
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

RESPOSTAS DE TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A
EM FOLHAS VERTICAIS DE *STYRAX CAMPORUM* POHL. (STYRACACEAE)
SUBMETIDA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA

ALINE MARIANI FEISTLER

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Março - 2011

ALINE MARIANI FEISTLER

RESPOSTAS DE TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A
EM FOLHAS VERTICAIS DE *STYRAX CAMPORUM* POHL. (STYRACACEAE)
SUBMETIDA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Habermann

Rio Claro

2011

581.1 Feistler, Aline Mariani
F299r Respostas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em folhas verticais de *Styrax camporum* Pohl. (Styracaceae) submetida à deficiência hídrica / Aline Mariani Feistler. - Rio Claro : [s.n.], 2011
51 f. : il., gráfs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Gustavo Habermann

1. Fisiologia vegetal. 2. Ecofisiologia. 3. Fotossíntese. 4. Orientação foliar. 5. Face foliar. 6. Cerrado. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

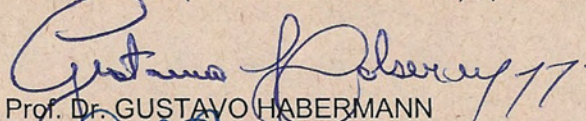
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Respostas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em folhas verticais de *Styrax comporum* Pohl. submetida a deficiência hídrica

AUTORA: ALINE MARIANI FEISTLER

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO HABERMANN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL) , pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUSTAVO HABERMANN

Departamento de Botânica / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro


Prof. Dr. JOSÉ PIRES DE LEMOS FILHO

Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. RAFAEL VASCONCELOS RIBEIRO

Centro de Ecofisiologia e Biofísica, Instituto Agronômico de Campinas

Data da realização: 31 de março de 2011.

Dedico esse trabalho à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Eu acredito que essa é uma parte do trabalho que é muito gostosa de ser feita, afinal, é o reconhecimento de que não é possível fazer um bom trabalho sozinho. É revelar quantas pessoas estiveram envolvidas com esse projeto das mais diferentes formas e colaboraram com ele.

Em primeiro lugar, eu agradeço a Deus pela presença em minha vida e por mais essa oportunidade de crescimento e aprendizado. Eu também agradeço a Ele por estar ao meu lado a cada dia, nos bons momentos e também nos não tão bons assim, me animando e dando forças para sempre seguir em frente.

Agradeço também aos meus pais, Neusa e Otto. Agradeço a minha mãe, aquela com quem mais dividi minha vida ao longo desses dois anos e que sempre esteve presente, sendo companheira até mesmo em algumas das avaliações realizadas de madrugada! Agradeço também ao meu pai pelo interesse por esse projeto e pela companhia nos finais de semana no cuidado com as plantas. Fica aqui registrado que ele também ajudou no trabalho noturno de medições de potencial hídrico! Obrigada por todo o amor e apoio em mais essa etapa da minha vida.

Agradeço também ao Professor Dr. Gustavo Habermann pela orientação nesses dois anos. Deixo aqui também meu obrigado aos pesquisadores Dr. Eduardo Caruso Machado e Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro pela boa vontade ao permitir que toda a parte prática desse trabalho fosse realizada no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

Esse trabalho também, sem dúvida, não seria o mesmo sem a presença de Severino Silva Nogueira, funcionário do Centro Experimental Central do IAC e grande “ajudador” de todos os alunos que passam por lá, estagiários e pós-graduandos. Obrigada pelo apoio em todos os momentos, pela ajuda em cada situação difícil, pelas idéias, conversas e, claro, pelos saborosos chás de melissa e erva-doce!

Deixo aqui também meus agradecimentos a amigos e colegas, alunos do IAC, com quem convivi ao longo do mestrado: José Rodrigues Magalhães Filho, Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori, Leandro da Silva, Carlos Marcos Alves dos Santos, Ricardo Silverio Machado, Daniela Fávero São Pedro Machado, Verônica Lorena DAVIS, Fernanda Keila Junqueira Vilela, Gilberto Freitas, Ana Carolina Rosa Bueno, Cristina Rodrigues Gabriel Sales e

Danielle Araújo Prudente. Agradeço especialmente ao Leandro, ao Paulo e ao Zé por toda a ajuda e companhia durante a realização dos experimentos.

Bem, como aluna da UNESP - Rio Claro, não poderia deixar de lembrar os amigos e colegas unespianos! Obrigada por todos os bons momentos, pelas conversas e risadas no departamento, na cantina e em disciplinas que cursamos juntos. Fica aqui o reconhecimento da importância de cada um, mas especialmente de Guilherme Garcia Roberto, Henrique Hespanhol Tozzi, Paulo Roberto de Moura Souza Filho, Natália Costa Soares, Camila Kissmann, Mayra Teruya Eichenberg, Shirley Martins, Ítalo Macedo Silva, Eliana Ramos, Luis Alberti e Leonardo Biral dos Santos.

Agradeço também ao Professor Dr. Reinaldo Monteiro (UNESP) e aos pesquisadores Dra. Maria do Carmo de Salvo Soares Novo (IAC) e Dr. Robert Deuber (IAC) pela convivência e pelas conversas!

Agradeço também aos muitos professores que tive ao longo de minha vida. Apesar de alguns terem me marcado mais do que outros, todos contribuíram de alguma maneira com a minha formação e agradeço por tudo o que me ensinaram!

Obrigada também ao Centro Infantil Boldrini, onde trabalho como voluntária e tenho aprendido tantas coisas e conhecido pessoas tão bonitas! Obrigada às minhas coordenadoras, Nina Mazzon e Claudia Lisboa, e a todos os colegas voluntários, especialmente às “amigas das sextas de manhã”: Sandra Regina de Freitas, Marta Maria Bedotti e Maria Cristina Sims. Todos vocês fazem parte de uma atividade muito gratificante para mim e que sem dúvida tem contribuído bastante para minha formação como pessoa e profissional!

Não posso deixar de agradecer também ao Instituto de Biociências da UNESP – Rio Claro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal) pela infraestrutura e pelo apoio institucional; e ao Instituto Agrônomo de Campinas, onde todos os experimentos foram realizados. Além disso, agradeço também a FAPESP pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2009/04007-4).

Também é imprescindível agradecer a cada planta utilizada nos experimentos!

Obrigada!!

Would you believe me if I said that we are the ones who can make the change in the world today?

Would you believe me if I said that all of the dreams in your heart can come true today?

Would you believe me if I said that life can be all that you want it to be today?

(Free – Hillsong United)

RESUMO GERAL

As folhas são órgãos adaptados para a captação de energia luminosa e sua transformação em energia bioquímica. Entretanto, a irradiância interceptada pelas folhas é maior do que a irradiância que é de fato absorvida e aproveitada de forma eficiente, o que torna os mecanismos de fotoproteção essenciais. Esses mecanismos podem minimizar a absorção da irradiância ou ativar respostas metabólicas responsáveis pela proteção do sistema fotoquímico. *Styrax camporum* é uma espécie com ampla distribuição no cerrado *sensu lato*. Suas folhas possuem orientação horizontal ou vertical, mas também podem apresentar ângulos intermediários. Com a finalidade de observar a influência que a orientação foliar exerce sobre o desempenho fotossintético, foram avaliadas as curvas das taxas fotossintéticas em resposta ao aumento da disponibilidade de luz para ambas as faces (adaxial e abaxial) de folhas horizontais e verticais. Além disso, foi realizado um experimento de deficiência hídrica no qual as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a* e as relações hídricas foram acompanhadas em ambas as faces dos dois tipos foliares. Os resultados mostraram que, em *S. camporum*, a orientação vertical de parte das folhas não está relacionada à fotoproteção estrutural e que, nessa espécie, o posicionamento vertical das folhas poderia estar relacionado à otimização da assimilação de CO₂ em decorrência da potencial exposição de ambas as faces foliares à radiação direta.

Palavras-chave: Fisiologia vegetal. Ecofisiologia. Fotossíntese. Orientação foliar. Face foliar. Cerrado.

ABSTRACT

Leaves are organs adapted to sunlight interception and conversion of light energy into biochemical energy. However, the irradiance that is intercepted by leaves is greater than the absorbed irradiance that is effectively used in photosynthesis, making photoprotective mechanisms essential. Such mechanisms may reduce the amount of absorbed irradiance or may activate metabolic activities that are responsible for protecting the photochemical system. *Styrax camporum* is a woody species that is widely distributed in the cerrado *sensu lato* areas. *S. camporum* leaves show horizontal or vertical orientation, but they may also have intermediate angles. We investigated whether the leaf angles of *S. camporum* have any influence on photosynthetic performance. Photosynthetic response curves in response to increasing light were measured on both surfaces (adaxial and abaxial) of horizontal and vertical leaves. In addition, a water deficiency experiment was performed. In this experiment, gas exchange rates, chlorophyll *a* fluorescence and plant water relations values were also monitored on both surfaces of both leaf types. Results showed that, in *S. camporum*, vertical leaf orientation is not related to structural photoprotection and that, in this species, such leaf orientation could be related to the optimization of CO₂ assimilation since both leaf surfaces are potentially exposed to direct sunlight.

Keywords: Plant physiology. Ecophysiology. Photosynthesis. Leaf orientation. Leaf surface. Brazilian savanna.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	10
Heliotropismo	11
Orientação Foliar	12
<i>Styrax camporum</i> Pohl.	13
OBJETIVOS	16
Objetivos gerais	16
Objetivos específicos	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
Capítulo 1 Vertical leaf orientation of <i>Styrax camporum</i> Pohl. is not related to structural photoprotection when under drought conditions	
Abstract	22
Resumo	23
Introduction	24
Material and Methods	25
Results	27
Discussion	34
Acknowledgements	37
References	38
ANEXOS	41
Anexo A - Fotos do experimento	42

INTRODUÇÃO GERAL

As folhas são órgãos vegetais adaptados para a captação de energia luminosa e sua transformação em energia bioquímica. Essa energia bioquímica é inicialmente armazenada nas ligações químicas de duas moléculas: NADPH e ATP, formadas ao final do transporte eletrônico, primeira etapa da fotossíntese (TAIZ & ZEIGER, 2009). Entretanto, as plantas vivenciam situações nas quais a quantidade de luz absorvida é maior do que aquela que podem metabolizar de forma eficiente (LONG et al., 1994). Assim, tendo em vista que essa energia excedente pode causar danos ao aparato fotossintético (EDREVA, 2005), é necessário que ela seja dissipada. Se a planta consegue metabolizar esse excesso energético de forma eficiente, danos não ocorrem ou são minimizados. Entretanto, se isso não é possível, ocorre a fotoinibição.

