



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



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

CARACTERIZAÇÃO SISTÊMICA DE ALTERAÇÕES EM REDES FISIOLÓGICAS DE
PLANTAS C3 E C4 SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA.

SUZANA CHIARI BERTOLLI

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

Fevereiro- 2012

SUZANA CHIARI BERTOLLI

CARACTERIZAÇÃO SISTÊMICA DE ALTERAÇÕES EM REDES FISIOLÓGICAS
DE PLANTAS C3 E C4 SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Maia Souza

Fevereiro – 2012

581.1 Bertolli, Suzana Chiari
B546c Caracterização sistêmica de alterações em redes
fisiológicas de plantas C3 e C4 submetidas à deficiência
hídrica / Suzana Chiari Bertolli. - Rio Claro : [s.n.], 2012
80 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Botânica - Fisiologia. 2. Análise de redes. 3.
Homeostase. I. Título

SUZANA CHIARI BERTOLLI

CARACTERIZAÇÃO SISTÊMICA DE ALTERAÇÕES EM REDES FISIOLÓGICAS
DE PLANTAS C3 E C4 SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Maia Souza

Prof. Dr. Gustavo Habermann

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro

Rio Claro, 29 de fevereiro de 2012.

Dedico à Sheila Chiari Bertolli (*in memoriam*)

Por ter me amado e me ensinado em cada dia da sua existência.

O caminho pode nos levar para onde não esperamos, mas sempre para onde deveríamos estar.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por conceder a bolsa de estudo (Processo: 2009/11212-3).

Ao Professores Doutores Gustavo Habermann e Rafael Vasconcelos Ribeiro pelas conversas, conselhos e treinamentos que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos Prof. Dr. Victor José Mendes Cardoso pelas críticas e opiniões.

Ao meu amigo e orientador Gustavo Maia Souza pela parceria, confiança e lealdade. Obrigada pelos ensinamentos teóricos, filosóficos e críticos, pelo resgate, e por ter me apresentado o caminho. Não posso deixar de agradecer também aos cafés e as conversas que seguiram cada xícara.

A Rosemary Cardoso e, especialmente, a Vanessa Moruzzi pela paciência e dedicação com as solicitações junto à Seção de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

Aos colegas de laboratório Kézia Guidorizi, Me. Tiago Catuchi, Me. Hilton Fabrício Vítole, Me. Willyam de Lima Vieira, Alexandrius de Moraes, Anderson Guerra, Fernando Guidorizzi, Gabriel Rapchan, Gabriel Toledo, Luanda Torquato, Eduardo Mazzuchelli e Prof. Dr. Ana Claudia Pacheco Santos, pelo apoio e cooperação. Agradeço também pelos bons momentos diários e pelas inúmeras risadas regadas à salgadinhos e tubaína.

Às amigas de Rio Claro, Me. Ludmila Freitas, Me. Viviane Vivi e Me. Viviane Lopes pelos poucos e bons momentos. Agradeço especialmente a minha amiga Me. Bruna Locardi, que me recebeu de portas abertas. Obrigada, Querida, pelas conversas, críticas e amizade incondicional.

Às eternas amigas, Carol Nunes, Camila Mine, Dani Banci, Suellen Salgueiro, Mariana Panceira, Ana Irene Coimbra e Eliane Nascimento pelo amor e por serem as minhas irmãs de alma.

Aos ex-colegas de trabalho e também amigos, Juliane Ribeiro, Lívia Ramos de Paula, Bruno Augusto e Kelson Villa, por sempre me apoiarem nessa jornada.

A toda a minha imensa família que também sempre me apoiou. Em especial a Nádia T. Chiari Terrin pela simples presença em minha vida, e a minha avó Dona Gila pelos cuidados maternos.

Agradeço ao meu pai, Odair, por sempre estar ao meu lado nas horas difíceis e por me amar do seu jeito. Às minhas irmãs, Mariana e Juliana, obrigada pelo cuidado, carinho, zelo e dedicação à distância.

À minha doce terceira mãe, Ivanilde dos Santos, por todas as refeições e dedicação nos momentos difíceis. Obrigada também a toda família dos Santos pela motivação e boas vibrações.

Ao meu amigo, namorado e marido Hugo Leonardo dos Santos pelo apoio incondicional ao longo desses dois anos. Obrigada pelo amor, humor, companhia, dedicação, paciência, exemplo e respeito. Sem você ao meu lado, nada teria o mesmo sabor.

A Deus, por sempre acreditar em mim e me confortar nos momentos de conflito. Obrigada por favorecer todas as minhas conquistas.

RESUMO GERAL

O objetivo geral foi o de investigar o fenômeno da homeostase em plantas cultivadas de metabolismo C3 e C4 submetidas à deficiência hídrica, utilizando para isto a abordagem do “Paradigma Sistêmico”. Tal abordagem permite a superação de certas limitações impostas pela abordagem cartesiana clássica, levando a uma nova interpretação de fenômenos fisiológicos com a possibilidade de desvendar mecanismos de controle subjacentes às respostas das plantas submetidas à perturbações ambientais potencialmente estressantes. A partir dos conceitos de homeostase, plasticidade fenotípica e estabilidade do desenvolvimento, o dissertação foi desenvolvida em torno de um experimento envolvendo condições de maior e menor variabilidade ambiental, isto é, em ambiente controlado e semi-controlado. Foram utilizadas como espécies-modelo nesse estudo a soja (*Glycine max*), de metabolismo C3, e o capim marandú (*B. brizantha brizantha*), de metabolismo C4, permitindo maior generalização dos resultados entre espécies cultivadas herbáceas. Diferentes aspectos fisiológicos foram considerados na análise das respostas das plantas submetidas aos diferentes regimes hídricos e ambientes de crescimento, como produção de biomassa, e fotossíntese, todos integrados em uma rede de relações. De forma geral, os resultados indicaram que apesar de as duas espécies serem de metabolismos fotossintéticos diferentes, não apresentaram diferenças claras nas suas respostas a todas as condições testadas, mostrando desempenhos fisiológicos e plasticidade fenotípica relativamente similares. As diferenças entre os resultados das análises de conectância global (Cg) indicam que o padrão de modulação das redes fisiológicas em resposta à deficiência hídrica pode ser espécie-específico e dependente da condição de crescimento (variabilidade ambiental).

Palavras-chave: Análise de redes, Homeostase, Deficiência hídrica, Plantas C3 e C4.

ABSTRACT

The general aim of this study was to investigate the phenomenon of homeostasis in plants of metabolism C3 and C4 under water deficit, using the approach of "systemic paradigm." This approach helps to overcome limitations imposed by classical Cartesian approach, leading to a new interpretation of physiological phenomena with the possibility to unravel the control mechanisms underlying plant responses subjected to potentially stressful environmental disturbances. Based on the concepts of homeostasis, phenotypic plasticity and developmental stability, the project was developed around an experiment in conditions of high and low environmental variability, in other words, in a controlled and semi-controlled environment. Were used two species in this study, soybean (*Glycine max*), C3 metabolism, and Marandu grass (*Brachiaria brizantha*), C4 metabolism, allowing greater generalization of results between cultivated herbs species. Different physiological aspects were considered in the analysis of plant responses under different water regimes and growth environments, such as biomass and photosynthesis, all integrated into a network of relationships. Overall, the results indicated that although both species being different photosynthetic metabolisms, they showed no clear differences in their responses to all conditions tested, showing relatively similar response of phenotypic plasticity and physiological performance. The differences between the results of the global connectance (C_g) indicate that the modulation pattern of physiological networks in response to water deficit may be species-specific and dependent on the growth condition (environmental variability).

Keywords: Network analysis, Homeostasis, Water deficit, C3 and C4 plants.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores médios e coeficiente de variação (CV) das condições ambientais da câmara de crescimento (A_C) e da casa de vegetação (A_{SC}), onde as espécies foram cultivadas por trinta dias. Considerando os seguintes parâmetros em cada período do dia: $DFFF_{dia}$, irradiância diária ($\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$); T , temperatura ($^{\circ}\text{C}$); UR , umidade relativa do ar (%).

Pg. 32

Tabela 2: Valores médios de extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) e conteúdo relativo de água (CRA) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental.

Pg. 33

Tabela 3: Valores médios da eficiência quântica potencial e efetiva do FSII (F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, respectivamente), coeficiente de extinção fotoquímico e não fotoquímico (qP e NPQ , respectivamente), taxa de transporte de elétrons (ETR), dreno alternativo de elétrons (DAE), e índice de teor de clorofila (ICC) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental.

Pg. 34

Tabela 4: Valores médios do potencial fotossintético (A_{maxCO_2}), pontos de compensação e saturação ao CO_2 (P_{comCO_2} e P_{satCO_2} , respectivamente), limitação estomática relativa da fotossíntese (L_s) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental.

Pg. 35

Tabela 5: Valores médios de eficiência quântica aparente (EQA), respiração no escuro (R_d), fotorrespiração (F_R), capacidade fotossintética (A_{maxL}), pontos de compensação e saturação da fotossíntese à luz (P_{com} e P_{sat} , respectivamente), transpiração (E), eficiência intrínseca do uso da água ($Eiua$), e dreno alternativo de elétrons (DAE) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental.

Pg. 36

Tabela 6: Valores médios de massa seca da raiz (MS_R), massa seca foliar (MS_F), massa seca do caule (MS_C), massa seca total (MS_T), relação parte aérea raiz (PA/R), índice de área foliar (AF) e massa específica foliar (MEF) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Pg. 38

Tabela 7: Diferenças entre os desvios de simetria nas diferentes partes de folhas de *B. brizantha* e *G. max* submetida à deficiência hídrica em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Pg. 39

Tabela 8: Valores de índice de plasticidade fenotípica (IPF) calculados para alguns parâmetros fisiológicos essenciais entre os diferentes regimes de irrigação (100% e 30% de reposição de água evapotranspirada) e ambiente (A_C e A_{SC}). Pg. 40

Tabela 9: Valores de conectância global ($C_{g_{total}}$) das redes fotossintéticas $C_{g_{tot}}$ (fotoquímica) e $C_{g_{ge}}$ (trocas gasosas), e a relação entre o módulo fotoquímico e de trocas gasosas dada pela relação $ETR-A_{maxL}$ de plantas de *G. max* e *B. brizantha* nos dois ambientes de crescimento (A_C e A_{SC}). Pg. 43

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Influência da deficiência hídrica na fisiologia das plantas	14
1.2. Efeitos da deficiência hídrica na fotossíntese	15
1.3. Proposta teórica e sua relevância científica	19
1.4. Contexto experimental e conceitos básicos operacionais	21
2. Material e métodos	22
2.1. Influência do ruído ambiental sobre as respostas fisiológicas de plantas de <i>G. max</i> e <i>B. brizantha</i> sob deficiência hídrica	23
2.2. Parâmetros avaliados	24
2.2.1. Conteúdo relativo de água e integridade das biomembranas	24
2.2.2. Curvas A/C_i	24
2.2.3. Curvas $A/DFFF$	25
2.2.4. Fluorescência da clorofila <i>a</i> e índice de teor de clorofila	26
2.2.5. Recuperação da capacidade fotossintética	27
2.2.6. Estabilidade do Desenvolvimento	27
2.2.7. Variáveis de crescimento	28
2.3. Índice de plasticidade fenotípica	29
2.4. Análise estatística	29
2.5. Análise de redes (conectância global)	29
3. Resultados	32
3.1. Variabilidade dos ambientes	32
3.2. Conteúdo relativo de água e integridade das biomembranas	32
3.3. Parâmetros fotoquímicos	33
3.4. Curvas A/C_i	34
3.5. Curvas $A/DFFF$	35
3.6. Análise de crescimento	37
3.7. Simetria foliar	38
3.8. Recuperação da capacidade fotossintética	39
3.9. Índice de plasticidade fenotípica	40
3.10. Análise de componentes principais	41

3.11. Análise sistêmica (conectância global) das respostas fisiológicas	42
4. Discussão	43
4.1. Análise conectância global	51
5. Considerações finais	52
6. Referências bibliográficas	52
7. Anexo – Artigo científico	
A complexidade ambiental afeta o desempenho fisiológico de <i>Glycine max</i> em condições de deficiência hídrica	62

1. Introdução

O impacto causado por um determinado tipo de perturbação ambiental na performance da planta é o resultado da interação entre as plantas e o ambiente, funcionando num sistema controlado de acordo com a informação genética e com o estímulo ambiental (Chaves, 1991). Plantas em ambientes naturais encontram uma combinação de fatores de estresses decorrentes da variabilidade de diversos recursos ambientais (Chapin, 1991; Sultan et al., 1997). Particularmente a água tem sido considerada o principal fator que, de forma isolada ou combinada com outros fatores ambientais, limita a produtividade agrícola ao redor do mundo (Flexas et al, 2009; Murchie et al., 2008; Chaves and Oliveira, 2004).

Todavia, as respostas às alterações do ambiente de produção agrícola são variáveis entre as diferentes espécies cultivadas, especialmente no que se refere às diferenças entre plantas de metabolismo C3 e C4. As espécies de metabolismo fotossintético C4 são, em geral, mais eficientes no uso da água, o que lhes confere maior tolerância à deficiência hídrica, salinidade e temperaturas mais elevadas. Nesses ambientes com condições desfavoráveis, a reduzida ou insignificante fotorrespiração dessas plantas confere vantagem adaptativa em relação às plantas do tipo C3 (Sage & Kubien, 2007; Stepien & Klobus, 2005; Yoshimura et al., 2004; Ward et al., 1999). Por outro lado, segundo Sage e McKown (2006) as espécies C3 tendem a apresentar maior plasticidade fenotípica da fotossíntese do que espécies C4, o que deve contribuir para a maior restrição na distribuição geográfica e ecológica das plantas com metabolismo C4.

1.1. Influência da deficiência hídrica na fisiologia de plantas

A seca como fator de estresse ocorre quando pouca água está disponível em um estado termodinâmico apropriado. O termo “seca” significa um período sem precipitação apreciável durante o qual o conteúdo de água no solo é reduzido (Larcher, 2000), e quando as condições atmosféricas causam contínuas perdas de água por transpiração ou evaporação (Jaleel et al., 2009), de forma que as plantas fiquem perturbadas com a ausência de água.

Para Jaleel et al. (2009), o estresse hídrico é considerado uma perda moderada de água, que provoca o fechamento dos estômatos e a limitação das trocas gasosas. A dessecação é uma perda de água mais extensiva, que potencialmente pode levar a uma grande ruptura do metabolismo e da estrutura celular e eventualmente a uma interrupção das reações catalisadas por enzimas (Smirnoff, 1993; Jaleel et al., 2009). O estresse hídrico ainda é caracterizado pela

redução do conteúdo de água, decréscimo do potencial hídrico foliar e perda de turgor, menor expansão celular e, conseqüentemente, do crescimento. O estresse hídrico severo pode resultar em impedimento da fotossíntese, distúrbio metabólico e finalmente a morte da planta (Jaleel et al., 2009). Além disso, outros fatores como altas temperaturas, salinidade do solo, ataque de patógenos e também danos mecânicos, podem contribuir para a diferença de concentração de água nas plantas interferindo no seu desenvolvimento e reduzindo a sua produtividade (Larcher, 2000).

O estresse induzido por deficiência hídrica ocorre dependendo das condições que o ambiente proporciona à planta, variando em função da intensidade e duração da deficiência hídrica, da velocidade de imposição à falta de água e do estágio de desenvolvimento da planta em que a seca ocorre (Pinheiro & Chaves, 2011). Além disso, esses fatores podem ditar se os processos de mitigação associados à aclimação irão ocorrer ou não (Chaves et al., 2009). Respostas de aclimação geradas em plantas sob deficiência hídrica geralmente incluem aqueles relacionados à inibição do crescimento ou descarte de folhas (Khanssi et al. 2010), para que o consumo de água por esses tecidos seja reduzido, contribuindo com a manutenção do balanço hídrico, e favorecendo a assimilação de carbono (Chaves et al., 2009). Compostos osmorreguladores formados em resposta a uma desidratação lenta, também tem a função de proporcionar a manutenção da atividade metabólica. Essa manutenção ou aumento dos níveis de açúcares, durante a desidratação da folha, parece ser a consequência de uma regulação coordenada entre a síntese e a translocação da sacarose, contribuindo com o ajuste osmótico e possibilitando a manutenção do turgor em regiões meristemáticas (Chaves, 1991). Essas respostas eventualmente podem levar a uma restauração da homeostase celular e, portanto, a sobrevivência da planta sob estresse (Chaves et al., 2009).

