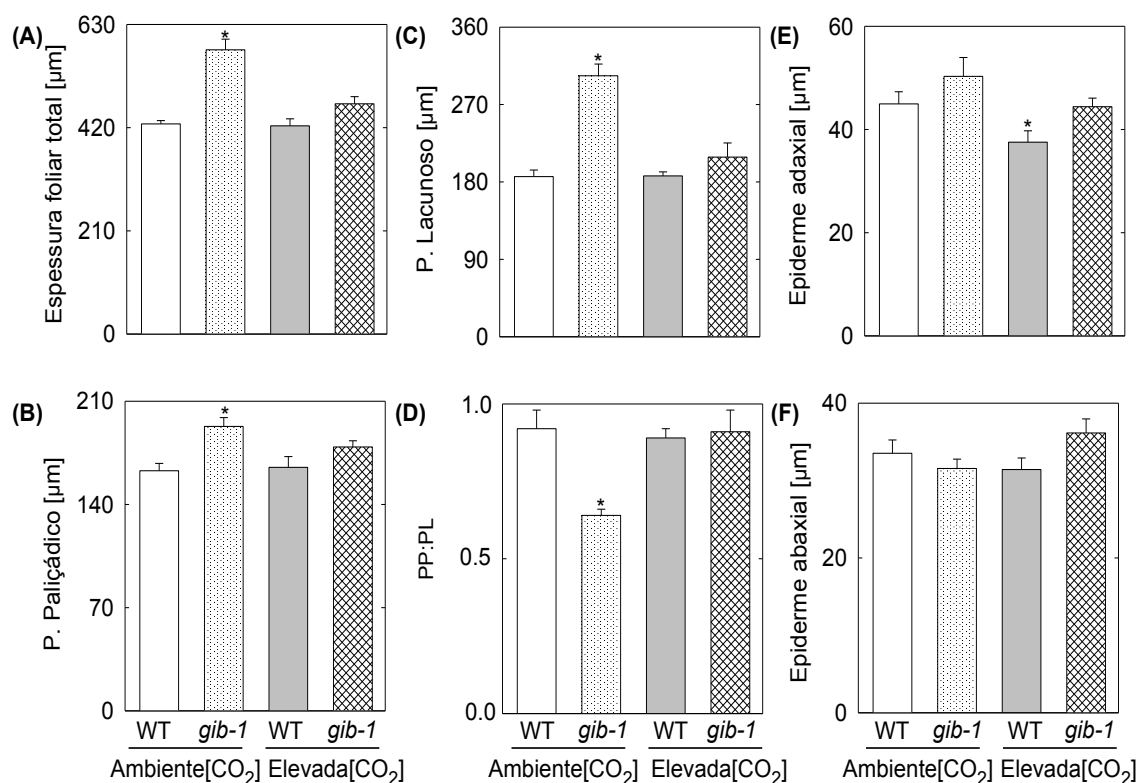


Figura 5. Parâmetros anatômicos da folha do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente (400 μmol CO₂ mol⁻¹ ar) e elevada de CO₂ (750 μmol CO₂ mol⁻¹ ar). Espessura foliar total (A). Espessura parênquima paliçádico (B). Espessura parênquima lacunoso (C). Razão entre parênquima paliçádico e lacunoso (D). Espessura epiderme adaxial (E). Espessura epiderme abaxial (F). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições ± erro da média.

Em concentração de CO₂ elevada, foi observada um aumento significativo na A, R_D e C_i tanto em plantas do tipo selvagem e mutante *gib-1* (Figura 6A, B, G). Claramente, houve uma redução significativa na V_{max}, R_p e ETR nas plantas do tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ elevada (Figura 6C, E, F). J_{max} permaneceu estável tanto em plantas do tipo selvagem e mutante sob concentração

de CO₂ elevada, em relação as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 6D). Plantas de tomate do tipo selvagem e mutante *gib-1* não apresentaram alterações significativas na condutância estomática (g_s) tanto sob concentração de CO₂ ambiente e elevada (Figura 6H). A razão F_v/F_m permaneceu constante nas plantas do tipo selvagem e mutante em ambas concentrações de CO₂ utilizadas (Figura 6I).

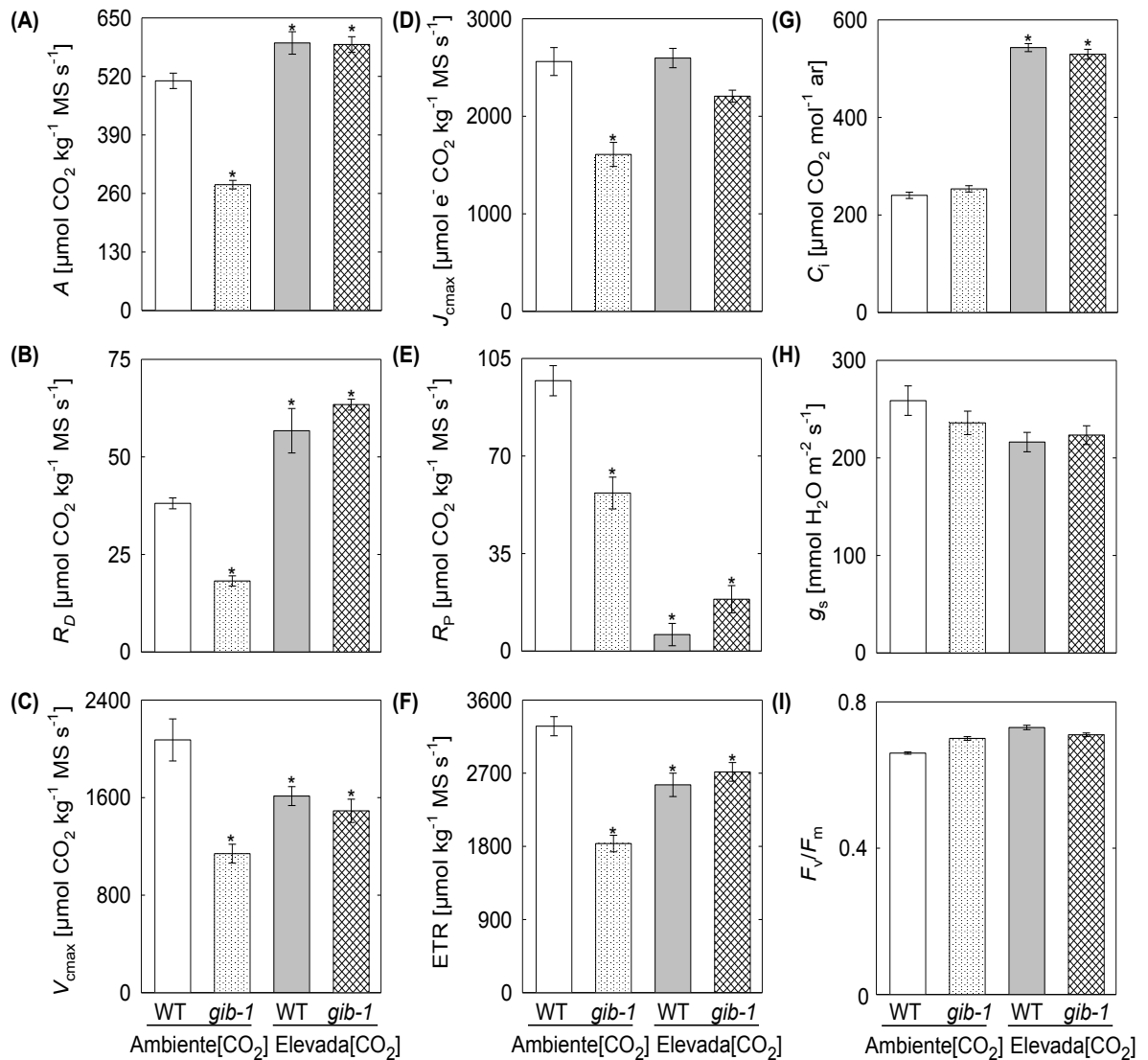


Figura 6. Trocas gasosas e fluorescência do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente (400 μmol CO₂ mol⁻¹ ar) e elevada de CO₂ (750 μmol CO₂ mol⁻¹ ar). Taxa de assimilação líquida de carbono (A). Respiração noturna (B). Taxa máxima de carboxilação da Rubisco (C). Taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons (D). Fotorrespiração (E). Taxa de transporte de elétrons (F). Concentração interna de CO₂ (G). Condutância estomática (H).

Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (I). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições ± erro da média.

3.1.4 Efeito da concentração de CO₂ elevada no metabolismo primário do tomateiro em resposta às giberelinas

Nas folhas, o maior nível de nitrato ocorreu nas plantas mutantes *gib-1* cultivadas sob CO₂ ambiente (Figura 7A). Por outro lado, os níveis de aminoácidos e proteínas foram reduzidos nas folhas do mutante *gib-1* mantido sob concentração de CO₂ ambiente, quando comparado com as plantas do tipo selvagem sob a mesma condição (Figura 7B, C). Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de nitrato e de aminoácidos totais permaneceram estáveis nas folhas das plantas do tipo selvagem e mutante *gib-1*, em comparação com os das plantas do tipo selvagem que cresceram sob CO₂ ambiente (Figura 7A, B). Entretanto, os níveis de proteína foram reduzidos nas folhas das plantas do tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ elevada (Figura 7C). A redução no conteúdo de GAs no mutante *gib-1* cultivado sob concentração de CO₂ ambiente foi acompanhada por aumento no nível de clorofila total (Figura 7D). A exposição à concentração de CO₂ elevada restaurou o conteúdo de clorofila total das folhas do mutante, apresentando valores próximos ao das plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 7D).

O nível de nitrato no caule não foi significativamente afetado pelo nível de GAs em plantas cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente e elevada (Figura 7E). Entretanto, a redução na biossíntese das GAs no mutante foi acompanhada de aumento nos níveis de aminoácidos, proteínas e clorofila no caule da planta mutante sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 7F-H). A concentração de CO₂ elevada restaurou o nível de aminoácidos totais no caule do mutante (Figura 7F), mas não foi

capaz de restaurar o nível de proteínas; que permaneceu superior ao das plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 7G). Sob concentração de CO₂ elevada, foi observada uma redução nos níveis de clorofila no caule das plantas do tipo selvagem, em comparação as plantas que cresceram sob concentração de CO₂ ambiente. No entanto, o nível de clorofila permaneceu estável no caule da planta mutante sob concentração de CO₂ elevada, em comparação com os das plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 7H).

Nas raízes, o nível de nitrato permaneceu constante nas plantas do tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente ou elevada (Figura 7I). Sob concentração de CO₂ ambiente, o nível de aminoácidos aumentou nas raízes das plantas mutante, quando comparado com as plantas do tipo selvagem sob a mesma condição de CO₂. Por outro lado, o nível de aminoácidos se manteve estável nas raízes das plantas do tipo selvagem e mutante sob concentração de CO₂ elevada (Figura 7J). Além disso, o nível de proteína manteve-se inalterado nas raízes do mutante em relação as plantas do tipo selvagem cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente. Entretanto, a concentração de CO₂ elevada promoveu um aumento acentuado no nível de proteína tanto nas raízes das plantas do tipo selvagem e mutante (Figura 7K).

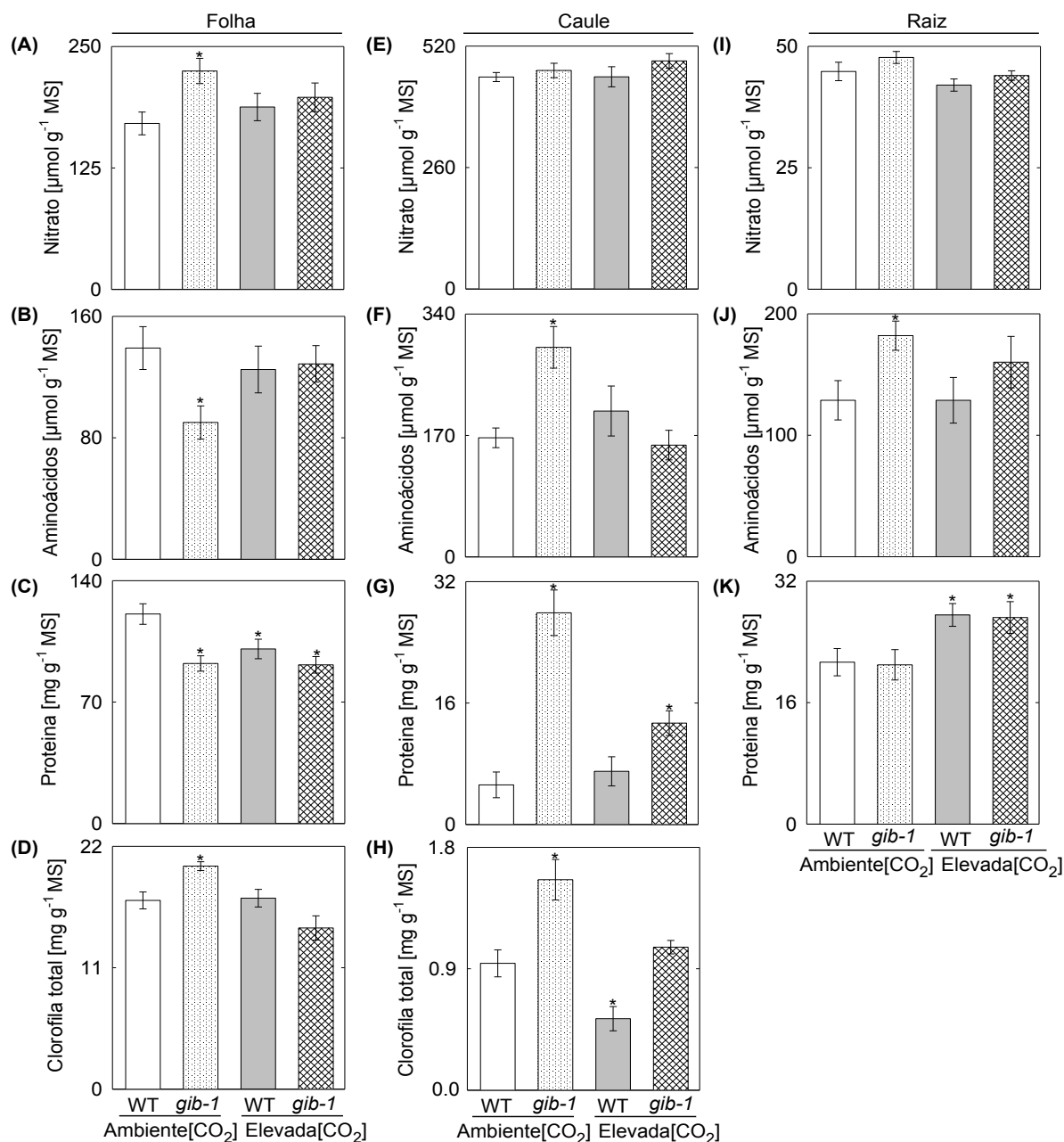


Figura 7. Nível de nitrato, aminoácidos, proteínas e clorofilas do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada de CO_2 ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). Nitrato (A), aminoácidos (B), proteína (C) e clorofila total (D) em folha. Nitrato (E), aminoácidos (F), proteína (G) e clorofila total (H) em caule. Nitrato (I), aminoácidos (J) e proteína (K) em raiz. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO_2 ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições $\pm$ erro da média.

Os níveis de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e amido foram alterados quando levado em consideração os níveis de GAs e a concentração de CO_2 nos

órgãos avaliados (Figura 8). Nas folhas dos mutantes *gib-1* houve uma redução significativa dos níveis de glicose (60%), frutose (77%), sacarose (94%) e amido (58%) sob concentração de CO₂ ambiente, em relação às plantas do tipo selvagem sob a mesma condição de CO₂ (Figura 8A-D). Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de glicose e sacarose na folha do mutante foram restaurados, não apresentando diferença significativa quando comparados às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 8A, C). Já os níveis de frutose e amido tiveram um incremento de 37% e 25%, respectivamente, na folha das plantas do mutante sob concentração de CO₂ elevada (Figura 8B, D). A elevada concentração de CO₂ aumentou significativamente o conteúdo de amido foliar (36%) das plantas tipo selvagem, mas não influenciou o conteúdo de glicose, frutose e sacarose (Figura 8A-D).

O nível de glicose reduziu em 52% no caule das plantas mutante cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente, em comparação com as plantas do tipo selvagem sob a mesma condição de CO₂ (Figura 8E). Em contraste, os níveis de frutose, sacarose e amido foram 1,4, 2,4 e 9,7 vezes maior no caule das plantas do mutante em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 8F-H). Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de glicose, sacarose e amido não foram afetados no caule das plantas do tipo selvagem, já o conteúdo de frutose aumentou 37% em relação às plantas tipo selvagem em concentração de CO₂ ambiente (Figura 8E-H). Plantas mutantes cultivadas sob concentração de CO₂ elevada tiveram redução de 25% no nível de glicose caulinar em relação às plantas tipo selvagem em concentração de CO₂ ambiente, enquanto os níveis de frutose e amido tiveram aumento significativo de 90% e 185%, respectivamente (Figura 8 E,

F, H). Assim como nas plantas tipo selvagem, o nível de sacarose não foi afetado no caule das plantas do mutante mantidas sob concentração de CO₂ elevada (Figura 8G).

Nas raízes, houve um aumento significativo nos níveis de glicose (57%), frutose (92%) e sacarose (49%) no mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente, em comparação ao tipo selvagem nessa mesma concentração de CO₂ (Figura 8I-K). Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de glicose e frutose mantiveram-se superiores nas raízes das plantas mutantes, em relação ao tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 8I, J), já o conteúdo de sacarose não apresentou diferença significativa (Figura 8K). Nas raízes das plantas do tipo selvagem, cultivadas sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de glicose e sacarose mantiveram-se estáveis, enquanto o nível de frutose aumentou em 37%, em relação às plantas do tipo selvagem mantidas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 8I-K).

Para um melhor entendimento das alterações acima descritas no metabolismo primário do tomateiro, o perfil metabólico foi analisado usando CG-EM (Figuras 9, 10, 11). De forma geral, a redução nos níveis de GAs no mutante *gib-1*, sob concentração de CO₂ ambiente, foi acompanhada de redução na maioria dos açúcares detectados nas folhas, quando comparados às plantas tipo selvagem em concentração de CO₂ ambiente. Exceção a esses açúcares, fosfoglicerato (3-PGA) e trealose tiveram aumento do seu nível no mutante em relação ao tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 9A). A concentração de CO₂ elevada restaurou o conteúdo de alguns açúcares, tais como, 3-PGA, glicose, frutose manitol sacarose e trealose na folha do mutante, que passaram a apresentar níveis similares ao quantificado nas plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente. O

conteúdo de mio-inositol manteve-se constante nas plantas tipo selvagem e mutante tanto sob concentração de CO₂ ambiente ou elevada (Figura 9A).

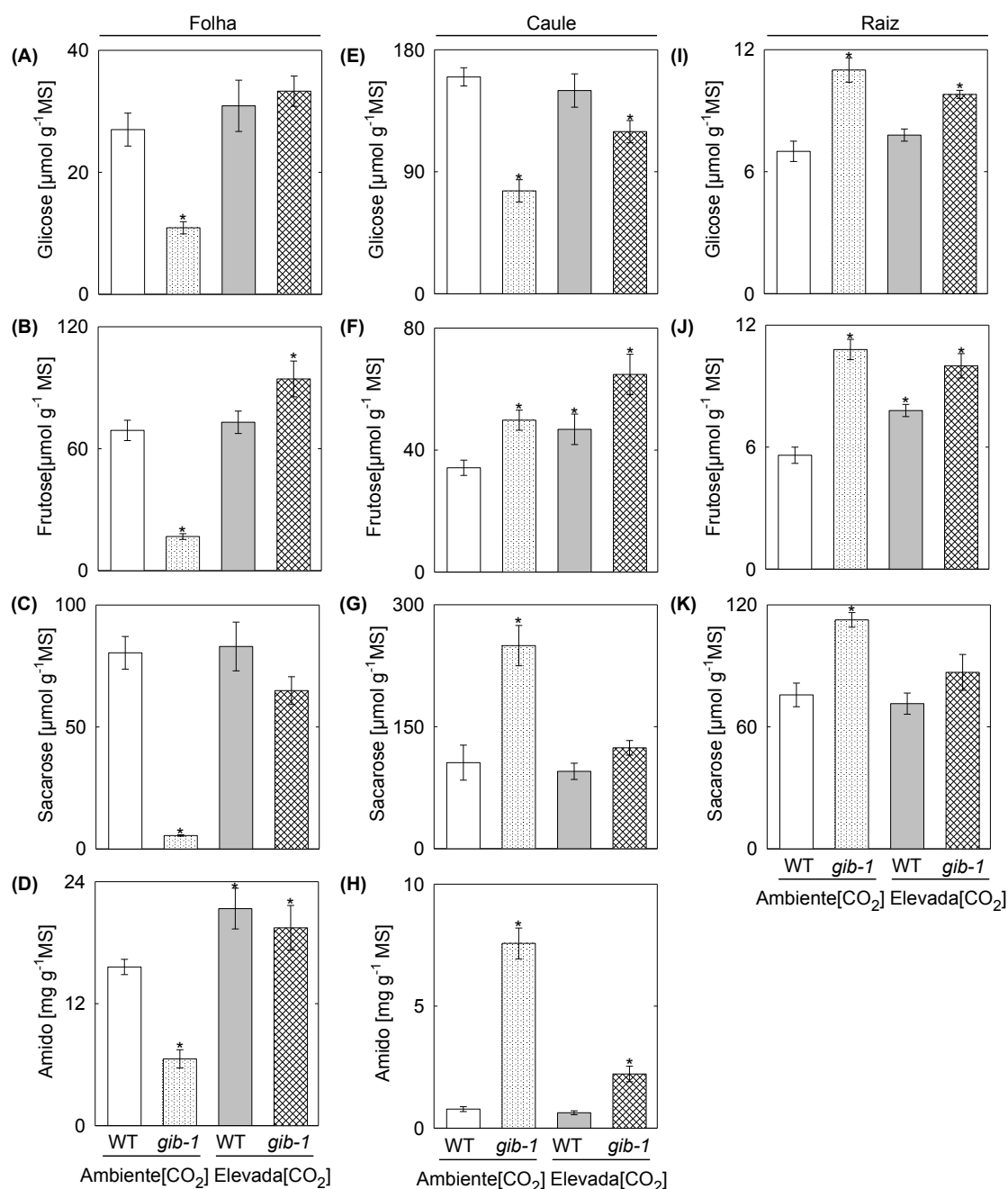


Figura 8. Níveis de carboidratos nos tecidos da folha, caule e raiz do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada de CO₂ (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). Glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) em folha. Glicose (E), frutose (F), sacarose (G) e amido (H) em caule. Glicose (I), frutose (J) e sacarose (K) em raiz. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições $\pm$ erro da média.