A fotoinibição causa uma redução do desempenho fotossintético (LONG et al., 1994) e resulta da quantidade de luz que é absorvida além da capacidade fotossintética (DEMMIG-ADAMS & ADAMS, 1992). Dessa forma, qualquer fator ambiental que limite a assimilação de CO₂, como o fechamento estomático em resposta ao déficit hídrico do solo e/ou da atmosfera (alto déficit de pressão de vapor, DPV), resulta em um excesso de fótons absorvidos (DEMMIG-ADAMS & ADAMS, 1992; PASTENES et al., 2005). Como consequência, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os superóxidos (O₂⁻) e o oxigênio singlete (O₂^{*}), que prejudicam a estrutura e a funcionalidade dos cloroplastos (EDREVA, 2005).

Assim, mecanismos de fotoproteção que minimizem a absorção de fótons ou que permitam que a planta metabolize seu excesso de forma eficiente são essenciais. Entre aqueles que reduzem a captação de energia estão o reposicionamento dos cloroplastos (KASAHARA et al., 2002), a perda de clorofila (MUNNÉ-BOSCH & ALEGRE, 2000), o paraheliotropismo (PASTENES et al., 2005) e a orientação vertical estacionária das folhas (WERNER et al., 1999). Por outro lado, o ciclo das xantofilas contribui para dissipar, em forma de calor, o excesso de energia que já foi absorvido (DEMMIG-ADAMS & ADAMS, 1992). Esse excesso de energia também pode ser dissipado através de drenos alternativos de elétrons para os ciclos do nitrogênio (CHAPIM III et al., 1987) e do enxofre (LEUSTEK & SAITO, 1999) e para a reação de Mehler, associada à atividade de enzimas que eliminam as EROs (JAHNKE et al., 1991; EDREVA, 2005). Além disso, também pode ocorrer o transporte

cíclico de elétrons através do fotossistema I (PSI) (HEBER, 2002) e, em plantas C3, a fotorrespiração (FRANCO & LÜTTGE, 2002).

Heliotropismo

O ajuste do posicionamento de folhas e flores em relação à direção dos raios solares é denominado heliotropismo. O heliotropismo divide-se em dois tipos: para- e diaheliotropismo. Folhas paraheliótropicas posicionam-se paralelamente aos raios solares, enquanto as diaheliotrópicas posicionam-se perpendicularmente a eles (EHLERINGER & FORSETH, 1980), minimizando e maximizando a incidência da irradiância, respectivamente.

Na maioria das espécies, o pulvino é reconhecido como a região responsável pela movimentação foliar, que ocorre em consequência de alterações na pressão de turgor de células motoras nele localizadas (KOLLER, 1990). A existência de pressões de turgor distintas em células localizadas em lados opostos dessa estrutura é a responsável pela mudança de orientação da lâmina (SHERIFF & LUDLOW, 1985). Entretanto, em alguns casos, a orientação foliar é controlada também por pequenas mudanças mecânicas ao longo do comprimento do pecíolo (VOGELMANN & BJÖRN, 1983; SHERIFF & LUDLOW, 1985).

Sabe-se que maiores amplitudes de movimentação são obtidas quando a luz incide obliquamente sobre a superfície da folha ou do pulvino (VOGELMANN & BJÖRN, 1983). Essa movimentação é induzida pela radiação com comprimento de onda na região azul do espectro (VOGELMANN & BJÖRN, 1983; SHERIFF & LUDLOW, 1985), que é percebida por fotorreceptores cuja localização varia entre as diferentes famílias. Enquanto nas leguminosas esses fotorreceptores estão localizados no pulvino, em outras espécies eles estão na lâmina foliar, sendo o sinal transmitido até o órgão que realiza a movimentação (KOLLER, 1990).

Os movimentos heliotrópicos estão presentes em diversas famílias, como Leguminosae, Malvaceae, Araceae, Begoniaceae, Oxalidaceae, Euphorbiaceae e Capparidaceae (KOLLER, 1990). Por propiciar uma maior captação de fótons pelas folhas, o diaheliotropismo é vantajoso especialmente pela manhã porque permite que a temperatura fotossintética ótima seja alcançada quando a temperatura e o DPV do ar são baixos (KOLLER, 1990; PASTENES et al., 2005).

Já o paraheliotropismo favorece uma menor interceptação de luz pela lâmina foliar (FORSETH & EHLERINGER, 1980). Essa movimentação da folha é induzida por fatores

como aumento da temperatura foliar (FU & EHLERINGER, 1991), irradiância excessiva (FU & EHLERINGER, 1991) e deficiência hídrica no solo (FORSETH & EHLERINGER, 1980; KOLLER, 1990; PASTENES et al., 2005), sendo observada especialmente em horários próximos ao meio-dia (PASTENES et al., 2005). A menor exposição da folha à radiação reduz a perda de água por transpiração (FORSETH & EHLERINGER, 1982) e diminui o superaquecimento foliar (PASTENES et al., 2005), mantendo sua temperatura próxima do ótimo fotossintético (FU & EHLERINGER, 1989). Além disso, a menor exposição da folha a irradiância a protege contra a fotoinibição (GAMON & PEARCY, 1989; KAO & FORSETH, 1992; PASTENES et al., 2005; ARENA, 2008).

Esse efeito da fotoinibição sobre o acúmulo de biomassa é de particular interesse para espécies cultivadas porque pode gerar produção menor do que aquela potencial para determinada cultura. Dessa forma, estudos sobre as respostas ecofisiológicas ao heliotropismo tem sido realizados especialmente com espécies cultivadas, como o feijão (BIELENBERG et al., 2003; PASTENES et al., 2005) e a soja (KAO & FORSETH, 1992; JIANG et al., 2006).

Em espécies nativas brasileiras, as conseqüências ecofisiológicas do heliotropismo parecem ser conhecidas apenas na leguminosa *Pterodon pubescens* Benth. (CALDAS et al., 1997), ocorrente no Cerrado. Por ser um bioma onde predominam as formações abertas, sem dossel contínuo, e estar situado na região tropical, muitas de suas espécies estão sujeitas a baixa disponibilidade hídrica do solo e da atmosfera (alto DPV) durante a estação seca e a estresses térmicos (temperaturas elevadas) e foto oxidativos, que podem ocorrer concomitantemente. Em *Pterodon pubescens*, o movimento paraheliotrópico das folhas em resposta a elevada incidência de fótons permitiu alta atividade fotoquímica apesar da menor irradiância a que estavam expostas (CALDAS et al., 1997).

Orientação foliar

Outra estratégia de fotoproteção estrutural utilizada por diferentes espécies vegetais com o objetivo de equilibrar a absorção da energia luminosa com a capacidade fotossintética é a orientação vertical das folhas. A orientação foliar interfere diretamente tanto na quantidade total de luz que é interceptada ao longo do dia quanto nos períodos em que a exposição à radiação é elevada. Assim, enquanto folhas horizontais estão mais expostas à radiação especialmente em torno do meio-dia, quando a temperatura e o DPV do ar são altos, a

exposição das folhas verticais é maior no meio da manhã e no final da tarde, quando as condições ambientais são mais amenas (JURIK et al., 1990; LIU et al., 2003).

Estudos sobre a influência da orientação foliar sobre o desempenho fotossintético constataram que folhas verticais geralmente atuam de forma a minimizar a captação de luz em horários próximos ao meio-dia e, dessa forma, reduzem a ocorrência de superaquecimento e fotoinibição (WERNER et al., 1999; LIU et al., 2003). Além disso, avaliações que consideraram a arquitetura da copa de diferentes espécies com o objetivo de verificar sua influência sobre a produtividade vegetal também apontam para uma função fotoprotetora das folhas com ângulos mais acentuados (VALLADARES & PUGNAIRE, 1999; FALSTER & WESTOBY, 2003). De fato, a maior ocorrência de plantas cujas folhas possuem orientação vertical em ambientes onde a luminosidade é alta e a precipitação é baixa ilustra a importância da orientação vertical como estratégia de proteção contra danos foto oxidativos (EHLERINGER, 1988; SMITH et al., 1998).

Entretanto, em algumas situações específicas, folhas verticais não estão relacionadas à fotoproteção. Verificou-se que folhas verticais que tem suas superfícies voltadas para o leste e o oeste assimilam tanto carbono quanto as folhas horizontais e, ainda, possuem maior eficiência de uso da água (JURIK et al., 1990). Além disso, em populações estabelecidas em regiões de altas latitudes, nas quais o sol faz um caminho mais baixo no céu, folhas verticais podem interceptar mais radiação e, dessa maneira, apresentar maior fixação diária de CO₂ do que folhas horizontais (KING, 1997).

***Styrax camporum* Pohl.**

Styrax camporum Pohl. é uma espécie arbustiva ocorrente, no Brasil, predominantemente no Cerrado (NAKAJIMA & MONTEIRO, 1986). Foi descrito que suas folhas, apesar de não possuírem pulvino morfológicamente delimitado, apresentam tanto diaquanto paraheliotropismo (MACHADO, 1991). Ela é uma espécie hipoestomática (HABERMANN et al., 2008) e, ao acompanhar a performance fotossintética de folhas dia- e paraheliotrópicas ao longo do dia, HABERMANN et al. (2008) observaram que as folhas paraheliotrópicas iluminadas em ambas as faces tem maiores taxas de assimilação de CO₂ (*A*) e de transpiração (*E*) e maior condutância estomática (*gs*) em comparação às folhas diaheliotrópicas. Nesse trabalho, os autores também mostraram que as folhas diaheliotrópicas de *S. camporum* não assimilaram menos carbono por causa de estômatos mais fechados;

ambos os tipos foliares atingiram abertura estomática satisfatória e a mesma zona de resposta de g_s resultou em concentrações similares de CO_2 intercelular (C_i). Folhas paraheliotrópicas tiveram maior A sob irradiância elevada, sugerindo evitação da carga excessiva de irradiância, apesar do desempenho fotoquímico não ter sido medido. Contudo, em ambos os tipos de folhas, Habermann et al. (2008) notaram parênquima esponjoso compacto, sugerindo maior capacidade fotossintética por unidade de área foliar, o que poderia explicar as maiores taxas de assimilação de carbono observadas nas folhas paraheliotrópicas em relação às diaheliotrópicas.