1.2. Efeitos da deficiência hídrica na fotossíntese

As respostas da fotossíntese sob deficiência hídrica tem se tornado o objeto de estudos e debates por décadas, em particular, sobre quais são os fatores mais limitantes da fotossíntese (Lawlor e Cornic, 2002; Lawlor e Tezara, 2009; Flexas et al., 2009). No entanto, ainda existem algumas controvérsias em relação à importância e ao momento em que os principais parâmetros fisiológicos são responsáveis por limitar a fotossíntese (Pinheiro & Chaves, 2011).

Em níveis de desidratação em que o conteúdo relativo de água (CRA) está abaixo de 70%, a assimilação de carbono pode diminuir chegando próximo de zero sem nenhum

declínio significativo na capacidade fotossintética do mesófilo, sendo nesse caso, os estômatos os principais fatores limitantes da assimilação de carbono (Chaves, 1991). O decréscimo da difusão de CO₂ da atmosfera até o sítio de carboxilação é geralmente considerada a principal causa da redução da fotossíntese em condições de deficiência hídrica leve e moderada (Grassi & Magnani, 2005; Chaves et al., 2003, 2009; Pinheiro & Chaves, 2011), sendo que essa redução da difusão inclui interferências estomáticas e do mesófilo (Flexas et al., 2009). Os estômatos atuam na regulação da entrada de CO₂ (substrato essencial para a fotossíntese) na folha e na perda de vapor d'água para a atmosfera pela transpiração, promovido pelas alterações do turgor das células guarda. O controle de trocas gasosas entre folha e atmosfera pelos estômatos é essencial para a manutenção da atividade fotossintética e hidratação dos tecidos, de forma que o ajuste estomático possibilita o fornecimento de substrato para as reações bioquímicas da fotossíntese e impede a perda excessiva de água e consequente desidratação (Oliver et al., 2009; Blum, 2009). Contudo, a dinâmica de abertura e fechamento dos estômatos é heterogênea e pode levar a erros nas medidas de trocas gasosas (Mott & Buckley, 1998; Flexas et al., 2009). A heterogeneidade entre os estômatos de uma folha pode envolver alterações em nível espacial e temporal, e atualmente, já são conhecidos alguns fatores ambientais que influenciam o predomínio de uma condutância estomática irregular (ou "patchness"), entre eles estão incluídos as mudanças repentinas na intensidade de luz, deficiência hídrica e baixa umidade do ar (Mott & Buckley, 1998). Segundo Woodruff *et al.* (2010), a dinâmica estomática pode ser diretamente sensível ao déficit de pressão de vapor, sugerindo que o potencial hídrico da planta não é o único mecanismo que regula a condutância estomática em condições de boa disponibilidade hídrica. Em termos de controle, isso pode ser reconhecido como uma resposta de antecipação da planta frente às intempéries ambientais (Franks et al., 1997; Katul et al., 2009).

Parte da redução da fotossíntese pode ser atribuída aos efeitos não estomáticos em nível do cloroplasto, sendo o transporte de elétrons e a fotofosforilação os principais alvos da inibição (Sanda et al., 2011). Quando o decréscimo na condutância estomática é combinado com uma alta irradiância, as folhas estão sujeitas a uma quantidade excessiva de energia incidente quando comparados a quantidade disponível de CO₂ intercelular e, por isso, a taxa de produção de "energia redutora" pode sobrepôr a taxa de seu consumo pelo ciclo de Calvin. Como consequência, o excesso de energia absorvida pode ser destinado para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO apresentam o potencial de causar danos oxidativos no aparato fotoquímico, e assim contribuem para a redução da eficiência

fotoquímica; esse fenômeno é conhecido como fotoinibição (Baker, 2008; Sanda et al., 2011). Uma vez que há a dependência da fixação de CO_2 em relação à eficiência fotoquímica (geração de *ATP* e *NADPH*) e vice-versa (Miyake et al., 2009), qualquer tipo de estresse ou situação que reduz o consumo dos produtos fotoquímicos pela diminuição da eficiência de carboxilação, poderá gerar excesso de energia de excitação (Baker et al., 2004; Sarlikioti et al., 2010). Mesmo baixos valores de luz podem representar excesso de energia, visto que a relação entre luz e assimilação de CO_2 irá aumentar devido à redução da fotossíntese em condições de estresse (Demmig-Adams et al., 1992; Sanda et al., 2011). Sob essas circunstâncias, uma baixa regulação da fotossíntese ou até mesmo a fotoinibição, pode se tornar um poderoso mecanismo de defesa para as plantas (Pinheiro & Chaves, 2011, Sanda et al. 2011) contra os possíveis danos oxidativos.

Parte do excesso de energia absorvida pela folha é dissipada como calor, culminando com o acréscimo do coeficiente de extinção não-fotoquímico da fluorescência (*NPQ*). A dissipação termal envolve a atuação de pigmentos do ciclo da xantofila que estão acoplados ao complexo coletor de luz do aparato fotoquímico (Demmig-Adams et al., 2006, Sarlikioti et al. 2010). Quando o *NPQ* é insuficiente para lidar com esse excesso de energia, os drenos alternativos de elétrons, tais como a fotorrespiração e a reação de Mehler, também conhecida como ciclo água-água (Miyake, 2010), são ativados, os quais são determinantes para a manutenção da atividade fotossintética (Miyake et al., 2009, 2010; Lawlor e Tezara, 2009; Lawlor e Cornic, 2002). Esse tipo de resposta tem sido documentada principalmente para plantas C3, mas não para C4. Algumas evidências sugerem que existe igual ou até mesmo maior susceptibilidade de plantas C4 à deficiência hídrica (Ueno et al., 2005; Ghannoum, 2009; Carmo-Silva et al., 2010) em comparação com plantas C3, apesar do mecanismo concentrador de CO_2 das plantas C4. Segundo Ghannoum (2009), essa resposta poderia ser atribuída à uma capacidade limitada da fotorrespiração ou da reação de Mehler em atuar como dreno alternativo de elétrons para o excesso de energia redutora em plantas C4.

Altas temperaturas também podem afetar a atividade fotoquímica diretamente pela inativação do fotossistema II e desorganização estrutural dos tilacóides ou indiretamente pela redução da atividade do ciclo de Calvin (Zhang & Sharkey, 2009). Plantas submetidas à deficiência hídrica normalmente apresentam redução da transpiração e conseqüentemente uma redução da capacidade de dissipação de calor latente aumentando a temperatura da folha. A fixação de CO_2 é mediada pela atividade carboxilase da Rubisco, que com o aumento da temperatura tende a ser desfavorecida, uma vez que a enzima Rubisco ativase apresenta uma

grande sensibilidade com as mudanças de temperatura (Kumar et al., 2009). Além disso, em altas temperaturas, a relação entre as solubilidades do dióxido de carbono e oxigênio (CO_2/O_2) aumenta devido ao maior decréscimo na solubilidade do CO_2 (Berry et al., 1980; Jordan et al., 1984). Logo, a alta temperatura também afeta a fotossíntese pelo aumento na resistência do mesofilo foliar à passagem do CO_2 (Khairi et al., 1976), favorecendo a fotorrespiração.

Quando o aparato fotoquímico não opera de forma adequada, a capacidade de regeneração da ribulose bifosfato (RuBP) diminui, visto que a síntese de ATP e NADPH pode estar comprometido, levando a uma redução na fotossíntese potencial (Lawlor e Tezara, 2009; Pinheiro & Chaves, 2011). A atividade da Rubisco pode ser limitada pela redução de ATP e pela atividade da Rubisco ativase, uma chaperona molecular catalítica que remove os inibidores do sítio ativo da enzima. Lawlor e Tezara (2009) afirmam que inibidores, tais como os análogos da RuBP, se ligam ao sítio ativo da Rubisco, diminuindo a atividade da Rubisco ativase, especialmente quando a concentração de RuBP está sub-saturada com a deficiência hídrica (Giménez *et al.*, 1992; von Caemmerer, 2000). A restauração e regulação da Rubisco são mediadas pela Rubisco ativase e requer uma grande taxa ATP/ADP. Uma vez que a fosforilação pode ser reduzida sob deficiência hídrica, a atividade da Rubisco será comprometida (Lawlor e Tezara, 2009; Parry et al., 2002).

Embora as medidas de trocas gasosas (CO_2 e O_2) sejam importantes para determinar as taxas fotossintéticas, podem não ser eficientes para avaliar os efeitos deletérios nos cloroplastos, ocasionados pelas diversas formas de estresse abiótico. Uma alternativa às medidas de trocas gasosas é a avaliação da eficiência fotoquímica da fotossíntese, obtida por meio das diversas variáveis da fluorescência da clorofila *a*. Condições extremas de estresse ambiental podem afetar os eventos nos tilacóides, interferindo na eficiência da fotossíntese e inativando o fotossistema II (FSII) e a cadeia de transporte de elétrons, que daria origem ao ATP e NADPH (Krause & Weis, 1991; Sanda et al., 2011). O rendimento da fluorescência da clorofila revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que dirige a fotossíntese e fornece subsídios para estimar a inibição ou o dano no processo de transferência de elétrons do fotossistema II (Miyake et al., 2009). Além disso, é uma técnica rápida, não-destrutiva e sensível, constituindo importante avanço em estudos fisiológicos e em ecologia de plantas (Krause & Weis, 1991).

Considerando os recentes avanços em pesquisas e abordagens técnicas no estudo de ecofisiologia vegetal, poderia ser possível desenvolver um melhor entendimento sobre as

interações entre as variáveis fisiológicas e ambientais, que são primordiais para o estudo das relações hídricas, considerando a adaptação e resposta das plantas aos mais variados tipos de estresse (Pinheiro & Chaves, 2010).

1.3. Proposta teórica e sua relevância científica

O objetivo geral foi o de investigar o fenômeno da homeostase em plantas de metabolismo C3 e C4 submetidas à deficiência hídrica, utilizando para isto a abordagem do “Paradigma Sistêmico”. Essa abordagem permite a superação de certas limitações impostas pela abordagem cartesiana clássica, levando a uma nova interpretação de fenômenos fisiológicos com a possibilidade de desvendar mecanismos de controle subjacentes às respostas das plantas submetidas à perturbações ambientais potencialmente estressantes (Souza et al. 2009a).

Tal abordagem, utilizando como ferramenta a análise de redes formadas por interações entre parâmetros fisiológicos, tem sido aplicada em estudos de fisiologia vegetal com espécies cultivadas (Sato et al., 2010; Carli et al., 2009; Amzallag, 2000; Souza et al., 2004a, 2005a e b) e ecofisiologia de espécies tropicais arbóreas (Prado et al., 2004; Souza et al., 2005a, e 2009a), fornecendo importantes informações sobre padrões emergentes de resposta a variações ambientais que podem ser úteis para compreensão da regulação dos processos fisiológicos envolvidos, bem como para fornecer novos parâmetros para seleção de materiais mais tolerantes a diferentes tipos de restrições ambientais.

Embora a primeira tentativa de formalizar uma Teoria Geral de Sistemas tenha sido realizada nas décadas de 1950-60 pelo biólogo teórico Ludwig von Bertalanffy (von Bertalanffy, 1968 – *General System Theory*), apenas recentemente essa teoria vem sendo aplicada à biologia, especialmente à biologia molecular (Barabási e Oltvai, 2004; Voit et al., 2006) e, em particular a sistemas vegetais, mas ainda com grande ênfase em redes moleculares com foco nos processos de sinalização (Sweetlove e Fernie, 2005; Dietz et al., 2010). Nesse contexto, predominam os estudos de descrição de grandes redes de interações protéicas ou de regulação gênica (Lucas et al., 2011). De fato, ainda pouca atenção é dada a aspectos fundamentais referentes à organização propriamente dita de sistemas biológicos que pressupõe algum grau de robustez. Isso é, a capacidade de um sistema atuar sem falhas sob uma ampla faixa de condições ambientais (Lucas et al., 2011). Tradicionalmente, essa

característica também pode ser identificada como a “homeostase” do sistema (Souza e Oliveira, 2004).

Anteriormente, o pesquisador israelense G. Nissin Amzallag (Amzallag, 2001) propôs que os modelos estatísticos clássicos, baseados em testes de comparações de média, eram insuficientes para dar conta da grande complexidade de comportamentos que são subjacentes à manutenção da homeostase de plantas em diferentes condições internas (fases do desenvolvimento) e externas (variações ambientais). Amzallag sugeriu, e forneceu algumas evidências experimentais, que a homeostase de plantas era mantida por meio de alterações no padrão de organização de redes subjacentes aos níveis de organização sob a observação do pesquisador. Isso é, por trás da manutenção de certas características das plantas frente a mudanças (internas ou externas) havia um ajuste ou modulação do padrão de conexão entre os elementos do sistema.

A susceptibilidade de uma rede fisiológica às variações ambientais depende da força com que seus elementos estão conectados e do grau de acoplamento dessa rede ao ambiente (Souza et al., 2005b e 2009a). A força das ligações entre os elementos de uma rede é denominada de *conectância da rede* (Amzallag, 2001; Souza et al. 2004a). Elementos fortemente conectados entre si (com alta conectância) podem promover maior capacidade de controle à rede, uma vez que possibilitariam ao sistema implementar ajustes mais rápidos e mais “precisos” (Csermely, 2006; Souza et al., 2005a). Em geral, os sistemas biológicos apresentam capacidade de modular suas redes, isto é, podem transitar entre os diferentes padrões de conectância de acordo com o contexto, possibilitando a manutenção da capacidade de crescimento, defesa e reprodução sob uma grande diversidade de condições de variabilidade ambiental (Csermely, 2006; Souza et al., 2009a).

É importante destacar nesse contexto que a utilização dessa análise sistêmica tem sido particularmente importante exatamente quando testes estatísticos clássicos não captam diferenças significativas entre tratamentos (Amzallag, 2001; Sato et al., 2010). A ausência dessa significância implica que o sistema foi capaz de manter sua homeostase. Todavia, essa manutenção da capacidade homeostática não significa que o organismo não tenha sido afetado em absoluto. Pelo contrário, a manutenção da homeostase de sistemas biológicos está baseada em uma série de ajustes internos que permitem o sistema continuar operando dentro de seu equilíbrio dinâmico próprio (Amzallag, 2001; Souza et al., 2005a).

1.4. Contexto experimental e conceitos básicos operacionais

O contexto experimental desse trabalho foi baseado nos seguintes conceitos: homeostase, plasticidade fenotípica e estabilidade do desenvolvimento. Homeostase pode ser considerada como uma expressão geral que indica a tendência das condições internas de um organismo em se manter constante apesar das condições externas (Møller e Swaddler, 1997).

O conceito tradicional de plasticidade fenotípica foi definido por Gianoli e Valladares (2011) como sendo a capacidade de um determinado genótipo em gerar fenótipos alternativos sob diferentes condições ambientais ou estímulos. Essa definição, bastante geral, pode ser operacionalmente reduzida a um tipo comumente estudado de plasticidade que é a ‘plasticidade do desenvolvimento’, definida como as mudanças no desenvolvimento que seguem a percepção e integração da informação ambiental (Novoplansky, 2002). O estudo da plasticidade fenotípica deve considerar diferentes níveis hierárquicos de organização, uma vez que há uma continuidade de respostas entre esses níveis, isto é, os sinais ambientais percebidos no nível celular resultam em mudanças fisiológicas e de crescimento, podendo afetar características morfológicas da planta (Schlichting e Smith, 2002).

O terceiro conceito operacional chave deste trabalho é o de estabilidade do desenvolvimento. A estabilidade do desenvolvimento é baseada na habilidade dos organismos em minimizar perturbações aleatórias durante seu desenvolvimento, enquanto a instabilidade do desenvolvimento é freqüentemente usada como um meio de avaliar os efeitos das perturbações ambientais nos organismos (Freeman et al. 1993; Graham et al. 1993; Møller e Swaddler, 1997). Assim, estabilidade do desenvolvimento é a produção de um fenótipo pré-determinado geneticamente, sob um dado grupo de condições ambientais e genéticas específicas. Um dos indicadores do desenvolvimento estável em plantas é a simetria. Uma incapacidade individual para conter distúrbios aleatórios, de ordem genética ou ambiental, durante o desenvolvimento poderia ocasionar desvios na simetria do organismo ou em partes dele como, por exemplo, as folhas em plantas. Esses desvios são denominados de assimetria flutuante quando eles são não-direcionados e aleatórios (Palmer & Strobeck 1986; Møller & Swaddler 1997). Segundo Souza et al. (2005c), plantas que crescem sob deficiência hídrica exibem maior assimetria em folhas do que plantas que crescem com irrigação constante. Em geral, desvios simétricos aumentaram 80% em folhas desenvolvidas sob falta de água. Portanto, quanto mais simétrico um indivíduo, maior sua estabilidade do desenvolvimento, sucesso reprodutivo e maior taxa de sobrevivência (Freeman et al. 1993).