Os níveis de frutose e sacarose aumentaram significativamente no caule do mutante sob concentração de CO₂ ambiente. Já os níveis de glicose e manose foram reduzidos no mutante sob concentração de CO₂ ambiente, quando comparados às plantas tipo selvagem em concentração de CO₂ ambiente (Figura 9B). Os níveis de glicose e sacarose no mutante foram restaurados sob concentração de CO₂ elevada. Entretanto, os níveis de frutose e manose apresentaram-se ainda aumentados e reduzidos, respectivamente, sob concentração de CO₂ elevada, em relação as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 9B). Ademais, os níveis de 3-PGA, galactinol, glicose, mio-inositol e sacarose mantiveram-se inalterados no caule das plantas do tipo selvagem cultivadas sob concentração de CO₂ elevada, quando comparadas com as plantas do tipo selvagem mantidas sob concentração de CO₂ ambiente. Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de frutose aumentaram, enquanto os níveis de manose foram reduzidos no caule de plantas do tipo selvagem (Figura 9B). No caule, os níveis 3-PGA, galactinol e mio-inositol mantiveram-se inalterados entre as plantas do tipo selvagem e mutante tanto sob concentração de CO₂ ambiente quanto em concentração de CO₂ elevada.

Nas raízes, os níveis de 3-PGA, frutose, glicose e sacarose aumentaram no mutante *gib-1* em relação as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente, (Figura 9C). O nível de mio-inositol manteve-se inalterado na raiz das plantas do tipo mutante sob concentração de CO₂ ambiente. Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de 3-PGA, frutose e galactinol aumentaram tanto nas raízes das plantas do tipo selvagem quanto no mutante, em relação as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 9C). Por outro lado, observou-se um aumento significativo nos níveis de glicose nas raízes das plantas mutante, mas não em plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ elevada. Ademais,

nenhuma mudança no nível de sacarose foi observada nas raízes das plantas do tipo selvagem e mutante sob concentração de CO₂ elevada (Figura 9C). Nas raízes, o nível de mio-inositol manteve-se inalterado entre as plantas do tipo selvagem e mutante tanto sob concentração de CO₂ ambiente quanto em concentração de CO₂ elevada.

Os níveis de ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, fenilalanina, GABA, glutamina, homoserina, prolina, tirosina, triptofano, treonina e β -alanina foram reduzidos na folha das plantas do mutante, em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (figura 10A). Ademais, os níveis de glicina, ornitina, serina e valina se manteve estável, enquanto o nível de leucina aumentou na folha das plantas mutante sob concentração de CO₂ ambiente. Sob concentração de CO₂ elevada, o nível de GABA aumentou, enquanto o nível de prolina foi reduzido tanto na folha das plantas do tipo selvagem quanto no mutante, quando comparadas com as plantas do tipo selvagem mantidas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 10A). Além disso, não houve diferenças significativas nos níveis de ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, fenilalanina, glicina, glutamina, homoserina, leucina, ornitina, serina, tirosina, triptofano, treonina, valina e β -alanina tanto na folha das plantas do tipo selvagem quanto nos mutantes mantidas sob concentração de CO₂ elevada.

Em concentração ambiente de CO₂ o nível de GAs influenciou a maioria dos aminoácidos identificados no caule (Figura 10B). A redução no nível de GAs no mutante foi acompanhada de redução de ornitina, prolina e serina, e aumento no conteúdo de asparagina, ácido aspártico, glutamato, glutamina e fenilalanina. A concentração de CO₂ elevada foi capaz restaurar o conteúdo da maioria dos aminoácidos modificados no mutante, dessa forma, eles passaram a apresentar

conteúdos similares às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente. Contudo, sob concentração de CO₂ elevada, o mutante manteve elevados níveis de ácido glutâmico, asparagina e glutamina no caule, além de manterem reduzidos os níveis de serina no caule, em relação às plantas tipo selvagem em concentração de CO₂ ambiente (Figura 10B). Sob concentração de CO₂ elevada, com exceção no nível de serina que reduziu no caule das plantas do tipo selvagem, os níveis de todos os outros aminoácidos quantificados não foram alterados, em comparação com as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente.

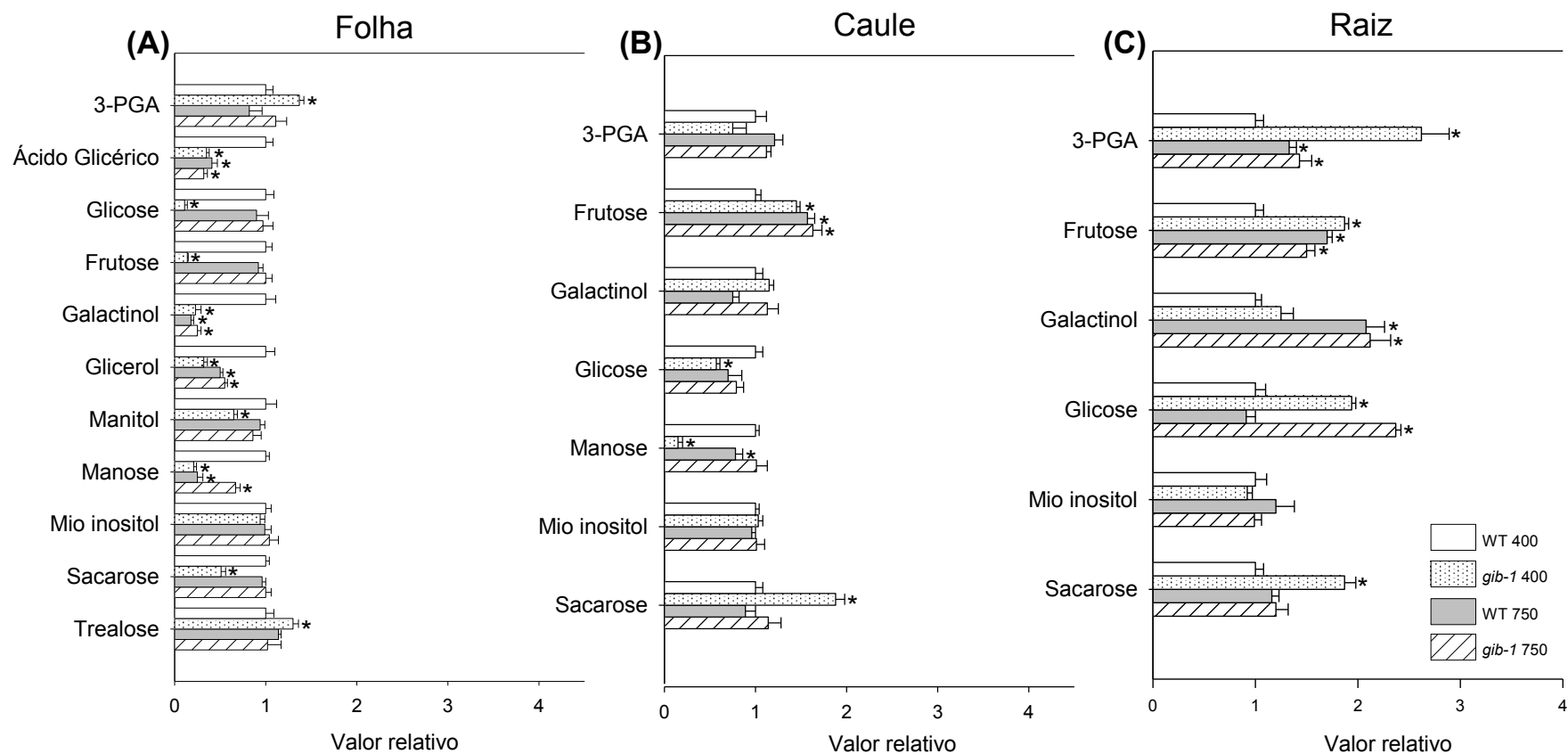


Figura 9. Alterações nos níveis de açúcares nas folhas (A), caule (B) e raiz (C) do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente (400 μmol CO₂ mol⁻¹ ar) e elevada de CO₂ (750 μmol CO₂ mol⁻¹ ar). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições ± erro da média. Uma lista completa dos açúcares e seus valores relativos, medidos no CG-EM foi apresentada na Tabela S1, material suplementar.

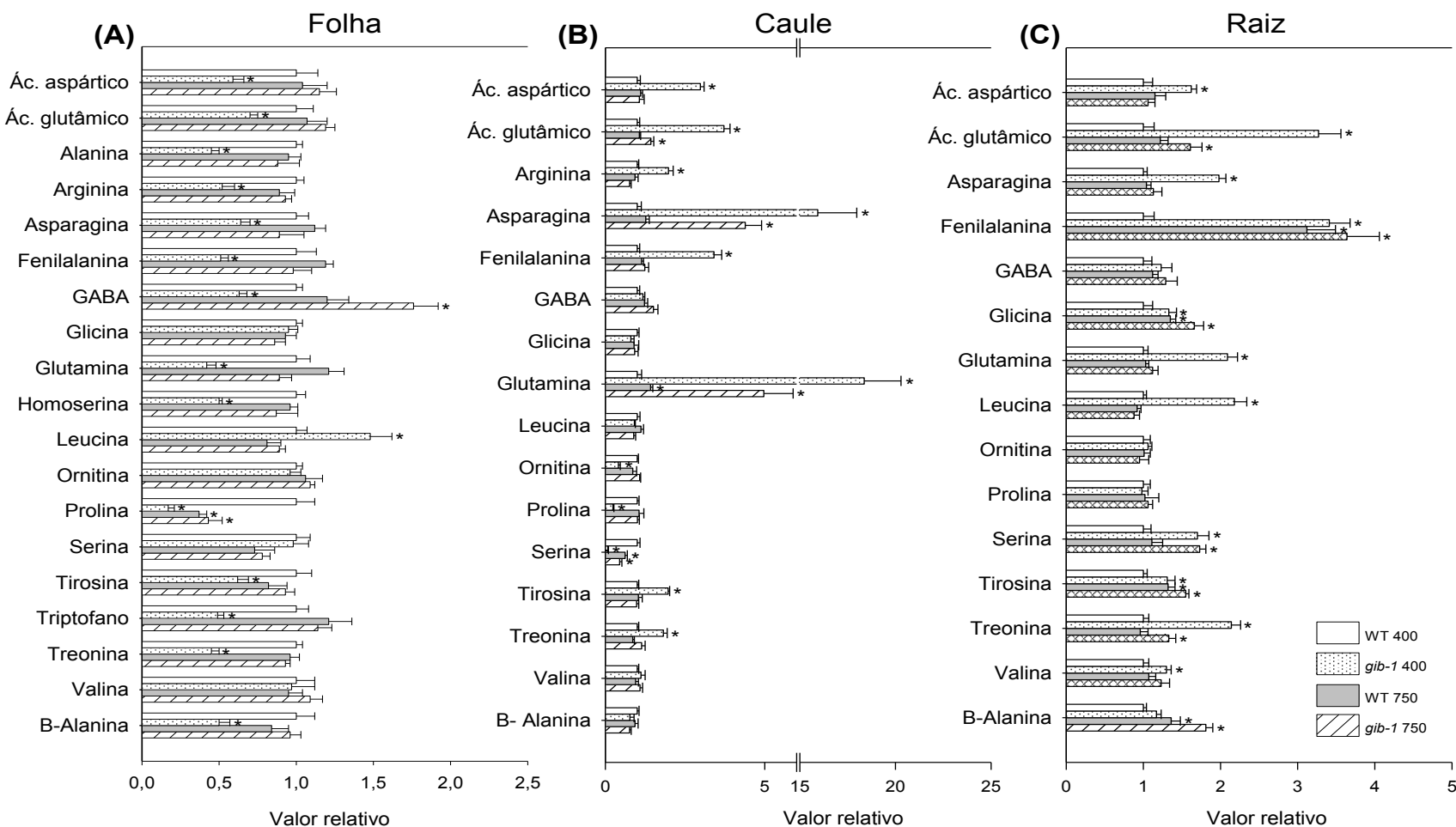


Figura 10. Alterações nos níveis de aminoácidos nas folhas (A), caule (B) e raiz (C) do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada de CO_2 ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO_2 ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições $\pm$ erro da média. Uma lista completa dos aminoácidos e seus valores relativos, medidos no CG-EM foi apresentada na Tabela S2, material suplementar.

Os níveis de ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, fenilalanina, glicina, glutamina, leucina, serina, tirosina, treonina e valina foram aumentados na raiz das plantas do mutante, em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 10C). Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de ácido aspártico, asparagina, glutamina, leucina e valina mantiveram-se inalterados tanto na raiz das plantas do tipo selvagem quanto no mutante, em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 10C). Os níveis de fenilalanina, glicina, tirosina e β -alanina aumentaram tanto na raiz das plantas do tipo selvagem quanto no mutante mantido sob concentração de CO₂ elevada. Por outro lado, os níveis de ácido glutâmico, serina e treonina mantiveram-se inalterados na raiz das plantas do tipo selvagem, mas não na raiz das plantas mutante sob concentração de CO₂ elevada. Na raiz, os níveis GABA, ornitina e prolina mantiveram-se inalterados entre as plantas do tipo selvagem e mutante tanto sob concentração de CO₂ ambiente quanto em concentração de CO₂ elevada (Figura 10C).

Sob concentração de CO₂ ambiente, os níveis de 2-OG, aconitato, citrato, fumarato, isocitrato, malato, piruvato e succinato foram reduzidos na folha das plantas do mutante, em relação às plantas do tipo selvagem (Figura 11A). Entretanto, o nível de oxalacetato aumentou no mutante sob concentração de CO₂ ambiente. Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de aconitato, fumarato, isocitrato, malato, oxaloacetato, piruvato e succinato mantiveram-se inalterados tanto na folha das plantas do tipo selvagem quanto no mutante, em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 11A). Os níveis de 2-OG e citrato aumentou tanto na folha das plantas do tipo selvagem quanto no mutante cultivadas sob concentração de CO₂ elevada. Na folha, o nível de lactato manteve-se inalterado

entre as plantas do tipo selvagem e mutante tanto sob concentração de CO₂ ambiente quanto em concentração de CO₂ elevada (Figura 11A).

Sob concentração de CO₂ ambiente, os níveis de aconitato, citrato, fumarato, isocitrato, malato, oxaloacetato e succinato foram reduzidos no caule das plantas do mutante, em relação às plantas do tipo selvagem (Figura 11B). Entretanto, o nível de 2-OG aumentou no mutante sob concentração de CO₂ ambiente. Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de 2-OG, aconitato, citrato, fumarato, isocitrato, malato, oxaloacetato, e succinato mantiveram-se inalterados tanto no caule das plantas do tipo selvagem quanto no mutante, em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 11B). O nível de malato reduziu tanto no caule das plantas do tipo selvagem quanto no mutante cultivado sob concentração de CO₂ elevada. Os níveis de lactato e piruvato no caule não foram afetados pela redução nos níveis de GAs no mutante e/ou pelas concentrações de CO₂ testadas.

A redução no nível de GAs no mutante foi acompanhada de aumento significativo no nível de 2-OG e redução nos níveis de fumarato, malato e oxalacetado na raiz, quando as plantas foram cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 11C). Os níveis citrato, isocitrato e succinato mantiveram-se estáveis na raiz das plantas do mutante, em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente. Sob concentração de CO₂ elevada, os níveis de 2-OG, fumarato e oxaloacetato mantiveram-se inalterados tanto na raiz das plantas do tipo selvagem quanto no mutante, em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 11C). O nível de malato reduziu tanto na raiz das plantas do tipo selvagem quanto no mutante cultivado sob concentração de CO₂ elevada. Entretanto, o nível de succinato aumentou tanto na raiz das plantas do tipo selvagem quanto no mutante cultivado sob concentração de CO₂ elevada. Os níveis

de citrato e isocitrato mantiveram-se estáveis na raiz das plantas do tipo selvagem, mas não na raiz das plantas mutante sob concentração de CO₂ elevada. Na raiz, os níveis de aconitato, lactato e piruvato mantiveram-se inalterados entre as plantas do tipo selvagem e mutante tanto sob concentração de CO₂ ambiente quanto em concentração de CO₂ elevada (Figura 11C).

3.1.5 Efeito da concentração de CO₂ elevada no nível foliar de macro e micronutrientes do tomateiro

A redução no conteúdo de GA nos mutantes *gib-1*, sob concentração de CO₂ ambiente, foi acompanhada de redução significativa de K (13%), Fe (29%) e Mn (6%); e aumento em S (33%) (Tabela 1). A concentração de CO₂ elevada não alterou o nível de macro e micronutrientes das plantas tipo selvagem. Já nos mutantes *gib-1*, a concentração de CO₂ elevada aumentou os níveis de Ca (31%), Mg (56%), S (68%), Cu (197%) e Zn (107%); e reduziu o conteúdo de Fe (19%), em relação às plantas selvagem em concentração de CO₂ ambiente (Tabela 1).

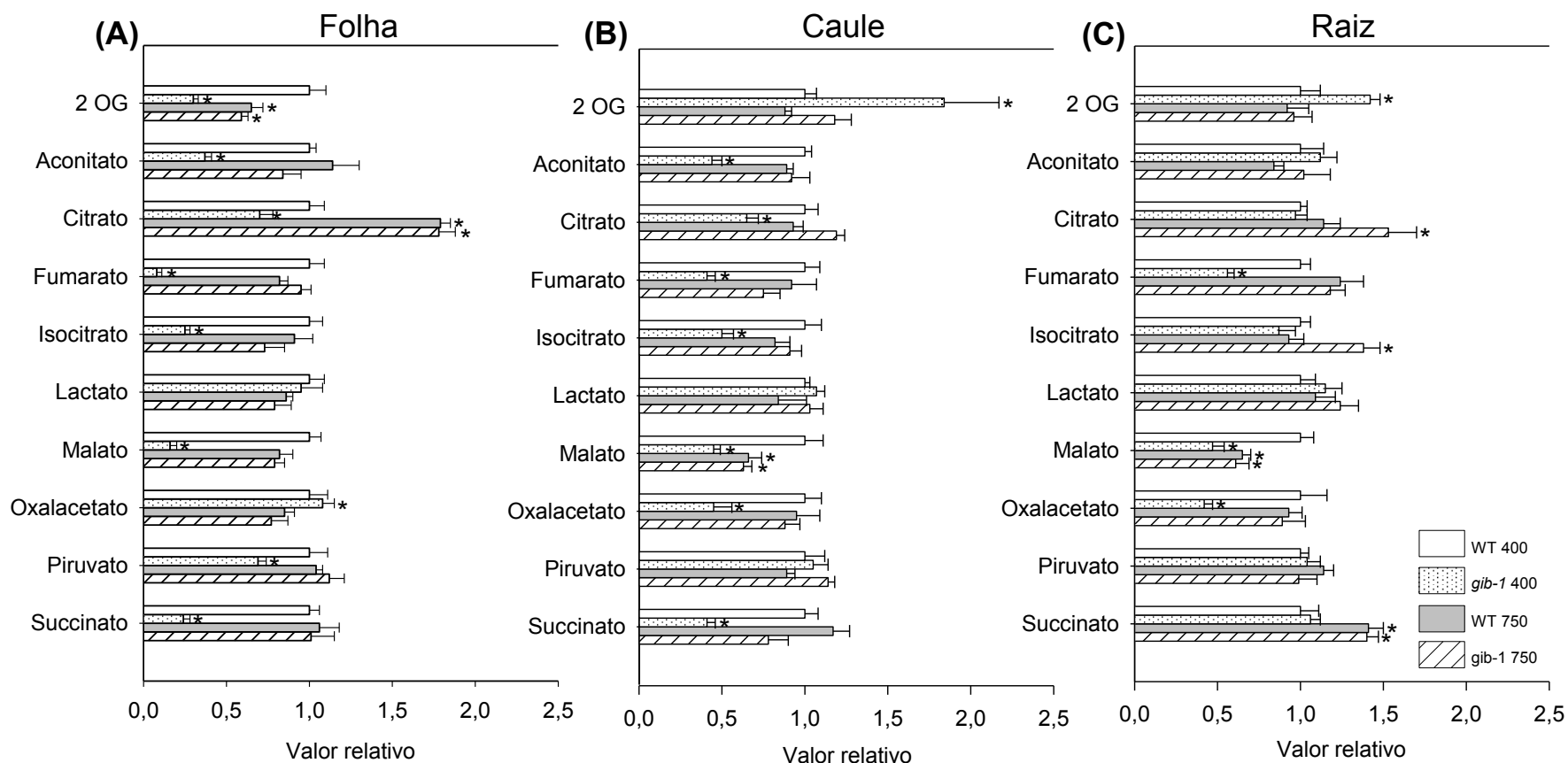


Figura 11. Alterações nos níveis de ácidos orgânicos nas folhas (A), caule (B) e raiz (C) do tomateiro tipo selvagem e mutante *gib-1* sob concentração ambiente ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada de CO_2 ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (planta do tipo selvagem cultivada sob concentração de CO_2 ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições $\pm$ erro da média. Uma lista completa dos ácidos orgânicos e seus valores relativos, medidos no CG-EM foi apresentada na Tabela S3, material suplementar.