Assim, levando em consideração os resultados de Habermann et al. (2008), o objetivo inicial do presente estudo foi investigar se as folhas paraheliotrópicas de *S. camporum* apresentam maiores taxas de assimilação de CO_2 devido (i) à menor interceptação de irradiância ou (ii) se essa diferença decorre da presença de parênquima esponjoso compacto, que permitiria que ambas as faces foliares contribuam significativamente para a fotossíntese. Além disso, o estudo também se propôs a investigar se o posicionamento paraheliotrópico atenuaria o efeito do estresse hídrico.

Entretanto, durante a realização do trabalho, verificou-se que as diferentes orientações foliares encontradas em folhas maduras de *S. camporum* não estão relacionadas ao fenômeno do heliotropismo. Ao acompanhar a posição das folhas de mudas de aproximadamente oito meses de idade ao longo do dia, observou-se que apenas parte das folhas jovens apresenta heliotropismo, resposta essa que é perdida com a maturação do órgão, sendo as folhas maduras estacionárias.

Dessa forma, visto que as avaliações do presente estudo foram realizadas apenas em folhas maduras (horizontais e verticais) com a finalidade de eliminar o efeito de possíveis variações ontogenéticas sobre as variáveis fotossintéticas (SOBRADO, 1996), o tema desse estudo passou a ser a orientação *estacionária* de folhas de *S. camporum*. Assim, folhas antes denominadas dia- e paraheliotrópicas passaram a ser chamadas horizontais e verticais, respectivamente. Entretanto, tendo em vista que o posicionamento vertical estacionário das folhas, assim como o paraheliotropismo, é considerado uma estratégia de fotoproteção estrutural (EHLERINGER, 1988; VALLADARES & PUGNAIRE, 1999; LIU et al., 2003) e que os dados de Habermann et al. (2008) também foram medidos em folhas estacionárias e podem, dessa forma, ser utilizados como base para o presente trabalho, os objetivos do trabalho foram mantidos, com as devidas alterações de nomenclatura.

Essa dissertação é apresentada em um único capítulo, intitulado “*Vertical leaf orientation of Styraax camporum Pohl. is not related to structural photoprotection when under*

drought conditions” e no qual são apresentadas e discutidas as respostas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* medidas com luz artificial em ambas as faces de folhas horizontais e verticais de *S. camporum* ao longo de um experimento de deficiência hídrica; também foram avaliadas e comparadas as relações hídricas de ambos os tipos de folhas ao longo do tratamento hídrico. Em anexo (Anexo A), é apresentada uma foto (Figura 1) do local onde foi realizado o estudo, no Centro de Ecofisiologia e Biofísica, no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC); e uma segunda foto na qual é possível observar folhas com diferentes orientações num ramo de uma planta de *S. camporum* (Figura 2).

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Considerando que a orientação foliar interfere diretamente na quantidade de radiação que é absorvida pelas folhas e, dessa forma, afeta diretamente o desempenho fotossintético, o objetivo do presente trabalho foi estudar as consequências de diferentes orientações foliares (horizontal e vertical) sobre parâmetros fotossintéticos e de relações hídricas em *Styrax camporum*, uma espécie que, no Brasil, ocorre predominantemente no Cerrado.

Objetivos Específicos

- Medir e analisar as curvas de resposta à luz para ambas as faces (adaxial e abaxial) de folhas horizontais e verticais de *S. camporum* [essas curvas foram publicadas no trabalho de Habermann et al. (2011) Environ. Exp. Bot. 71: 10];

- Verificar se o posicionamento vertical das folhas de *S. camporum* tem função fotoprotetora em situação de estresse hídrico;

- Investigar se, em plantas irrigadas, a face adaxial apresenta desempenho fotossintético maior, menor ou similar àquele da face abaxial em cada tipo de folha (horizontal e vertical);

- Testar as seguintes hipóteses:

a) Em situação de estresse hídrico, folhas verticais não apresentam maior desempenho fotoquímico do que folhas horizontais;

b) Em folhas verticais e horizontais de *S. camporum*, as respostas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* dependem da face (adaxial ou abaxial) que é iluminada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ARENA, C.; VITALE, L.; VIRZO DE SANTO, A. Paraheliotropism in *Robinia pseudoacacia* L.: an efficient strategy to optimize photosynthetic performance under natural environmental conditions. **Plant Biology**, v.10, p. 194-201, 2008.

BIELENBERG, D.G.; MILLER, J.D.; BERG, V.S. Paraheliotropism in two Phaseolus species: combined effects of photon flux density and pulvinus temperature, and consequences for leaf gas exchange. **Environmental and Experimental Botany**, v.49, p. 95-105, 2003.

CALDAS, L.S.; LÜTTGE, U.; FRANCO, A.C.; HARIDASAN, M. Leaf heliotropism in *Pterodon pubescens*, a woody legume from the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p. 1-7. 1997.

CHAPIN III, F.S.; BLOOM, A.J.; FIELD, C.B.; WARING, R.H. Plant responses to multiple environmental factors. **BioScience**, v.37, p. 49-57. 1987.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p. 599-626. 1992.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.106, p. 119-133. 2005.

EHLERINGER, J.R. Changes in leaf characteristics of species along elevational gradients in the Wasatch Front, Utah. **American Journal of Botany**, v.75, p. 680-689. 1988.

EHLERINGER, J.; FORSETH, I. Solar tracking by plants. **Science**, v.210, p. 1094-1098. 1980.

FALSTER, D.S.; WESTOBY, M. Leaf size and angle vary widely across species: what consequences for light interception? **New Phytologist**, v. 158, p. 509-525. 2003.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

FORSETH, I.N.; EHLERINGER, J.R. Solar tracking response to drought in a desert annual. **Oecologia**, v.44, p. 159-163. 1980.

FORSETH, I.N.; EHLERINGER, J.R. Ecophysiology of two solar tracking desert winter annuals. II. Leaf movements, water relations and microclimate. **Oecologia**, v.54, p. 41-49. 1982.

FRANCO, A.C.; LÜTTGE, U. Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. **Oecologia**, v.131, p. 356-365. 2002.

FU, Q.A.; EHLERINGER, J.R. Heliotropic leaf movements in common beans controlled by air temperature. **Plant Physiology**, v.91, p. 1162-1167. 1989.

FU, Q.A.; EHLERINGER, J.R. Modification of paraheliotropic leaf movement in *Phaseolus vulgaris* by photon flux density. **Plant, Cell and Environment**, v. 14, p. 339-343. 1991.

GAMON, J.A.; PEARCY, R.W. Leaf movement, stress avoidance and photosynthesis in *Vitis californica*. **Oecologia**, v.79, p. 475-481. 1989.

HABERMANN, G; MACHADO, S.R.; GUIMARÃES, V.F.; RODRIGUES, J.D. Leaf heliotropism in *Styrax camporum* Pohl from the Brazilian Cerrado – distinct gas exchange and leaf structure, but similar leaf temperature and water relations. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p. 71-83. 2008.

HEBER, U. Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. **Photosynthesis Research**, v.73, p. 223-231. 2002.

JAHNKE, L.S.; HULL, M.R.; LONG, S.P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. **Plant, Cell and Environment**, v.14, p. 97-104. 1991.

JIANG, C-D; GAO, H-Y; ZOU, Q.; JIANG, G-M; LI, L-H. Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 87-96. 2006.

JURIK, T.W.; ZHANG, H.; PLEASANTS, J.M. Ecophysiological consequences of non-random leaf orientation in the prairie compass plant, *Silphium laciniatum*. **Oecologia**, v.82, p. 180-186. 1990.

KAO, W.-Y.; FORSETH, I.N. Diurnal leaf movement, chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in soybean grown under different nitrogen and water availabilities. **Plant, Cell and Environment**, v.12, p. 703-710. 1992.

KASAHARA, M.; KAGAWA, T.; OIKAWA, K.; SUETSUGU, N.; MIYAO, M.; WADA, M. Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. **Nature**, v.420, p. 829-832. 2002.

KING, D.A. The functional significance of leaf angle in *Eucalyptus*. **Australian Journal of Botany**, v.45, p. 619-639. 1997.

KOLLER, D. Light-driven leaf movements. **Plant, Cell and Environment**, v.13, p. 615-632. 1990.

LEUSTEK, T.; SAITO, K. Sulfate transport and assimilation in plants. **Plant Physiology**, v.120, p. 637-643. 1999.

LIU, L-X.; XU, S-M.; WOO, K.C. Influence of leaf angle on photosynthesis and the xanthophyll cycle in the tropical tree species *Acacia crassicaarpa*. **Tree Physiology**, v.23, p. 1255-1261. 2003.

LONG, S.P.; HUMPRIES, S.; FALKOWSKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p. 633-62. 1994.

MACHADO, S.R. **Morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos de *Styrax camporum* Pohl. (Styracaceae) em desenvolvimento.** São Paulo, 1991, 324p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. **Planta**, v.210, p. 925-931. 2000.

NAKAJIMA, J.N.; MONTEIRO, R. Estudos fitogeográficos com espécies de *Styrax* L. (Styracaceae) dos cerrados brasileiros. **Eugeniana**, v.12, p. 3-10, 1986.

PASTENES, C.; PIMENTEL, P.; LILLO, J. Leaf movements and photoinhibition in relation to water stress in field-grown beans. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p. 425-433. 2005.