Dentro deste contexto de homeostase, plasticidade fenotípica e estabilidade do desenvolvimento, o trabalho foi desenvolvido em torno de um experimento, onde as espécies foram submetidas à deficiência hídrica em condições de maior e menor variabilidade ambiental, isto é, em ambiente controlado e semi-controlado. Assim, nesse experimento foi avaliada a influência do ruído ambiental (variações aleatórias de fatores físicos do ambiente, que não a falta de água) sobre as respostas à deficiência hídrica. Além disso, também foi avaliada a recuperação da capacidade fotossintética com a reidratação das plantas após o período de deficiência hídrica.

Nesse contexto teórico-experimental, pretende-se testar o seguinte conjunto de hipóteses:

- A modulação de redes fisiológicas apresenta forte relação com a manutenção da homeostase de plantas cultivadas, C3 ou C4, sob condições estressantes.
- Plantas de metabolismo C3 e C4, apesar de poderem apresentar diferentes níveis de tolerância a perturbações ambientais, devem possuir um mecanismo subjacente similar de regulação de redes em resposta ao estresse (aspecto qualitativo), variando apenas o grau de intensidade com que as interações de determinados pares de variáveis fisiológicas devem mudar (aspecto quantitativo).
- Plantas com maior grau de plasticidade fenotípica apresentam maior estabilidade do desenvolvimento em ambientes com maior variabilidade ambiental.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado com duas espécies de metabolismos fotossintéticos diferentes. A espécie de ciclo C3, *Glycine max* (L.) Merr. cv. Codetec 202 (Fabaceae), e a espécie de ciclo C4, *B. brizantha brizantha* cv. Marandú (Poaceae).

As plantas de ambas as espécies foram obtidas de sementes germinadas em condições de casa de vegetação em vasos contendo 12 kg de solo tipo argissolo vermelho/amarelo eutrófico de textura arenosa-média com substrato agrícola (casca de amendoim e de pinus triturados e torrados) na proporção 2:1 em condições de capacidade de campo, e o solo corrigido segundo necessidades apontadas em análise química, corrigindo a saturação de bases para 60%.

2.1. Influência do ruído ambiental sobre as respostas fisiológicas de plantas de *G. max* e *B. brizantha* sob deficiência hídrica

Ambas as espécies foram submetidas à deficiência hídrica em condições de maior e menor variabilidade ambiental, isto é, em ambiente controlado (câmara de crescimento) e um semi-controlado (casa de vegetação). O objetivo foi avaliar a influência do ruído ambiental (variações aleatórias de fatores físicos secundários do ambiente, que não a falta de água) sobre as respostas à deficiência hídrica.

Plantas das duas espécies foram submetidas a duas condições de irrigação, uma com 100% de reposição da água evapotranspirada e outra com 30% de reposição, durante 30 dias de cultivo. A reposição de água foi realizada por método gravimétrico, com pesagem diária dos vasos. A cada dia a água era repostada de acordo com os tratamentos, considerando a variação de peso do vaso de um dia para outro em função da evapotranspiração.

As plantas de *G. max* foram submetidas aos tratamentos de reposição de água quando o quarto trifólio estava totalmente expandido (fase fenológica V4), enquanto que as plantas de *B. brizantha* passaram por um corte de homogeneização realizado a 20 cm do solo antes de serem submetidas aos tratamentos, isto é, aproximadamente 50 dias após a germinação em condições de casa de vegetação.

O ambiente controlado (A_C) foi estabelecido em câmara de crescimento com controle de luz ($600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperatura dia/noite (30/23 °C), umidade (60%) e fotoper\u00edodo com 16 horas de luz. As varia\u00e7\u00f5es ambientais do A_C e do ambiente semi-controlado (A_{SC}) foram monitoradas diariamente a cada 10 minutos por um sistema HOBO (modelo H08-004-02, EUA) de coleta autom\u00e1tico de temperatura, luz e umidade. As medidas de todas as vari\u00e1veis fisiol\u00f3gicas foram realizadas ap\u00f3s 30 dias de cultivo das plantas em cada ambiente de crescimento e regime de irriga\u00e7\u00e3o.

Os tratamentos foram arranajados de forma inteiramente casualizada no esquema fatorial 2 x 2, dois regimes de irriga\u00e7\u00e3o e dois ambientes, totalizando 4 tratamentos para cada esp\u00e9cie. Para cada tratamento foram consideradas 7 repeti\u00e7\u00f5es (plantas).

2.2. Parâmetros avaliados

2.2.1. Conteúdo relativo de água e integridade das biomembranas

O conteúdo relativo de água (*CRA*) foi utilizado para avaliar o estado hídrico das plantas. O *CRA* é uma estimativa direta da porcentagem de água na folha e é calculado como (Larcher, 2000)

$$CRA = (M_f - M_s) / (M_{sat} - M_s) \times 100 (\%)$$

onde M_f corresponde à massa fresca da folha pesada imediatamente após a coleta; M_{sat} corresponde a massa da folha sob saturação de água, após imersão durante 12h em água destilada; e M_s corresponde a massa seca obtida após secagem das folhas em estufa a 60°C até obtenção de massa constante.

A integridade das biomembranas foi avaliada pelo extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) (adaptado de Matos *et al.*, 2010). Dez discos de tecidos foliares frescos foram coletados de folhas totalmente expandidas e de forma aleatória em cada repetição de todos os tratamentos. Em seguida, os discos, de peso seco conhecido, foram colocados em um recipiente plástico com 10 mL de água deionizada, foram então tampados e mantidos à temperatura de 25° C por 24 horas. Após a incubação, a condutividade do meio foi determinada (X_i) com o auxílio de um medidor portátil de condutividade elétrica (LTLutron, modelo CD-4301). Essa técnica permite avaliar a integridade das membranas celulares visto que quanto menor a condutividade elétrica da solução, menor é a quantidade de eletrólitos que extravasam das membranas indicando seu grau de integridade.

2.2.2. Curvas A/C_i

As curvas A/C_i foram realizadas variando-se a concentração de CO_2 do ar dentro da câmara de amostragem de um analisador de gases por infra-vermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA) entre 0 e 1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Long e Bernacchi, 2003). As medidas foram realizadas sob irradiância saturante de 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (definida pela curva $A/DFFF$) e déficit de pressão de vapor em torno de 1,5 kPa, mantida com um gerador de ponto de orvalho (modelo Li-610, Li-Cor) acoplado ao Li-6400XT; a temperatura da folha foi ajustada para 30 °C. As curvas foram ajustadas conforme modelo proposto por Monteiro e Prado (2006)

$$A = A_{maxCO_2} (1 - e^{-c(C_i - P_{comCO_2})}),$$

onde A é a assimilação de CO_2 momentânea, $A_{max\text{CO}_2}$ é o potencial fotossintético, e é a constante de Euler, c é a constante relativa à convexidade da curva, C_i concentração momentânea de CO_2 intercelular, $P_{com\text{CO}_2}$ é o ponto de compensação da fotossíntese ao CO_2 .

As variáveis derivadas das curvas A/C_i analisadas foram: potencial fotossintético ($A_{max\text{CO}_2}$); ponto de saturação da fotossíntese ao CO_2 ($P_{sat\text{CO}_2}$), que foi estimada calculando os valores do eixo x quando a A atingiu 90% de $A_{max\text{CO}_2}$; e limitação estomática relativa da fotossíntese (L_S), calculada segundo Farquhar e Sharkey (1982)

$$L_S = [(A' - A)/A] * 100,$$

onde A' é a assimilação de CO_2 quando C_i equivale a concentração atmosférica de CO_2 ($370 \pm 10 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e A é a assimilação de CO_2 quando a concentração de CO_2 na câmara de amostragem for similar a concentração atmosférica. Além disso, a fotorrespiração (F_R) e a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) foram calculadas conforme o modelo proposto para plantas de metabolismo C3 (Sharkey, 1988; Sharkey et al., 2007) e metabolismo C4 (von Caemmerer 2000), respectivamente, para *G. max* e *B. brizantha*.

2.2.3. Curvas $A/DFFF$

A fotossíntese em plantas pode ser descrita quantitativamente pelas curvas de $A/DFFF$ que discriminam alguns pontos: capacidade fotossintética (A_{maxL}); ponto de compensação da fotossíntese à luz (P_{comL}); ponto de saturação da fotossíntese à luz (P_{satL}) calculado quando A atinge 90% de A_{maxL} ; eficiência quântica aparente (EQA), correspondendo à inclinação da região linear inicial da curva $A/DFFF$; e respiração da folha (R_d) quando $DFFF = 0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores de condutância estomática (g_s) e transpiração (E) foram obtidos no ponto de saturação da fotossíntese à luz para cada espécie, regime de irrigação e ambiente de crescimento. A eficiência intrínseca do uso de água ($Eiua$) foi calculada como a relação entre o A_{maxL} e a condutância estomática (g_s).

Folhas sadias e totalmente expandidas foram submetidas a diferentes intensidades de $DFFF$, desde 2000 até $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 3 a 6 minutos, dependendo da velocidade de estabilização das leituras, sendo registradas as leituras ao final de cada etapa. Durante estas

medições, a concentração de CO₂ na câmara de amostragem do Li-6400XTR foi mantida em 380 µmol mol⁻¹, a temperatura da folha foi ajustada para 30 °C, e o déficit de pressão de vapor mantido em torno de 1,5 kPa com auxílio de um gerador de ponto de orvalho (modelo Li-610, Li-Cor) acoplado ao Li-6400XTR. A luz para as curvas foi fornecida com uma fonte de LEDs de emissão no espectro do vermelho, acoplada a câmara de amostragem do Li-6400XTR.

As curvas de resposta $A/DFFF$ foram ajustadas de acordo com a equação de Prado & Moraes (1997)

$$A = A_{maxL} (1 - e^{-c(DFFF - P_{comL})}),$$

onde A é a assimilação de CO₂ momentânea; A_{maxL} é capacidade fotossintética; $DFFF$ é a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos momentâneo; e P_{comL} é o ponto de compensação da fotossíntese à luz.

Todas as curvas A/C_i e $A/DFFF$ foram realizadas em sete plantas por tratamento em cada experimento das 9:00 as 14:00h.

2.2.4. Fluorescência da clorofila a e índice de teor de clorofila.

A avaliação da atividade fotoquímica, por meio da análise de fluorescência da clorofila a , foi realizada simultaneamente às curvas $A/DFFF$ com o fluorômetro de luz modulada (LI-6400-40) acoplado ao Li-6400XTR. Os parâmetros determinados foram: eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva ($\Delta F/F_m'$) do FSII, coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e não-fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] da fluorescência, e a taxa de transporte de elétrons ($ETR = DFFF * \Delta F/F_m' * 0,5 * 0,84$) (Bilger & Björkman, 1990). Os valores de F_m e F_v indicam, respectivamente, as fluorescências máxima e variável, determinadas após 30 minutos de adaptação ao escuro. F_m' e F_s são, respectivamente, as fluorescências máxima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, e F_0' representa a fluorescência basal após a excitação do FSI.

O dreno alternativo de elétrons (DAE) foi calculado como a relação entre a eficiência quântica efetiva do FSII no ponto de saturação da fotossíntese à luz ($\Delta F/F_m'$) e a eficiência quântica de fixação de CO₂ (ϕCO_2), conforme proposto por Ribeiro et al. (2003):

$$DAE = \frac{\Delta F / F_m'}{\phi CO_2}$$

ϕCO_2 foi calculado de acordo com Edwards & Baker (1993)

$$\phi CO_2 = \frac{(A_{maxL} + R_d)}{(P_{satL} \times 0.84)}$$

O índice de teor de clorofila (*ICC*) foi estimado por um medidor de teor de clorofila (CCM-200 Opti-Sciences, Tyngsboro, Massachusetts, USA) baseado na absorvância em comprimento de onda de 660 e 950 nm.

2.2.5. Recuperação da capacidade fotossintética

Após as determinações do estado hídrico das plantas, integridade das biomembranas e as análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, as plantas que permaneceram em regime de deficiência hídrica foram submetidas a um período de reidratação por 15 horas para analisarmos o grau de recuperação de A_{maxL} em relação às plantas bem irrigadas. Após as medidas de A_{maxL} , as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes e as folhas foram excisadas para as avaliações de crescimento e simetria.

2.2.6. Estabilidade do Desenvolvimento

Para a avaliação da estabilidade do desenvolvimento das plantas, foi realizada uma análise de simetria em três folhas de cada repetição usando-se um paquímetro digital (Electronic Digital Caliper, USA), medindo-se a largura dos lados esquerdo e direito de uma única folha, em relação à nervura central, na porção mediana da folha de *B. brizantha* e porções medianas dos folíolos de *G. max*. As medidas foram feitas nas porções de maior comprimento entre a nervura central e a borda foliar. Os desvios de simetria (d) foram calculados subtraindo-se as medidas do lado esquerdo e direito em cada espécie, *B. brizantha* (A – A') e *G. max* (A – A'; B – B'; C – C'; D – D'), conforme esquema a baixo (figura 1) em todas as três folhas totalmente expandidas de cinco plantas por tratamento.

Os valores das medidas de simetria foram transformados em seus logaritmos para remover o efeito da escala de tamanho sobre os resultados. O desvio foi recalculado a partir destes novos valores ($d = \log x - \log x'$). Para normalizar os dados foi utilizada a transformação Box-Cox, $d^* = (|d| + 0,00005 * 0,33)$ (Souza et al. 2005c). No total, foram amostradas 10 plantas e todas as folhas saudáveis e totalmente expandidas dos módulos desenvolvidos sob cada tratamento. Os desvios entre cada ambiente foram comparados com teste t ($p = 0,05$).

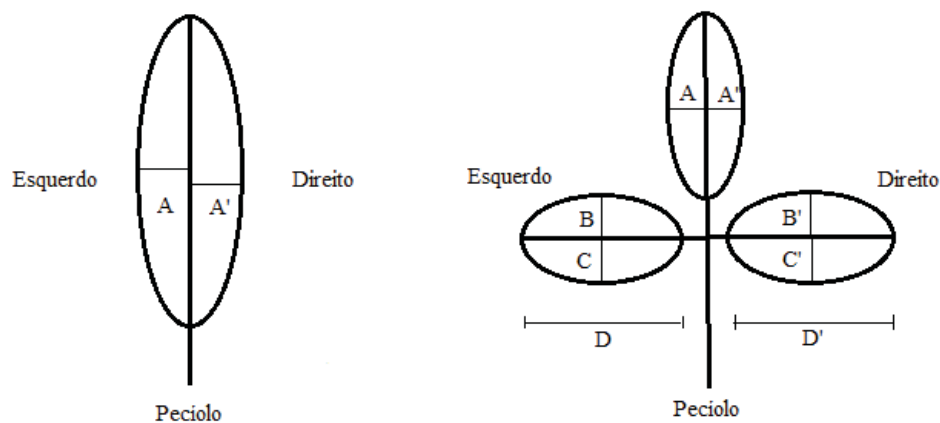


Figura 1: Esquema exemplificando a forma de coleta dos dados para o cálculo de simetria foliar em plantas de *B. brizantha* (esquerda) e *G. max* (direita), crescidas nas diferentes condições experimentais. As letras A, B, C e D representam os locais onde foram realizadas as medidas para as análises da simetria foliar (desvios entre os lados direito x' e esquerdo x).

2.2.7. Variáveis de crescimento

A área foliar total (AF) foi medida com um integrador portátil de área foliar (modelo LI-3000A, Li-Cor, USA), e a massa específica foliar (MEF) foi obtida pela relação entre a massa seca (MS_F) e a AF . Para a quantificação da massa seca (g), as folhas (MS_F), talos (MS_C) e raízes (MS_R) foram armazenados em sacos de papel, identificadas e mantidas em estufa sob uma temperatura constante de 70 °C até obtenção de massa constante.

2.3. Índice de plasticidade fenotípica

Os índices de plasticidade fenotípica (IPF), que variam de zero a um, foram calculados a partir dos valores médios para cada parâmetro fisiológico (ETR , A_{maxL} , R_d , EM_{MS} e MS_T) de acordo com Rozendaal et al. (2006) e Valladares et al. (2000):

$$IPF = (Média_{Max} - Média_{Min}) / Média_{Max}$$

2.4. Análise estatística dos resultados

Para as variáveis ambientais, foram calculados os valores médios e o coeficiente de variação de cada ambiente de crescimento. Os resultados de cada variável fisiológica foram analisados por meio de análise de variância (two-way ANOVA, $p = 0,05$), considerando o esquema fatorial para cada espécie, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

Além disso, foi realizada uma análise multivariada por componentes principais (PCA) na tentativa de separar os diferentes comportamentos observados, considerando-se a integração de todas as variáveis medidas.