Tabela 1. Concentração de macro e micronutrientes em folhas de tomateiro tipo selvagem (WT) e mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente (400 µmol mol⁻¹) e elevada (750 µmol mol⁻¹). Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do respectivo controle (WT) em nível de 5 % pelo teste *t*.

	400 µmol mol ⁻¹ de CO ₂		750 µmol mol ⁻¹ de CO ₂		Elevada [CO ₂] vs. Ambiente [CO ₂]	
Macronutriente [mg g ⁻¹ MS]	WT	<i>gib-1</i>	WT	<i>gib-1</i>	WT	<i>gib-1</i>
P	3.4±0.1	3.3±0.2	4.2±0.3	5.2±0.1	1.23	1.57
K	22.9±0.5	20.0±0.7	24.6±0.7	25.9±0.8	1.07	1.29
Ca	25.4±0.9	26.2±0.8	28.2±0.3	33.4±1.3	1.11	1.27
Mg	10.0±0.4	11.4±1.0	12.0±0.3	15.6±0.5	1.20	1.37
S	13.6±1.2	18.1±1.0	16.6±1.1	22.9±1.3	1.22	1.26
Micronutriente [µg g ⁻¹ MS]						
Cu	3.3±0.2	3.1±0.3	4.4±0.3	9.8±0.4	1.33	3.16
Fe	176.2±11.4	125.3±7.2	176.6±17.7	142.7±9.6	1.00	1.14
Zn	32.4±2.3	33.5±1.6	39.5±0.8	67.2±1.9	1.22	2.00
Mn	763.6±48.3	722.4±36.6	891.0±43.1	834.1±10.9	1.17	1.15

3.2 Avaliação da janela de resposta à concentração de CO₂ elevada associada às giberelinas em tomateiro

3.2.1 Influência da idade da planta em resposta a concentração de CO₂ elevada

O efeito da concentração de CO₂ elevada no crescimento e desenvolvimento das plantas é conhecido por ser dependente da idade da planta (Ainsworth, 2008; Franks et al., 2013). Assim, os efeitos da concentração de CO₂ elevada no crescimento e no metabolismo das plantas *gib-1* e plantas do tipo selvagem crescendo em solo suplementado com PAC com diferentes idades (21 e 35 dias após a germinação) foram investigados acompanhando-se os parâmetros de crescimento, as trocas gasosas e os níveis de metabolitos envolvidos no metabolismo central das plantas. A inibição do crescimento provocado pelo tratamento com PAC e pela mutação *gib-1* na biossíntese de GAs nas plantas cultivadas sob concentração de CO₂ ambiente foi revertida quando aquelas plantas foram mantidas sob concentração de CO₂ elevada aos 21 dias após a germinação (DAG). Entretanto, o estímulo no crescimento das plantas com níveis reduzidos de GAs não foi observado, quando as plantas com 35 DAG foram mantidas sob concentração de CO₂ elevada.

A partir da análise de crescimento do tomateiro, foi observado que o tratamento com PAC promoveu forte redução na biomassa total (79%), área foliar (86%) e AFE (46%) das plantas submetidas à concentração de CO₂ ambiente aos 21 DAG (Figura 12A-C). Nessa mesma idade, mas em concentração de CO₂ elevada, o tratamento com PAC promoveu redução na biomassa (22%), área foliar (20 %) e AFE (15 %) das plantas cultivadas sob concentração de CO₂ elevada, quando comparadas com as plantas sem tratamento com PAC (controle) sob concentração ambiente de CO₂ ambiente (Figura 12A-C). As plantas controle não apresentaram alteração significativas nos parâmetros de biomassa, área foliar e AFE quando

submetidas à concentração de CO₂ elevada aos 21 DAG, mas pode-se notar uma tendência em aumento de biomassa foliar nessa condição.

O tratamento com PAC também reduziu a biomassa (54%), área foliar (48%) e AFE (16%) das plantas submetidas à concentração de CO₂ ambiente aos 35 DAG (Figura 12E-G). Nessa fase, a exposição à concentração de CO₂ elevada não reverteu o crescimento das plantas, que apresentaram ainda grande redução na biomassa (43%), área foliar (43%) e AFE (13%), em relação ao controle sob concentração de CO₂ ambiente (Figuras 12E-G). Apesar da redução na biomassa foliar das plantas de tomate tratadas com PAC, não houve diminuição do número de folhas das plantas cultivadas tanto sob concentração de CO₂ ambiente quanto sob concentração de CO₂ elevada (Figuras 12D, H). A exposição das plantas controle à concentração elevada de CO₂ aos 35 DAG não afetou o acúmulo de biomassa, área foliar e AFE destas plantas.

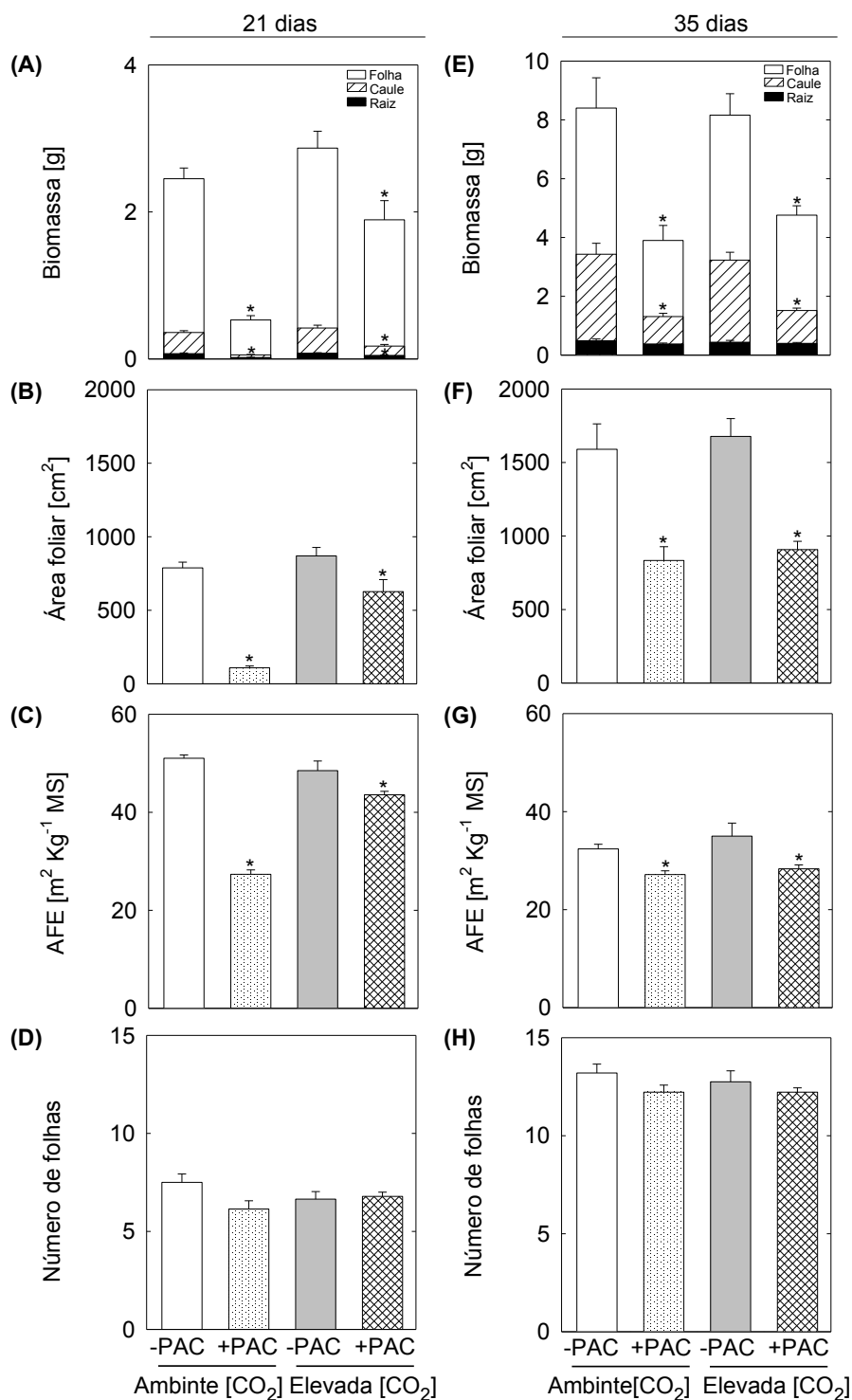


Figura 12. Análise de crescimento do tomateiro tratado com PAC submetido à concentração de CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. Biomassa (A), área foliar (B), área foliar específica (AFE) (C), número de folhas (D) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Biomassa (E), área foliar (F), área foliar específica (AFE) (G), número de folhas (H) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco

diferem estatisticamente do controle (-PAC sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições ± erro da média

O reduzido conteúdo de GA no mutante *gib-1* reduziu significativamente a biomassa (78%), área foliar (89%) e AFE (47%), quando estes foram expostos a concentração de CO₂ ambiente, 21 DAG (Figura 13A-C). Nessa mesma idade, sob concentração de CO₂ elevada, as plantas mutantes não apresentaram diferença significativa na biomassa total, em relação às plantas tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente, mesmo com a redução significativa na biomassa caulinar (Figura 13A). Ademais, a área foliar e AFE foram restauradas no mutante submetidas à concentração de CO₂ elevada aos 21DAG (Figura 13B, C). As plantas tipo selvagem tiveram incremento na área foliar quando submetidas à concentração de CO₂ elevada, contudo a biomassa e AFE mantiveram-se estáveis, em relação às plantas tipo selvagem em concentração de CO₂ ambiente (Figura 13A-D). Semelhante ao tratamento com PAC, o cultivo das plantas de tomate sob concentração de CO₂ elevada aos 35 DAG, não restaurou a biomassa, área foliar e AFE dos mutantes, além de não influenciar estes mesmos parâmetros nas plantas tipo selvagem (Figura 13E-G). O número de folhas manteve-se constante no mutante mantidas sob concentração de CO₂ ambiente ou elevada, aos 21 e 35 DAG (Figura 13D, H).

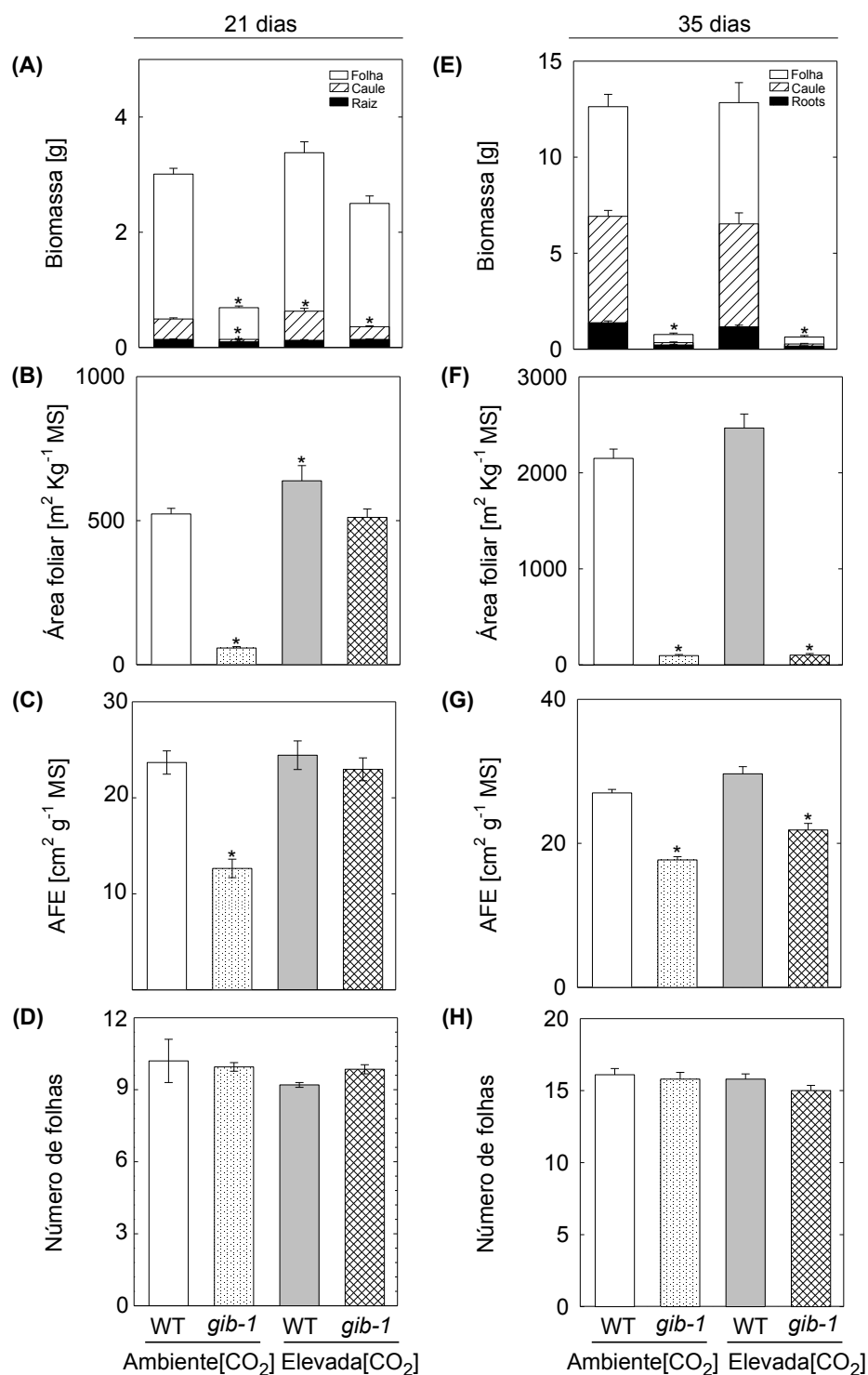


Figura 13. Análise de crescimento do mutante *gib-1* cultivada sob concentração de CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. Biomassa (A), área foliar (B), área foliar específica (AFE) (C), número de folhas (D) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Biomassa (E), área foliar (F), área foliar específica (AFE) (G), número de folhas (H) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas do tipo selvagem sob concentração de

CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições $\pm$ erro da média.

3.2.2 Efeito da concentração de CO₂ elevada nos parâmetros de trocas gasosas em resposta a idade das plantas deficiente na biossíntese das giberelinas

O tratamento com PAC reduziu significativamente *A*, *ETR*, *R_D*, *R_p* das plantas de tomate expostas à concentração de CO₂ ambiente, aos 21 DAG (Figura 14A-D). Sob concentração de CO₂ elevada, houve aumento significativo em *A* nas plantas controle e tratadas com PAC, enquanto *R_p* reduziu em ambas, quando comparada com a planta controle sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 14A, D). Em relação à *ETR* e *R_D*, não houve diferença significativa entre o tratamento com PAC sob concentração de CO₂ elevada em relação às plantas controle sob concentração de CO₂ ambiente (Figuras 14A, C). Adicionalmente, as plantas controle tiveram redução em *ETR*, mas mantiveram *R_D* semelhante às plantas controle em concentração de CO₂ ambiente (Figura 14, C)

Plantas tratadas com PAC expostas à concentração de CO₂ ambiente aos 35 DAG não apresentaram alteração em *A*, mas houve redução significativa em *ETR*, *R_D* e *R_p* (Figura 14E-H). Ao serem submetidas à concentração de CO₂ elevada, essas plantas apresentaram aumento em *A* e redução em *ETR*, *R_D* e *R_p*, em relação às plantas controle sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 14E-H). Sob concentração de CO₂ elevada, as plantas controle apresentaram aumento significativo em *A* e redução em *R_p*, mas mantiveram inalterados *ETR* e *RD* (Figura 14E-H). Houve um aumento significativo na *C_i* nas plantas cultivadas sob concentração de CO₂ elevada, independente do regime de GAs ou da idade das plantas (Figura 15A). A *g_s* e *F_v/F_m* mantiveram-se inalterada, não sendo afetado pelo regime de GAs, concentração de CO₂ e pela idade das plantas (Figura 15B, C, E, F).

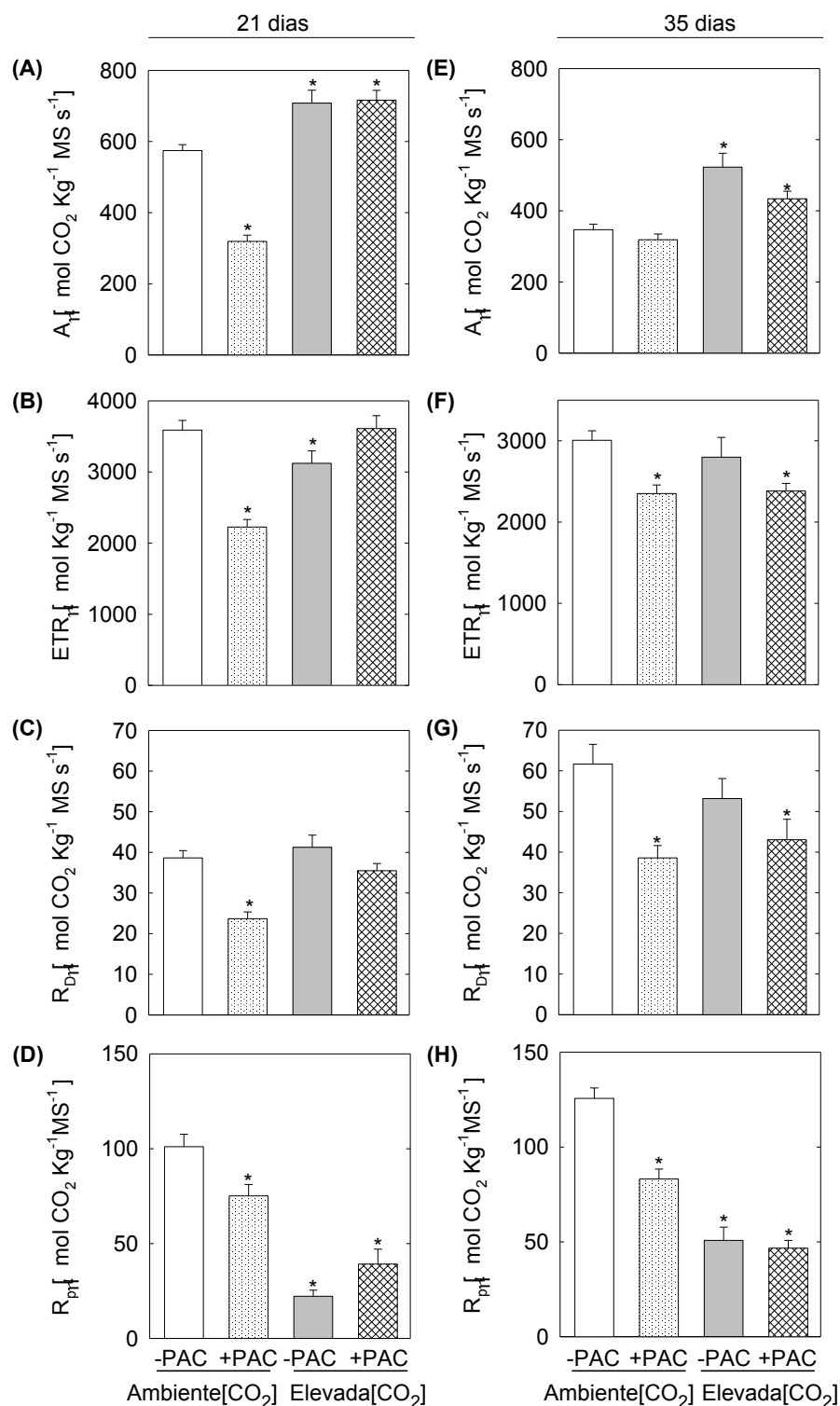


Figura 14. Trocas gasosas do tomateiro tratado com PAC cultivado sob concentração de CO₂ ambiente (400 μ mol CO₂ mol⁻¹) e elevada (750 μ mol CO₂ mol⁻¹ ar) aos 21 e 35 dias após a germinação. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), taxa de transporte de elétrons (B), respiração noturna (C), fotorrespiração (D) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Taxa de assimilação líquida de carbono (E), taxa de transporte de elétrons (F), respiração noturna (G), fotorrespiração (H) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco

diferem estatisticamente do controle (- PAC sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições ± erro da média.