SHERIFF, D.W.; LUDLOW, M.M. Diaheliotropic responses of leaves of *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.12, p. 151-171. 1985.

SMITH, W.K.; BELL, D.T.; SHEPHERD, K.A. Associations between leaf structure, orientation, and sunlight exposure in five western Australian communities. **American Journal of Botany**, v.85, p. 56-63. 1998.

SOBRADO, M.A. Leaf photosynthesis and water loss as influenced by leaf age and seasonal drought in an evergreen tree. **Photosynthetica**, v.32, p. 563-568. 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

VALLADARES, F.; PUGNAIRE, F.I. Tradeoffs between irradiance capture and avoidance in semi-arid environments assessed with a crown architecture model. **Annals of Botany**, v.83, p. 459-469. 1999.

VOGELMANN, TC; BJÖRN, LO. Response to directional light by leaves of a sun-tracking lupine (*Lupinus succulentus*). **Physiologia Plantarum**, v.59, p. 533-538. 1983.

WERNER, C.; CORREIA, O.; BEYSCHLAG, W. Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. **Acta Oecologica**, v.20, p. 15-23. 1999.

CAPÍTULO 1

Vertical leaf orientation of *Styrax camporum* Pohl. is not related to structural photoprotection when under drought conditions

Aline Mariani Feistler¹, Leandro da Silva², Gustavo Habermann¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Av. 24-A, 1515, Rio Claro-SP, 13506-900, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Av. Barão de Itapura, 1481, Campinas-SP, 13012-970, Brazil.

ABSTRACT

Vertical leaf orientation is considered a structural photoprotective mechanism, which helps to decrease the amount of sunlight interception and reduces the risk of overheating and photoinhibition. However, a previous study with the species *Styrax camporum* demonstrated that vertical leaf orientation could be related to the optimization of CO₂ assimilation. To test the hypothesis that vertical leaf orientation is not related to structural photoprotection in *S. camporum*, a water deficiency (WD) study was conducted. Gas exchange rates and chlorophyll *a* fluorescence were monitored in naturally oriented vertical and horizontal leaves, under adaxial or abaxial artificial illumination. The two main questions of interest were: 1) Does vertical leaf orientation protect the photosynthetic apparatus of *S. camporum* under water-stressful conditions? 2) Do adaxial and abaxial leaf surfaces of vertical and horizontal leaves demonstrate different photosynthetic capacities under non-water stressful conditions? Similar gas exchange rates and chlorophyll *a* fluorescence values were found between horizontal and vertical leaves throughout the WD experiment. WD reduced CO₂ assimilation rates on both leaf surfaces of both leaf types, but the effective quantum yield of PSII ($\Delta F/F_m'$) and the apparent electron transport rate (*ETR*) were reduced only on the adaxial surface. WD increased the relative excessive PPFD on the adaxial surface of both leaf types. The maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m) was not reduced by WD even on the day of maximum stress. We concluded that vertical leaf orientation in *S. camporum* is not related to structural photoprotection when under drought conditions. Evidences towards the optimization of CO₂ assimilation in vertical leaves were discussed as well.

Keywords: Photosynthesis. Gas Exchange. Chlorophyll fluorescence. Leaf surface. Brazilian savanna.

RESUMO

A orientação vertical das folhas é considerada uma estratégia de fotoproteção estrutural que reduz a absorção de irradiância, minimizando os riscos de superaquecimento e de fotoinibição. Entretanto, um estudo anterior com a espécie *Styrax camporum* mostrou que suas folhas verticais poderiam estar relacionadas à otimização da assimilação de CO₂. Para testar a hipótese de que a orientação vertical de parte das folhas de *S. camporum* não atua como um mecanismo de fotoproteção estrutural, foi realizado um experimento de deficiência hídrica (DH) no qual as taxas de trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* foram acompanhadas em folhas naturalmente horizontais e verticais, sob iluminação adaxial ou abaxial. As duas perguntas de interesse do estudo foram: 1) A orientação vertical ajuda a proteger o aparato fotossintético de *S. camporum* em situação de estresse hídrico? 2) As faces adaxial e abaxial, em folhas horizontais e verticais, mostram capacidade fotossintética distinta entre si em plantas que não enfrentam estresse hídrico? Foram observados valores similares de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* entre os dois tipos foliares ao longo do tratamento hídrico. A DH reduziu a assimilação de CO₂ em ambas as faces dos dois tipos de folhas, mas a eficiência quântica efetiva do PSII ($\Delta F/F_m'$) e a taxa aparente de transporte de elétrons (*ETR*) foram reduzidas apenas na face adaxial. A DH causou aumento do excesso relativo de DFFFA na face adaxial dos dois tipos de folhas, mas não diminuiu a eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) mesmo no dia do estresse máximo. Nós concluímos que a orientação vertical de parte das folhas de *S. camporum* não está relacionada à fotoproteção estrutural em situação de estresse hídrico. Evidências que sugerem a otimização da assimilação de CO₂ em folhas verticais também foram discutidas.

Palavras-chave: Fotossíntese. Trocas gasosas. Fluorescência da clorofila *a*. Face foliar. Cerrado.

INTRODUCTION

High-irradiance stress is a common situation in nature and plants have evolved physiological, anatomical and morphological strategies to avoid oxidative damage (LONG et al., 1994). Vertical leaf orientation is recognized as a structural photoprotective strategy because it reduces excessive light interception (VALLADARES & PUGNAIRE, 1999; WERNER et al., 1999; LIU et al., 2003), preventing an unbalance between the production and scavenging of reactive oxygen species (ROS), which can damage molecules in the chloroplasts (EDREVA, 2005). In comparison to horizontal leaves, vertical leaves show lower risks of overheating and photoinhibition. In addition, they exhibit reduced costs with biochemical photoprotective mechanisms such as the xanthophyll cycle (LIU et al., 2003).

The importance of vertical leaf orientation in avoiding or minimizing oxidative damage is evidenced by the steepest leaf angles that are observed in dry environments (EHLERINGER, 1988; SMITH et al., 1998). In environments subjected to seasonal drought, reducing excessive light absorption is particularly important because a reduced stomatal conductance (g_s) can limit CO₂ diffusion to the carboxylation sites, which may favor the overproduction of ROS (EDREVA, 2005).

In Brazil, *Styrax camporum* is predominantly distributed in the Cerrado, or Brazilian savanna (NAKAJIMA & MONTEIRO, 1986). The Cerrado is subjected to a hot and rainy season from October to March, and to a dry season from April to September, when plants may also face high irradiance. *Styrax camporum* has vertical, horizontal and intermediate angled leaves in relation to the horizon. It has been described that some of its leaves show heliotropic movements (MACHADO, 1991). Previous studies (HABERMANN et al., 2008; HABERMANN et al., 2011) that evaluated mature leaves of *S. camporum* referred to its horizontal and vertical leaves as dia- and paraheliotropic, respectively. However, leaf movement is observed only in immature leaves.

Habermann et al. (2008) found higher CO₂ assimilation rates (A), stomatal conductance (g_s), and transpiration rates (E) in vertical leaves when compared to horizontal leaves of unstressed plants, when both leaf surfaces were simultaneously illuminated with natural light. However, the higher g_s of the vertical leaves did not explain the elevated A , nor did it influence intercellular CO₂ concentration (C_i). Additionally, vertical leaf orientation was not related to lower leaf temperatures. Even though a low interception of irradiance preventing photoinhibition could have accounted for the higher photosynthetic performance of vertical over horizontal leaves in *S. camporum*, an alternative hypothesis was raised for this

finding. Habermann et al. (2008) argued that the compact spongy parenchyma observed in both leaf types could have allowed the abaxial surface to significantly cooperate with CO₂ assimilation in vertical leaves, since their abaxial surface is frequently exposed to direct sunlight. In a subsequent study, Habermann et al. (2011) observed that differences in gas exchange rates between horizontal and vertical oriented leaves were mainly observed when both leaf sides were illuminated.

The present study aimed to acquire further knowledge regarding the role of vertical leaf orientation in *S. camporum*. A water deficiency experiment was performed and gas exchange rates and chlorophyll *a* fluorescence were measured in vertical and horizontal oriented leaves, when illuminated on the adaxial or the abaxial leaf surface. The two main questions of interest were: 1) Does vertical orientation protect the photosynthetic apparatus of *S. camporum* under water-stressful conditions? 2) Do adaxial and abaxial leaf surfaces of vertical and horizontal leaves demonstrate different photosynthetic capacities under non-water stressful conditions? In addition, we discuss whether vertical leaf orientation of *S. camporum* represents a strategy to face drought and sunlight excess, which frequently and concomitantly occur during the dry season in the Cerrado or if vertical leaf orientation in this species could be related to the optimization of CO₂ assimilation by the exposure of both leaf surfaces to direct sunlight.

MATERIAL AND METHODS

Plant material:

Young *S. camporum* plants were cultivated in pots (100 L) containing a 3:2:1 mixture of oxisoil:sand:organic substrate (Plantmax, Eucatex®, Paulínia, São Paulo, Brazil). The plants were irrigated monthly with a nutritive solution containing 20 mg L⁻¹ of Al³⁺, according to Furlani & Furlani (1988). When the water deficiency experiment began, plants were approximately 15 months old and 1 m high.

Experimental description and study site:

The study was carried out from August to October 2009 at the Experimental Center of the Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), located in Campinas, São Paulo State, Brazil (22°54' S, 47°05'W). Plants were randomly separated into irrigated plants (five individuals under daily irrigation regime) and a group of five plants submitted to water deficiency (WD),

which was applied by water withholding. A circular plastic canvas cut from the edge to its center was placed around the main stem and over the soil, and it was fixed with rubber bands around the pot opening of WD plants. This efficiently prevented increases in water availability due to rain.

The duration of water withholding and the evaluation dates were determined by the stomatal conductance (g_s) and the leaf water potential (Ψ_w) of WD plants. Measurements of Ψ_w before sunrise (predawn, Ψ_{pd}) and when vapor pressure deficit (VPD) was maximum (midday, Ψ_{md}) were made on August 29th (1st day after water withholding), September 3rd (6th day) and 16th (19th day) and October 2nd (35th day) and 4th (37th day). Measurements of leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence were performed on the first day after WD was imposed (August 29th; Beginning), on the day of maximum stress (October 2nd; MS), when g_s values approached zero and the lowest Ψ_w values were observed, and two days after plants were rewatered (October 4th; REC).

Gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence data were measured on the adaxial and abaxial surfaces of horizontal and vertical leaves of *S. camporum* irrigated and WD plants in the morning period (8:30 h – 10:30 h) of sunny days.

Gas exchange was measured with an open-gas portable infrared analyzer (LI-6400, LI-COR, Lincoln, NE, USA). The CO₂ assimilation (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and transpiration (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) rates, and stomatal conductance (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were calculated by the LI-6400 data analysis program. The leaf temperature (T_{leaf} , °C) was assessed by a thermocouple inside the LI-6400 leaf cuvette. Water use efficiency (WUE , A/E , $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) was calculated according to Berry & Downton (1982). The photosynthetic photon flux density (PPFD) was provided by an artificial red–blue light emitting diode (LED) light source (6400–02B, LI-COR, Lincoln, NE, USA) inside the leaf cuvette. It was set to $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which corresponds to the saturating PPFD for *S. camporum* CO₂ assimilation rates (HABERMANN et al., 2011).

Fluorescence measurements were made with a modulated fluorometer (FMS 1, Hansatech, Norfolk, UK). The analyzed variables were the maximum quantum yield of PSII [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$], the effective quantum yield of PSII [$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$] and the apparent electron transport rate ($ETR = \Delta F/F_m' \times \text{PPFD} \times 0.5 \times 0.84$), where F_m and F_o are, respectively, the maximum and the minimum fluorescence of dark-adapted leaves and F_m' and F_s are, respectively, the maximum and the steady state fluorescence in the light adapted state. For the calculation of ETR , 0.5 was assumed as the fraction of excitation energy distributed between the two photosystems and 0.84 as the fraction of light that was absorbed

by the leaf (BAKER, 2008). The *relative excessive PPF* was calculated as $EXC = [(Fv/Fm - \Delta F/Fm')/Fv/Fm]$ (BILGER et al., 1995). To measure Fv/Fm , leaves were dark-adapted for 30 minutes (BOLHÀR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993).

The predawn (Ψ_{pd}) and midday (Ψ_{md}) leaf water potentials were measured in horizontal and vertical leaves of irrigated and WD plants using a pressure chamber (DIK-7000, Daiki Rika Kogyo, Tokyo, Japan).

Statistical analyses:

Leaf gas exchange variables (A , g_s , E , $Tleaf$ and WUE), fluorescence variables (Fv/Fm , $\Delta F/Fm'$, ETR and the EXC), Ψ_{pd} and Ψ_{md} were obtained from five completely randomized replicates (plants) from the irrigated or the WD group of plants.

For the present study, three factors were considered: water deficiency (two levels of water supply), leaf orientation (horizontal and vertical) and leaf surface (adaxial and abaxial). However, as leaf orientation and leaf surface are associated factors (both horizontal and vertical leaves are comprised of adaxial and abaxial surfaces), a two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to test each variable separately for each evaluation date. The Tukey test ($P < 0.05$) was used to conduct post-hoc comparisons to estimate the least significant difference between mean values. All statistical tests were performed on SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, United States of America).

RESULTS

Plants that were submitted to water deficiency (WD) already showed lower Ψ_{pd} and Ψ_{md} than irrigated plants 6 days after water withholding (Fig. 1A and 1B). During the whole experimental period, the water potential (Ψ_{pd} and Ψ_{md}) between horizontal and vertical leaves was the same, for irrigated or WD plants ($P > 0.05$). The lowest Ψ_{pd} and Ψ_{md} values observed for WD plants, in comparison to irrigated plants, occurred 35 days after the imposition of WD. Two days after rewatering the plants that had been submitted to WD, Ψ_{pd} and Ψ_{md} were the same between irrigated and WD plants (Fig. 1A and 1B).

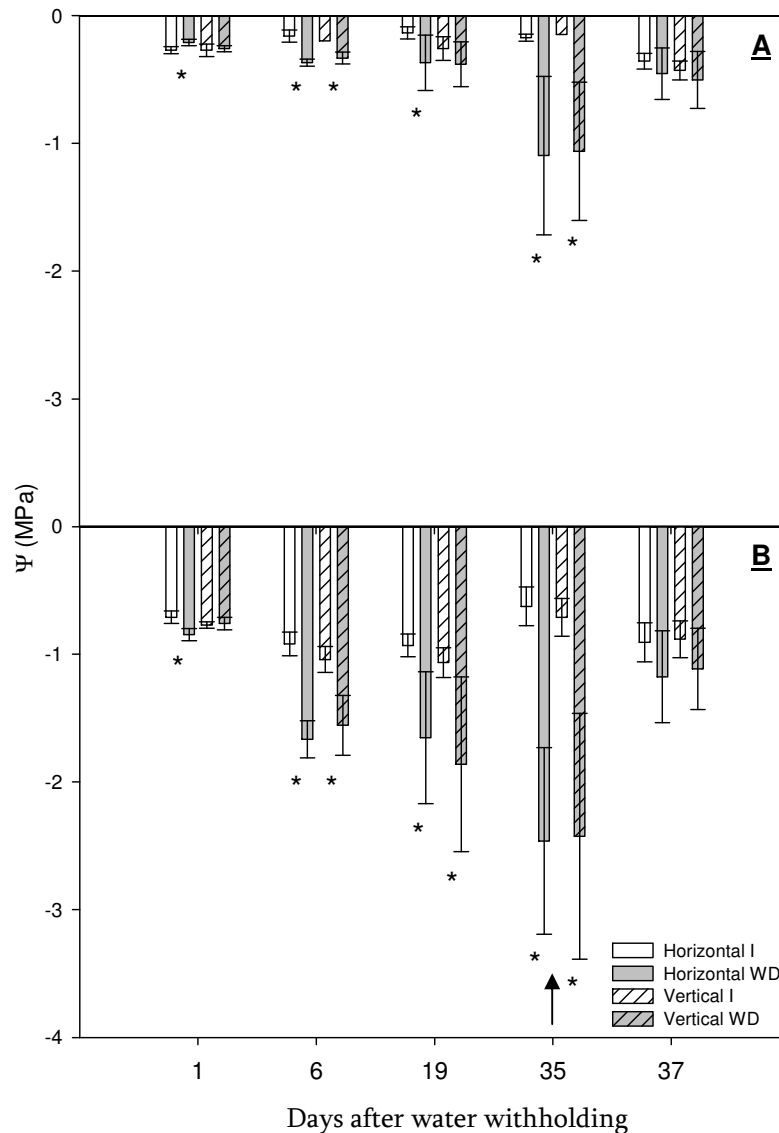


Figure 1 – Predawn (A) and midday (B) leaf water potential in horizontal and vertical leaves of irrigated (I) and water deficient (WD) *S. camporum* plants ($n = 5$), in different evaluation dates. Vertical bars are the standard deviation (SD). For each evaluation date and for the same leaf type, asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$) between irrigated and WD plants. Arrow indicates rewatering.

Horizontal and vertical oriented leaves had similar ($P > 0.05$) CO_2 assimilation rates (A) throughout the experimental period, when evaluations were made on the adaxial or abaxial leaf surface, in irrigated or WD plants. However, we did not find a conclusive pattern in the comparison between the surfaces of each leaf type (Fig. 2A and 2B).

In both leaf types, the adaxial and abaxial surfaces exhibited the same A values one day after water withholding (Beginning), in irrigated or WD plants (Fig. 2A and 2B). On the day of maximum stress (MS), irrigated plants showed higher A values compared to those of

WD plants obtained on the same leaf surface of horizontal (Fig. 2A) and vertical (Fig. 2B) leaves. Additionally, on the day of MS, the adaxial surface of horizontal leaves had an increased A in comparison to its abaxial surface in irrigated plants; however, such difference between leaf surfaces was not observed for WD plants (Fig. 2A). On the other hand, vertical leaves showed similar A values between the adaxial and abaxial surfaces in irrigated and WD plants (Fig. 2B).

The A values obtained on both surfaces of horizontal leaves from WD plants were completely recovered in the recovery evaluation (REC), two days after rewatering (Fig. 2A). Only the adaxial surface of vertical leaves had not completely recovered the A values in plants that had been submitted to WD (Fig. 2B).

Horizontal and vertical oriented leaves had similar ($P > 0.05$) stomatal conductance (g_s) and transpiration rate (E) values throughout the experimental period, when evaluations were made on the adaxial or abaxial leaf surface, in irrigated or WD plants. On the day of MS, g_s (Fig. 2C and 2D) and E (Fig. 2E and 2F) were significantly lower in WD compared to irrigated plants, independently of leaf surface or leaf type. In plants that had been submitted to WD, g_s was completely recovered on both surfaces of horizontal leaves two days after rewatering (Fig. 2C), but g_s had not completely recovered on vertical leaves (Fig. 2D); E values were not recovered on the adaxial or the abaxial surface of horizontal (Fig. 2E) or vertical (Fig. 2F) leaves.

Horizontal and vertical oriented leaves presented the same ($P > 0.05$) water use efficiency (WUE) throughout the experimental period, when evaluations were made on the adaxial or abaxial leaf surface, in irrigated or WD plants. For each evaluation date, WUE varied substantially among leaf types and leaf surfaces. However, the imposition of drought did not cause any significant differences for adaxial or abaxial surfaces of horizontal or vertical leaves (Fig. 2G and 2H).