2.5. Análise de redes (conectância global)

A base do modelo proposto, a partir de uma rede constituída por variáveis fotossintéticas, foi definida por Souza et al. (2005a, 2009a). Nesse trabalho foi agregado à rede fotossintética (construída a partir de medidas derivadas de curvas de resposta fotossintética à luz e ao CO_2 , e fluorescência da clorofila) e o módulo com parâmetros de crescimento (figura 2) associado, posteriormente, a medidas de simetria foliar. A relação entre fotossíntese e simetria foliar foi previamente estabelecida por Souza et al. (2005c). O modelo geral de construção das redes, baseado na conectância (força de ligação) entre elementos da rede, foi descrito por Amzallag (2001) e adaptado por Souza et al. (2004a) e é apresentado a seguir.

A conectância da rede modular representada na figura 2 foi estimada a partir da análise de conectância global (C_g), definida por Amzallag (2001), que avalia a força de relação entre as variáveis de uma rede. Um valor do coeficiente de correlação (r) é calculado para cada par de variáveis de interesse na rede, método inspirado na análise de trilha, “path analysis” (Souza et al., 2009a). Para obter a intensidade de relação além de sua significância, foi realizada uma transformação-z:

$$z = 0,5 \times \ln \left[\frac{(1+r)}{(1-r)} \right]$$

Este valor corresponde ao grau de conectância entre um par de elementos da rede, sendo calculado entre as variáveis fisiológicas que compõe cada módulo da rede (Figura 2). C_g é, então, calculada pela média dos valores z de cada par de elementos da rede. Assim, a rede foi analisada considerando os seguintes parâmetros: i) os valores de z das ligações entre os módulos ii) conectância global do módulo de desenvolvimento (C_{g_d}), da rede fotoquímica ($C_{g_{fot}}$), e da rede de trocas gasosas ($C_{g_{ge}}$); e iii) conectância global da rede inteira ($C_{g_{total}}$ = média dos valores de C_g de todos os módulos avaliados) (Figura 2). Os cálculos de correlação de Pearson entre os pares de parâmetros e os cálculos de C_g foram implementados no programa Ecograph, desenvolvido para esse fim em nosso laboratório.

Nesse trabalho, não foi incluída a análise da rede de desenvolvimento (C_{g_d}) (Figura 2), pois os resultados foram inconclusivos e pouco significativos. Futuramente, isso merecerá uma reavaliação sobre sua pertinência no modelo de redes fisiológicas como um todo.

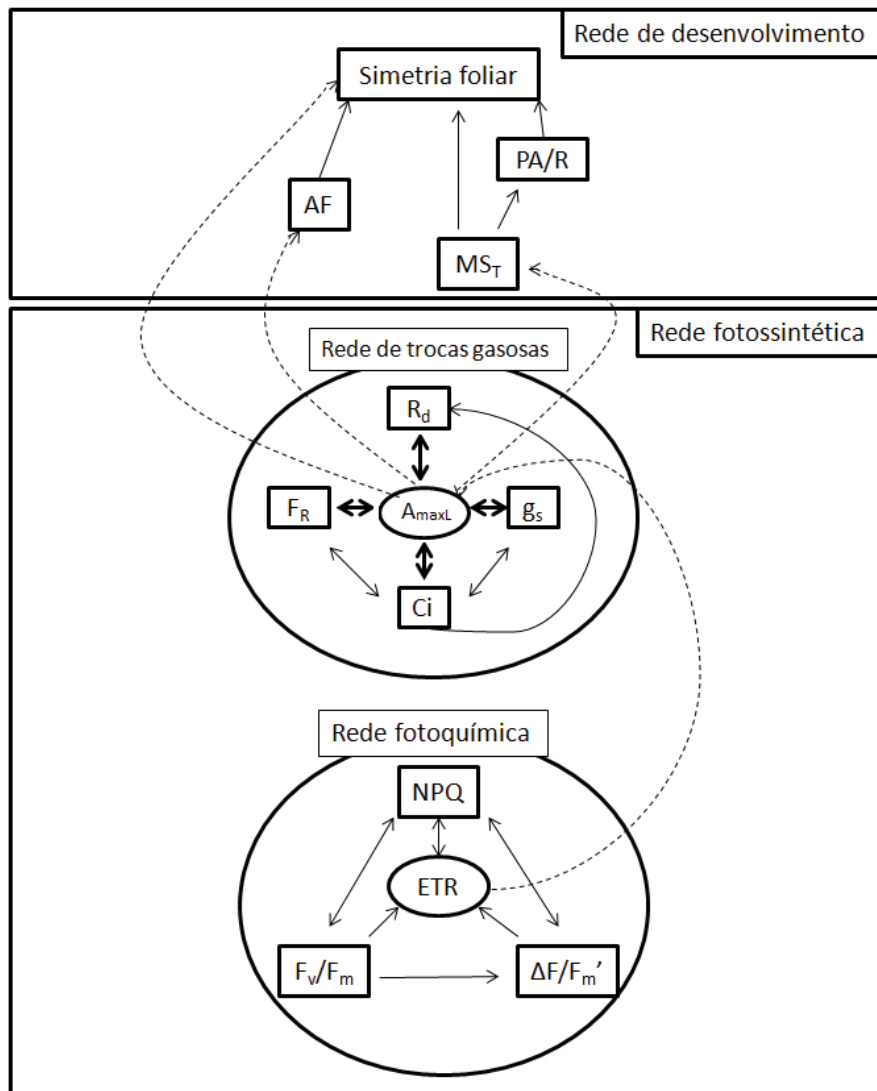


Figura 2: Representação esquemática da rede de relações entre variáveis fisiológicas a ser considerada nesse estudo. As setas indicam as correlações consideradas entre pares de variáveis dentro e entre módulos. A rede é constituída por três módulos, sendo dois relativos à fotossíntese (rede fotoquímica e rede das trocas gasosas), e um módulo (topo) relacionado ao desenvolvimento da planta, apresentando variáveis de crescimento e de simetria foliar, que representam o estado da estabilidade do desenvolvimento. MS_T = massa seca total. AF = área específica foliar. PA/R = relação entre a massa seca da parte aérea e a da raiz. Os três módulos estão relacionados por ligações específicas entre elementos de cada módulo. Os módulos de fotossíntese estão conectados pela relação entre a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e a capacidade fotossintética (A_{maxL}) segundo Souza et al., 2008). O módulo de desenvolvimento está conectado ao módulo da rede de trocas gasosas pelas relações entre A_{maxL} e MS_T , A_{maxL} e AF , e A_{maxL} e a Simetria foliar. R_d = respiração no escuro, F_R = fotorrespiração, g_s = condutância estomática, C_i = concentração intercelular de CO_2 , NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência, F_v/F_m = eficiência quântica potencial do fotossistema II, $\Delta F/F_m'$ = eficiência quântica efetiva do fotossistema II.

3. Resultados

3.1. Variabilidade dos ambientes

Apesar de as médias de irradiância diária ($DFFF_{dia}$) e da temperatura (T) terem sido aproximadamente as mesmas nos dois ambientes (Tabela 1), o coeficiente de variação (CV) dos fatores ambientais medidos foi relativamente baixo em A_C indicando que a variabilidade ambiental foi reduzida, quando comparada ao A_{SC} . Em A_C a $DFFF_{dia}$ não apresentou variabilidade, visto que a fonte de luz da câmara de crescimento fornece iluminação constante ao longo do fotoperíodo. Os valores médios da umidade relativa (UR) foram relativamente maiores em A_{SC} , apresentando um CV superior quando comparados ao A_C (tabela 1).

Tabela 1: Valores médios e coeficiente de variação (CV) das condições ambientais da câmara de crescimento (A_C) e da casa de vegetação (A_{SC}), onde as espécies foram cultivadas por trinta dias. Considerando os seguintes parâmetros em cada período do dia: $DFFF_{dia}$, irradiância diária ($\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$); T , temperatura ($^{\circ}\text{C}$); UR , umidade relativa do ar (%).

	Variabilidade Ambiental					
	A_C			A_{SC}		
	$DFFF_{dia}$ - CV	T - CV	UR - CV	$DFFF_{dia}$ - CV	T - CV	UR - CV
Dia	30,2 - 0	33 - 5	40 - 14	32,1 - 50	33 - 18	50 - 42
Noite	-	23 - 3	70 - 10	-	23 - 13	88 - 13

3.2. Conteúdo relativo de água e integridade das biomembranas

Ambas as espécies reduziram o CRA quando foram mantidas sob deficiência hídrica (tabela 2), no entanto esse efeito foi maior no A_{SC} com redução de 32% em *G. max* e 22% em *B. brizantha*, enquanto que em ambiente A_C a redução foi de 10% em *G. max* e 17% em *B. brizantha*. O extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}), que é avaliado pelo vazamento de eletrólitos celulares em consequência dos danos na membrana, não apresentou variações significativas quando plantas de *G. max* foram submetidas à deficiência hídrica. Por outro lado, quando *B. brizantha* foi sujeita a mesma condição de irrigação, o EM_{MS} aumentou 60% quando mantidas em ambiente A_C , enquanto que no ambiente A_{SC} esse aumento foi de 50%. Notavelmente, as plantas de *B. brizantha* aumentaram os valores de EM_{MS} de forma significativa quando foram mantidas em A_C , enquanto que em *G. max* o aumento foi observado no ambiente com maior variação (A_{SC}).

Tabela 2: Valores médios de extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) e conteúdo relativo de água (CRA) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água em cada espécie; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes em cada espécie.

	Estado Hídrico							
	<i>G. max</i>				<i>B. brizantha</i>			
	100%		30%		100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
EM_{MS} (mS/g)	0,55 ^{Ab}	5,19 ^{Aa}	1,23 ^{Ab}	5,69 ^{Aa}	9,43 ^{Ba}	3,89 ^{Bb}	15,12 ^{Aa}	5,82 ^{Ab}
CRA (%)	87 ^{Ab}	92 ^{Aa}	79 ^{Ba}	63 ^{Bb}	95 ^{Aa}	95 ^{Aa}	78 ^{Ba}	73 ^{Ba}

3.3. Parâmetros fotoquímicos

Analisando os dados baseados na análise de fluorescência da clorofila *a* obtidos no ponto de saturação à luz para cada tratamento e ambiente (tabela 3), os valores de eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) não apresentaram variações significativas quando ambas as espécies foram submetidas à deficiência hídrica. E, além disso, as plantas de *G. max* que foram submetidas à deficiência hídrica em A_{SC} apresentaram um aumento significativo da eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_m'$) ao passo que o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) foi reduzido, enquanto a taxa de transporte de elétrons (ETR) permaneceu estável. O dreno alternativo de elétrons (DAE) de *G. max* aumentou nas plantas sob deficiência hídrica dos dois ambientes, sobretudo no A_{SC} onde os valores de DAE dobraram. Já em plantas de *B. brizantha*, a deficiência hídrica afetou diretamente o ETR , que reduziu significativamente no ambiente A_C e A_{SC} (22% e 30%, respectivamente). Por outro lado, os valores de DAE das plantas de *B. brizantha* foram maiores quando mantidas em A_{SC} , apesar de não terem apresentado alterações significativas frente à deficiência hídrica nos dois ambientes. Além disso, observamos que as duas espécies aumentaram o índice de teor de clorofila (ICC) sob deficiência hídrica (tabela 3), no entanto o ICC foi maior quando as plantas de *G. max* foram mantidas em A_{SC} , enquanto que em *B. brizantha* os valores foram maiores quando as plantas estavam em A_C .

Tabela 3: Valores médios da eficiência quântica potencial e efetiva do FSII (F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, respectivamente), coeficiente de extinção fotoquímico e não fotoquímico (qP e NPQ , respectivamente), taxa de transporte de elétrons (ETR), dreno alternativo de elétrons (DAE), e índice de teor de clorofila (ICC) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água em cada espécie; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes em cada espécie.

	Fluorescência Cl_a							
	<i>G. max</i>				<i>B. brizantha</i>			
	100%		30%		100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
F_v/F_m	0,731 ^{Aa}	0,788 ^{Aa}	0,745 ^{Ab}	0,817 ^{Aa}	0,793 ^{Aa}	0,783 ^{Aa}	0,788 ^{Aa}	0,786 ^{Aa}
$\Delta F/F_m'$	0,302 ^{Aa}	0,273 ^{Ba}	0,388 ^{Aa}	0,404 ^{Aa}	0,177 ^{Aa}	0,196 ^{Aa}	0,185 ^{Aa}	0,208 ^{Aa}
qP	0,657 ^{Aa}	0,596 ^{Aa}	0,830 ^{Aa}	0,760 ^{Aa}	0,445 ^{Ab}	0,572 ^{Aa}	0,472 ^{Ab}	0,565 ^{Aa}
NPQ	1,65 ^{Ab}	2,07 ^{Aa}	1,63 ^{Aa}	1,70 ^{Ba}	2,26 ^{Ab}	3,15 ^{Aa}	2,40 ^{Ab}	3,10 ^{Aa}
ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	63 ^{Ab}	90 ^{Aa}	71 ^{Ab}	87 ^{Aa}	76 ^{Aa}	65 ^{Aa}	59 ^{Ba}	45 ^{Bb}
DAE	14,5 ^{Ba}	10,7 ^{Ba}	18,5 ^{Aa}	21,8 ^{Ab}	7,1 ^{Ab}	8,8 ^{Aa}	8,5 ^{Ab}	12,4 ^{Aa}
ICC	11 ^{Bb}	17 ^{Ba}	19 ^{Ab}	37 ^{Aa}	23 ^{Ba}	17 ^{Bb}	38 ^{Aa}	36 ^{Aa}

3.4. Curva A/C_i

Nos dados obtidos da curva A/C_i (tabela 4), as plantas de *G. max* e *B. brizantha*, que foram mantidas em ambientes diferentes, apresentaram comportamentos distintos na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}). As duas espécies apresentaram uma manutenção de V_{cmax} quando foram submetidas a deficiência hídrica no A_C . Por outro lado, as plantas de *G. max* que foram mantidas no A_{SC} apresentaram decréscimos significativos de V_{cmax} sob deficiência hídrica (27%), enquanto que em *B. brizantha* essa redução foi de 52% no mesmo ambiente e regime de irrigação. Além disso, o potencial fotossintético (A_{maxCO_2}) e o ponto de saturação da fotossíntese ao CO_2 (P_{satCO_2}) reduziram quando as plantas de *G. max* foram submetidas à deficiência hídrica mas, principalmente, em A_{SC} . Por outro lado, o ponto de compensação da fotossíntese ao CO_2 (P_{comCO_2}) e a limitação estomática relativa da fotossíntese (L_S) em plantas de *G. max* não apresentaram variações significativas quanto ao tipo de irrigação e ambiente de crescimento, embora o L_S tendesse a aumentar sob deficiência

hídrica quando mantidas em A_C (30%). Já em plantas de *B. brizantha* sob deficiência hídrica, observamos uma redução de A_{maxCO_2} somente quando foram mantidas em ambiente A_{SC} , enquanto que a L_S aumentou e o P_{satCO_2} e P_{comCO_2} permaneceram estáveis no mesmo ambiente e regime de irrigação. Por outro lado, as plantas de *B. brizantha* sob deficiência hídrica do A_C aumentaram de forma significativa os valores de P_{satCO_2} sob deficiência hídrica (86%) assim como o P_{comCO_2} que aumentou mais de 2 vezes, enquanto a L_S dobrou no mesmo ambiente de crescimento (tabela 4).

Tabela 4: Valores médios do potencial fotossintético (A_{maxCO_2}), pontos de compensação e saturação ao CO_2 (P_{comCO_2} e P_{satCO_2} , respectivamente), limitação estomática relativa da fotossíntese (L_S) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água em cada espécie; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes em cada espécie.