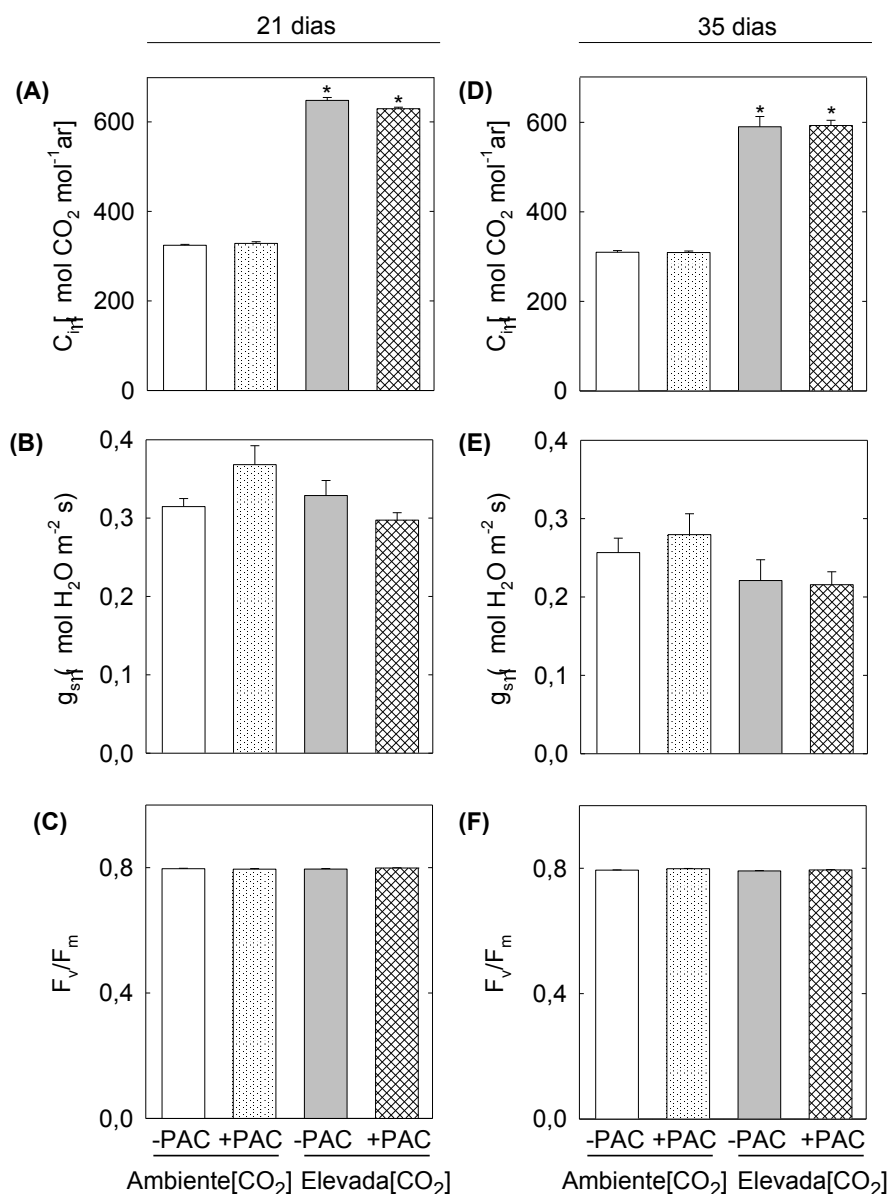


Figura 15. Concentração interna de CO₂, condutância estomática e razão F_v/F_m em tomateiro tratado com PAC cultivado sob concentração CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. Concentração interna de CO₂ (A), condutância estomática (B), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (C) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Concentração interna de CO₂ (D), condutância estomática (E), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (- PAC sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições ± erro da média.

O mutante *gib-1* apresentou redução em A , ETR, R_D e R_p , quando submetidas à concentração de CO_2 ambiente, 21 DAG (Figura 16A-D). Sob concentração de CO_2 elevada, A e R_D aumentaram nas plantas do tipo selvagem e mutante, enquanto ETR e R_p foram reduzidos, quando comparada com as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO_2 ambiente (Figura 16A-D). Os mutantes submetidos à concentração de CO_2 ambiente aos 35 DAG apresentaram redução significativa em A , ETR, R_D e R_p (Figura 16A-D). Sob concentração de CO_2 elevada, nesse mesmo período (35 DAG), foi observado aumento em A e redução em R_D e R_p nos mutantes (Figura 16E, G, H). Já a ETR em concentração de CO_2 elevada não mostrou diferença significativa no mutante em relação às plantas tipo selvagem sob concentração ambiente de CO_2 (Figura 16F). As plantas tipo selvagem apresentaram aumento significativo em A e redução em ETR e R_p sob concentração de CO_2 elevada, 35 DAG (Figura 16E, F, H). R_D manteve-se inalterado nas plantas tipo selvagem sob concentração de CO_2 elevada, quando comparada as mesmas plantas em concentração de CO_2 ambiente (Figura 16H). Um aumento significativo em C_i foi observado nas plantas tipo selvagem e mutante *gib-1* submetidos à concentração de CO_2 elevada aos 21 e 35 DAG (Figura 17A, D). A g_s e F_v/F_m mantiveram-se inalteradas nas plantas tipo selvagem e mutantes em concentração de CO_2 ambiente e elevada em ambos estádios avaliados (21 e 35 DAG) (Figura 17B, C, E, F).

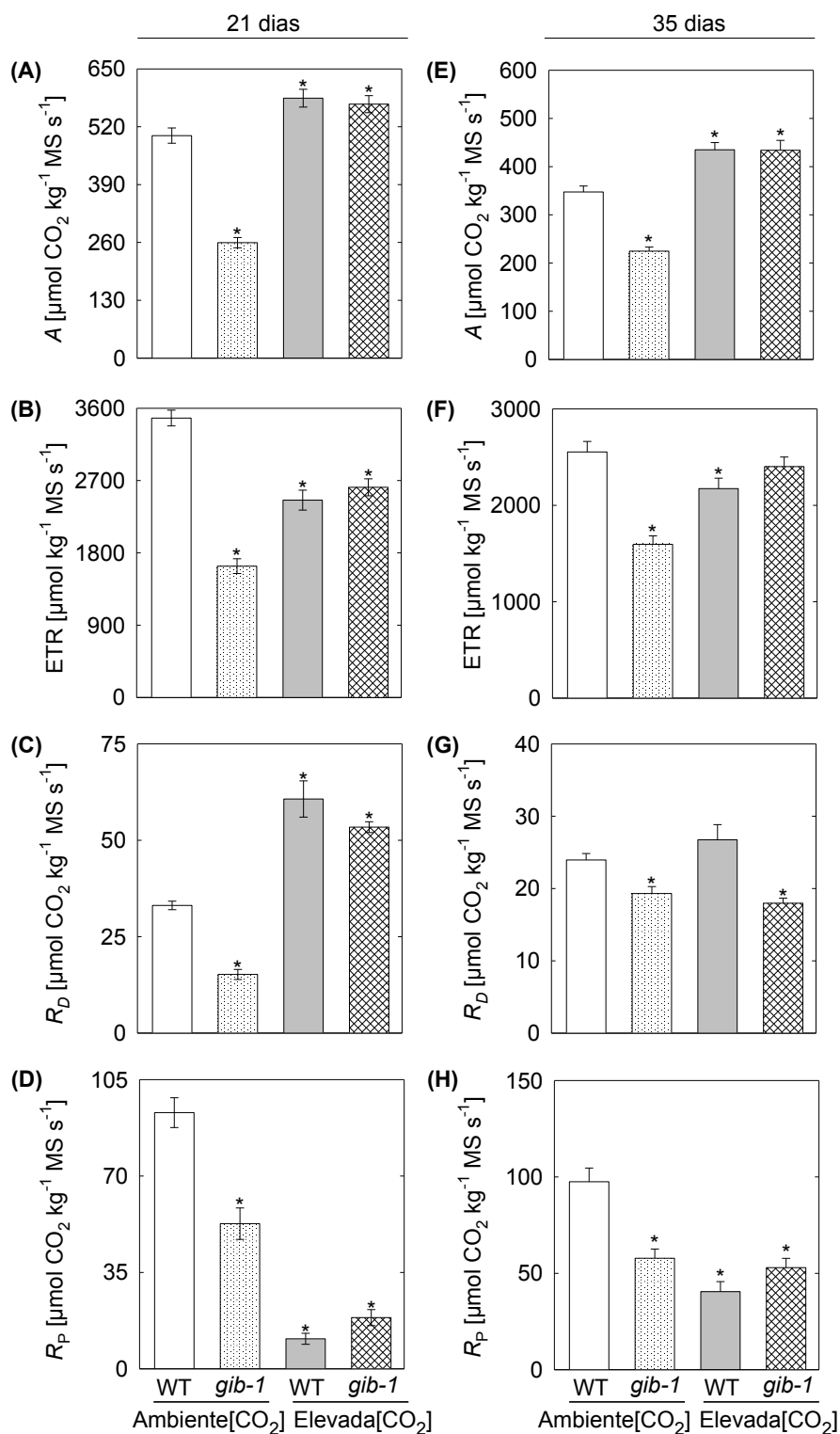


Figura 16. Trocas gasosas do tomateiro mutante *gib-1* submetidas à concentração de CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), taxa de transporte de elétrons (B), respiração noturna (C), fotorrespiração (D) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Taxa de assimilação líquida de carbono (E), taxa de transporte de elétrons (F), respiração noturna (G), fotorrespiração (H) sob

tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições ± erro da média.

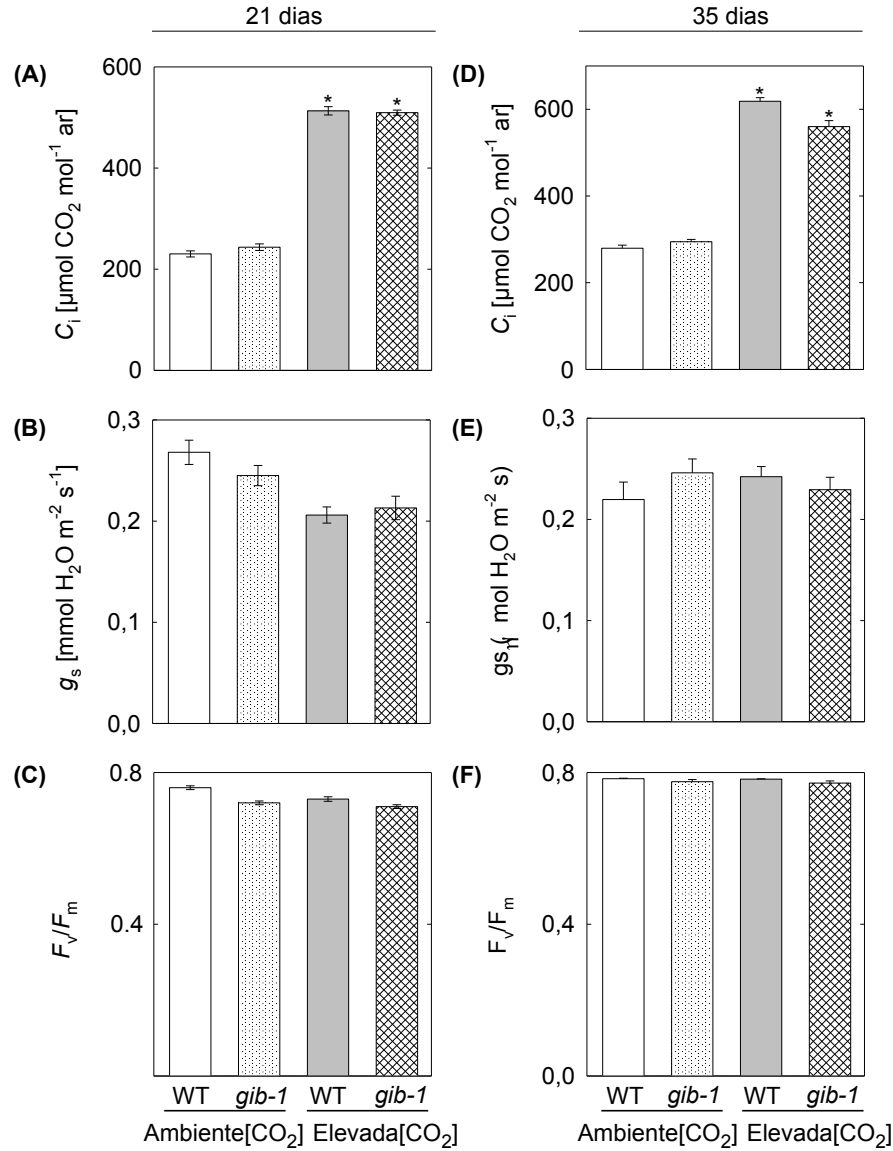


Figura 17. Concentração interna de CO₂, condutância estomática e razão F_v/F_m no mutante *gib-1* submetidas à concentração de CO₂ ambiente (400 μmol CO₂ mol⁻¹ ar) e elevada (750 μmol CO₂ mol⁻¹ ar) aos 21 e 35 dias após a germinação. Concentração interna de CO₂ (A), condutância estomática (B), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (C) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Concentração interna de CO₂ (D), condutância estomática (E), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 10 repetições ± erro da média.

3.2.3 *Efeito da concentração de CO₂ elevada no metabolismo do nitrogênio em resposta a idade das plantas deficiente na biossíntese das giberelinas*

As plantas tratadas com PAC, submetidas aos 21 DAG à concentração de CO₂ ambiente, apresentaram aumento significativo no nível de aminoácidos nas folhas em comparação às plantas controle sob mesma condição de CO₂ (Figura 18A). Sob concentração de CO₂ elevada, o nível de aminoácidos foi significativamente reduzido nas plantas controle e tratadas com PAC (Figura 18A). Quando submetidos ao tratamento com CO₂ aos 35 DAG, o nível de aminoácidos foi reduzido nas plantas tratadas com PAC em concentração ambiente e elevada de CO₂ (Figura 18C). A exposição à concentração de CO₂ elevada, aos 35 DAG, não afetou o conteúdo de aminoácidos nas plantas controle (Figura 18C). Os níveis de proteína mantiveram-se estável nas folhas das plantas controle e tratadas com PAC sob concentração de CO₂ ambiente e elevada, aos 21e 35 DAG (Figura 18B, D).

Contrariamente ao tratamento com PAC, o mutante apresentou significativa redução no nível de aminoácidos quando expostos a concentração de CO₂ ambiente aos 21 DAG, em relação às plantas tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 19A). Sob concentração de CO₂ elevada, nesse mesmo período, não houve diferença significativa entre o nível de aminoácidos nas plantas do tipo selvagem e mutante em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração ambiente de CO₂ (Figura 19A). Os níveis de proteínas foram significativamente inferior no mutante *gib-1* sob concentração CO₂ ambiente e elevada, 21 DAG (Figura 19B). A exposição à concentração de CO₂ elevada, aos 21 DAG, também reduziu significativamente o nível de proteínas nas plantas tipo selvagem (Figura 19B). Aos 35 DAG, o nível de aminoácidos total foi alterado no mutante somente em concentração de CO₂ ambiente, onde houve um aumento significativo em relação às plantas tipo selvagem

(Figura 19C). Aos 35 DAG, o conteúdo de proteína não foi influenciado pela concentração de CO₂ e pelo nível de GAs nas plantas tipo selvagem e mutante (Figura 19C).

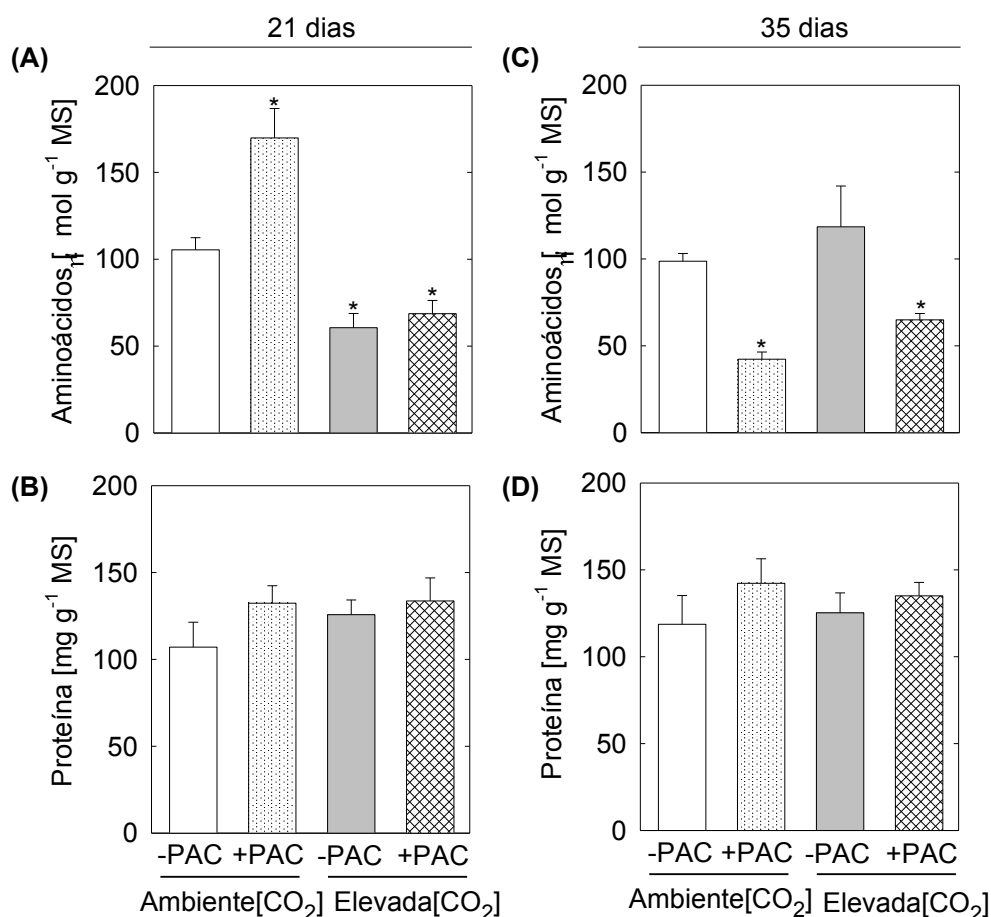


Figura 18. Níveis de aminoácidos e proteína em folhas de tomateiro tratado com PAC submetido à concentração de CO₂ ambiente (400 μmol CO₂ mol⁻¹ ar) e elevada de CO₂ (750 μmol CO₂ mol⁻¹ ar) aos 21 e 35 dias após a germinação. Aminoácidos (A), proteína (B) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Aminoácidos (C) e proteína (D) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (-PAC sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições ± erro da média

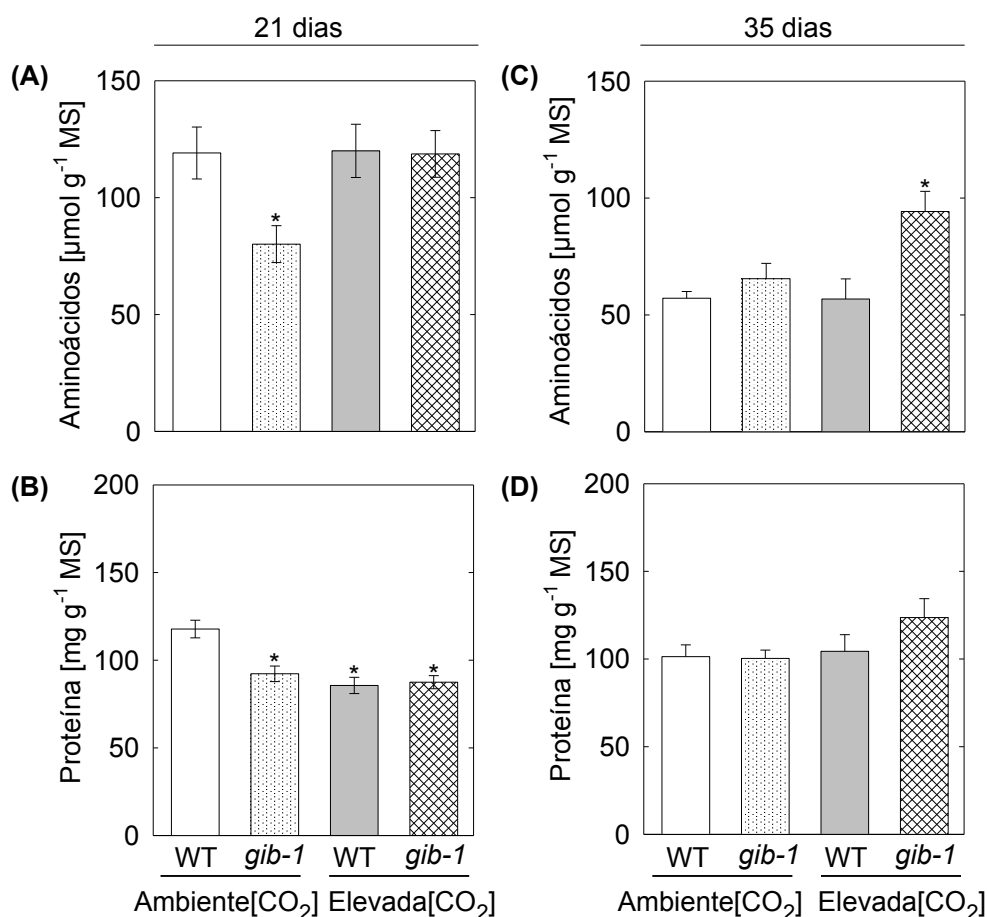


Figura 19. Níveis de aminoácidos e proteína em folhas do mutantes *gib-1* submetido à concentração CO_2 ambiente ($400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{ar}$) e elevada ($750 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. Aminoácidos (A), proteína (B) sob tratamento com CO_2 aos 21 dias após a germinação. Aminoácidos (C) e proteína (D) sob tratamento com CO_2 aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (plantas do tipo selvagem sob concentração de CO_2 ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições $\pm$ erro da média.