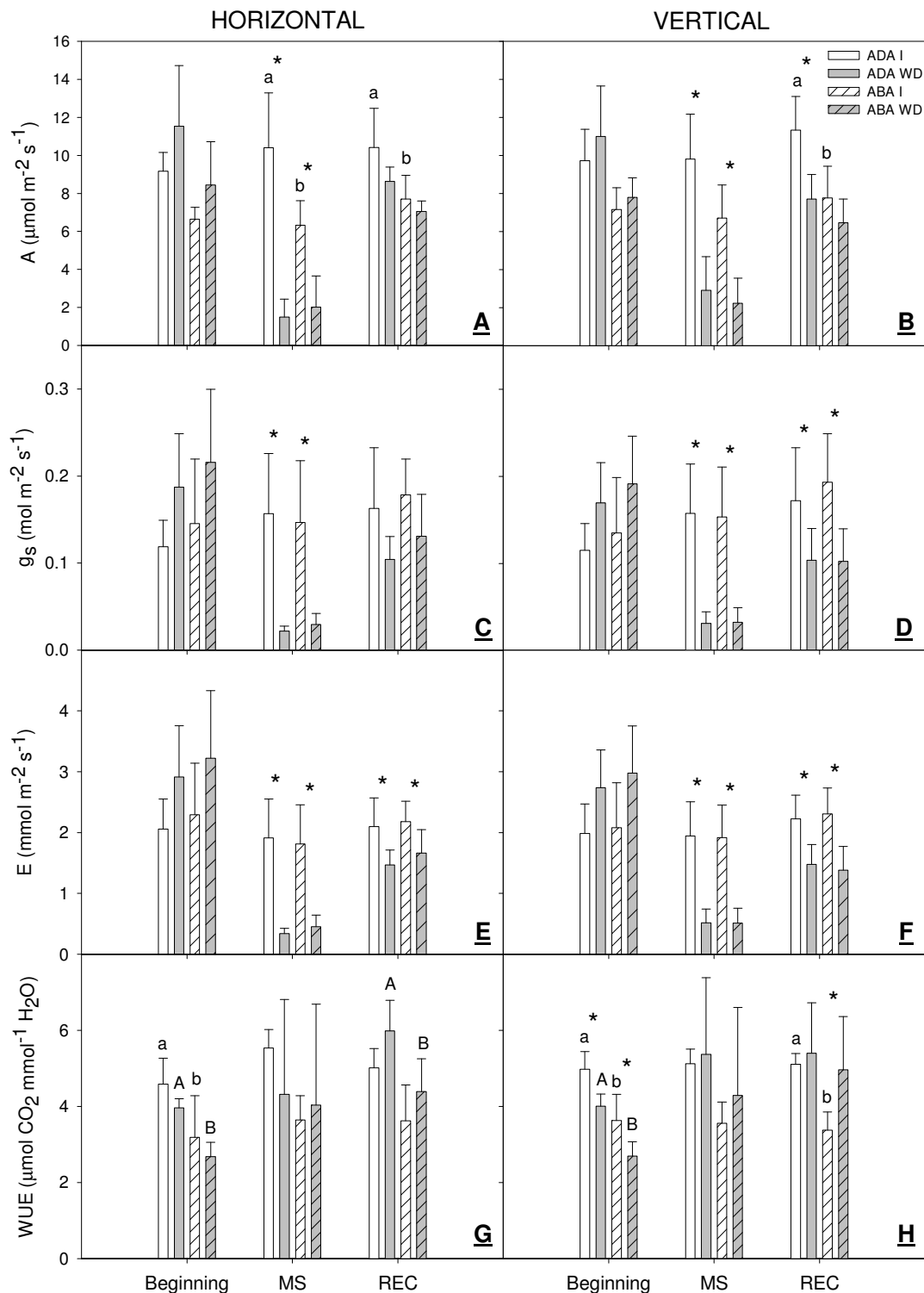


Figure 2 – CO₂ assimilation rates, (A and B), stomatal conductance (C and D), transpiration rate (E and F), and water use efficiency (G and H) of adaxial (ADA) and abaxial (ABA) surfaces of horizontal (A, C, E and G) and vertical (B, D, F and H) leaves of irrigated (I) and water deficient (WD) *S. camporum* plants (n = 5). For each evaluation date, on the same surface of the same leaf type, asterisks indicate significant difference (P < 0.05) between irrigated and WD plants. For each evaluation date, and on the same leaf type, presence of letters indicates significant difference (P < 0.05) between leaf surfaces of irrigated (lower case letters) or WD (upper case letters) plants. (Bars = SD)

Horizontal and vertical leaves exhibited the same ($P > 0.05$) leaf temperature (T_{leaf}) throughout the experimental period, when evaluations were made on the adaxial or abaxial leaf surface, in irrigated or WD plants. T_{leaf} was also the same between the adaxial and abaxial surfaces of each leaf type (Fig. 3A and 3B), in irrigated or WD plants. In the afternoon, when irradiance, air temperature and VPD were more elevated in comparison to the morning period, horizontal and vertical leaves showed the same ($P > 0.05$) T_{leaf} , on the adaxial or abaxial leaf surface, in irrigated or WD plants (data not shown). On the day of MS, water deficiency did not cause a significant increase in the temperature of the adaxial or abaxial surface of horizontal or vertical leaves in the morning (Fig. 3A and 3B) or in the afternoon (data not shown).

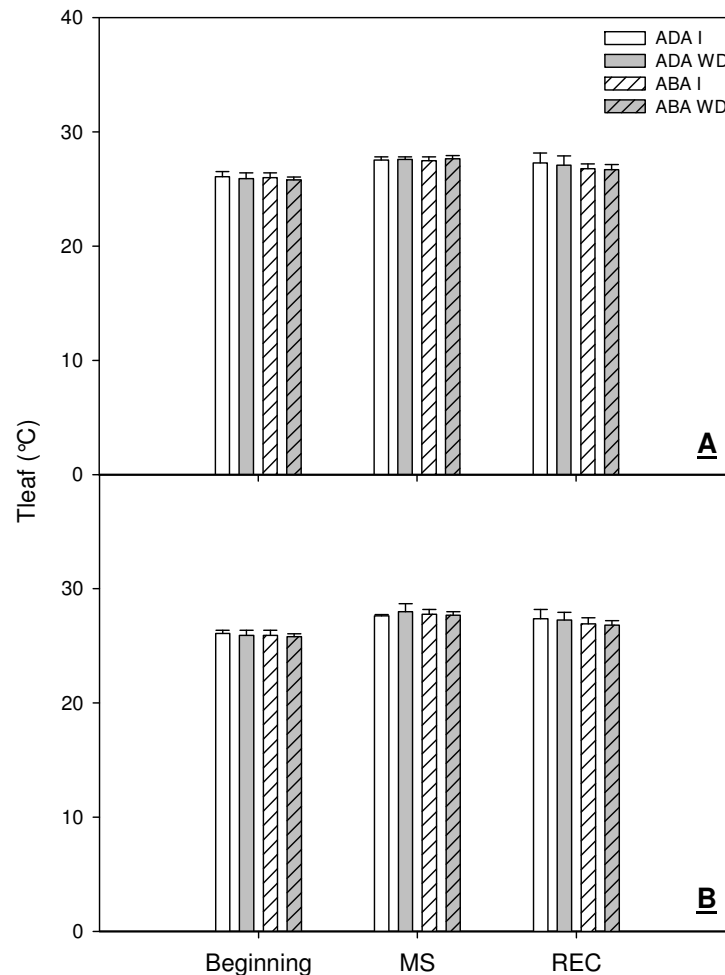


Figure 3 – Leaf temperature of adaxial (ADA) and abaxial (ABA) surfaces of horizontal (**A**) and vertical (**B**) leaves of irrigated (I) and water deficient (WD) *S. camporum* plants ($n = 5$). For each evaluation date, on the same surface of the same leaf type, asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$) between irrigated and WD plants. For each evaluation date, and on the same leaf type, presence of letters indicates significant difference ($P < 0.05$) between leaf surfaces of irrigated (lower case letters) or WD (upper case letters) plants. (Bars = SD)

Horizontal and vertical oriented leaves presented the same ($P > 0.05$) effective quantum yield of PSII ($\Delta F/Fm'$) and apparent electron transport rate (ETR) throughout the experimental period, when evaluations were made on the adaxial or abaxial leaf surface, in irrigated or WD plants. $\Delta F/Fm'$ and ETR were higher on the adaxial than on the abaxial surface of both leaf types when plants were not facing water stress (Fig. 4A, 4B, 4C and 4D). On the day of MS, regardless of the leaf type, only the adaxial surface showed a decrease in $\Delta F/Fm'$ and in ETR caused by WD. On the day of MS, in both leaf types, the $\Delta F/Fm'$ and ETR values measured on the abaxial surface of irrigated and WD plants were the same (Fig. 4A and 4B). In the recovery evaluation, the abaxial surface of vertical leaves showed higher $\Delta F/Fm'$ and ETR in WD in comparison to irrigated plants (Fig. 4B and 4D).

Horizontal and vertical oriented leaves demonstrated the same ($P > 0.05$) maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) throughout the experimental period, when evaluations were made on the adaxial or abaxial leaf surface, in irrigated or WD plants. Fv/Fm was also similar between the surfaces of each leaf type (Fig. 4E and 4F), in irrigated or WD plants. Water deficiency did not cause any reduction in Fv/Fm on the adaxial or abaxial surface of horizontal (Fig. 4E) or vertical (Fig. 4F) leaves.

Horizontal and vertical oriented leaves had similar ($P > 0.05$) relative excessive PPFD (EXC) throughout the experimental period, when evaluations were made on the adaxial or abaxial leaf surfaces, in irrigated or WD plants. In plants that were not submitted to WD, EXC was higher on the abaxial in comparison to the adaxial leaf surface, regardless of the leaf type (Fig. 5). Water deficiency caused a significant increase in EXC on the adaxial, but not on the abaxial surface of horizontal (Fig. 5A) and vertical (Fig. 5B) leaves. In the recovery evaluation, the adaxial surface of horizontal and vertical leaves had returned to the initial EXC values. However, in vertical leaves, the abaxial surface exhibited a reduced value of EXC in plants that had been exposed to WD in comparison to irrigated plants (Fig. 5B).