	Curva A/Ci							
	<i>G. max</i>				<i>B. brizantha</i>			
	100%		30%		100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
A_{maxCO_2} ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	22,8 ^{Aa}	18,6 ^{Ab}	13,8 ^{Ba}	6,8 ^{Bb}	22,2 ^{Aa}	21,7 ^{Aa}	20,4 ^{Aa}	10,4 ^{Bb}
P_{comCO_2} ($\mu mol mol^{-1}$)	81 ^{Aa}	70 ^{Aa}	78 ^{Aa}	88 ^{Aa}	16 ^{Ba}	4 ^{Aa}	43 ^{Aa}	7 ^{Ab}
P_{satCO_2} ($\mu mol mol^{-1}$)	697 ^{Aa}	512 ^{Ab}	462 ^{Ba}	133 ^{Bb}	192 ^{Ba}	57 ^{Ab}	358 ^{Aa}	52 ^{Ab}
L_S (%)	23 ^{Aa}	28 ^{Aa}	30 ^{Aa}	28 ^{Aa}	19 ^{Ba}	9 ^{Bb}	46 ^{Aa}	19 ^{Ab}
V_{cmax} ($\mu mol m^{-2} s^{-1}$)	78 ^{Aa}	84 ^{Aa}	63 ^{Aa}	61 ^{Ba}	25 ^{Aa}	21 ^{Aa}	25 ^{Aa}	10 ^{Bb}

3.5. Curva A/DFFF

De acordo com os dados obtidos no ponto de saturação à luz para cada tratamento (tabela 5), ambas as espécies submetidas à deficiência hídrica nos dois ambientes apresentaram um aumento na eficiência intrínseca do uso de água ($Eiua$), ao passo que reduziram a eficiência quântica aparente (EQA), capacidade fotossintética (A_{maxL}), ponto de saturação da fotossíntese à luz (P_{satL}), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e,

particularmente em *G. max*, a fotorrespiração (F_R). As plantas de *B. brizantha* submetidas à deficiência hídrica no A_C aumentaram de forma significativa os valores de fotorrespiração (F_R) (tabela 5), embora os valores fossem muito baixos nos dois tipos ambientais, como é esperado para plantas de metabolismo C4 em comparação com plantas C3.

A variabilidade ambiental, influenciou as respostas dos parâmetros da curva $A/DFFF$ descritos acima. Comparando-se com o ambiente A_C , o ambiente com maior variabilidade (A_{SC}) propiciou a redução de todos os parâmetros da curva $A/DFFF$ avaliados para *B. brizantha*, com exceção de *Eiua* que aumentou nesse ambiente. Em plantas de *G. max* foi observado um aumento de EQA , R_d , A_{maxL} , P_{sat} e *Eiua*, com exceção de E que se manteve constante, e g_s que reduziu em plantas do A_{SC} (tabela 5).

Tabela 5: Valores médios de eficiência quântica aparente (EQA), respiração no escuro (R_d), fotorrespiração (F_R), capacidade fotossintética (A_{maxL}), pontos de compensação e saturação da fotossíntese à luz (P_{com} e P_{sat} , respectivamente), transpiração (E), eficiência intrínseca do uso da água (*Eiua*), e dreno alternativo de elétrons (DAE) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapontranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água em cada espécie; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes em cada espécie.

	Curva $A/DFFF$							
	<i>G. max</i>				<i>B. brizantha</i>			
	100%		30%		100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
EQA	0,049 ^{Ab}	0,064 ^{Aa}	0,035 ^{Bb}	0,050 ^{Ba}	0,060 ^{Aa}	0,043 ^{Ab}	0,051 ^{Ba}	0,026 ^{Bb}
R_d ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2,09 ^{Aa}	2,28 ^{Aa}	1,05 ^{Bb}	2,07 ^{Aa}	2,82 ^{Aa}	1,23 ^{Ab}	1,72 ^{Ba}	0,86 ^{Ab}
F_R ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,25 ^{Ab}	5,25 ^{Aa}	2,04 ^{Bb}	3,40 ^{Ba}	0,17 ^{Ba}	0,07 ^{Aa}	0,37 ^{Aa}	0,08 ^{Ab}
A_{maxL} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	10,1 ^{Ab}	17,3 ^{Aa}	5,6 ^{Bb}	10,9 ^{Ba}	21,6 ^{Aa}	14,0 ^{Ab}	12,1 ^{Ba}	6,8 ^{Bb}
P_{comL} ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	39,2 ^{Aa}	32,4 ^{Aa}	29,2 ^{Aa}	39,6 ^{Aa}	43,0 ^{Aa}	24,6 ^{Ab}	31,1 ^{Ba}	27,9 ^{Aa}
P_{satL} ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	483 ^{Ab}	633 ^{Aa}	315,6 ^{Bb}	496,9 ^{Ba}	874,5 ^{Aa}	563,2 ^{Ab}	492,5 ^{Ba}	381,9 ^{Ba}
g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,218 ^{Aa}	0,147 ^{Ab}	0,054 ^{Ba}	0,052 ^{Ba}	0,200 ^{Aa}	0,059 ^{Ab}	0,093 ^{Ba}	0,024 ^{Bb}
E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,47 ^{Aa}	3,45 ^{Aa}	0,95 ^{Ba}	1,44 ^{Ba}	3,45 ^{Aa}	1,87 ^{Ab}	1,62 ^{Ba}	0,80 ^{Bb}
<i>Eiua</i> ($\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol H}_2\text{O}$)	47 ^{Bb}	120 ^{Ba}	93 ^{Ab}	188 ^{Aa}	111 ^{Bb}	246 ^{Ba}	131 ^{Ab}	284 ^{Aa}

Enquanto isso, a deficiência hídrica também reduziu os valores de respiração no escuro (R_d) (tabela 5), mas somente quando ambas as espécies foram mantidas em ambiente A_C , bem como os valores de ponto de compensação da fotossíntese à luz (P_{comL}) em *B. brizantha*. Observamos também que a R_d foi maior em plantas de *G. max* em ambiente A_{SC} em comparação ao ambiente A_C , sobretudo em plantas sob deficiência hídrica, onde os valores dobraram.

3.6. Análise de crescimento

De acordo com os dados de crescimento, a deficiência hídrica reduziu a massa seca das plantas como um todo. Em plantas de *G. max* do A_{SC} , os valores de massa seca decaíram 60% e 52% em plantas (bem irrigadas e sob deficiência hídrica, respectivamente) comparadas ao A_C . Já em *B. brizantha*, o A_{SC} provocou reduções de 73% (para ambos os regimes de irrigação) em relação ao A_C , nos mesmos parâmetros avaliados. Por outro lado, embora a deficiência hídrica tenha reduzido a área foliar (AF), as espécies responderam de forma diferente conforme o ambiente. As plantas de *G. max* reduziram a AF quando mantidas em A_C , enquanto que as plantas de *B. brizantha* aumentaram este parâmetro no mesmo ambiente. Esses resultados contribuíram para o aumento da massa específica foliar (MEF) em *G. max* (tabela 6), que foi em média 5 vezes maior em A_C , enquanto que em *B. brizantha* esse mesmo parâmetro reduziu 13% em plantas bem irrigadas na mesma condição ambiental. Além disso, a deficiência hídrica reduziu de forma significativa a MEF somente em plantas de *G. max* do A_C .

Tabela 6: Valores médios de massa seca da raiz (MS_R), massa seca foliar (MS_F), massa seca do caule (MS_C), massa seca total (MS_T), relação parte aérea raiz (PA/R), índice de área foliar (AF) e massa específica foliar (MEF) em plantas de *G. max* e *B. brizantha* submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água em cada espécie; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes em cada espécie.

	Crescimento							
	<i>G. max</i>				<i>B. brizantha</i>			
	100%		30%		100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
MS_R (g)	59 ^{Aa}	22 ^{Ab}	12 ^{Ba}	4 ^{Ba}	454 ^{Aa}	100 ^{Ab}	154 ^{Ba}	31 ^{Bb}
MS_F (g)	59 ^{Aa}	21 ^{Ab}	16 ^{Ba}	7 ^{Ba}	36 ^{Aa}	25 ^{Ab}	16 ^{Ba}	9 ^{Bb}
MS_C (g)	62 ^{Aa}	29 ^{Ab}	13 ^{Ba}	8 ^{Ba}	52 ^{Aa}	23 ^{Ab}	13 ^{Ba}	7 ^{Bb}
MS_T (g)	180 ^{Aa}	72 ^{Ab}	41 ^{Ba}	19 ^{Ba}	543 ^{Aa}	147 ^{Ab}	183 ^{Ba}	48 ^{Bb}
PA/R	1,9 ^{Aa}	2,4 ^{Ba}	2,5 ^{Ab}	3,7 ^{Aa}	0,2 ^{Ab}	0,5 ^{Aa}	0,2 ^{Ab}	0,5 ^{Aa}
AF (m^2)	0,21 ^{Ab}	0,5 ^{Aa}	0,08 ^{Bb}	0,18 ^{Ba}	0,78 ^{Aa}	0,46 ^{Ab}	0,32 ^{Ba}	0,18 ^{Bb}
MEF ($g\ m^{-2}$)	272 ^{Aa}	43 ^{Ab}	190 ^{Ba}	41 ^{Ab}	46 ^{Ab}	53 ^{Aa}	49 ^{Aa}	49 ^{Aa}

A deficiência hídrica provocou um aumento nos valores da relação parte aérea/raiz (PA/R) somente em plantas de *G. max* do A_{SC} . Por outro lado, embora o regime de irrigação não tenha afetado a PA/R em *B. brizantha*, no A_{SC} foi observado um aumento significativo nos valores desse parâmetro (150%).

3.7. Simetria foliar

A estabilidade do desenvolvimento, avaliada pelo desvio da simetria foliar, apresentou variações significativas em ambas às espécies que foram submetidas à deficiência hídrica (tabela 7). Sendo que em plantas de *B. brizantha* o desvio aumentou 48% em A_C , enquanto que em plantas mantidas em A_{SC} o aumento foi de 13% na mesma condição hídrica. O mesmo efeito foi encontrado em plantas de *G. max* do A_C , onde a deficiência hídrica aumentou o desvio em 30% e 20% na porção B e D da folha, respectivamente.

Tabela 7: Diferenças entre os desvios de simetria nas diferentes partes de folhas de *B. brizantha* e *G. max* submetida à deficiência hídrica em ambiente de maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos hídricos em cada espécie; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes em cada espécie.

Simetria – <i>B. brizantha</i>		
	A_C	A_{SC}
A	$0,27 \pm 0,23$ (irr) ^{Bb}	$0,34 \pm 0,08$ (irr) ^{Ba}
	$0,40 \pm 0,27$ (dh) ^{Aa}	$0,38 \pm 0,06$ (dh) ^{Aa}
Simetria – <i>G. max</i>		
	A_C	A_{SC}
A	$0,25 \pm 0,09$ (irr) ^{Aa}	$0,26 \pm 0,05$ (irr) ^{Aa}
	$0,25 \pm 0,08$ (dh) ^{Aa}	$0,27 \pm 0,08$ (dh) ^{Aa}
B	$0,24 \pm 0,06$ (irr) ^{Ba}	$0,22 \pm 0,08$ (irr) ^{Aa}
	$0,31 \pm 0,07$ (dh) ^{Aa}	$0,24 \pm 0,08$ (dh) ^{Ab}
C	$0,29 \pm 0,05$ (irr) ^{Aa}	$0,22 \pm 0,08$ (irr) ^{Ab}
	$0,26 \pm 0,09$ (dh) ^{Aa}	$0,23 \pm 0,06$ (dh) ^{Aa}
D	$0,22 \pm 0,09$ (irr) ^{Ba}	$0,20 \pm 0,06$ (irr) ^{Aa}
	$0,26 \pm 0,07$ (dh) ^{Aa}	$0,20 \pm 0,05$ (dh) ^{Ab}

3.8. Recuperação da capacidade fotossintética

As plantas que permaneceram em regime de deficiência hídrica foram submetidas a um período de reidratação por 15 horas para analisarmos o grau de recuperação da capacidade fotossintética. Foi observado que a reidratação propiciou a recuperação total A_{maxL} das duas espécies (figura 3), independente da condição ambiental que foram mantidas.

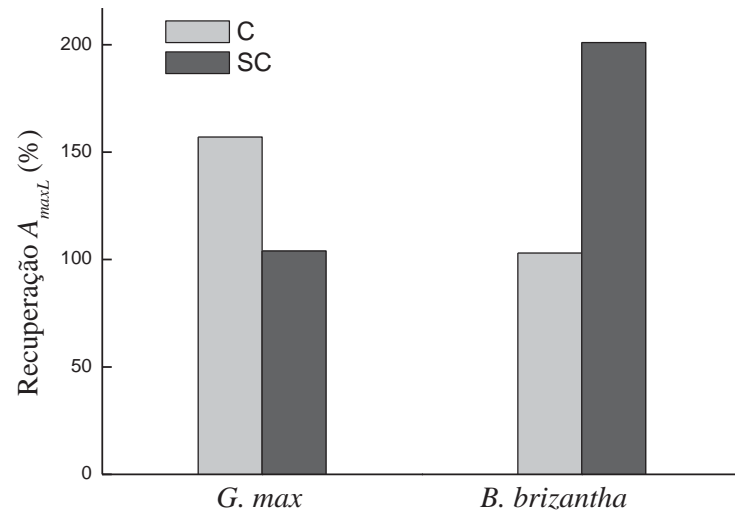


Figura 3: Porcentagem de recuperação da capacidade fotossintética (A_{maxL}) de plantas de *G. max* e *B. brizantha* sob deficiência hídrica após um período de 15 horas de reidratação. A recuperação foi estimada em relação aos valores de A_{maxL} de plantas bem irrigadas (100% de reposição hídrica). Colunas cinzas representam a porcentagem de recuperação no A_C , e colunas pretas representam a porcentagem de recuperação em A_{SC} para *G. max* e *B. brizantha*.

3.9. Índice de plasticidade fenotípica

A partir da análise de plasticidade fenotípica de algumas características marcantes das espécies estudadas, nossos resultados mostram que, apesar de *G. max* e *B. brizantha* apresentarem variações no *IPF* de ETR , R_d e EM_{MS} , a plasticidade fenotípica de A_{maxL} e MS_T foram similares (tabela 8).

Tabela 8: Valores de índice de plasticidade fenotípica (*IPF*) calculados para alguns parâmetros fisiológicos essenciais entre os diferentes regimes de irrigação (100% e 30% de reposição de água evapotranspirada) e ambiente (A_C e A_{SC}), de acordo com Rozendaal et al. (2006) e Valladares et al. (2000): $IPF = (méd\grave{a} \text{ m}\acute{a}x\text{ima} - méd\grave{a} \text{ m}\acute{i}n\text{ima}) / (méd\grave{a} \text{ m}\acute{a}x\text{ima})$.

<i>IPF</i>	<i>G. max</i>	<i>B. brizantha</i>
ETR	0.29	0.41
A_{maxL}	0.67	0.68
R_d	0.53	0.69
EM_{MS}	0.90	0.74
MS_T	0.89	0.91

3.10. Análise de componentes principais

Análise multivariada por componentes principais (PCA) apontou diferentes padrões de respostas das duas espécies às diferentes condições de crescimento as quais foram expostas (Figura 4). A PCA foi realizada levando em conta todos os parâmetros fisiológicos analisados em cada condição ambiental. Considerando dois componentes principais (PC1 e PC2), a PCA explicou 57,4% da variação total dos dados, permitindo a observação de 5 grupos (Figura 4). O PC1 explicou 32,7% da variação total dos dados originais, de forma que as variáveis que mais contribuíram para a separação dos grupos foram: MS_R (0,287), MS_T (0,285), DAE (0,284) e AF (0,284). Já o PC2 explicou 24,6% da variação total dos dados, e as variáveis que contribuíram para a formação dos grupos foram: P_{satCO_2} (0,298), V_{cmax} (0,259), P_{comCO_2} (0,257), $EiUA$ (0,256) e EQA (0,239). Dessa forma, para a separação entre os grupos observados ao longo do PC1 predominaram as variações em parâmetros de crescimento, enquanto que na separação dos grupos ao longo do PC2 os parâmetros de fotossíntese foram mais predominantes.

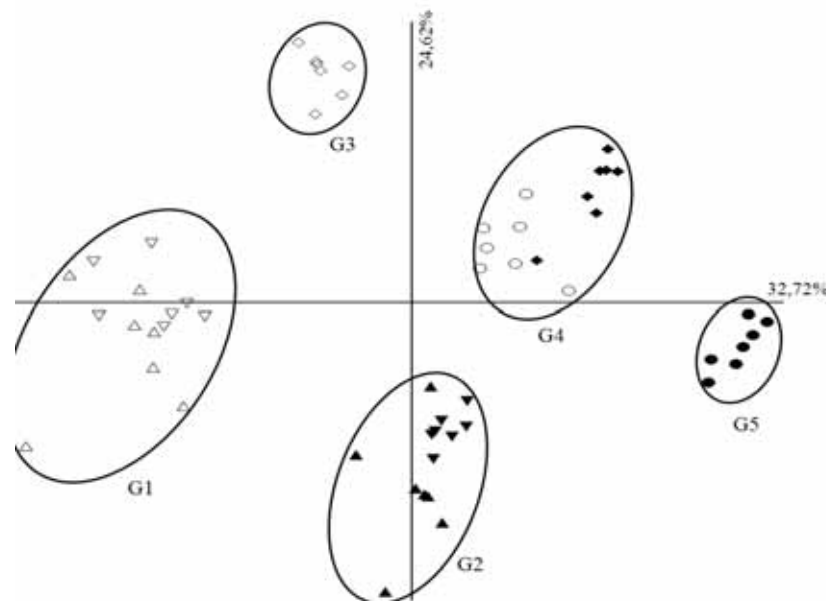


Figura 4: Espaço de ordenação gerado pela análise de componentes principais. Todos os parâmetros de curva A/C_i e $A/DFFF$, estado hídrico, fluorescência da clorofila a e biometria foram considerados. A ordem decrescente de importância de cada parâmetro para a separação dos grupos foi: MS_R , MS_T , DAE e AF . O primeiro componente principal explicou 32,7% da variância total dos dados, enquanto o segundo componente explicou os 24,6% restantes. ▲ e ● representam respectivamente as plantas de *G. max* e *B. brizantha* com 100% de reposição hídrica em ambiente A_C . ▽ e ◆ representam respectivamente as plantas de *G. max* e *B. brizantha* com 30% de reposição hídrica em A_C . ▽ e ◇ representam respectivamente as plantas de *G. max* e *B. brizantha* com 100% de reposição hídrica em A_{SC} . ▽ e ◇ representam respectivamente as plantas de *G. max* e *B. brizantha* com 30% de reposição hídrica em A_{SC} .