3.2.4 Efeito da concentração de CO_2 elevada nos níveis de açúcares e amido em resposta a idade das plantas deficiente na biossíntese das giberelinas

O nível de glicose permaneceu estável nas plantas tratadas com PAC sob concentração de CO_2 ambiente e elevada, em relação às plantas controle sob concentração de CO_2 ambiente, 21 DAG (Figura 20A). O tratamento com PAC, sob concentração de CO_2 ambiente, reduziu significativamente o conteúdo de frutose e amido das folhas somente sob concentração de CO_2 elevada (Figura 20B, D), já o

conteúdo de sacarose foi reduzido no tratamento com PAC em ambas as concentrações de CO₂ no período de exposição ao gás aos 21 DAG (Figura 20C). Adicionalmente, a exposição das plantas tratadas com PAC à concentração de CO₂ ambiente e elevada aos 35 DAG, reduziu significativamente o conteúdo de glicose e frutose (Figura 20E, F). O conteúdo de sacarose se manteve estável nas plantas tratadas com PAC em ambas as concentrações de CO₂ testadas, em relação ao controle sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 20G). Ademais, o PAC reduziu o nível de amido das plantas com 35 DAG somente sob concentração de CO₂ elevada (Figura 20H). O conteúdo de glicose, frutose e sacarose nas plantas controle não foi alterado quando estas foram expostas a concentração de CO₂ elevada aos 21 e 35 DAG (Figura 20A-H).

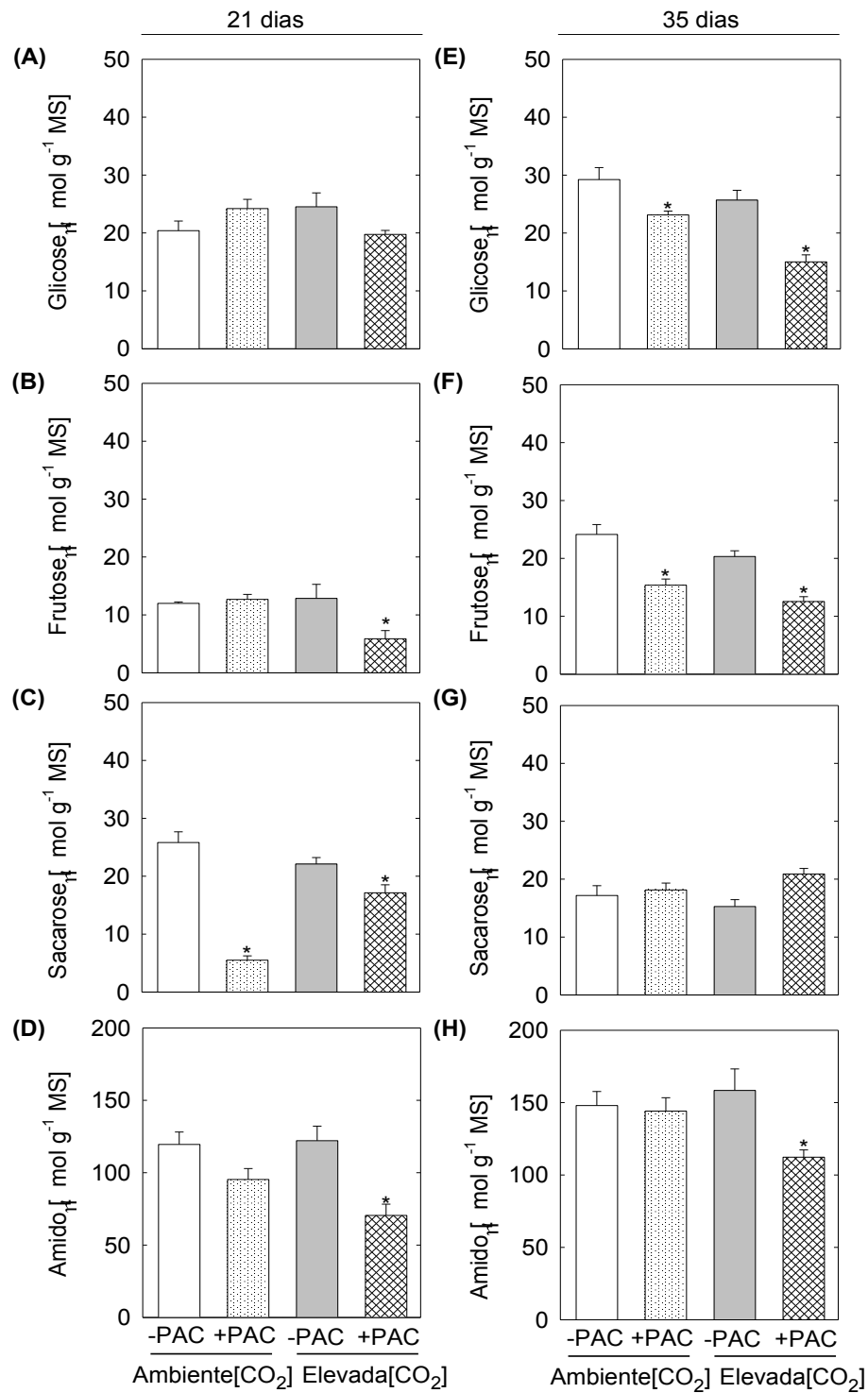


Figura 20. Níveis de açúcares e amido em folhas do tomateiro tratado com PAC submetidas à concentração de CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. Glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Glicose (E), frutose (F), sacarose (G) e amido (H) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle (-PAC sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5% pelo teste *t*. Médias de 6 repetições $\pm$ erro da média.

A inibição da biossíntese das GAs no mutante reduziu significativamente os níveis de glicose, frutose, sacarose e amido foliar quando estes foram submetidos aos 21 DAG à concentração ambiente de CO₂ (Figura 21A-D). A exposição à concentração de CO₂ elevada aos 21 DAG, não alterou o conteúdo de glicose, frutose e sacarose das plantas tipo selvagem, mas aumentou significativamente o conteúdo de amido (Figura 21A-D). Sob elevada concentração de CO₂, o mutante, nesta fase do desenvolvimento não apresentou diferença significativa no conteúdo de glicose e frutose em relação ao às plantas tipo selvagem sob concentração ambiente de CO₂ (Figura 21A, B). O nível de sacarose foi significativamente inferior nos mutantes *gib-1* sob elevada concentração de CO₂, embora tenha sido observado uma tendência de aumento em relação ao mutante sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 21C). Adicionalmente, houve um aumento expressivo no conteúdo de amido no mutante sob concentração de CO₂ elevada, 21 DAG (Figura 21D). Redução significativa no conteúdo de glicose e frutose foi observado no mutante quando submetidos à concentração de CO₂ ambiente aos 35 DAG (Figura 21E, F), em contrapartida o nível de sacarose aumentou significativamente nessa condição em relação as plantas tipo selvagem sob concentração ambiente de CO₂ (Figura 21G). O conteúdo de amido não foi alterado pela redução de GAs no mutante (Figura 21H). A exposição das plantas tipo selvagem à concentração de CO₂ elevada não afetou o conteúdo de glicose, frutose, sacarose e amido destas plantas (Figura 21E-H). Nesta fase do desenvolvimento sob concentração de CO₂ elevada, as plantas mutantes mantiveram o padrão apresentado sob concentração de CO₂ ambiente, com redução no conteúdo de glicose e frutose, e aumento no conteúdo de sacarose (Figura 21E-G). O conteúdo de amido foi significativamente reduzido no mutante quando submetido à concentração de CO₂ elevada, aos 35 DAG (Figura 21H).

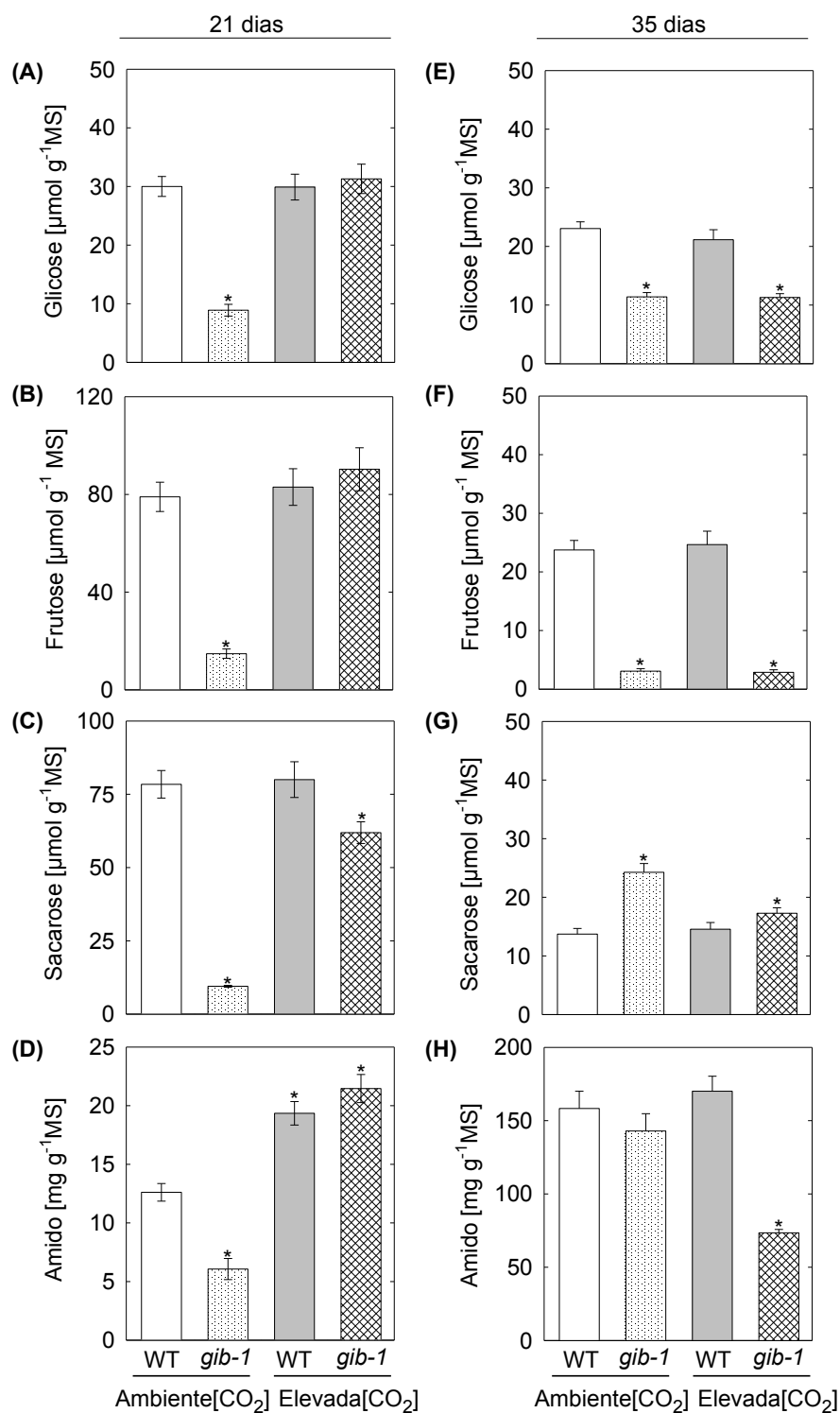


Figura 21. Níveis de açúcares e amido em folhas do mutante *gib-1* submetido à concentração de CO₂ ambiente (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e elevada (750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) aos 21 e 35 dias após a germinação. Glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) sob tratamento com CO₂ aos 21 dias após a germinação. Glicose (E), frutose (F), sacarose (G) e amido (H) sob tratamento com CO₂ aos 35 dias após a germinação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente do controle.

(plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente), em nível de 5 % pelo teste *t*. Médias de 6 repetições ± erro da média.

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeito da concentração de CO₂ elevada em tomateiro deficiente em giberelinas

4.1.1 Crescimento e disponibilidade de recursos

A GA é um hormônio vegetal que regula os principais aspectos do crescimento e desenvolvimento nas plantas (Davière e Achard, 2013). Dessa forma, alterações no nível endógeno de GAs causam distúrbio no crescimento e na alocação de biomassa nas plantas (Nagel et al., 2001). A alocação de biomassa está diretamente relacionada com a TCR (Poorter, 1989; Poorter e Lambers, 1991; Villar et al., 1998; Poorter et al., 2012; Li et al., 2016). Alguns estudos têm mostrado que a TCR é positivamente relacionado com a FMF, enquanto uma correlação negativa entre a alocação de biomassa radicular e TCR é esperada (Gleeson e Tilman, 1992; Walters et al., 1993). Assim a redução na alocação de biomassa para a parte aérea resulta em redução na TCR dos mutantes *gib-1*. Ademais, o crescimento radicular no mutante *gib-1* foi também afetado pela redução no nível de GAs, que apresentou maior valor de FMR em comparação as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3). De acordo com Poorter e Van der Werf (1998), variações na TCR em espécies herbáceas tem sido relacionadas principalmente com a AFE, parâmetro que foi fortemente influenciado pela redução no conteúdo de GAs nos mutantes e conseqüentemente na TCR destas plantas (Figura 3). Por restaurar os parâmetros de área e massa foliar, a concentração de CO₂ elevada conseguiu restaurar a TCR dos mutantes, a valores próximos ao das plantas tipo selvagens em concentração de CO₂ ambiente (Figura 3).

A concentração de GAs no mutante *gib-1* é extremamente reduzida para conseguir suportar o crescimento normal das folhas e do caule, o que reduz a força dreno destes órgãos. Apesar da redução na fotossíntese (Figura 6), o mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente aparentemente apresentou uma produção de carbono que excede a demanda para o crescimento, levando ao acúmulo de carboidratos no caule e raiz (Figura 8). O armazenamento de carboidratos no caule e na raiz do mutante pode ser uma forma de estocar o excesso de fotoassimilados devido à redução mais drástica no crescimento das folhas do que na taxa de fotossíntese. O excesso de carboidratos estocados no caule é uma forma de tamponar as alterações na interação fonte-dreno durante as diferentes fases do crescimento e condições do ambiente (Slafer, 2003). Esse mecanismo de acúmulo de carboidratos no caule pode ser ainda uma tentativa do mutante *gib-1* reduzir o acúmulo de carboidrato foliar, e assim retardar a inibição da fotossíntese devido ao acúmulo de açúcares e amido nas folhas. O aumento de carboidratos nas raízes poderia estar associado a uma maior alocação de carbono para esse órgão. Neste contexto, o crescimento da raiz parece ser menos afetado pela redução no nível de GAs em relação às folhas e caule, tendo assim maior demanda de carbono. Além disso, a respiração radicular de plantas com deficiência em GAs tende a sofrer uma redução menos pronunciada do que a respiração da parte aérea (Nagel e Lambers, 2002), sustentando a necessidade de uma maior alocação de carbono para esse órgão. De forma geral, a disponibilidade de carbono no mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente não resultou em aumento na biomassa, pois a deficiência em GAs no mutante restringiu acentuadamente o crescimento da parte aérea. Assim, o mutante *gib-1* tentou particionar o carbono remanescente para órgãos que tivessem a capacidade de armazená-lo e/ou utilizá-lo.

A concentração de CO₂ elevada foi anteriormente descrita como um fator capaz de influenciar o crescimento, em parte, de maneira independente de GA em plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com PAC, um inibidor da biossíntese de GAs (Ribeiro et al., 2012). Esse resultado foi confirmado no presente trabalho em plantas de tomate mutante *gib-1*, que tiveram seu crescimento e alocação de biomassa restaurados quando submetidos à concentração de CO₂ elevada (Figura 3). De forma geral, a concentração de CO₂ elevada aumenta a fixação de carbono e a disponibilidade de carboidratos das plantas (Ainsworth e Long, 2005; Teng et al., 2006; Li et al., 2013). A disponibilidade adicional de fotoassimilados possibilita o maior crescimento das plantas sob concentração de CO₂ elevada (Ainsworth e Long, 2005), quando elas têm a capacidade de usá-lo para o crescimento. A respiração das plantas está intimamente relacionada ao balanço de carbono (Xu et al., 2015) e por isso a disponibilidade do mesmo pode interferir na respiração. O acúmulo de carboidratos pode afetar os níveis de transcritos que codificam enzimas respiratória (Watanabe et al., 2014) e alguns genes que codificam estas enzimas aumentam sua expressão sob concentração de CO₂ elevada (Li et al., 2008; Leakey et al., 2009; Watanabe et al., 2014). Dessa forma, o aumento da R_D encontrada nas plantas do tipo selvagem e mutante sob concentração de CO₂ elevada pode ser atribuído ao aumento da disponibilidade de carboidratos. A manutenção do nível de açúcares nas folhas, sob concentração de CO₂ elevada (Figura 8), pode refletir que o aumento de fotoassimilados foi suficiente para ser exportado e utilizado pelos órgãos dreno e ainda incrementar o conteúdo de amido foliar (Figura 8). Adicionalmente, estudos tem demonstrado que a capacidade de respirar o carbono recém assimilado é importante para evitar o acúmulo excessivo dos mesmo, que leva a retroinibição da fotossíntese e/ou danos físicos ao cloroplasto (Aranjuelo et al., 2009; Li et al., 2013).

A retroinibição da fotossíntese em plantas sob concentração de CO₂ elevada é resultado da inabilidade das plantas em formar drenos suficientes para consumir os fotoassimilados excedentes (Ainsworth et al., 2004). A capacidade de utilização dos fotoassimilados em plantas de soja com crescimento indeterminado, em relação às plantas de crescimento determinado, sustenta o aumento na fotossíntese em concentração de CO₂ elevada (Ainsworth et al., 2004). O hábito de crescimento indeterminado dos tomates utilizado neste experimento não limita a força dreno destas plantas em concentração de CO₂ elevada. Assim, elas são capazes de utilizar o carbono assimilado para o crescimento, evitando o acúmulo e a retroinibição da fotossíntese.

A concentração de GAs parece não estar diretamente relacionada com o crescimento sob concentração de CO₂ elevada (Ribeiro et al 2012). Entretanto, as GAs podem ser importantes para restabelecer o crescimento, visto que o comprimento do caule no mutante sob concentração de CO₂ elevada permaneceu inferior as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente. O hormônio brassinosteróide (BR) é um importante estimulador do crescimento das plantas, promovendo divisão e expansão celular (Bai et al., 2012). De acordo com Bai et al. (2012), o BR é essencial para a indução do alongamento do caule, enquanto as GAs potencializam o efeito do crescimento promovido pelo BR. A interação entre GAs e BR pode explicar o menor efeito no crescimento do caule do mutante *gib-1* de tomate, mesmo sob concentração de CO₂ elevada. Adicionalmente, o BR tem sido apontado como responsável pelo aumento no crescimento de plantas expostas a concentração de CO₂ elevada. Em *Brassica napus* L. a concentração de CO₂ elevada aumentou significativamente a expressão de genes relacionados com BR (Rizi, 2014). Em *Arabidopsis thaliana* também foi encontrado um efeito positivo na

regulação do fator de transcrição BZR (*Brassinazole-resistant*) sob concentração de CO₂ elevada (Ribeiro et al., 2013). Plantas tratadas com PAC e/ou GA sob concentração de CO₂ ambiente apresentou uma pequena alteração na expressão de genes associados ao hormônio BR, em contrapartida todos os genes avaliados associados ao BR foram regulados positivamente tanto em plantas com baixo ou alto nível de GAs sob concentração de CO₂ elevada.

Embora ainda pouco se conheça sobre o papel das vias hormonais nas respostas à concentração de CO₂ elevada, a existência de uma relação entre eles deve ser levada em conta, visto que muitos hormônios apresentaram alteração em seus níveis em plantas cultivadas sob concentração de CO₂ elevada (Li et al., 2011; Jiang et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Zavala et al., 2013; Rizi, 2014; Vaughan et al., 2014). A concentração de CO₂ elevada pode promover o acúmulo de ácido salicílico (Zavala et al., 2013), BR (Jiang et al., 2012; Rizi, 2014), enquanto reduz jasmonatos e a concentração de etileno (Vaughan et al., 2014). Aumentos na concentração de AIA também foram encontrados em *Ginkgo biloba* enquanto houve queda nas concentrações de ABA (Teng et al., 2006; Li et al., 2011). Além disso, os níveis de transcritos de genes relacionados à síntese ou transporte de auxina e citocinina aumentam na presença de concentração de CO₂ elevada (Gupta et al., 2005; Taylor et al., 2005; Huang e Xu, 2015). A existência de um *crosstalk* hormonal permite que alteração em uma via seja percebida e altere outras vias hormonais (O'Brien e Benkova, 2013). Sendo os hormônios vegetais os principais reguladores do crescimento e desenvolvimento das plantas, essa flexibilidade das vias hormonais em resposta a concentração de CO₂ elevada, permite uma modulação apropriada do crescimento das plantas (Ribeiro et al., 2013).