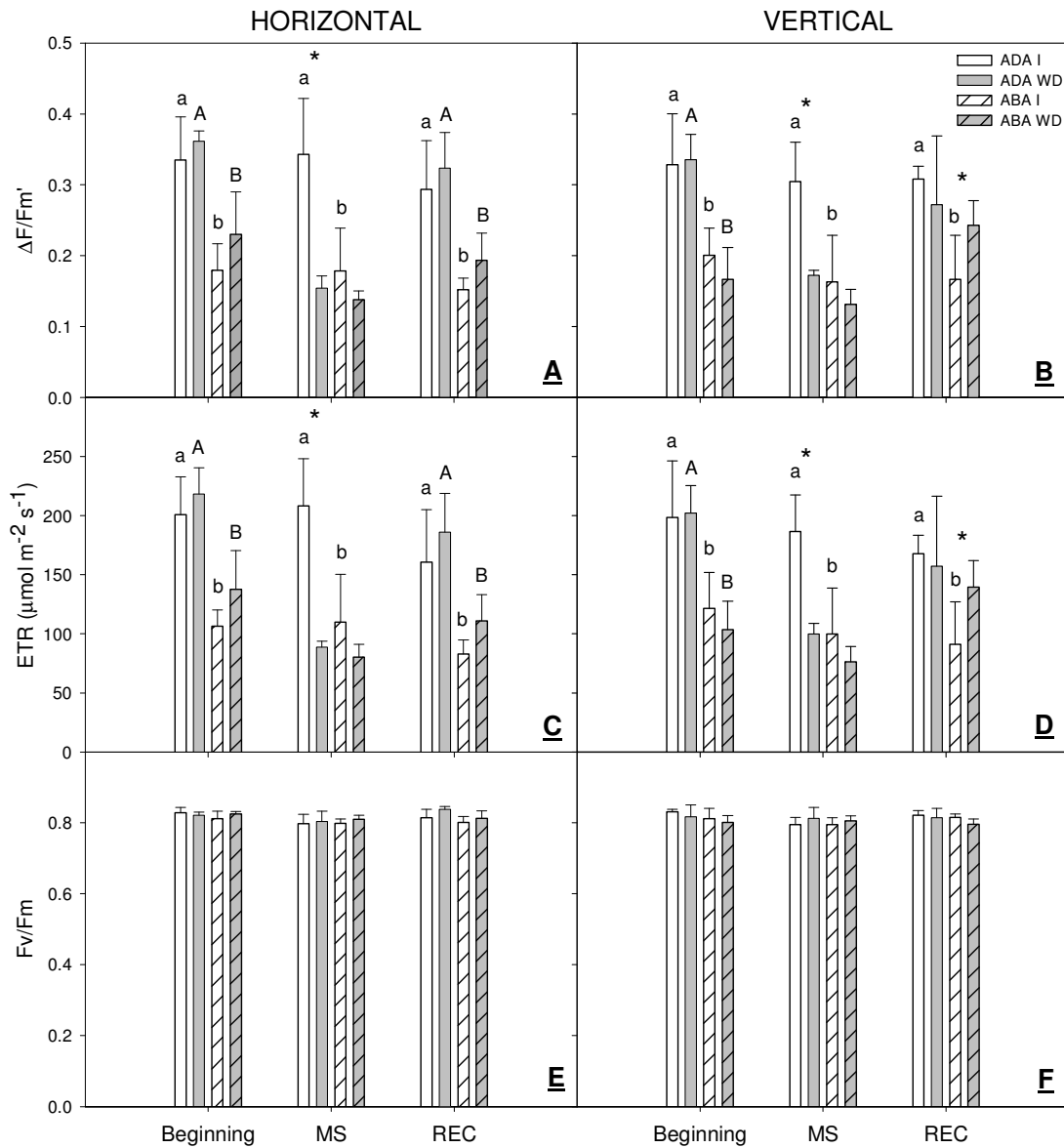


Figure 4 – Effective quantum yield of PSII (**A** and **B**), apparent electron transport rate (**C** and **D**) and maximum quantum yield of PSII (**E** and **F**) of adaxial (ADA) and abaxial (ABA) surfaces of horizontal (**A**, **C**, and **E**) and vertical (**B**, **D**, and **F**) leaves of irrigated (I) and water deficient (WD) *S. camporum* plants (n = 5). For each evaluation date, on the same surface of the same leaf type, asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$) between irrigated and WD plants. For each evaluation date, and on the same leaf type, presence of letters indicates significant difference ($P < 0.05$) between leaf surfaces of irrigated (lower case letters) or WD (upper case letters) plants. (Bars = SD)

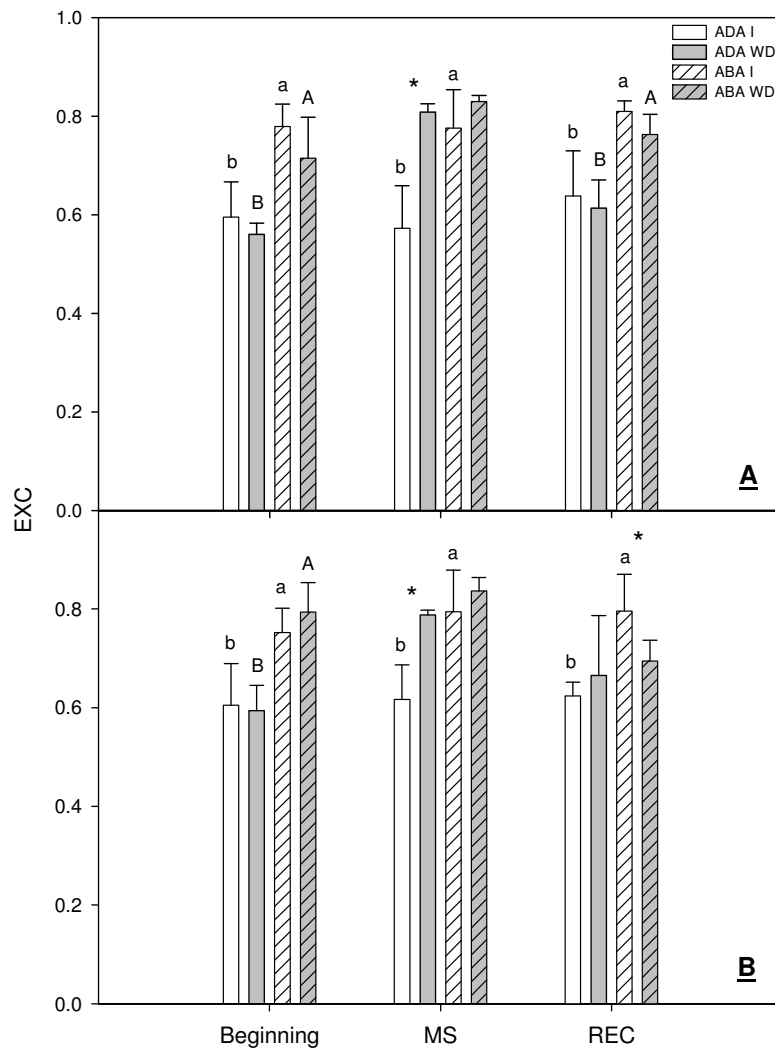


Figure 5 – Relative excessive PPFD of adaxial (ADA) and abaxial (ABA) surfaces of horizontal (A) and vertical (B) leaves of irrigated (I) and water deficient (WD) *S. camporum* plants ($n = 5$). For each evaluation date, on the same surface of the same leaf type, asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$) between irrigated and WD plants. For each evaluation date, and on the same leaf type, presence of letters indicates significant difference ($P < 0.05$) between leaf surfaces of irrigated (lower case letters) or WD (upper case letters) plants. (Bars = SD)

DISCUSSION

Styrax camporum has naturally horizontal, vertical and intermediate angled leaves in relation to the horizon line. Different from what has been described for vertical oriented leaves (EHLERINGER, 1988; VALLADARES & PUGNAIRE, 1999; WERNER et al., 1999; LIU et al., 2003), our data demonstrates that, for *S. camporum*, even though vertical leaf

orientation can reduce light interception, it is not related to structural photoprotection. This affirmation is supported by (1) lack of higher photochemical performance (Fv/Fm) in vertical compared to horizontal oriented leaves, which rejects the idea of avoidance of excessive light interception; (2) EXC similarities between leaf types, evaluated on their respective surfaces; (3) the similarities of A values between horizontal and vertical oriented leaves, measured on their adaxial and abaxial surfaces, mainly in water deficient (WD) plants; and (4) $Tleaf$ similarities between horizontal and vertical oriented leaves, measured on the adaxial and abaxial leaf surfaces of irrigated and WD plants.

On the day of maximum water deficiency, reductions in A , g_s , and E were observed on the adaxial and abaxial surfaces of both leaf types (Fig. 2). However, on this same day, there were no reductions in Fv/Fm on any of the surfaces of both leaf types (Fig. 4E and 4F). This suggests that either *S. camporum* has an efficient electron sink that avoids the formation of reactive oxygen species (ROS), such as superoxides and singlet oxygen, or it has an efficient antioxidant system to cope with these toxic species, which could damage the photosynthetic apparatus and lead to photoinhibition (EDREVA, 2005). Nevertheless, the adaxial surface of both leaf types demonstrated higher susceptibility to WD in comparison to the abaxial leaf surface. On the adaxial surface, WD caused significant reductions in $\Delta F/Fm'$ and ETR (Fig. 4) and an increase in EXC (Fig. 5), which suggest elevated thermal energy dissipation and down-regulation of PSII to reduce excessive light energy in the photosynthetic apparatus.

The CO_2 assimilation rates of horizontal and vertical leaves may be dependent on g_s and/or on the carboxylation efficiency, which in turn depends on the photochemical efficiency (BAKER, 2008). The CO_2 assimilation was reduced by WD on both surfaces of both leaf types (Fig. 2A and 2B), and our data suggest that these reductions in A were caused by the decrease in g_s . An increase in the intercellular/atmospheric CO_2 concentration (C_i/C_a) ratio would indicate biochemical damages to the carboxylation reactions, but such C_i/C_a increase was not observed even on the day of maximum stress (data not shown). Thus, it seems that A measured on the adaxial and abaxial leaf surfaces was reduced because WD caused a low stomatal aperture. Measuring gas exchange on the adaxial or abaxial leaf surface of WD plants returned A values that were dependent on low stomatal aperture on the abaxial leaf surface because mature leaves of *S. camporum* are hypostomatous, with stomata covered by stellate trichomes (HABERMANN et al., 2008).