Considerando-se o vetor formado pelos eixos PC1 e PC2, é possível identificar um gradiente de respostas em função das condições ambientais, partindo do quadrante inferior direito (controles) para o quadrante superior esquerdo, e uma nítida separação entre as espécies ao longo desse vetor (Figura 4).

Por outro lado, enquanto nos tratamentos com *G. max* não é possível identificar a influência dos diferentes ambientes de crescimento (A_C e A_{SC}), as plantas de *B. brizantha* parecem ter sido mais responsivas às diferenças de variabilidade ambiental as quais foram expostas durante os dois regimes hídricos. Considerando a direção do vetor de influência ambiental definido acima, o ambiente semi-controlado, com maior ruído ambiental, parece ter acirrado os efeitos da deficiência hídrica, enquanto que o ambiente controlado parece ter reduzido tais efeitos. Isso é possível identificar pela proximidade entre o grupo irrigado no ambiente semi-controlado e o grupo sob deficiência hídrica no ambiente controlado (Figura 4).

3.11. Análise sistêmica (conectância global) das respostas fisiológicas.

Os resultados da análise de redes, considerando apenas as variações de modulação nas redes fotossintéticas, mostraram algumas diferenças entre as duas espécies na maneira como o aparato fotossintético se ajusta às variações do ambiente.

Foram observados dois comportamentos distintos em relação aos ambientes de crescimento (tabela 9). Nas condições de menor variabilidade ambiental (A_C) os valores de Cg_{total} em *G. max* foram reduzidos (relaxamento da rede) sob deficiência hídrica (54%) e mantiveram-se estáveis em *B. brizantha*, no mesmo regime de irrigação. No ambiente de maior variabilidade ambiental (A_{SC}) os valores de Cg_{total} aumentaram em resposta à deficiência hídrica em ambas as espécies (18,5% em *G. max* e 31,5% em *B. brizantha*). Já os valores de z que ligam os módulos da rede de trocas gasosas e rede fotoquímica (definido por $ETR-A_{maxL}$) diminuíram quando ambas as espécies foram submetidas a deficiência hídrica no A_C (18% em *G. max* e 15% em *B. brizantha*), enquanto que no ambiente A_{SC} os valores aumentaram em resposta a deficiência hídrica para as duas espécies (14% em *G. max* e o triplo em *B. brizantha*).

Tabela 9: Valores de conectância global ($C_{g_{total}}$) das redes fotossintéticas $C_{g_{fot}}$ (fotoquímica) e $C_{g_{ge}}$ (trocas gasosas), e a relação entre o módulo fotoquímico e de trocas gasosas dada pela relação $ETR-A_{maxL}$ de plantas de *G. max* e *B. brizantha* nos dois ambientes de crescimento (A_C e A_{SC}).

	A_C				A_{SC}			
	<i>G. max</i>		<i>B. brizantha</i>		<i>G. max</i>		<i>B. brizantha</i>	
	100%	30%	100%	30%	100%	30%	100%	30%
$C_{g_{fot}}$	4,31	2,49	2,27	3,04	4,09	5,07	2,91	3,04
$C_{g_{Ge}}$	2,61	0,80	2,57	2,28	1,28	1,42	0,90	1,92
$C_{g_{total}}$	3,5	1,6	2,4	2,6	2,7	3,2	1,9	2,5
$ETR-A_{maxL}$	0,91	0,74	0,98	0,83	0,85	0,97	0,31	0,93

4. DISCUSSÃO

O nível de severidade da deficiência hídrica (30% de reposição de água evapotranspirada) foi suficiente pra reduzir os valores de CRA nos dois ambientes, sobretudo em plantas de *G. max* do A_{SC} (tabela 2). Por outro lado, apesar de provocarmos um estresse considerável nas plantas, a ponto de afetar seu metabolismo e crescimento, a espécie C3 apresentou uma tendência de manutenção do seu balanço hídrico no ambiente com menor variabilidade (A_C). Além disso, o extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) apresentou uma constância quando as plantas de *G. max* sob deficiência hídrica foram mantidas no A_C , enquanto que as plantas de *B. brizantha* no mesmo ambiente foram significativamente mais afetadas na mesma condição de irrigação. A desidratação profunda pode induzir alterações conformacionais na estrutura das membranas a nível biofísico, todavia, podem ser reversíveis logo que as condições ambientais se tornem mais favoráveis (Matos et al, 2010; Leshem, 1992). Assim, danos na estrutura das membranas dos tilacóides, podem induzir mudanças no aparato fotoquímico que dificultam os processos fotossintéticos (Matos et al, 2010; Kaiser, 1987), como pode ser observado em plantas de *B. brizantha*, que sob deficiência hídrica reduziu a taxa de transporte de elétrons (ETR) ao passo que o EM_{MS} aumentou. Contrariamente, a manutenção do ETR (tabela 3) na espécie C3 sob deficiência hídrica pode ser justificada pela maior manutenção da integridade das membranas celulares. Assim, embora o estado hídrico (CRA) em *G. max* fosse reduzido sob deficiência hídrica, provavelmente não foi severo a ponto de desestruturar as biomembranas, particularmente os tilacóides.

Ao considerarmos a variabilidade ambiental, o fato de encontrarmos valores superiores de EM_{MS} quando as plantas de *B. brizantha* foram mantidas em A_C sugere que a

energia excedente do aparato fotoquímico também estava sendo destinada para a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que esses compostos apresentam o potencial de causar danos oxidativos ao reagir com biomoléculas (Smirnoff, 2005). Portanto, os danos na membrana das espécies estudadas possivelmente foram provocados por dois fatores: redução do *CRA* que desestrutura as biomembranas de formação fosfolipídica (Chandler e Bartels, 1999; Larcher, 2000) especialmente em *G. max*, e pelo excesso de elétrons que formam as ERO (Blokhina et al., 2003) em plantas de *B. brizantha*, embora devemos considerar que essas causas podem ocorrer de forma independente em cada espécie. Além disso, ambas as espécies tenderam a aumentar o dreno alternativo de elétrons (*DAE*) quando foram submetidas à deficiência hídrica. Normalmente, quando a fixação do carbono é limitada alguns elétrons produzidos pelo processo fotoquímico são direcionados para drenos, atuando como uma rota de escape para o excesso da energia do aparato fotoquímico, e então protegendo as plantas de ERO (Ribeiro et al., 2003; Laisk et al., 1998; Loreto et al., 1995 e 1994). Segundo Lawlor e Cornic (2002), as principais rotas que compõe o *DAE* são: a fotorrespiração, reação de Mehler e metabolismo de nitrato e sulfato. Portanto, ao observar os efeitos causados pelos diferentes ambientes, sugerimos que a manutenção do *DAE* nas plantas de *G. max* mantidas no A_{SC} foi constituída principalmente pela fotorrespiração (F_R), uma vez que esse parâmetro aumentou significativamente no mesmo ambiente (tabela 5). Por outro lado, apesar dos valores do *DAE* tenderem a aumentar em plantas de *B. brizantha* sob deficiência hídrica no A_C , poderíamos supor que os drenos alternativos não foram suficientes para a manutenção dos níveis de EM_{MS} (tabela 2).

Conforme a literatura (Silva et al., 2006; Godde, 1999; Chaves e Oliveira, 2004) seria esperado que houvesse uma redução dos parâmetros de fluorescência quando as plantas fossem sujeitas ao estresse, inativando o PSII e a cadeia de transporte de elétrons, interferindo assim na fotossíntese. Apesar da redução no *ETR* em *B. brizantha*, os resultados de eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva ($\Delta F/F_m'$) do FSII e coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e não fotoquímico (NPQ) amostrados no ponto de saturação à luz de ambas as espécies, sugerem que o período de estresse foi longo o bastante pra iniciar um processo de aclimação. Flexas et al. (2006) relatam que em muitos trabalhos as respostas fotossintéticas ao estresse hídrico, provêm de plantas com períodos relativamente curtos de experimento, obtendo-se parâmetros de resposta imediata. Contudo, em condições naturais, o estresse hídrico se desenvolve gradualmente, de semanas a meses, podendo ocorrer um processo de aclimação nesse período. Plantas aclimatadas podem melhorar suas relações hídricas e

fotossíntese em relação às plantas não-aclimatadas, que podem levar a menores decréscimos do ganho de carbono e crescimento. Portanto, embora fosse observado um aumento nos danos de membrana (tabela 3), a redução no *ETR* em plantas de *B. brizantha* sobre deficiência hídrica provavelmente ocorreu pela menor quantidade de energia utilizada no ponto de saturação da fotossíntese (P_{satL}) (tabela 5), e não por danos no aparato fotoquímico. Os resultados observados da recuperação da capacidade fotossintética após a reidratação (figura 3) reforçam essa hipótese de aclimação.

Quando a disponibilidade hídrica é baixa e a planta é forçada a operar com uma baixa condutância estomática (diminuindo o uso de água), o decréscimo na fotossíntese pode aumentar o teor de nitrogênio foliar (Chapin, 1987). Cheng e Fuchigami (2000) evidenciaram a relação entre o estado de ativação da Rubisco e o nitrogênio foliar. Aproximadamente 75% do nitrogênio foliar em plantas C3 são encontrados nos cloroplastos, e a maior parte dela é investida somente na Rubisco (Fredeen et al., 1991; Dordas e Sioulas, 2008). Ao considerar que a Rubisco gera custos em termos de investimento de nitrogênio (N), os recursos de N podem ser desperdiçados se o teor de Rubisco for maior que a quantidade necessária utilizada (Cheng and Fuchigami, 2000). Visto que o decréscimo na condutância estomática em plantas de *G. max* sob restrição hídrica pode reduzir a fotossíntese líquida, a utilização de triose fosfato e, conseqüentemente, a regeneração da RuBP, o estado de ativação da Rubisco diminui (Galmés et al. 2011), bem como foi observado nos valores da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) que reduziram em plantas sob deficiência hídrica do A_{SC} . Portanto, sugerimos que houve uma alocação da quantidade de N disponível para a produção de clorofila, como indicado pelo aumento dos valores de *ICC* em plantas de *G. max* sob deficiência hídrica. Esse aumento nos valores de índice de teor de clorofila (*ICC*) em plantas *G. max* sob deficiência hídrica também pode indicar o processo de aclimação.

A fotossíntese em resposta a deficiência hídrica recebeu muita atenção nos últimos anos, mas ultimamente muitos autores estão questionando qual é a limitação primária da fotossíntese: condutância estomática ou dano metabólico (Galmés et al., 2007; Chaves, 1991; Lawlor, 1995; Cornic & Massaci, 1996). Recentemente, estudos generalizaram as respostas fotossintéticas frente à deficiência hídrica (Flexas & Medrano, 2002; Lawlor e Cornic, 2002; Chaves et al., 2003), e como resultado, existem alguns consensos de que a limitação difusiva predomina sobre a maioria das situações de estresse. Por outro lado, alguns estudos baseados em curva *A/Ci* sugerem que tanto a capacidade de regeneração da ribulose-1,5-bifostato (RuBP) como a atividade e teor da Rubisco reduzem significativamente sob deficiência

hídrica (Bota et al., 2004; Martin e Ruiz-Torres, 1992; Escalona et al., 1999; Lal e Edwards, 1996). Nossos resultados indicaram que a redução de A_{maxCO_2} em plantas de *B. brizantha* sob deficiência hídrica do A_{SC} pode ter ocorrido pela atuação sinérgica de alguns fatores, como a redução da cadeia transportadora de elétrons (*ETR*) e da velocidade de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), e o aumento da limitação estomática relativa para fotossíntese (L_S), enquanto que em plantas do A_C , a manutenção de V_{cmax} pode ter proporcionado um maior controle A_{maxCO_2} , mesmo quando a L_S dobrou. Já o A_{maxCO_2} das plantas de *G. max* sob deficiência hídrica decaíram principalmente pela queda do V_{cmax} , apesar dos dados no A_C terem apresentado apenas uma tendência de redução. De acordo com Galmés et al. (2011), sob deficiência hídrica os efeitos na atividade da Rubisco são muito mais correlacionados com mudanças na condutância estomática do que com mudanças no conteúdo relativo de água. Porém, como o efeito direto da condutância estomática é um tanto improvável, eles sugerem que o efeito é mediado pela indisponibilidade de CO_2 , que foi induzido pela menor condutância estomática e do mesófilo. Contudo, sugerimos que a queda no V_{cmax} encontrado em *G. max* pode estar relacionada à concentração de inibidores de forte ligação induzidos pela deficiência hídrica (Roy & Andrew, 2000; Parry et al., 2002). Observamos também que a queda no A_{maxCO_2} das duas espécies foi muito maior quando as plantas foram mantidas em A_{SC} , bem como o V_{cmax} . Assim, poderíamos considerar que o ambiente com maior variabilidade (A_{SC}) causou maiores danos bioquímicos, provavelmente em virtude de efeitos sinérgicos entre grandes variações de temperatura e luz com a deficiência hídrica.

Quando uma planta é susceptível a indisponibilidade hídrica, a redução na condutância estomática (g_s) é necessária a fim reduzir a perda de água por transpiração (E), ao passo que também impede a difusão do carbono até o sítio de carboxilação ocasionando decréscimos significativos na capacidade fotossintética e acréscimos na eficiência intrínseca do uso de água ($Eiua$) (Yu et al., 2004), como pode ser observado a partir dos valores obtidos desse estudo para as duas espécies (tabela 5). Por outro lado, quando as plantas foram mantidas em ambiente com maior variabilidade ambiental (A_{SC}), a $Eiua$ em cada espécie foi maior quando comparada ao ambiente A_C . De acordo com a literatura (Franks et al., 1997; Schulze et al., 1972) a dinâmica estomática pode ser diretamente sensível ao déficit de pressão de vapor, independente do potencial hídrico da planta. Em termos de controle, isso é reconhecido como uma resposta de antecipação da planta frente às intempéries ambientais (Nobel, 1999). Portanto, em relação ao A_C , o A_{SC} poderia conter algum tipo de estresse atmosférico capaz de

provocar respostas mais efetivas das plantas frente às variações ambientais (Chamont et al., 1995), como sugerido pelo alto coeficiente de variação de UR (tabela 1).

A fotossíntese em plantas C3 e C4 compartilham muito dos processos fotossintéticos fundamentais tais como o ciclo C3, o complexo coletor de luz e componentes de transporte de elétrons. Por isso, as duas rotas fotossintéticas podem demonstrar, na maioria das vezes, respostas similares a disponibilidade hídrica. Contudo existem diferenças significativas entre os dois tipos fotossintéticos, que fazem com que suas respostas ao estresse hídrico difiram em vários níveis (Ghannoum, 2009). Os dados obtidos do nosso trabalho confirmam a redução de A_{maxL} após o período de déficit hídrico, no entanto podem ser apontadas diferentes causas para essa redução. Apesar de Silva et al. (2004) sugerir que a limitação estomática é mais importante do que a não-estomática para reduzir a fotossíntese, os dados em *B. brizantha* indicaram que A_{maxL} reduziu principalmente pela queda do ETR e da eficiência quântica aparente (EQA), mais uma vez indicando um possível dano bioquímico. Outro dado que corrobora com essa hipótese é a queda da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) no A_{SC} (tabela 4), que acompanha de forma similar o decréscimo do EQA (tabela 5) em plantas de *B. brizantha* sob deficiência hídrica, enquanto que no A_C , embora o V_{cmax} fosse estável sob deficiência hídrica, a redução de EQA decaiu de forma significativa.