Sob concentração de CO₂ ambiente, a inibição da biossíntese das GAs no mutante foi capaz de alterar a concentração de alguns nutrientes presentes na folha (Tabela 1). O nível de K se mostrou indispensável para o alongamento celular em trigo, e o tratamento com GA₃ aumentou a absorção celular desse macronutriente (Chen et al., 2001). A redução no conteúdo de K no mutante pode ser um reflexo da menor absorção de K diante da redução nos níveis de GAs. Apesar do aumento do conteúdo de clorofila nas folhas do mutante em concentração de CO₂ ambiente (Figura 7), a concentração de ferro e Mn foi reduzido nestas plantas. Segundo Matsuoka et al. (2014), os mecanismos de translocação são suprimidos para manter a homeostase e prevenir o acúmulo de ferro na parte aérea de plantas com deficiência em GAs.

A concentração foliar de muitos nutrientes é frequentemente reduzida em resposta ao aumento da concentração de CO₂ (Atkinson et al., 1997; Duval et al., 2015; Jauregui et al., 2016). Esse efeito é geralmente atribuído a maiores taxas de crescimento, reduzida transpiração foliar e alteração no padrão de alocação dos nutrientes (Lethiec et al., 1995; Cotrufo et al., 1998; Jauregui et al., 2016). A concentração de CO₂ elevada utilizada nesse experimento não foi capaz de alterar a concentração de macro e micronutrientes presentes na folha das plantas do tipo selvagem (Tabela 1). Visto que, o fechamento estomático tem um importante efeito no processo de transpiração que coordena o fluxo de massa (Taub e Wang, 2008), a manutenção da g_s das plantas selvagem em concentração de CO₂ elevada pode ter contribuído para a manutenção na concentração de nutrientes. O estímulo do crescimento nos mutantes promovido pela concentração de CO₂ elevada possivelmente está relacionado ao aumento na concentração de cálcio, magnésio, enxofre, cobre e zinco (Tabela 1). De forma geral, esses nutrientes estão envolvidos

em processos que podem favorecer o crescimento das plantas como metabolismo de parede celular, fotossíntese, respiração e sinalização hormonal (Shaul, 2002; Droux, 2004; Hepler, 2005; Yruela, 2005).

4.1.2 *A concentração de CO₂ elevada modifica a anatomia foliar do mutante gib-1 favorecendo a fotossíntese*

A extrema deficiência em GAs no mutante *gib-1*, cultivados sob concentração de CO₂ ambiente modificou a anatomia foliar dessa planta (Figura 4). De fato, as GAs possuem papel crucial na divisão, expansão e organização das células do mesofilo (Jiang et al., 2012), e dessa forma, sua redução atua como um fator perturbador do crescimento e desenvolvimento foliar. Nesse experimento foi possível confirmar o aumento na espessura do mesofilo devido à redução nos níveis de GAs, observado anteriormente no mutante *gib-1* (Nagel et al., 2001) e também descrito em *Arabidopsis thaliana* (Jiang et al., 2012). Esse aumento se deve principalmente a uma maior espessura do parênquima lacunoso (Figura 5), que por sua vez auxiliou na redução da AFE no mutante sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 3). Observou-se também um maior empacotamento das células do mesofilo do mutante *gib-1*, sob concentração ambiente de CO₂. Segundo Jiang et al. (2012), esse aspecto reflete o aumento do número de células por unidade de área foliar devido à restrição na expansão foliar ocasionada pela redução no conteúdo de GAs. Quando expostos à concentração de CO₂ elevada, o mutante apresentou organização do mesofilo similar ao das plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente. Além disso, foi possível observar a redução da espessura, densidade celular, bem como aumento dos espaços intercelulares no mesofilo do mutante sob concentração de CO₂ elevada.

As características anatômicas das folhas exercem papel fundamental na capacidade fotossintética por determinarem a difusão de CO_2 através do mesofilo (Terashima et al., 2011; Tomas et al., 2013). O aumento da espessura foliar acompanhado pela redução nos espaços intercelulares no mutante *gib-1* sob concentração de CO_2 ambiente pode ter contribuído para a redução na A , visto que estas características restringem a difusão do CO_2 através do mesofilo e a chegada do gás ao sítio de carboxilação da RuBisCO (Weraduwege et al., 2016). Já folhas mais finas, com mesofilo menos denso e mais espaços intercelulares criam menor resistência à difusão de CO_2 no interior da folha, além de aumentar a área de exposição das células ao espaço intercelular que tende a favorecer o aumento da concentração de CO_2 próximo a Rubisco (Weraduwege et al., 2016). Isso leva a maiores taxas fotossintéticas, e, conseqüentemente aumento no crescimento e acúmulo de biomassa como observado nas plantas de tomate sob concentração de CO_2 elevada (Figuras 3, 6).

4.1.3 Alteração nos parâmetros de trocas gasosas

No mutante *gib-1*, sob concentração de CO_2 ambiente, a extrema deficiência na produção de GAs levou a redução na A , R_D , V_{cmax} , J_{max} , R_p e ETR (Figura 6), o que provavelmente acarretou na redução no crescimento dessas plantas. A fotossíntese no mutante não foi limitada pela g_s e/ou pela C_i , visto que ambas não apresentaram alterações significativas sob concentração de CO_2 ambiente. A redução na taxa fotossintética no mutante está relacionada à sua menor área foliar e AFE. A redução na área foliar reduz a área de interceptação luminosa, já a redução na AFE limita a exposição da maquinaria fotossintética à luz (Pons et al., 1994). Apesar de estudos relatarem a associação entre GAs e A (Biemelt et al., 2004; Huerta et al.,

2008; Xie et al., 2016) pouco, ainda, é conhecido sobre esta associação. Recentemente, Xie et al. (2016) relatou a mudança transcricional de um grande número de genes envolvidos na fotossíntese em resposta à GAs, mostrando a importância deste hormônio na regulação positiva da fotossíntese.

A exposição por um longo período das plantas à concentração de CO₂ elevada, frequentemente está associada à redução na capacidade fotossintética (aclimatação) devido ao acúmulo dos produtos finais da fotossíntese (Ainsworth e Rogers, 2007; Leakey et al., 2009). De forma geral, a aclimatação é atribuída à redução em V_{cmax} e J_{max} , além de um maior investimento em Rubisco (Ainsworth e Long, 2005; Ainsworth e Rogers, 2007; Kirschbaum, 2011). Embora sob concentração de CO₂ elevada tenha ocorrido redução significativa em V_{cmax} nas plantas do tipo selvagem e mutante, a *A* sofreu um aumento significativo em ambos (Figura 6). Tais resultados indicam que as plantas sob concentração de CO₂ elevada não estão em processo de aclimatação. A redução em V_{cmax} pode ser uma forma de otimizar a fotossíntese para o crescimento sob concentração de CO₂ elevada, com menor investimento em Rubisco. Além disso, a fotossíntese ocorrendo sob concentrações de CO₂ elevada sem decréscimo em J_{max} mostra que uma regulação negativa da Rubisco sob concentração de CO₂ elevada não leva necessariamente a perdas na fotossíntese (Bernacchi et al., 2005).

Alguns hormônios, além de GAs, exercem influência sob o aparato fotossintético, sendo essencial a interação entre eles para a resposta da fotossíntese (Gururani et al., 2015). Adicionalmente, a concentração de CO₂ elevada é capaz de modular o nível hormonal das plantas (Li et al., 2011; Jiang et al., 2012; Zavala et al., 2013; Rizzi, 2014; Vaughan et al., 2014). Dessa forma, a influência e interação hormonal é um fator que deve ser considerado na resposta fotossintética, que se torna

prejudicado na ausência de GAs. Alguns trabalhos tem destacado o papel dos BRs na fotossíntese (Yu et al., 2004; Bai et al., 2012; Jiang et al., 2012; Li et al., 2016). Em tomates mutantes superexpressando gene de biossíntese de BR foi observada um aumento na capacidade fotossintética pela regulação das enzimas do ciclo de Calvin e atividade da Rubisco (Li et al., 2016). Visto que a concentração de CO₂ elevada aumenta a expressão de genes relacionados à síntese, sinalização e resposta de BR (Rizi, 2014), a combinação entre concentração de CO₂ elevada e o estímulo de BR pode auxiliar no aumento da fotossíntese observado nos mutantes *gib-1* (Figura 6).

Uma das respostas das plantas à concentração de CO₂ elevada é a redução da condutância estomática (Ainsworth e Long, 2005; Ainsworth e Rogers, 2007). Neste experimento foi possível verificar que a concentração de CO₂ elevada não afetou a condutância estomática de forma significativa nas plantas do tipo selvagem e no mutante *gib-1* em relação as plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 6). Apesar de frequente, a redução na condutância estomática sob concentração de CO₂ elevada não é universal. Outros trabalhos já relataram a pouca influência da concentração de CO₂ em controlar a abertura estomática (Haworth et al., 2013; Damatta et al., 2016). Esse resultado mostra que a concentração de CO₂ não é o único fator que modula a condutância estomática das plantas, fatores adicionais como status hídrico, temperatura, luz, genótipo e estágio de desenvolvimento das plantas devem ser levado em consideração no momento da avaliação (Xu et al., 2016).

4.1.4 A concentração de CO₂ elevada é capaz de reprogramar parte do metabolismo primário em resposta às giberelinas

O crescimento e desenvolvimento das plantas são dependentes da interação entre o metabolismo do carbono e nitrogênio, na qual uma complexa maquinaria regulatória coordena a capacidade de assimilação de nitrogênio com disponibilidade de carbono, disponibilidade de nutrientes e outros fatores do ambiente (Nunes-Nesi et al., 2010). O ciclo dos ácidos tricarboxílicos é uma via essencial na interação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio, pois além da produção de poder redutor (NADH e FADH₂), ele é responsável pela assimilação de nitrogênio e otimização da fotossíntese. Em condição de estresse, as plantas tendem a reorganizar seu metabolismo, permitindo que elas continuem a produzir metabólitos indispensáveis, evitando ao mesmo tempo a produção de espécies reativas de oxigênio (Kaplan et al., 2004; Gong et al., 2005; Kaplan et al., 2007; Lehmann et al., 2012; Muscolo et al., 2015).

Diante do exposto acima, podemos dizer que a redução do nível de GAs é um fator perturbador do crescimento capaz de reorganizar o metabolismo para sustentar a produção de metabólitos essenciais para estas plantas. Adicionalmente, a alteração na demanda energética no mutante, resultante da diminuição no crescimento, refletem as alterações encontradas no nível de metabólitos, juntamente com a redução em R_D e A (Figuras 6, 9, 10, 11). Segundo Sweetlove et al. (2010), a redução na demanda energética é um fator que tende a favorecer a ocorrência do modo não cíclico no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Assim, a alteração no nível de ácidos orgânicos encontrado no mutante pode refletir a ocorrência de fluxos não cíclicos do ciclo do ácido tricarboxílico. Essa reorganização do fluxo metabólico no ciclo do ciclo dos ácidos tricarboxílicos só é possível devido à grande variedade de

substratos respiratórios e vias metabólicas, capaz de conferir certa flexibilidade à respiração das plantas (Araujo et al., 2012). Além disso, a distribuição do fluxo através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos é um reflexo do contexto celular e fisiológico na qual ele está operando (Sweetlove et al., 2010), assim, uma gama de variações podem ser encontradas em nível de ácidos orgânicos dependendo da situação avaliada.

A reorganização do metabolismo da planta mutante em GAs sob concentração de CO₂ ambiente pode ser uma alternativa para suportar a assimilação de nitrogênio. Em função da demanda energética, os aminoácidos podem ser armazenados ou catabolizados, e o produto do catabolismo pode alimentar o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, gerando energia para os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas (Zhu e Galili, 2004; Galili et al., 2014). A redução no crescimento do mutante e consequente redução da demanda energética realocou os aminoácidos produzidos nas folhas para o caule e raiz (Figura 10). Como já discutido anteriormente, caule e raiz podem funcionar como órgãos de armazenamento temporário, onde os compostos armazenados podem posteriormente ser utilizados para suportar o crescimento (Lemoine et al., 2013). Assim, sob concentração de CO₂ elevada, o acúmulo de aminoácidos no caule e raiz pode ter suprido a demanda energética para restaurar o crescimento do mutante deficiente em GAs nessa condição. Embora o conteúdo de aminoácidos tenha sido restaurado sob concentração de CO₂ elevada o conteúdo de proteína apresentou-se inferior nas plantas do tipo selvagem e mutante em relação às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 7). Plantas sob concentração de CO₂ elevada geralmente requerem uma quantidade adicional de nitrogênio para investimento em Rubisco e o aumento na disponibilidade de carboidratos pode aumentar a razão C/N

nessa condição, resultado em menor conteúdo proteico (Kant et al., 2012). Contudo, nas plantas de tomates do tipo selvagem e mutante sob concentração de CO₂ elevada, a disponibilidade de nitrogênio foliar pode não ser o fator responsável pela redução no conteúdo proteico, visto que elas apresentam conteúdo de nitrato, aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos semelhantes ao das plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figuras 7, 8, 9, 11). Além disso, o conteúdo de arginina - um dos principais aminoácidos envolvidos no armazenamento e transporte de nitrogênio (Winter et al., 2015) e de seu precursor glutamato não foram afetados pela sob concentração de CO₂ elevada nestas plantas (Figura 10). Adachi et al. (2014) encontraram uma correlação positiva entre conteúdo de Rubisco e V_{cmáx} em folhas de arroz submetidos ao tratamento com CO₂. Essa correlação pode estar ligada a redução de proteínas nas plantas do tipo selvagem e mutante sob concentração de CO₂ elevada, visto que nesta condição o conteúdo de V_{cmáx} foi significativamente inferior às plantas do tipo selvagem sob concentração de CO₂ ambiente (Figura 6).

O aumento no crescimento do mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ elevada foi acompanhado pela restauração de grande parte do perfil metabólico nestas plantas (Figuras 9, 10, 11). Segundo Ribeiro et al. (2012), as diferenças no perfil metabólico demonstram uma flexibilidade metabólica sob concentração de CO₂ elevada que permite o crescimento das plantas mesmo em um regime reduzido de GAs. Sob concentração de CO₂ elevada, houve aumento significativo em GABA somente no mutante (Figura 10). GABA *shunt* participa do fluxo de carbono e tem uma ligação direta com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Fait et al., 2008). Em situações de estresse, o fluxo de carbono para essa via é normalmente aumentado. A concentração de CO₂ elevada juntamente com redução no nível de GAs no mutante

pode ter levado a alteração no fluxo de carbono acarretando aumento no conteúdo de GABA, como forma de adaptação a nova condição imposta para estas plantas.

O 2-OG é o principal ponto de integração entre o metabolismo do carbono e nitrogênio; e a dependência de 2-OG liga diretamente a biossíntese de GAs ao metabolismo primário (Lancien et al., 2000; Araujo et al., 2014). A redução na atividade da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase em plantas de tomate foi capaz de inibir a respiração, além de alterar os níveis de GAs bioativa e o crescimento (Araujo et al., 2012), confirmando a relação entre 2-OG e GAs. A redução no conteúdo de GA reduziu significativamente a R_D nos mutantes *gib-1*, diante disso seria interessante avaliar a relação de GAs com a expressão gênica e atividade de enzimas envolvidas na respiração para um melhor entendimento das alterações em R_D nestas plantas. Apesar da associação entre em 2-OG e crescimento, a redução no conteúdo de 2-OG não necessariamente indica menores taxas de crescimento. Sob concentração de CO_2 elevada, as plantas do tipo selvagem e mutante apresentaram redução no conteúdo de 2-OG foliar sem que o crescimento fosse reduzido. O 2-OG é um dos principais responsáveis por reabastecer o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e para a assimilação de nitrogênio (Lancien et al., 2000). Assim, a redução no nível de 2-OG nas plantas selvagens e mutante sob concentração de CO_2 elevada pode indicar o aumento no consumo para manter o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, e com isso, sustentar as taxas respiratórias e a produção de aminoácidos em concentração de CO_2 elevada.

Interessantemente, a concentração de CO_2 elevada promoveu alteração em poucos metabólitos detectados no perfil das plantas do tipo selvagem (Figuras 9, 10, 11). Liu et al. (2016) verificaram, por meio de modelagem, que a variação no metabolismo é dependente da concentração de CO_2 , na qual a concentração de CO_2

elevada promove uma menor alteração nos processos metabólicos do que a concentração de CO₂ ambiente. Seria como se na concentração de CO₂ utilizada neste experimento (750 µmol CO₂ mol⁻¹ ar) as plantas do tipo selvagem tivessem as condições metabólicas necessárias para crescerem e os ajustes no metabolismo seriam feitos para otimizar o crescimento e/ou se adaptarem a nova condição. No mutante *gib-1*, a concentração de CO₂ elevada, foi capaz de modular o metabolismo e restabelecer o crescimento das plantas com deficiência em GAs, mostrando a flexibilidade metabólica das plantas quando em uma condição de estímulo.

4.2 Avaliação da janela de resposta a concentração de CO₂ elevada associada às giberelinas

4.2.1 A ação da concentração de CO₂ elevada é restrita a idade das plantas de tomate

A alteração no crescimento das plantas deficientes em GAs é um efeito direto da ação daquele hormônio sobre o alongamento e a expansão celular (Vanhaeren et al., 2016). As GAs influenciam na expressão de genes relacionados ao afrouxamento e rearranjo da parede celular, como genes que codificam expansinas e xiloglucano *endotransglicosilase-hidrolase (XTH)* (Cho e Kende, 1997, 1997; Vogler et al., 2003; Yang et al., 2004; Ribeiro et al., 2012) e assim estimulam o alongamento celular e crescimento das plantas. Diante dessa função das GAs, as plantas submetidas ao tratamento com PAC e mutante *gib-1* apresentaram redução no crescimento, biomassa, área foliar e AFE sob concentração de CO₂ ambiente, independente do estágio avaliado (21 e 35 DAG) (Figuras 12, 13). Os efeitos da redução no nível de GAs no crescimento foram revertidos quando as plantas tratadas com PAC e mutante foram submetidos à concentração de CO₂ elevada aos 21 DAG.

Interessantemente, aos 35 DAG, a concentração de CO₂ elevada não foi capaz de estimular o crescimento das plantas controle em relação às mesmas sob concentração de CO₂ ambiente, nem tão pouco induzir a restauração do crescimento das plantas com reduzido nível de GAs. Estes resultados indicam a existência de uma janela de resposta à concentração de CO₂ elevada que modula o crescimento das plantas de tomate do tipo selvagem e com reduzido nível de GAs. Em *Arabidopsis thaliana*, submetidas à concentração de CO₂ elevada, maiores diferenças entre taxa de crescimento foram observados durante o estágio vegetativo (Watanabe et al., 2014). Assim como observado em *Arabidopsis thaliana*, a sensibilidade das plantas de tomate à concentração de CO₂ elevada pode estar ligada ao estágio de juvenil/adulto e/ou vegetativo/reprodutivo.

Segundo Ribeiro et al. (2012) a concentração de CO₂ elevada não afeta significativamente os níveis de expressão de genes relacionados à GAs quando comparados ao CO₂ ambiente, indicando que esse efeito de reversão pelo CO₂ ocorre de forma independente de mudanças transcricionais em genes da biossíntese de GAs. A influência da concentração de CO₂ elevada sob outros hormônios pode ser responsável por mitigar o efeito da redução do nível de GAs no crescimento das plantas de tomate aos 21 DAG. Assim, a alteração no conteúdo dos hormônios vegetais sob concentração de CO₂ elevada pode compensar a redução no nível de GAs e assim estimular o crescimento diante de uma condição favorável. O aumento na concentração de BR sob concentração de CO₂ elevada (Jiang et al., 2012; Rizi, 2014) juntamente com aumento no conteúdo e sinalização de auxina e redução em ABA (Teng et al., 2006; Li et al., 2011), pode favorecer o crescimento das plantas. Os BRs atuam sinergicamente com auxina para promover o alongamento celular através do controle do regulador negativo BIN2 (*Brassinosteroid insensitive 2*) e

liberação de fatores de transcrição de resposta à auxina (ARF- *auxin response factors*) (Halliday, 2004; Vert et al., 2008). Já o aumento em BR inibe a regulação de ABI5 (*Abscisic acid insensitive 5*) via alteração na atividade de BIN2, que regula positivamente as respostas ao ABA (Hu e Yu, 2014). Com esse exemplo é possível perceber que a existência de um *crosstalk* hormonal pode ser fundamental para o crescimento das plantas sob concentração de CO₂ elevada. Essa interação pode ser a responsável por estimular o crescimento dos mutantes em concentração de CO₂ mesmo com reduzido conteúdo de GA. Contudo, o efeito da concentração de CO₂ elevada sobre o crescimento pode estar restrito a um período em que a planta esteja mais hábil a receber e responder ao estímulo.