In contrast to gas exchange, photochemical efficiency was impaired by WD only on the adaxial surface (Fig. 4A, 4B, 4C and 4D), which is glabrous (HABERMANN et al., 2008). Therefore, measuring fluorescence response variables on the adaxial or abaxial leaf

surface in WD plants returned values that are exclusively dependent on light absorption by the leaf surface which was being illuminated. In *S. camporum* leaves, light reflectance within the photosynthetic spectrum (400-800 nm) is approximately three times greater on the abaxial than on the adaxial surface (HABERMANN et al., 2011). For these reasons, WD affected A on both surfaces, but the photochemical reactions were affected only on the adaxial surface, which is mostly exposed to large amounts of light.

The other point of interest of the present study was to verify, in irrigated plants, whether adaxial and abaxial surfaces of each leaf type have different photosynthetic capacities. The photosynthetic capacity of a leaf surface is influenced by the light environment during development (EVANS et al., 1993) and also by the amount of sunlight it is exposed to after maturity (TERASHIMA, 1986). As a result, higher photosynthetic capacity is observed in leaves of sun-adapted than in leaves of shade-adapted plants (DeLUCIA et al., 1991), in leaves that are mostly exposed to the sun in an individual's canopy (LICHTENTHALER et al., 2007), and in palisade rather than in spongy chloroplasts of horizontally oriented leaves (TERASHIMA & INOUE, 1985). Hence, considering that the surfaces of horizontal and vertical leaves of *S. camporum* differ in their exposure to sunlight, we expected to find differences in photosynthetic capacity between the surfaces of horizontal leaves and similarities between the surfaces of vertical leaves.

We did not obtain conclusive data on the expected similarity of A values between the adaxial and abaxial surfaces of vertical leaves nor on the expected different A values between the surfaces of horizontal leaves of *S. camporum* irrigated plants (Fig. 2A and 2B), but the adaxial surface of both leaf types exhibited higher $\Delta F/F_m'$ and ETR in comparison to the abaxial leaf surface (Fig. 4A, 4B, 4C and 4D). Greater adaxial photosynthetic capacity in relation to the abaxial surface has already been observed in horizontal sun leaves (DeLUCIA et al., 1991; EVANS et al., 1993; PROIETTI & PALLIOTTI, 1997). In horizontally oriented leaves, palisade chloroplasts have higher amounts of electron carriers than the spongy ones (TERASHIMA & INOUE, 1985). Moreover, higher amounts and activity of Rubisco (Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase) are observed in the palisade compared to the spongy parenchyma in horizontal leaves (NISHIO et al., 1993; SUN & NISHIO, 2001).

On the other hand, we did not find the expected similarity between the surfaces of vertical leaves. Under a direct red-blue LED light, both surfaces of vertical leaves of *S. camporum* present the same A values between 800 and 1800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HABERMANN et al., 2011). However, when *S. camporum* leaves were maintained at their natural orientation and were measured with a leaf cuvette that enables sunlight to penetrate

both the top and bottom of the leaf chamber, the abaxial surface of both leaf types showed significant and conspicuous low A values compared to the adaxial surface (data not shown). Thus, the presence of trichomes on the abaxial surface of leaves of *S. camporum* (HABERMANN et al., 2008) may cause low light absorptance on this surface (EHLERINGER et al., 1976), which could account for the reduced photochemical performance of the abaxial surface of vertical leaves (Fig. 4B and 4D) despite its potential exposure to direct sunlight.

Nevertheless, the presence of compact spongy parenchyma on the abaxial surface of *S. camporum* leaves (HABERMANN et al., 2008) and in many other Cerrado species (BIEIRAS & SAJO, 2009) could allow vertical leaves to have carbon-gain benefits due to the exposure of both leaf surfaces to direct sunlight (PROIETTI & PALLIOTTI, 1997). Indeed, it has been demonstrated that vertical leaves of *S. camporum* have higher photosynthetic performance than horizontal leaves when measurements are taken under bilateral natural illumination (HABERMANN et al., 2008), which support cooperation between the surfaces of vertical leaves to enhance carbon assimilation (HABERMANN et al., 2011).

The present study demonstrated that vertical leaf orientation is not related to structural photoprotection in *S. camporum* plants when under water deficiency. In addition, reductions of A values due to WD were perceived on the adaxial and abaxial surfaces of horizontal and vertical leaves, whereas down-regulation of photochemical activity was observed only on the adaxial glabrous leaf surface of both leaf types.

ACKNOWLEDGEMENTS

Aline M. Feistler thanks FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for her Master's fellowship (Proc. 2009/04007-4). We thank Dr. Eduardo C. Machado and Dr. Rafael V. Ribeiro for the photosynthesis systems and for the experimental facilities provided at Instituto Agrônômico de Campinas. We extend our appreciation to M.Sc. Paulo E. R. Marchiori and Danielle A. Prudente for their help with some of the evaluations, and to Severino S. Nogueira for technical support.

REFERENCES²

- BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **The Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 89-113. 2008.
- BERRY, J.A.; DOWNTON, W.J.S. Environmental regulation of photosynthesis. In: GOVINDJEE, E. **Photosynthesis: development, carbon metabolism and plant production**. New York: Academic Press, 1982. v.2, p. 306-308.
- BIERAS, A.C.; SAJO, M.G. Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. **Trees**, v.23, p. 451-471, 2009.
- BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v.102, p. 425-432, 1995.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. (eds.) **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.193-206.
- DeLUCIA, E.H.; SHENOI, H.D.; NAIDU, S.L.; DAY, T.A. Photosynthetic symmetry of sun and shade leaves of different orientations. **Oecologia**, v.87, p. 51-57. 1991.
- EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.106, p. 119-133. 2005.
- EHLERINGER, J.R. Changes in leaf characteristics of species along elevational gradients in the Wasatch Front, Utah. **American Journal of Botany**, v.75, p. 680-689. 1988.
- EHLERINGER, J.; BJÖRKMAN, O.; MOONEY, H. Leaf pubescence: effects on absorptance and photosynthesis in a desert shrub. **Science**, v.192, p. 376-377. 1976.

² ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

EVANS, J.R.; JAKOBSEN, I.; ÖGREN, E. Photosynthetic light-response curves. 2. Gradients of light absorption and photosynthetic capacity. **Planta**, v.189, p. 191-200. 1993.

FURLANI, A.M.C.; FURLANI, P.R. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. **Boletim Técnico do Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1988. Série 121. 34 p.

HABERMANN, G; MACHADO, S.R.; GUIMARÃES, V.F.; RODRIGUES, J.D. Leaf heliotropism in *Styrax camporum* Pohl from the Brazilian Cerrado – distinct gas exchange and leaf structure, but similar leaf temperature and water relations. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p.71-83. 2008.

HABERMANN, G.; ELLSWORTH, P.F.V; CAZOTO, J.L.; FEISTLER, A.M.; da SILVA, L.; MACHADO, S.R. Leaf paraheliotropism in *Styrax camporum* confers increased light use efficiency and advantageous photosynthetic responses rather than photoprotection. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p. 10-17. 2011.

LICHTENTHALER, H.K.; BABANI, F.; LANGSDORF, G. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity in sun and shade leaves of trees. **Photosynthesis Research**, v.93, p. 235-244. 2007.

LIU, L-X.; XU, S-M.; WOO, K.C. Influence of leaf angle on photosynthesis and the xanthophyll cycle in the tropical tree species *Acacia crassiparva*. **Tree Physiology**, v.23, p. 1255-1261. 2003.

LONG, S.P.; HUMPRIES, S.; FALKOWSKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p. 633-62. 1994.

MACHADO, S.R. **Morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos de *Styrax camporum* Pohl. (Styracaceae) em desenvolvimento**. São Paulo, 1991, 324p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

NAKAJIMA, J.N.; MONTEIRO, R. Estudos fitogeográficos com espécies de *Styrax* L. (Styracaceae) dos cerrados brasileiros. **Eugeniana**, v.12, p. 3-10, 1986.

NISHIO, J.N.; SUN, J.; VOGELMANN, T.C. Carbon fixation gradients across spinach leaves do not follow internal light gradients. **Plant Cell**, v.5, p. 953-961. 1993.

PROIETTI, P.; PALLIOTTI, A. Contribution of the adaxial and abaxial surfaces of olive leaves to photosynthesis. **Photosynthetica**, v.33, p. 63-69. 1997.

SMITH, W.K.; BELL, D.T.; SHEPERD, K.A. Association between leaf structure, orientation and sunlight exposure in five western Australian communities. **American Journal of Botany**, v.85, p. 56-63. 1998.

SUN, J.; NISHIO, J.N. Why abaxial illumination limits photosynthetic carbon fixation in spinach leaves. **Plant Cell Physiology**, v.42, p. 1-8. 2001.

TERASHIMA, I. Dorsiventrality in photosynthetic light response curves of a leaf. **Journal of Experimental Botany**, v.37, p. 399-405. 1986.

TERASHIMA, I.; INOUE, Y. Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: biochemical and ultrastructural differences. **Plant Cell Physiology**, v.26, p. 63-75. 1985.

VALLADARES, F.; PUGNAIRE, F.I. Tradeoffs between irradiance capture and avoidance in semi-arid environments assessed with a crown architecture model. **Annals of Botany**, v.83, p. 459-469. 1999.

WERNER, C.; CORREIA, O.; BEYSCHLAG, W. Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. **Acta Oecologica**, v.20, p. 15-23. 1999.

ANEXOS

Anexo A - Fotos do experimento



Figura 1 – Área experimental do Centro de Ecofisiologia e Biofísica, no Centro Experimental Central do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), onde é possível observar as plantas de *S. camporum* utilizadas no estudo. As plantas cujos vasos possuem uma cobertura plástica são aquelas pertencentes ao grupo que enfrentou a deficiência hídrica.



Figura 2 – Ramo de uma planta de *S. camporum* no qual é possível perceber a ocorrência de folhas com orientação horizontal, vertical ou com ângulos intermediários.