A expansão celular e o crescimento das plantas é um mecanismo que depende das modificações na parede celular. A adição de novos polímeros e remodelamento dos componentes existentes da parede marca a fase exponencial da expansão celular, que é sucedida pelo espessamento e enrijecimento que restringe a extensibilidade da parede celular e conseqüentemente o crescimento (Hall e Ellis, 2013). As paredes celulares sofrem alterações durante o crescimento e desenvolvimento das plantas e esse pode ser um fato que determina o período de resposta das plantas à concentração de CO₂ elevada. As expansinas são proteínas de parede celular associadas ao processo de crescimento das plantas devido a sua habilidade de promover a expansão celular. A sensibilidade das células em relação à ação das expansinas pode depender do tecido e estágio de desenvolvimento avaliados (Sloan et al., 2009). Segundo Sloan et al. (2009), a eficácia da ação das expansinas depende da presença de outros fatores controlados pelo estágio de desenvolvimento. Assim, sua ação só é eficaz durante um período de desenvolvimento específico; o que pode restringir o crescimento das plantas de tomate sob concentração de CO₂ elevada a um período específico.

Adicionalmente o processo de transição entre a fase vegetativa e reprodutiva pode estar influenciando nos fatores que controlam a capacidade das plantas em alterar a extensibilidade da parede celular e consequentemente a resposta à concentração de CO₂ elevada. A transição entre a fase juvenil e adulta é o principal determinante da arquitetura das plantas. O processo de transição é precedido por alteração na competência das plantas que as tornam capaz de responder aos estímulos que induzem o desenvolvimento reprodutivo (Poethig, 2013). As alterações na identidade meristemática durante essa fase são acompanhadas por uma reprogramação genética que desencadeia mudanças na morfologia das folhas e caule, bem como alteração na taxa de crescimento (Poethig, 2010, 2013). Essas alterações podem, então, afetar a sensibilidade das plantas de tomate à concentração de CO₂ elevada e dessa forma não exercer mais o esperado efeito sobre o crescimento. Além disso, durante este período as plantas tendem a investir mais em suas estruturas reprodutivas que no crescimento vegetativo propriamente dito.

Os miR156 e miR172 e as vias reguladas por eles tem um importante papel durante o processo de transição de fase. miR156 é abundante nas folhas mais jovens e decresce durante os processos de transição da fase juvenil para adulta, enquanto miR172 tem padrão de expressão oposto (Wang et al., 2011). A concentração de CO₂ elevada estimula o crescimento das plantas de tomate tratadas com PAC e mutante *gib-1* principalmente durante o estágio vegetativo, período correspondente aos maiores conteúdos de miR156. Dessa forma, os processos de sinalização desta fase podem estar envolvido na capacidade das plantas de tomate com deficiência em GAs em retomar o crescimento sob concentração de CO₂ elevada, por permitir o estímulo de vias relacionadas ao crescimento.

4.2.2 Efeito da concentração de CO₂ nas trocas gasosas e metabolismo primário em diferentes estádios de desenvolvimento do tomateiro

A redução nas taxas fotossintéticas e R_D das plantas de tomate em concentração de CO₂ ambiente foram comum para o tratamento com PAC 21 DAG e para o mutante *gib-1* em ambos os estádios avaliados (Figuras 14, 16). Esse resultado condiz com o menor crescimento destas plantas. Em contrapartida, a aplicação de PAC e a exposição das plantas à concentração de CO₂ ambiente aos 35 DAG não afetou a taxa fotossintética (Figura 14). Estas plantas foram submetidas ao tratamento com PAC no 33° DAG, assim elas tiveram maior tempo de crescimento sem a restrição no nível de GAs promovida por PAC. A aplicação tardia de PAC possibilitou o maior alongamento do caule, expansão foliar, e maiores valores de área foliar em relação às plantas tratadas com PAC e submetidas ao tratamento com CO₂ aos 21 DAG (Figura 12). Com isso, mesmo após o tratamento com PAC estas plantas conseguiram minimizar os efeitos de sombreamento e aumentaram a área de interceptação luminosa, refletindo em taxas fotossintéticas semelhantes às plantas controle sob concentração de CO₂ ambiente. A redução da fotossíntese no mutante *gib-1* ocorreu de maneira independente do estágio avaliado (Figura 16). Nestas plantas a deficiência de GAs é um fator intrínseco, acarretando menor nível de GAs em qualquer estágio avaliado o que afeta fortemente o alongamento do caule, expansão foliar durante todo o crescimento, e dessa forma interfere na fotossíntese como já discutido anteriormente.

O aumento das taxas fotossintéticas é uma resposta geral ao enriquecimento com CO₂ e a magnitude do estímulo varia entre as espécies (Ainsworth e Long, 2005; Ainsworth e Rogers, 2007; Xu et al., 2015). Nas plantas de tomate, o aumento nas taxas fotossintéticas sob concentração de CO₂ elevada foi independente do

estádio de desenvolvimento e regime de GAs. O aumento na fotossíntese é um reflexo do aumento em C_i e possivelmente aumento na concentração de CO_2 no sítio de carboxilação no cloroplasto (C_c). Maior concentração cloroplastídica de CO_2 reduz a atividade de oxigenase da Rubisco e consequentemente a fotorespiração, observada nas plantas controle e com redução no nível de GAs sob concentração de CO_2 elevada.

A exposição à concentração de CO_2 elevada aos 21 DAG foi capaz de restaurar o crescimento das plantas com reduzido nível de GAs. Embora o enriquecimento com CO_2 possa acelerar o acúmulo de carboidratos e intermediários da cadeia respiratória por aumentar as taxas fotossintéticas (Watanabe et al., 2014), este efeito não foi observado nas plantas com reduzido nível de GAs, expostas à concentração de CO_2 elevada aos 21 DAG. No tratamento com PAC, a redução nos níveis de carboidratos foliares sob concentração de CO_2 elevada é indicativo do uso para suportar o restabelecimento do crescimento. A manutenção do nível de açúcares nas folhas do mutante *gib-1* pode refletir que os fotoassimilados excedentes foram suficientes para restaurar o crescimento e para incrementar o nível de amido foliar. Visto que as plantas do controle e com reduzido nível de GAs não tiveram alteração no crescimento quando expostas à concentração de CO_2 elevada aos 35 DAG, poucas alterações nos níveis dos metabólitos avaliados foram observadas em relação as mesmas sob concentração de CO_2 ambiente (Figuras 18, 19, 20, 21). O aumento da fotossíntese sob concentração de CO_2 elevada não foi capaz de influenciar o acúmulo de carboidrato foliar nas plantas controle e tratadas com PAC. É importante ressaltar que essas plantas encontravam-se em estágio reprodutivo, com presença de estruturas reprodutivas. A manutenção do estágio reprodutivo requer das plantas um custo elevado para produção das flores e posteriormente frutos e para a manutenção da

respiração e transpiração das estruturas reprodutivas, havendo maior requerimento de fotoassimilados (Obeso, 2002). Os fotoassimilados que não são requeridos para sustentar as funções foliares são convertidos em sacarose e aminoácidos e então direcionados para órgãos dreno (Osorio et al., 2014). Assim, a formação das estruturas reprodutivas, nas plantas submetidas à concentração de CO₂ ambiente e elevada representa o principal destino de fotoassimilados, visto que o alongamento do caule e expansão foliar destas plantas permanece praticamente inalterado mesmo em concentração de CO₂ elevada.

No mutante *gib-1* aos 35 DAG submetidos à concentração de CO₂ elevada o aumento na fotossíntese resultou em aumento no nível de sacarose nas folhas. Parte do carbono assimilado foi destinada para a produção de aminoácidos, resultando em aumento significativo dos mesmos nas folhas. Os aminoácidos representam a principal forma de transporte de nitrogênio nas plantas, sendo transportados via floema para suportar o crescimento de órgãos dreno como folhas jovens, flores e fruto (Ortiz-Lopez et al., 2000). Como o mutante deficiente em GAs manteve o crescimento reduzido quando submetidos à concentração de CO₂ elevada aos 35 DAG, a força dreno foi reduzida, o que inibiu a utilização e o transporte de sacarose e aminoácidos, acarretando no acúmulo dos mesmos nas folhas.

5 CONCLUSÃO

A redução na fotossíntese no mutante deficiente na biossíntese de GAs é um reflexo das modificações anatômicas das folhas. O aumento da espessura foliar, acompanhado da redução nos espaços intercelulares no mutante sob concentração de CO₂ ambiente pode restringir a difusão do CO₂ através do mesófilo e a chegada do mesmo ao sítio de carboxilação da Rubisco. Apesar da redução na fotossíntese, o mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente aparentemente apresentam uma produção de carbono que excede a demanda para o crescimento, levando ao acúmulo de carboidratos no caule e raiz.

A concentração de CO₂ elevada é capaz estimular o crescimento das plantas e restaurar a anatomia foliar do mutante. O estímulo da A e o aumento nos níveis de carboidratos contribuem para o estímulo do crescimento mesmo sob deficiência de GAs. Além disso, influência da concentração de CO₂ elevada sob outros hormônios, como BR, pode ser responsável por mitigar o efeito da redução no nível de GAs no crescimento das plantas de tomate. A concentração de CO₂ elevada foi capaz de estimular o crescimento das plantas mesmo com deficiência em GAs, por conseguir restaurar grande parte do perfil metabólico. Contudo, o estímulo da concentração de CO₂ elevada no crescimento pode ser restrito a uma fase do desenvolvimento das plantas, visto que, quando submetidas à concentração de CO₂ elevada aos 35 DAG, plantas controle e com reduzido nível de GAs não alteraram seu crescimento. O processo de transição entre fase juvenil e adulta, bem como modificações na parede celular podem ser fatores que influenciam essa janela de sensibilidade à concentração de CO₂ elevada, visto que o estímulo do crescimento foi observado principalmente na fase vegetativa das plantas de tomate. Diante do exposto, estudos futuros podem ser direcionados para o melhor entendimento do efeito da concentração de CO₂

elevada sobre o crescimento e a influência de outros hormônios nesse processo; bem como a identificação dos fatores que afetam a resposta da concentração de CO₂ elevada ao longo do crescimento das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GTS, Genschik P** (2009) Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Current Biology* **19**: 1188-1193
- Adachi M, Hasegawa T, Fukayama H, Tokida T, Sakai H, Matsunami T, Nakamura H, Sameshima R, Okada M** (2014) Soil and Water Warming Accelerates Phenology and Down-Regulation of Leaf Photosynthesis of Rice Plants Grown Under Free-Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant and Cell Physiology* **55**: 370-380
- Ainsworth EA** (2008) Rice production in a changing climate: a meta-analysis of responses to elevated carbon dioxide and elevated ozone concentration. *Global Change Biology* **14**: 1642-1650
- Ainsworth EA, Long SP** (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol* **165**: 351-371
- Ainsworth EA, Rogers A** (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising CO₂ : mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell and Environment* **30**: 258-270
- Ainsworth EA, Rogers A, Nelson R, Long SP** (2004) Testing the "source-sink" hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated CO₂ in the field with single gene substitutions in Glycine max. *Agricultural and Forest Meteorology* **122**: 85-94
- Albacete A, Ghanem ME, Martinez-Andujar C, Acosta M, Sanchez-Bravo J, Martinez V, Lutts S, Dodd IC, Perez-Alfocea F** (2008) Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* **59**: 4119-4131
- Aranjuelo I, Pardo A, Biel C, Save R, Azcon-Bieto J, Nogues S** (2009) Leaf carbon management in slow-growing plants exposed to elevated CO₂. *Global Change Biology* **15**: 97-109
- Araujo WL, Martins AO, Fernie AR, Tohge T** (2014) 2-Oxoglutarate: linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Front Plant Sci* **5**: 552
- Araujo WL, Nunes-Nesi A, Nikoloski Z, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2012) Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell and Environment* **35**: 1-21
- Araujo WL, Tohge T, Osorio S, Lohse M, Balbo I, Krahnert I, Sienkiewicz-Porzucek A, Usadel B, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2012) Antisense Inhibition of the 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex in Tomato Demonstrates Its Importance for Plant Respiration and during Leaf Senescence and Fruit Maturation. *Plant Cell* **24**: 2328-2351
- Atkinson CJ, Taylor JM, Wilkins D, Besford RT** (1997) Effects of elevated CO₂ on chloroplast components, gas exchange and growth of oak and cherry. *Tree Physiology* **17**: 319-325
- Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY** (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nature Cell Biology* **14**: 810-U878

- Bernacchi CJ, Morgan PB, Ort DR, Long SP** (2005) The growth of soybean under free air CO₂ enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing in vivo Rubisco capacity. *Planta* **220**: 434-446
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U** (2004) Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* **135**: 254-265
- Booker FL, Burkey KO, Pursley WS, Heagle AS** (2009) Elevated Carbon Dioxide and Ozone Effects on Peanut: I. Gas-Exchange, Biomass, and Leaf Chemistry (vol 47, pg 1475, 2007). *Crop Science* **49**: 732-734
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Busov V, Meilan R, Pearce DW, Rood SB, Ma CP, Tschaplinski TJ, Strauss SH** (2006) Transgenic modification of *gai* or *rgl1* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus*. *Planta* **224**: 288-299
- Chen L, Nishizawa T, Higashitani A, Suge H, Wakui Y, Takeda K, Takahashi H** (2001) A variety of wheat tolerant to deep-seeding conditions: elongation of the first internode depends on the response to gibberellin and potassium. *Plant Cell and Environment* **24**: 469-476
- Cho HT, Kende H** (1997) Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiology* **113**: 1137-1143
- Cho HT, Kende H** (1997) Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *Plant Cell* **9**: 1661-1671
- Cotrufo MF, Ineson P, Scott A** (1998) Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biology* **4**: 43-54
- Damatta FM, Godoy AG, Menezes-Silva PE, Martins SCV, Sanglard LMVP, Morais LE, Torre-Neto A, Ghini R** (2016) Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: Disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany* **67**: 341-352
- Davière JM, Achard P** (2013) Gibberellin signaling in plants. *Gibberellin signaling in plants* **140**: 1147-1151
- Droux M** (2004) Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* **79**: 331-348
- Duval BD, Blankinship JC, Dijkstra P, Hungate BA** (2015) CO₂ effects on plant nutrient concentration depend on plant functional group and available nitrogen: a meta-analysis (Retraction of vol 213, pg 505, 2012). *Plant Ecology* **216**: 1675-1675
- Elliott RC, Ross JJ, Smith JL, Lester DR, Reid JB** (2001) Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**: 87-94
- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie AR** (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* **13**: 14-19
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (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 CM, Sun TP** (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 77-85
- Franks PJ, Adams MA, Anthor JS, Barbour MM, Berry JA, Ellsworth DS, Farquhar GD, Ghannoum O, Lloyd J, McDowell N, Norby RJ, Tissue DT, von Caemmerer S** (2013) Sensitivity of plants to changing atmospheric CO₂ concentration: from the geological past to the next century. *New Phytologist* **197**: 1077-1094
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M** (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal* **46**: 533-548
- Galili G, Avin-Wittenberg T, Angelovici R, Fernie AR** (2014) The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. *Frontiers in Plant Science* **5**
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Et Biophysica Acta* **990**: 87-92
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M** (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304-3325
- Gleeson SK, Tilman D** (1992) Plant allocation and the multiple limitation hypothesis. *American Naturalist* **139**: 1322-1343
- Gong QQ, Li PH, Ma SS, Rupassara SI, Bohnert HJ** (2005) Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **44**: 826-839
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inze D** (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Science* **17**: 332-340
- Gupta P, Duplessis S, White H, Karnosky DF, Martin F, Podila GK** (2005) Gene expression patterns of trembling aspen trees following long-term exposure to interacting elevated CO₂ and tropospheric O₃. *New Phytologist* **167**: 129-142
- Gururani MA, Venkatesh J, Tran LSP** (2015) Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. *Molecular Plant* **8**: 1304-1320
- Hall H, Ellis B** (2013) Transcriptional programming during cell wall maturation in the expanding *Arabidopsis* stem. *Bmc Plant Biology* **13**
- Halliday KJ** (2004) Plant hormones: The interplay of brassinosteroids and auxin. *Current Biology* **14**: R1008-R1010
- Hartig K, Beck E** (2006) Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology* **8**: 389-396
- Haworth M, Elliott-Kingston C, McElwain JC** (2013) Co-ordination of physiological and morphological responses of stomata to elevated CO₂ in vascular plants. *Oecologia* **171**: 71-82
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* **5**: 523-530
- Hedden P, Sponsel V** (2015) A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation* **34**: 740-760
- Hedden P, Thomas SG** (2016) The Gibberellins. *Annual Plant Reviews*
- Hepler PK** (2005) Calcium: A central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* **17**: 2142-2155

- Hoegy P, Keck M, Niehaus K, Franzaring J, Fangmeier A** (2010) Effects of atmospheric CO₂ enrichment on biomass, yield and low molecular weight metabolites in wheat grain. *Journal of Cereal Science* **52**: 215-220
- Hu YR, Yu DQ** (2014) BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 Interacts with ABCISIC ACID INSENSITIVE5 to Mediate the Antagonism of Brassinosteroids to Absciscic Acid during Seed Germination in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 4394-4408
- Huang BR, Xu Y** (2015) Cellular and Molecular Mechanisms for Elevated CO₂-Regulation of Plant Growth and Stress Adaptation. *Crop Science* **55**: 1405-1424
- Huerta L, Forment J, Gadea J, Fagoaga C, Pena L, Perez-Amador MA, Garcia-Martinez JL** (2008) Gene expression analysis in citrus reveals the role of gibberellins on photosynthesis and stress. *Plant Cell and Environment* **31**: 1620-1633
- Hunt R** (1982) *Plant Growth Curves – The Functional Approach to Plant Growth*. Edward Arnold Ltd.
- Jan A, Nakamura H, Handa H, Ichikawa H, Matsumoto H, Komatsu S** (2006) Gibberellin Regulates Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Activity in Rice. *Plant Cell Physiology* **47**: 244-253
- Jauregui I, Aparicio-Tejo PM, Avila C, Canas R, Sakalauskiene S, Aranjuelo I** (2016) Root-shoot interactions explain the reduction of leaf mineral content in Arabidopsis plants grown under elevated CO₂ conditions. *Physiologia Plantarum* **158**: 65-79
- Jiang XS, Li HY, Wang T, Peng CL, Wang HY, Wu H, Wang XJ** (2012) Gibberellin indirectly promotes chloroplast biogenesis as a means to maintain the chloroplast population of expanded cells. *Plant Journal* **72**: 768-780
- Jiang YP, Cheng F, Zhou YH, Xia XJ, Shi K, Yu JQ** (2012) Interactive effects of CO₂ enrichment and brassinosteroid on CO₂ assimilation and photosynthetic electron transport in *Cucumis sativus*. *Environmental and Experimental Botany* **75**: 98-106
- Johansen DA** (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book
- Kamiya Y, Garcia-Martinez J** (1999) Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 398-403
- Kant S, Seneweera S, Rodin J, Materne M, Burch D, Rothstein SJ, Spangenberg G** (2012) Improving yield potential in crops under elevated CO₂: integrating the photosynthetic and nitrogen utilization efficiencies. *Frontiers in Plant Science* **3**
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL** (2004) Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology* **136**: 4159-4168
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL** (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant Journal* **50**: 967-981
- Kirschbaum MUF** (2011) Does Enhanced Photosynthesis Enhance Growth? Lessons Learned from CO₂ Enrichment Studies. *Plant Physiology* **155**: 117-124
- Lancien M, Gadal P, Hodges M** (2000) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiology* **123**: 817-824

- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR (2009)** Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2859-2876
- Lehmann M, Laxa M, Sweetlove LJ, Fernie AR, Obata T (2012)** Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. *Metabolomics* **8**: 143-153
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Deedaldechamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Theevenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M (2013)** Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**
- Lethiec D, Dixon M, Loosveldt P, Garrec JP (1995)** Seasonal and annual variations of phosphorus, calcium, potassium and manganese contents in different cross-sections of *Picea-abies* (l) karst needles and *Quercus-rubra* l leaves exposed to elevated CO₂. *Trees-Structure and Function* **10**: 55-62
- Li CR, Gan LJ, Xia K, Zhou X, Hew CS (2002)** Responses of carboxylating enzymes, sucrose metabolizing enzymes and plant hormones in a tropical epiphytic CAM orchid to CO₂ enrichment. *Plant Cell and Environment* **25**: 369-377
- Li PH, Ainsworth EA, Leakey ADB, Ulanov A, Lozovaya V, Ort DR, Bohnert HJ (2008)** *Arabidopsis* transcript and metabolite profiles: ecotype-specific responses to open-air elevated CO₂. *Plant Cell and Environment* **31**: 1673-1687
- Li X, Zhang GQ, Sun B, Zhang S, Zhang YQ, Liao YWK, Zhou YH, Xia XJ, Shi K, Yu JQ (2013)** Stimulated Leaf Dark Respiration in Tomato in an Elevated Carbon Dioxide Atmosphere. *Scientific Reports* **3**
- Li XF, Schmid B, Wang F, Paine CET (2016)** Net Assimilation Rate Determines the Growth Rates of 14 Species of Subtropical Forest Trees. *Plos One* **11**
- Li XJ, Guo X, Zhou YH, Shi K, Zhou J, Yu JQ, Xia XJ (2016)** Overexpression of a brassinosteroid biosynthetic gene Dwarf enhances photosynthetic capacity through activation of Calvin cycle enzymes in tomato. *Bmc Plant Biology* **16**
- Li XM, Zhang LH, Li YY, Ma LJ, Chen QA, Wang LL, He XY (2011)** Effects of elevated carbon dioxide and/or ozone on endogenous plant hormones in the leaves of *Ginkgo biloba*. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**: 129-136
- Lichtenthaler HK (1987)** Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002)** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* **47**: 239-247
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006)** Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387-396
- Liu JJ, Zhang JG, He CY, Duan AG (2014)** Genes Responsive to Elevated CO₂ Concentrations in Triploid White Poplar and Integrated Gene Network Analysis. *Plos One* **9**
- Liu L, Shen FZ, Xin CP, Wang Z (2016)** Multi-scale modeling of *Arabidopsis thaliana* response to different CO₂ conditions: From gene expression to metabolic flux. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**: 2-11

- Lloyd J, Wong SC, Styles JM, Batten D, Priddle R, Turnbull C, McConchie CA** (1995) Measuring and modelling whole-tree gas exchange. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 987-1000
- Luomala EM, 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 and Environment* **28**: 733-749
- Martin DN, Proebsting WM, Hedden P** (1999) The SLENDER gene of pea encodes a gibberellin 2-oxidase. *Plant Physiology* **121**: 775-781
- 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 Physiology* **122**: 1399-1415
- Matsuoka K, Furukawa J, Bidadi H, Asahina M, Yamaguchi S, Satoh S** (2014) Gibberellin-Induced Expression of Fe Uptake-Related Genes in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **55**: 87-98
- Muscolo A, Junker A, Klukas C, Weigelt-Fischer K, Riewe D, Altmann T** (2015) Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. *Journal of Experimental Botany* **66**: 5467-5480
- Nagel OW, Konings H, Lambers H** (2001) Growth rate and biomass partitioning of wildtype and low-gibberellin tomato (*Solanum lycopersicum*) plants growing at a high and low nitrogen supply. *Physiologia Plantarum* **111**: 33-39
- Nagel OW, Lambers H** (2002) Changes in the acquisition and partitioning of carbon and nitrogen in the gibberellin-deficient mutants A70 and W335 of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell and Environment* **25**: 883-891
- Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M** (2010) Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. *Molecular Plant* **3**: 973-996
- O'Brien JA, Benkova E** (2013) Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* **4**
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME** (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. *Protoplasma* **59**: 368-&
- Obeso JR** (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist* **155**: 321-348
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14**: S61-S80
- Ortiz-Lopez A, Chang HC, Bush DR** (2000) Amino acid transporters in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**: 275-280
- Osorio S, Ruan YL, Fernie AR** (2014) An update on source-to-sink carbon partitioning in tomato. *Frontiers in Plant Science* **5**
- Paparelli E, Parlanti S, Gonzali S, Novi G, Mariotti L, Ceccarelli N, van Dongen JT, Kolling K, Zeeman SC, Perata P** (2013) Nighttime Sugar Starvation Orchestrates Gibberellin Biosynthesis and Plant Growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 3760-3769
- Poethig RS** (2010) The Past, Present, and Future of Vegetative Phase Change. *Plant Physiology* **154**: 541-544
- Poethig RS** (2013) Vegetative Phase Change and Shoot Maturation in Plants. In AE Rougvie, MB Oconnor, eds, *Developmental Timing*, Vol 105. Elsevier Science Bv, Amsterdam, pp 125-152
- Pons TL, Van der Werf A, Lambers H** (1994) Photosynthetic nitrogen use efficiency of inherently slow and fast growing species: possible explanations

- for observed differences. In JR & E Garnier, eds, A Whole Plant Perspective of Carbon–Nitrogen Interactions. SPB Academic Publishing, The Netherlands
- Poorter H** (1989) Plant growth analysis towards a synthesis of the classical and the functional approach. *Physiologia Plantarum* **75**: 237-244
- Poorter H, Lambers H** (1991) Is interspecific variation in relative growth-rate positively correlated with biomass allocation to the leaves. *American Naturalist* **138**: 1264-1268
- Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, Oleksyn J, Poot P, Mommer L** (2012) Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* **193**: 30-50
- Poorter H, Van der Werf A** (1998) Is inherent variation in RGR determined by LAR at low irradiance and by NAR at high irradiance? A review of herbaceous species,
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012) Action of gibberellins on growth and metabolism of Arabidopsis plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiology* **160**: 1781-1794
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B** (2012) Transcriptome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2769–2786
- Ribeiro DM, Mueller-Roeber B, Schippers JHM** (2013) Promotion of growth by elevated carbon dioxide is coordinated through a flexible transcriptional network in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e23356
- Richards DE, King KE, Ait-ali T, Harberd NP** (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 67-88
- Rizi VS** (2014) Oilseed rape (*Brassica napus* L.) transcriptome response to senescence, nitrogen deficiency and elevated CO₂. Freie Universität Berlin, Berlin
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1035–1040
- Shaul O** (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* **15**: 309-323
- Slafer GA** (2003) Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. appl. Biol.* **142**: 117-128
- Sloan J, Backhaus A, Malinowski R, McQueen-Mason S, Fleming AJ** (2009) Phased Control of Expansin Activity during Leaf Development Identifies a Sensitivity Window for Expansin-Mediated Induction of Leaf Growth. *Plant Physiology* **151**: 1844-1854
- Stavang JA, Junttila O, Moe R, Olsen JE** (2007) Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3061-3069
- Sun TP, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 197-223
- Sweetlove LJ, Beard KF, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci.* **15**: 462-470

- Taub DR, Wang XZ** (2008) Why are Nitrogen Concentrations in Plant Tissues Lower under Elevated CO₂? A Critical Examination of the Hypotheses. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1365-1374
- Taylor G, Street NR, Tricker PJ, Sjodin A, Graham L, Skogstrom O, Calfapietra C, Scarascia-Mugnozza G, Jansson S** (2005) The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂. *New Phytologist* **167**: 143-154
- Teng N, Wang J, Chen T, Wu X, Wang Y, Lin J** (2006) Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana* (vol 172, pg 92, 2006). *New Phytologist* **172**: 378-378
- Terashima I, Hanba YT, Tholen D, Niinemets U** (2011) Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis. *Plant Physiology* **155**: 108-116
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P** (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4698-4703
- Tomas M, Flexas J, Copolovici L, Galmes J, Hallik L, Medrano H, Ribas-Carbo M, Tosens T, Vislap V, Niinemets U** (2013) Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* **64**: 2269-2281
- Valentini R, Epron D, Deangelis 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 and Environment* **18**: 631-640
- Vanhaeren H, Inze D, Gonzalez N** (2016) Plant Growth Beyond Limits. *Trends in Plant Science* **21**: 102-109
- Vaughan MM, Huffaker A, Schmelz EA, Dafoe NJ, Christensen S, Sims J, Martins VF, Swerbilow J, Romero M, Alborn HT, Allen LH, Teal PEA** (2014) Effects of elevated CO₂ on maize defence against mycotoxigenic *Fusarium verticillioides*. *Plant Cell and Environment* **37**: 2691-2706
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL** (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 9829-9834
- Villar R, Veneklaas EJ, Jordano P, Lambers H** (1998) Relative growth rate and biomass allocation in 20 *Aegilops* (Poaceae) species. *New Phytologist* **140**: 425-437
- Vogler H, Caderas D, Mandel T, Kuhlemeier C** (2003) Domains of expansin gene expression define growth regions in the shoot apex of tomato. *Plant Molecular Biology* **53**: 267-272
- Walters MB, Kruger EL, Reich PB** (1993) Growth, biomass distribution and CO₂ exchange of northern hardwood seedlings in high and low light - relationships with successional status and shade tolerance. *Oecologia* **94**: 7-16
- Wang JW, Park MY, Wang LJ, Koo YJ, Chen XY, Weigel D, Poethig RS** (2011) MiRNA Control of Vegetative Phase Change in Trees. *Plos Genetics* **7**
- Wang L, Ruan Y-L** (2013) Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in Plant Science* **4**
- Watanabe CK, Sato S, Yanagisawa S, Uesono Y, Terashima I, 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 and Cell Physiology* **55**: 341-357
- Weraduwage SM, Kim SJ, Renna L, Anozie FC, Sharkey TD, Brandizzi F** (2016) Pectin Methylesterification Impacts the Relationship between Photosynthesis and Plant Growth. *Plant Physiology* **171**: 833-848
- Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G, Funck D** (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**
- Wu G, Chen F-J, Ge F, Sun Y-C** (2007) Effects, of elevated carbon dioxide on the growth and foliar chemistry of Transgenic bt cotton. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 1361-1369
- Xie JB, Tian JX, Du QZ, Chen JH, Li Y, Yang XH, Li BL, Zhang DQ** (2016) Association genetics and transcriptome analysis reveal a gibberellin-responsive pathway involved in regulating photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **67**: 3325-3338
- Xu Z, Jiang Y, Jia B, Zhou G** (2016) Elevated-CO₂ Response of Stomata and Its Dependence on Environmental Factors. *Frontiers in Plant Science* **7**
- Xu ZZ, Jiang YL, Zhou GS** (2015) Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**: 17
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *In Annual Review of Plant Biology*, Vol 59, pp 225-251
- Yang GX, Jan A, Shen SH, Yazaki J, Ishikawa M, Shimatani Z, Kishimoto N, Kikuchi S, Matsumoto H, Komatsu S** (2004) Microarray analysis of brassinosteroids- and gibberellin-regulated gene expression in rice seedlings. *Molecular Genetics and Genomics* **271**: 468-478
- Yruela I** (2005) Cooper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17**: 145-152
- Yu JQ, Huang LF, Hu WH, Zhou YH, Mao WH, Ye SF, Nogues S** (2004) A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1135-1143
- Zavala JA, Nabity PD, DeLucia EH** (2013) An Emerging Understanding of Mechanisms Governing Insect Herbivory Under Elevated CO₂. *In MR Berenbaum, ed, Annual Review of Entomology*, Vol 58, Vol 58, pp 79-97
- Zhu XH, Galili G** (2004) Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. *Plant Physiology* **135**: 129-136

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela S1. Nível de açúcares de plantas de tomate selvagem e mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente (400 µmol mol⁻¹) e elevada (750 µmol mol⁻¹). Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do respectivo controle (WT) em nível de 5 % pelo teste *t*. Os dados são a média de 6 repetições ± erro da média.

Órgão	Metabólito	400 µmol CO ₂ mol ⁻¹		750 µmol CO ₂ mol ⁻¹	
		WT	<i>gib-1</i>	WT	<i>gib-1</i>
Folha	3-PGA	1,00±0,08	1,37±0,05	0,82±0,14	1,11±0,12
	Ácido glicérico	1,00±0,08	0,35±0,03	0,41±0,06	0,32±0,04
	Glicose	1,00±0,09	0,11±0,03	0,90±0,13	0,97±0,11
	Frutose	1,00±0,07	0,14±0,01	0,92±0,05	1,00±0,07
	Galactinol	1,00±0,11	0,23±0,06	0,18±0,03	0,25±0,04
	Glicerol	1,00±0,10	0,32±0,04	0,50±0,03	0,55±0,03
	Manitol	1,00±0,12	0,65±0,04	0,94±0,05	0,86±0,09
	Manose	1,00±0,04	0,21±0,03	0,25±0,06	0,67±0,05
	Mio inositol	1,00±0,06	0,94±0,05	0,99±0,07	1,04±0,10
	Sacarose	1,00±0,04	0,51±0,05	0,96±0,04	1,00±0,06
	Trealose	1,00±0,09	1,30±0,06	1,14±0,03	1,02±0,15
Caule	3-PGA	1,00±0,12	0,75±0,15	1,21±0,09	1,12±0,05
	Frutose	1,00±0,06	1,45±0,04	1,57±0,08	1,63±0,10
	Galactinol	1,00±0,08	1,15±0,05	0,75±0,07	1,13±0,12
	Glicose	1,00±0,08	0,57±0,04	0,70±0,15	0,79±0,08
	Manose	1,00±0,04	0,15±0,05	0,78±0,08	1,01±0,12
	Mio inositol	1,00±0,04	1,03±0,05	0,96±0,04	1,01±0,09
	Sacarose	1,00±0,08	1,88±0,10	0,89±0,11	1,14±0,14
Raiz	3-PGA	1,00±0,08	2,62±0,27	1,33±0,07	1,43±0,12
	Frutose	1,00±0,08	1,87±0,04	1,70±0,05	1,50±0,08
	Galactinol	1,00±0,06	1,25±0,12	2,08±0,18	2,12±0,20
	Glicose	1,00±0,10	1,94±0,04	0,91±0,09	2,37±0,05
	Mio inositol	1,00±0,11	0,92±0,05	1,20±0,18	0,99±0,07
	Sacarose	1,00±0,08	1,87±0,11	1,16±0,07	1,20±0,12

Tabela S2. Nível de aminoácidos de plantas de tomate selvagem e mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente (400 µmol mol⁻¹) e elevada (750 µmol mol⁻¹). Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do respectivo controle (WT) em nível de 5 % pelo teste *t*. Os dados são a média de 6 repetições ± erro da média.

Órgão	Metabólito	400 µmol CO ₂ mol ⁻¹		750 µmol CO ₂ mol ⁻¹	
		WT	<i>gib-1</i>	WT	<i>gib-1</i>
Folha	Ácido aspártico	1,00±0,14	0,59±0,07	1,04±0,16	1,15±0,11
	Ácido glutâmico	1,00±0,11	0,70±0,05	1,07±0,13	1,19±0,06
	Alanina	1,00±0,04	0,45±0,05	0,95±0,08	0,88±0,14
	Arginina	1,00±0,05	0,52±0,08	0,89±0,10	0,93±0,04
	Asparagina	1,00±0,08	0,64±0,06	1,12±0,07	0,89±0,16
	Fenilalanina	1,00±0,13	0,51±0,05	1,19±0,05	0,98±0,12
	GABA	1,00±0,04	0,63±0,05	1,20±0,14	1,76±0,16
	Glicina	1,00±0,04	0,95±0,06	0,93±0,07	0,86±0,07
	Glutamina	1,00±0,09	0,42±0,06	1,21±0,10	0,89±0,08
	Homoserina	1,00±0,06	0,50±0,02	0,96±0,05	0,87±0,14
	Leucina	1,00±0,07	1,48±0,14	0,81±0,09	0,89±0,04
	Ornitina	1,00±0,04	0,96±0,07	1,06±0,11	1,09±0,03
	Prolina	1,00±0,12	0,17±0,04	0,37±0,05	0,43±0,09
	Serina	1,00±0,09	0,98±0,10	0,73±0,13	0,78±0,05
	Tirosina	1,00±0,10	0,62±0,07	0,82±0,12	0,93±0,06
	Triptofano	1,00±0,08	0,49±0,04	1,21±0,15	1,14±0,09
	Treonina	1,00±0,04	0,45±0,05	0,96±0,06	0,93±0,03
	Valina	1,00±0,12	0,97±0,15	0,95±0,09	1,09±0,08
	β-Alanina	1,00±0,12	0,50±0,07	0,84±0,11	0,96±0,07
Caule	Ácido aspártico	1,00±0,10	2,98±0,12	1,11±0,06	1,07±0,15
	Ácido glutâmico	1,00±0,08	3,72±0,19	1,07±0,04	1,43±0,09
	Arginina	1,00±0,05	1,98±0,15	0,93±0,10	0,76±0,05
	Asparagina	1,00±0,13	15,94±2,04	1,27±0,11	4,39±0,51
	Fenilalanina	1,00±0,08	3,41±0,24	1,14±0,06	1,24±0,12
	GABA	1,00±0,08	1,18±0,06	1,23±0,10	1,51±0,14
	Glicina	1,00±0,06	0,80±0,10	0,90±0,15	0,92±0,11
	Glutamina	1,00±0,14	18,37±1,92	1,42±0,07	4,97±0,92
	Leucina	1,00±0,09	0,91±0,03	1,12±0,08	0,89±0,06
	Ornitina	1,00±0,04	0,41±0,06	0,86±0,12	1,08±0,03
	Prolina	1,00±0,06	0,24±0,03	1,06±0,15	1,01±0,06
	Serina	1,00±0,09	0,08±0,02	0,62±0,07	0,45±0,07
	Tirosina	1,00±0,05	1,97±0,05	1,04±0,12	0,98±0,07
	Treonina	1,00±0,05	1,82±0,12	0,86±0,05	1,14±0,11
	Valina	1,00±0,05	1,12±0,13	0,95±0,09	1,09±0,08
	β-Alanina	1,00±0,06	0,77±0,13	0,93±0,10	0,76±0,05

Continuação Tabela S2...

Órgão	Metabólito	400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$		750 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$	
		WT	<i>gib-1</i>	WT	<i>gib-1</i>
Raiz	Ácido aspártico	1,00±0,12	1,62±0,07	1,15±0,14	1,06±0,09
	Ácido glutâmico	1,00±0,14	3,27±0,29	1,22±0,10	1,61±0,15
	Asparagina	1,00±0,05	1,98±0,09	1,04±0,06	1,13±0,11
	Fenilalanina	1,00±0,14	3,41±0,27	3,12±0,37	3,64±0,42
	GABA	1,00±0,11	1,23±0,14	1,12±0,07	1,29±0,15
	Glicina	1,00±0,12	1,33±0,10	1,35±0,07	1,66±0,12
	Glutamina	1,00±0,06	2,09±0,13	1,03±0,04	1,12±0,07
	Leucina	1,00±0,04	2,18±0,16	0,92±0,05	0,88±0,07
	Ornitina	1,00±0,09	1,06±0,05	1,01±0,08	0,95±0,12
	Prolina	1,00±0,09	0,98±0,08	1,02±0,18	1,06±0,06
	Serina	1,00±0,10	1,70±0,15	1,11±0,14	1,73±0,08
	Tirosina	1,00±0,05	1,31±0,10	1,32±0,09	1,55±0,04
	Treonina	1,00±0,07	2,14±0,12	0,96±0,10	1,33±0,09
	Valina	1,00±0,07	1,30±0,06	1,07±0,09	1,23±0,11
	β -Alanina	1,00±0,04	1,17±0,06	1,36±0,12	1,81±0,09

Tabela S3. Nível de ácidos orgânicos de plantas de tomate selvagem e mutante *gib-1* sob concentração de CO₂ ambiente (400 µmol mol⁻¹) e elevada (750 µmol mol⁻¹). Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do respectivo controle (WT) em nível de 5 % pelo teste *t*. Os dados são a média de 6 repetições ± erro da média.

Órgão	Metabólito	400 µmol CO ₂ mol ⁻¹		750 µmol CO ₂ mol ⁻¹	
		WT	<i>gib-1</i>	WT	<i>gib-1</i>
Folha	2-OG	1,00±0,10	0,30±0,03	0,65±0,07	0,59±0,04
	Aconitato	1,00±0,04	0,37±0,04	1,14±0,16	0,84±0,11
	Citrato	1,00±0,09	0,70±0,08	1,79±0,06	1,78±0,10
	Fumarato	1,00±0,09	0,08±0,03	0,82±0,05	0,95±0,06
	Isocitrato	1,00±0,08	0,25±0,03	0,91±0,11	0,73±0,12
	Lactato	1,00±0,09	0,95±0,13	0,86±0,04	0,79±0,10
	Malato	1,00±0,07	0,16±0,04	0,82±0,08	0,79±0,06
	Oxalacetato	1,00±0,11	1,08±0,07	0,85±0,06	0,77±0,10
	Pivuvato	1,00±0,11	0,69±0,05	1,04±0,04	1,12±0,09
	Succinato	1,00±0,06	0,24±0,04	1,06±0,12	1,01±0,14
Caule	2-OG	1,00±0,07	1,84±0,33	0,88±0,04	1,18±0,10
	Aconitato	1,00±0,04	0,44±0,06	0,89±0,04	0,92±0,11
	Citrato	1,00±0,08	0,65±0,07	0,93±0,06	1,19±0,05
	Fumarato	1,00±0,09	0,41±0,05	0,92±0,15	0,75±0,10
	Isocitrato	1,00±0,10	0,50±0,07	0,82±0,09	0,91±0,07
	Lactato	1,00±0,03	1,07±0,05	0,84±0,17	1,03±0,08
	Malato	1,00±0,11	0,45±0,04	0,66±0,08	0,63±0,05
	Oxalacetato	1,00±0,10	0,45±0,11	0,95±0,14	0,88±0,09
	Pivuvato	1,00±0,12	1,05±0,09	0,89±0,05	1,14±0,04
	Succinato	1,00±0,08	0,41±0,05	1,17±0,10	0,78±0,12
Raiz	2-OG	1,00±0,12	1,42±0,06	0,92±0,13	0,96±0,11
	Aconitato	1,00±0,14	1,12±0,10	0,84±0,06	1,02±0,16
	Citrato	1,00±0,04	0,97±0,07	1,14±0,10	1,53±0,17
	Fumarato	1,00±0,06	0,56±0,04	1,24±0,14	1,18±0,09
	Isocitrato	1,00±0,06	0,87±0,10	0,93±0,09	1,38±0,10
	Lactato	1,00±0,09	1,15±0,10	1,09±0,12	1,24±0,11
	Malato	1,00±0,08	0,47±0,07	0,65±0,05	0,61±0,08
	Oxalacetato	1,00±0,16	0,42±0,05	0,93±0,08	0,89±0,14
	Pivuvato	1,00±0,05	1,04±0,08	1,14±0,06	0,99±0,11
	Succinato	1,00±0,11	1,06±0,06	1,41±0,09	1,40±0,07