Em plantas de *G. max*, o decréscimo de A_{maxL} possivelmente ocorreu por limitação estomática, visto que os valores de g_s e C_i reduziram sob deficiência hídrica (reduções de 41% e 24% de C_i em A_C e A_{SC} , respectivamente. Dados não mostrados), ao passo que a $Eiua$ aumentou, principalmente no A_C . Notavelmente, a capacidade fotossintética também pode ter sido influenciada por um decréscimo na regeneração da RuBP (Bota et al., 2004) e atividade da Rubisco (indicado por V_{cmax}). Segundo Parry et al. (2002), a atividade da Rubisco em plantas de tabaco apresentou uma baixa correlação com o CRA , sugerindo uma limitação causada por danos irreversíveis da Rubisco. Assim, os autores sugerem que em baixo CRA , a presença de fatores de inibição de forte ligação podem estar relacionados à proteção contra a degradação proteolítica da Rubisco. Porém, a remoção desses inibidores é dependente da hidrólise de ATP (Salvucci, 1989; Portis, 1995) e quando as plantas estão sob deficiência hídrica a produção de ATP geralmente é comprometida (Lawlor, 1995; Tezara et al., 1995). Além disso, a Rubisco ativase é susceptível à altas temperaturas (Crafts-Brandner e Salvucci, 2000) que na maioria das vezes está associado com o estresse hídrico, sobretudo no A_{SC} que apresentou altas variações de temperatura.

Outro dado que corrobora a hipótese de limitação bioquímica nas plantas C3, é a redução da fotorrespiração (F_R). Segundo Ghannoum (2009), se o estresse hídrico reduz a atividade da Rubisco de forma independente de C_i , tanto as reações de carboxilação e de oxigenação da Rubisco são reduzidas em iguais proporções. A F_R de plantas C4 é considerada insignificante devido a alta afinidade do CO_2 com a enzima PEP-case. No entanto, observamos que quando *B. brizantha* foi submetida à deficiência hídrica em A_C , a F_R apresentou um leve acréscimo. Carmo-Silva et al. (2008) observaram que em espécies de gramíneas C4 a fotorrespiração foi ligeiramente alta em plantas bem irrigadas e de estresse moderado, mas quando submetidos a uma deficiência mais severa a fotorrespiração diminuiu tanto quanto a fotossíntese. Assim, podemos supor que o grau de deficiência hídrica foi moderado para a espécie C4, e que os danos bioquímicos foram amenizados pelo A_C , permitindo a sua manutenção ao longo do período de deficiência hídrica.

De acordo com Atkin & Macherel (2009), a deficiência hídrica induz mudanças no fluxo respiratório podendo refletir mudanças na atividade máxima de enzimas da respiração, mudanças no suprimento de substrato (devido à redução das taxas de fixação de carbono e subsequente produção de açúcar) e/ou demanda para ATP (associado ao crescimento, manutenção celular e transporte de íons). Ainda segundo os autores, de forma geral, o fator mais importante para o balanço de carbono se tornar desfavorável em plantas com deficiência hídrica, é a fotossíntese. Assim, a redução nos valores de R_d foi proporcional as reduções de A_{maxL} (tabela 5), quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica em A_C , sugerindo que tanto a capacidade de consumo de CO_2 como de assimilação foram afetados pela deficiência hídrica. Por outro lado, poderíamos supor que as plantas de *G. max* que foram mantidas em A_{SC} apresentaram uma manutenção no gasto energético (R_d), a fim de reparar os danos causados pela maior variabilidade ambiental. Outro dado que corrobora essa hipótese é o EM_{MS} , que apresentou valores muito maiores no mesmo ambiente.

Como era esperado, a quantidade de biomassa (MS_T) reduziu em ambas as espécies sobre deficiência hídrica (Chaves e Oliveira, 2004; Flexas et al., 2006). Desta forma, poderíamos supor que o nível e o tempo do regime de irrigação foi suficiente para provocar reduções no acúmulo de biomassa, sendo que esses efeitos ocorrem devido às limitações em vários níveis da planta. Assim, segundo Chaves et al. (2002), dependendo da duração e intensidade da restrição hídrica, a alocação de fotoassimilados para diferentes partes da planta (como caule e raiz) pode garantir a sobrevivência em ambientes estressantes. Por outro lado, de acordo Muller et al. (2011), quando as plantas são submetidas à deficiência hídrica moderada ou

severa, a taxa de alongamento radicular pode ser reduzida enquanto o teor de carboidrato também diminui. Isso significa que o acúmulo de fotoassimilados depende do quanto a taxa de crescimento radicular (consequentemente utilização de carbono) é maior do que o influxo de carbono. Os dados da relação PA/R em *G. max* indicam que houve um maior investimento de fotoassimilados na parte aérea, quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica. Por outro lado, se considerarmos que plantas sob estresse apresentam um maior custo energético para a manutenção de danos (manutenção de R_d), sugerimos que na verdade houve um consumo de reservas estocadas na raiz.

Além dos danos provocados pela deficiência hídrica, observamos que ambas as espécies foram favorecidas no acúmulo de biomassa total quando mantidas em A_C . Porém, a *G. max* não apresentou a mesma eficiência no índice de área foliar (AF) e, além disso, os dados de A_{maxA} foram significativamente menores quando foram mantidas no ambiente com menor variabilidade. Portanto, embora a capacidade fotossintética nas plantas de metabolismo C3 fosse menor em A_C , os resultados evidenciam diferentes estratégias de desenvolvimento para o melhor aproveitamento de luz, demonstrando capacidade de aclimação à ambientes com diferentes padrões de disponibilidade de luz (Souza et al. 2009b). Assim, as plantas de *G. max* crescidas no ambiente com fornecimento de luz homogêneo de média irradiância ($600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) podem ter desenvolvido folhas capazes de reduzir o auto-sombreamento, aproveitando melhor a luz, enquanto que as plantas do A_{SC} tenderam aumentar a AF , gerando maior auto-sombreamento, e assim evitando os picos de irradiância incidente excessiva em alguns períodos do dia (Larcher 2000, Souza et al. 2009b).

Os resultados de estabilidade do desenvolvimento das plantas de indicaram que, embora o A_C proporcionasse melhores condições de crescimento para as duas espécies, a distribuição de fotoassimilados ocorreu de forma desigual. Assim, os resultados evidenciaram que as folhas de *G. max* crescidas em A_C foram menos simétricas e, portanto, tiveram um desenvolvimento menos estável (Freeman et al. 1993), do que as plantas de *B. brizantha* no mesmo ambiente. Essa instabilidade pode ter ocorrido devido às menores variações do A_C em relação ao A_{SC} , pois a medida que a menor variabilidade ambiental favoreceu o ganho de fotoassimilados, a distribuição de biomassa entre as porções da folha pode não ter acompanhado a dinâmica de crescimento das espécies estudadas. A simetria, mais especificamente a assimetria flutuante, é amplamente usada em estudos sobre instabilidade do desenvolvimento (Graham et al. 1993). Isso acontece porque ela é resultado de processos internos do indivíduo, como fisiologia e metabolismo, além de também ser programada pelo

material genético. Portanto, a simetria revela, num nível individual, aspectos da qualidade genética e fenotípica do organismo (Møller & Swadlow 1997).

Para Galmés et al. (2007), estudos que envolvem recuperação tem recebido pouca atenção. Geralmente, a recuperação da fotossíntese, depois de um período de estresse hídrico moderado, é muito rápida (um dia após a reidratação) e quase completa (Flexas et al., 2006). Em contraste, depois de um período de estresse severo, a recuperação da fotossíntese é progressiva e lenta (durando de dias a semanas) e algumas vezes incompleta (de Souza et al., 2004c; Miyashita et al., 2005; Flexas et al., 2006). Neste último caso, seria interessante conhecer quais são os fatores limitantes da recuperação. A recuperação da fotossíntese depende de três fatores limitantes: condutância estomática, condutância do mesófilo e fatores bioquímicos. Nesse contexto, nossos resultados de recuperação fotossintética sugerem que a restrição hídrica foi moderada independente da condição ambiental em que foi mantida, todavia, embora o A_C tenha proporcionado melhores condições de desenvolvimento em ambas as espécies, os efeitos a longo prazo da deficiência hídrica na produção de biomassa foram significativos e similares, impondo reduções superiores a 50 %. Além disso, o impacto de uma deficiência hídrica deve considerar não somente a intensidade da restrição hídrica (moderada ou severa) mas, igualmente, deve levar em conta o tempo em que as plantas ficaram sujeitas a essa condição limitante bem como a interação e os danos causados por outros fatores ambientais.

Como observado no gráfico de ordenação (PCA) na figura 4, o efeito da deficiência hídrica foi proporcional entre as espécies. Assim, os diferentes tratamentos de reposição de água provocaram a formação de dois grupos em *G. max*, o primeiro das plantas com déficit hídrico (G1) e o segundo das plantas bem irrigadas (G2) independente do ambiente de crescimento. Dessa forma, a variabilidade ambiental foi indiferente para a formação desses grupos. Por outro lado, observamos a formação de 3 grupos em *B. brizantha*: plantas com déficit hídrico em A_{SC} (G3), plantas bem irrigadas em A_C (G5) e o último grupo de plantas com déficit hídrico em A_C e plantas bem irrigadas em A_{SC} (G4). Os diferentes tratamentos hídricos foram suficientes para agrupar o G3 no lado esquerdo do gráfico e G5 no extremo do lado direito. No entanto a formação do grupo G4 (localizado entre G3 e G5) indica que as diferentes condições ambientais (controlado e semi-controlado) foram suficientes para explicar a ordenação dos dados no gráfico.

Contudo, apesar de existir uma leve tendência de separação do grupo G4, esses dados poderiam indicar que os efeitos da deficiência hídrica nas plantas de *B. brizantha* em A_C

foram amenizados devido à menor variabilidade ambiental, e poderiam ser equiparadas as plantas bem irrigadas mantidas em condições de maior variabilidade ambiental.

4.1. Análise de conectância global

As variações observadas na modulação das redes das plantas sob deficiência hídrica nos dois ambientes não corresponde claramente a um padrão de resposta fisiológica comum às duas espécies (tabela 9). Por exemplo, as diferentes alterações em C_g nas duas espécies não produziram mudanças nas reduções da biomassa total, que foram as mesmas para *G. max* (72%) e *B. brizantha* (66%) nos dois ambientes de crescimento. As variações na capacidade fotossintética das plantas (A_{maxL}) também foram fracamente correlacionadas às alterações na C_g . Isso sugere que as mudanças nos padrões de modulação das redes fotossintéticas foram insuficientes para manter a homeostase das plantas nas condições testadas, ou mesmo favorecer uma maior condição para aclimatação. Esses resultados divergem significativamente do que foi observado por Sato et al. (2010) em plantas de cana-de-açúcar, onde aumentos nos valores de C_g das redes fotossintéticas contribuíram para a manutenção da homeostase das plantas sob deficiência hídrica severa.

Por outro lado, o nível de acoplamento entre os módulos fotoquímico e de trocas gasosas, representado pela relação entre $ETR-A_{maxL}$, apresentou um padrão de resposta entre as espécies em cada ambiente. No ambiente com menor variabilidade ambiental (A_C) essa relação foi reduzida nas plantas sob deficiência hídrica em cerca de 16%, enquanto que no A_{SC} (com maior variabilidade ambiental) houve uma tendência de aumento de conexão entre os módulos nas plantas do mesmo regime de irrigação. Esse aumento foi particularmente expressivo em *B. brizantha*, indicando um maior acoplamento entre o aparato fotoquímico e bioquímico em um ambiente mais variável, como observado por Souza et al. (2009a).

As análises de redes realizadas considerando os parâmetros de crescimento (dados não mostrados) não indicaram nenhum padrão de resposta que fosse coerente com as respostas ecofisiológicas observadas. Como argumentado acima, de fato, parece que a análise de conectância global (C_g) é mais apropriada para explicar as causas sistêmicas da manutenção da homeostase, isso é, quando não ocorrem respostas significativas da planta às mudanças ambientais, do que fornecer uma base explicativa causal para a perda da homeostase. Ao contrário, a aplicação da análise de C_g aos nossos dados atuais parece indicar uma possível correspondência entre a falta de padrão na modulação das redes e a quebra da homeostase do

sistema. Todavia, isso merece mais investigação a partir de novos resultados experimentais ou meta-análise.

5. Considerações finais

De forma geral, apesar das duas espécies serem de metabolismos fotossintéticos diferentes, não apresentaram diferenças claras nas suas respostas a todas as condições testadas, mostrando desempenhos fisiológicos similares, perdendo sua homeostase. A plasticidade fenotípica de ambas as espécies foi relativamente similar, considerando os parâmetros avaliados.

As diferenças entre os resultados das análises de conectância global (C_g) indicam que o padrão de modulação das redes fisiológicas em resposta à deficiência hídrica pode ser espécie-específico e dependente da condição de crescimento (variação do ruído ambiental), diferentemente do que foi sugerido por Souza et al. (2009a) em um estudo com espécies arbóreas de diferentes grupos da sucessão florestal crescendo em ambientes distintos. Entretanto, no A_{SC} , as respostas de modulação das redes testadas foram de acordo com a previsão do modelo geral de modulação de redes sugerido por Souza et al. (2004a) e confirmado em trabalhos posteriores (Souza et al., 2005a, 2005b; Camargo-Bartolin et al., 2008; Souza et al., 2009a; Sato et al. 2010), onde valores de C_g tendem a ser mais altos em ambientes limitantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMZALLAG, G. N. 2001. Data analysis in plants physiology: are we missing the reality? *Plant Cell Environ.* 24, 881-890
- AMZALLAG, G. N. 2000. Conectance in *Sorghum* development: beyond the genotype-phenotype duality. *BioSystems.* 56: 1-11.
- ATKIN, O. K.; MACHEREL, D.; 2009. The crucial role of plant mitochondria orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany.* 103: 581-597
- BARABÁSI, A.-L.; OLTVAI, Z. 2004. Network biology: understanding de cell's functional organization. *Nature Reviews – Genetics* 5: 101-113.
- BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany.* 55: 1607–1621.

- BERRY J.A.; BJÖRKMAN O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 491-543.
- BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*. 25: 173-185.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxidative Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*. 91, 179-194.
- BLUM, A. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*. 112: 119-123. 2009.
- BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. 2004. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*. 162: 671-681.
- CAMARGO-BORTOLIN, L.H.G., PRADO, C.H.B.A., SOUZA, G.M., NOVAES, P. 2008. Autonomy and network modulation of photosynthesis and water relations of *Coffea arabica* in the field. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 20: 141-151.
- CARLI, P.; ARIMA, S.; FOGLIANO, V.; TARDELLA, L.; FRUSCIANTE, L.; ERCOLANO, M. R. 2009. Use of network analyses to capture key traits affecting tomato organoleptic quality. *Journal of Experimental botany*. 60: 3379-3386.
- CARMO-SILVA, A. E.; KEYS, A. J.; ANDRALOJC, P. J.; POWERS, S. J.; ARRABAÇA, M. C.; PARRY, M. A. J. 2010. Rubisco activities, properties, and regulation in three different C4 grasses under drought. *Journal of Experimental Botany*. 61: 2355-2366.
- CARMO-SILVA, A. E.; POWERS, S. J.; KEYS, A. J.; ARRABAÇA, M. C.; PARRY, M. A. J. 2008. Photorespiration in C4 grasses remains slow under drought conditions. *Plant, Cell and Environment*. 31: 925-940.
- CHAMONT, S.; STRAINCHAMPS, D.; THUNOT, S. 1995. Short- and long-term stomatal responses to fluctuations in environment in southern European greenhouses. *Annals of Botany*. 75, 39-47.
- CHANDLER, J.; BARTELS, D. 1999. Plant Desiccation. In: LERNER, H. R. (Ed.) 1999. *Plant Responses to Environmental Stress*. 575-590.
- CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103: 551-560.
- CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficit: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2365-2384.
- CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. 2003. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 30, 239-264.
- CHAVES, M.M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.P.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. 2002. How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth*. *Annals of Botany*. 89, 907-916.

- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.42, p.1-16, 1991.
- CHAPIN, F. S III. 1991. Effects of multiple environmental stresses on nutrient availability and use. In: WINNER, E.; Pell, E.; Mooney, H. A. (eds) *The response of plants to multiple stresses*. Academic Press, New York, 67-88.
- CHAPIN, F. S III. BLOOM, A. J.; FIELD C. B.; WARING, R. H. 1987. Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* 37: 49-57.
- CHENG, L.; FUCHIGAMI, L. 2000. Rubisco activation state decreases with increasing nitrogen content in apple leaves. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1687-1694.
- CORNIC, G.; MASSACCI, A. 1996. Leaf photosynthesis under drought stress. In: BAKER, N. R. Ed. *Photosynthesis and Environment*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic. 347-366.
- CRAFTS-BRANDER S. J.; SALVUCCI M. E. 2000. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperatura and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97, 13430-13435.
- CSERMELY, P. 2006. *Weak Links: Stabilizers of complex systems from proteins to social networks*. Berlin: Springer-Verlag.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, III W.W.; MATTOO A. 2006. Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment. *Advances in photosynthesis and respiration*, Vol. 21. Dordrecht: Springer. eds.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mo1 Biol* 43: 599-626.
- DIETZ, K.-J.; JACQUOT, J.-P.; HARRIS, G. 2010. Hubs and bottlenecks in plant molecular signaling networks. *New Phytologist*. 188: 919-938.
- DORDAS, C. A.; SIOULAS, C. 2008. Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. *Industrial crops and products*. 27: 75-85.
- EDWARDS, G.E.; BAKER, N.R. 1993. Can carbon dioxide assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis. *Photosynthesis Research*. 37: 89-102.
- ESCALONA, J. M; FLEXAS, J.; MEDRANO, H. 1999. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*. 26: 421-433.
- FARQUHAR, G.D., SHARKEY, T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33:317-345.
- FLEXAS, J.; BARÓN, M.; BOTA, J.; DUCRUET, J.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; JIMÉNEZ, M.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAJNANI, C.; TOMÀS, M.; MEDRANO, H. 2009. Photosynthesis limitations dureing water stress acclimation and recovery in the drought-

- adapted *Vitis* hybrid Richer-110 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). *Journal of Experimental Botany*. 60: 2361-2377.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*. 127: 343-352.
- FLEXAS, J.; MEDRANO, H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis C3 plants: stomatal and non-stomatal limitation revisited. *Annals of Botany*. 89: 183-189.
- FRANKS, P. J.; COWAN, I. R.; FARQUHAR, G. D. 1997. The apparent feedforward response of stomata to air vapour pressure deficit: information revealed by different experimental procedures with two rainforest trees. *Plant, Cell and Environment*. 20, 142-145.
- FREDEEN, A.L.; GAMON, J.A.; FIELD, C.B. 1991. Responses of photosynthesis and carbohydrate-partitioning to limitations in nitrogen and water availability in field-grown sunflower. *Plant, Cell and Environment*. 14: 963-970.
- FREEMAN, D.C.; GRAHAM, J.H. & EMLEN, J.M. 1993. Developmental stability in plants: symmetries, stress and epigenesis. *Genetica*. 89: 97-119.
- GALMÉS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. 2011. Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *J. Experimental Botany*. 62: 653-665.
- GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. 2007. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist*. 175: 81-93.
- GHANNOUM, O. 2009. C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*. 103: 635-644.
- GIANOLI, E.; VALLADARES, F. 2011. Studying phenotypic plasticity: the advantages of a broad approach. *Biological Journal of the Linnean Society*. 105: 1-7
- GIMÉNEZ, C.; MITCHELL, V.; LAWLOR, D. W. 1992. Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology* 98: 516-524.
- GODDE, D. 1999. Adaptations of the Photosynthetic Apparatus to Stress Conditions. In: LERNER, H. R. Ed. *Plant responses to environmental stresses*. 449-474.
- GRAHAM, J.H.; FREEMAN, D.C. & EMLEN, J.M. 1993. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *Genetica*. 89: 121-137.
- GRASSI, G.; MAGNANI, F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment*. 28: 834-849. 2005.
- JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H. J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International journal of agriculture & biology*. 11: 100-105.

- JORDAN D.B. & OGREN W.L., 1984. The CO₂ specificity of ribulose-11,5-biphosphate carboxylase/oxygenase: dependence on ribulose-biphosphate concentration, pH and temperature. *Planta* 161, 308-313
- KAISER, W. M. 1987. Effects of Water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* 71: 142-149.
- KATUL, G. G.; PALMROTH, S.; OREN, R. 2009. Leaf stomatal responses to vapour pressure deficit under current and CO₂-enriched atmosphere explained by the economics of gas exchange. *Plant, Cell and Environment*. 32: 968-979.
- KHAIRI, M. M. A.; HALL, A. E. 1976. Temperature and humidity effects on net photosynthesis and transpiration of Citrus. *Physiologia Plantarum*. 36: 29-34.
- KRAUSE, G. H.; WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.
- KUMAR, A.; LI, C.; PORTIS A. R. Jr. 2009. Arabidopsis thaliana expressing a thermostable chimeric Rubisco activase exhibits enhanced growth and higher rates of photosynthesis at moderately high temperatures. *Photosynth Res*. 100: 143-153.
- LAISK, A.; RASULOV, B. H.; LORETO, F. 1998. Thermoinhibition of photosynthesis as analyzed by gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Russian Journal of Plant Physiology*. 45: 412-421.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Traduzido por PRADO, C. H. B. A. RiMa Artes e textos, São Carlos.
- LAL, A.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E. 1996. Analysis of inhibition of photosynthesis due to water stress in the C₃ species *Hordeum vulgare* and *Vicia faba*: electron transport, CO₂ fixation and carboxylation capacity. *Photosynthesis Research*. 49: 57-69.
- LAWLOR, D.W.; TEZARA, W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*. 103: 561–579.
- LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*. 25: 275-294.
- LAWLOR D. W., 1995. The effects of water deficit on photosynthesis. In: SMIRNOFF, N. (Ed). *Environmental and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimation*. UK: BIOS Scientific. 129-160.
- LESHEM, Y. Y.; SHEWFELT, R. L.; WILLMER, C. M.; PANTOJA, O. 1992. *Plant membranes: A biophysical approach to structure, development and senescence*. Kluwer Acad. Publi., Dordrecht - London
- LONG, S. P., BERNACCHI, C.J. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 54:2393-2401.
- LORETO, F.; TRICOLI, D.; DI MARCO, G. 1995. On the relationship between electron transport rate and photosynthesis in leaves of the C₄ plant *Sorghum bicolor* exposed to water

- stress, temperature changes and carbon metabolism inhibition. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 885-892.
- LORETO, F.; DI MARCO, G.; TRICOLI, D.; SHARKEY, T. D. 1994. Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of Field grown wheat leaves. *Photosynthesis Research*. 41: 397-403.
- LUCAS, M.; LAPLAZE, L.; BENNETT, M. 2011. Plant systems biology: network matters. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02273.x
- MARTIN, B.; RUIZ-TORRES, N. A. 1992. Effects of water-deficit stress on photosynthesis of C₃ plants in response to progressive drought: the interest of stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*. 89: 895-905.
- MATOS, M. C.; CAMPOS, P. S.; PASSARINHO, J. A.; SEMEDO, J. N.; MARQUES, N. M.; RAMALHO, J. C.; RICARDO, C. P. 2010. Drought effect on photosynthetic activity, osmolyte accumulation and membrane integrity of two *Cicer arietinum* genotypes. *Photosynthetica* 48, 303-312.
- MIYAKE, C. 2010. Alternative electron flow (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological function. *Plant and Cell Physiology*. 51:1951-1963.
- MIYAKE, C.; AMAKO, K.; SHIRAIISHI, N.; SUGIMOTO, T. 2009. Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system – relationship among the fraction of open PSII centers, non-photochemical quenching of chl fluorescence and the maximum quantum yield off PSII in the dark. *Plant and Cell Physiology*. 50: 730-743.
- MIYASHITA, K.; TANAKAMARU, S. MAITANI, T.; KIMURA, K. 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in Kidney bean following drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 205-214.
- MONTEIRO, J. A.; PRADO, C. H. B. A. 2006. Apparent carboxylation efficiency and relative stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in an evergreen cerrado species during water stress. *Photosynthetica*, 44:39-45.
- MØLLER, A.P. & SWADDLE, J.P. 1997. *Asymmetry, Developmental Stability, and Evolution*. New York, Oxford University Press, Inc.
- MOTT, K. A & BUCKLEY. T. N. 1998. Stomatal heterogeneity. *Journal of Experimental Botany*. 49:407-417.
- MULLER, B.; PANTIN, F.; GÉNARD, M.; OLIVER, T.; FREIXES, S.; PIQUES, M.; GIBON, Y. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J. Experimental Botany*. 62, 1715-1729.
- MURCHIE, E. H.; PINTO, M.; HORTON. 2008. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytologist*. 181: 532-552.
- NOBEL, P. 1999. *Plant Physiology*. (2^o ed.). Academic Press. San Diego, California.

- NOVOPLANSKY, A. 2002. Developmental plasticity in plants: implications of non-cognitive behavior. *Evolutionary Ecology*, New York, v. 16, p. 177-188,
- OLIVER, R. J.; FINCH, J. W.; TAYLOR, G. 2009. Second generation bioenergy crops and climate change: a review of the effects of elevated atmospheric CO₂ and drought on water use and the implications for yield. *CGB Bioenergy*. 1: 97-114.
- PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; KHAN, S.; LEA, P. J.; KEYS, A. J. 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany*. 89, 833-839
- PINHEIRO, C; CHAVES, M. M. 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J. Experimental Botany*. 62: 869-882.
- PORTIS, A. R. Jr.; 1995. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Journal of Experimental Botany*. 46: 1285-1291.
- PRADO, C.H.B.A.; WENHUI, Z.; ROJAS, M. H. C.; SOUZA, G. M. 2004. Seasonal leaf gas exchange and water potential in a woody cerrado species community. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 16: 7-16.
- PRADO, C.H.B.A.; MORAES, J.A.P.V. 1997. Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of cerrado vegetation under field conditions. *Photosynthetica*, 33:103-112.
- RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. D.; OLIVEIRA, R. F. 2003. Early photosynthetic responses of sweet Orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62: 167-173.
- ROZENDAAL D. M. A; HURTADO V. H; POORTER L. 2006. Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Functional Ecology*. 20: 207-216.
- ROY, H.; ANDREWS, T.J. 2000. Rubisco: assembly and mechanism. In: LEEGOOD, R.C.; SHARKEY, T.D.; VON CAEMMERER, S. (Ed). *Photosynthesis: Physiology and Mechanism*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 53–83.
- SAGE, R. F.; MCNKOWN, A. D. 2006. Is C₄ photosynthesis less phenotypically plastic than C₃ photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*. 57: 303-317.
- SAGE, R. F., KUBIEN, D.S. 2007. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 30:1086-1106.
- SALVUCCI, M. E. 1989. Regulation of Rubisco activity in vivo. *Physiologia Plantarum*. 77: 164-171.
- SANDA, S.; YOSHIDA, K.; MASAYOSHI, K.; KAWAMURA, T.; MUNEKAGE, Y. N.; AKASHI, K.; YOKOTA, A. 2011. Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiologia Plantarum*. 142: 247-264.
- SARLIKIOTI, V.; DRIEVER, S. M.; MARCELIS, L. F. M. 2010. Photochemical reflectance index as a mean of monitoring early water stress. *Annals of Applied Biology*. 157: 81-89.

- SATO, A.M.; CATUCHI, T.A.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, G.M. 2010. The use of network analysis to uncover homeostatic responses of a drought-tolerant sugarcane cultivar under severe water deficit and phosphorus supplying. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32: 1145-1151.
- SCHLICHTING, C. D.; SMITH, H. 2002. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology*. 16: 189-211.
- SCHULZE, E-D., LANGE, O. L.; BUSCHBOM, U.; KAPPEN, L.; EVENARI, M. 1972. Stomatal responses to changes in humidity in plants growing in the desert. *Planta*. 108, 259-270.
- SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR G. D.; SINGSAAS, E. L. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ*. 30: 1035-1040.
- SHARKEY, T. D. 1988. Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiologia Plantarum*. 73: 147-152.
- SILVA, M. M. P.; VASQUEZ, H. M.; BRESSAN-SMITH, R.; da SILVA, F. C.; ERBESDOBLER, E. D'A.; JUNIOR, P. S. C. A. 2006. Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas a deficiência hídrica. *R. Bras. Zootec*. 35: 67-74.
- SMIRNOFF, N. 2005. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing. University of Exeter – UK.
- SMIRNOFF, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*. 125: 27–58.
- SOUZA, G. M.; RIBEIRO, R. V.; PRADO, C. H. B. S.; DAMINELI, D. S. C.; SATO, A. M.; OLIVEIRA, M. S. 2009a. Using network connectance and autonomy analyses to uncover patterns of photosynthetic responses in tropical woody species. *Ecological Complexity*. 6: 15-26.
- SOUZA, G. M.; BALMANT, B. D.; VITOLO, H. F.; GOMES, K. B. P.; FLORENTINO, T. M.; CATUCHI, T. A.; VIEIRA, W. L. 2009b. Estratégias de utilização de luz e estabilidade do desenvolvimento de plântulas de *Cordia superba* Cham. (Boraginaceae) crescidas em diferentes ambientes luminosos. *Acta Bot. Bras*. 23, 474-485.
- SOUZA, G.M., PINCUS, S.M., MONTEIRO, J.A.F., 2005a. The complexity-stability hypothesis in plant gas exchange under water deficit. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:363-373.
- SOUZA, G.M., RIBEIRO, R.V., OLIVEIRA, R.F., MACHADO, E.C., 2005b. Network connectance and autonomy analyses of the photosynthetic apparatus in tropical tree species from different successional groups under contrasting irradiance conditions. *Revista Brasileira de Botânica* 28:47-59.
- SOUZA, G. M.; VIANA, J. O. F.; OLIVEIRA R. F. 2005c. Asymmetrical leaves by water deficit show asymmetric photosynthesis in common bean. *Braz. J. Plant Physiol*. 17, 223-227.

- SOUZA, G.M., OLIVEIRA, R.F. 2004a. Estabilidade e complexidade em sistemas biológicos. In: SOUZA, G.M., D'OTTAVIANO, I.M.L., GONZALES, M.E.Q. (Eds.). Auto-organização: estudos interdisciplinares. CLE/UNICAMP, Campinas. 38: 123-136.
- SOUZA, G.M., RIBEIRO, R.V., SANTOS, M.G., RIBEIRO, H.L., OLIVEIRA, R.F., 2004b. Functional groups of forest succession as dissipative structures: an applied study. *Brazilian Journal of Biology*. 64, 707-718.
- SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGÔA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. (2004c). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*. 51, 45-56
- STEPIEN, P.; KLOBUS, G. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiologia Plantarum* 125: 31-40.
- SULTAN, S. E.; WILCZEK, A. M.; BELL, D. L.; HAND, G. 1998. Physiological response to complex environments in annual *Polgonum* species of contrasting ecological breadth. *Oecologia*. 15: 564-578.
- SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. 2005. Regulations of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era. *New Phytologist* 168: 9-24.
- TEZARA, W.; LAWLOR, D. W. 1995. Effects of water stress on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. In: MATHIS, P. Ed. *Photosynthesis: from light to biosphere IV*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 625-628.
- UENO, O.; YOSHIMUA, Y.; SENTOKU, S. 2005. Variation in the activity of some enzymes of photorespiratory metabolism in C4 grasses. *Annals of Botany*. 96: 863-869.
- VALLADARES, F; WRIGHT, S. J.; LASSO, E.; KITAJIMA, K.; PEARCY, R. W. 2000. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a panamanian rainforest. *Ecology*. 81: 1925-1936.
- VOIT, E., NEVES, A. R.; SANTOS, H. 2006. The intricate side of systems biology. *PNAS*. 103: 9452-9457.
- von BERTALANFFY, L. 1968. *General System Theory*. ed. Braziller. New York.
- von CAEMMERER S. 2000. *Biochemical Models of Leaf Photosynthesis*. *Techniques in Plant Science* n2. CSIRO Publishing, Collingwood.
- ZHANG, R.; SHARKEY, T. D. 2009. Photosynthetic electron transport and photon flux under moderate heat stress. *Photosynth Res*. 100: 29-43.
- WARD, J.K.; TISSUE, D.T.; THOMAS, R.B.; STRAIN, B.R. 1999. Comparative responses of model C3 and C4 plants to drought in low and elevated CO₂. *Global Change Biology*. 5: 857-867.
- WILLIAMS, D. G; BLACK, R. A. 1993. Phenotypic variation in contrasting temperature environments – growth and photosynthesis 280 Atkin et al. in *Pennisetum setaceum* from different altitudes on Hawaii. *Functional Ecology* 7, 623–633.

WOODRUFF, D. R.; MEINZER, F. C.; McCULLOH, K. A. 2010. Height-related trends in stomatal sensitivity to leaf-to-air vapour pressure deficit in a tall conifer. *Journal of Experimental Botany*. 61: 203-210.

YAMORI, W; NOGUCHI, K; TERASHIMA, I. 2005 Temperature acclimation of photosynthesis in spinach leaves: analyses of photosynthetic components and temperature dependencies of photosynthetic partial reactions. *Plant Cell Environ* 28:536–547

YOSHIMURA, Y.; KUBOTA, F.; UENO, O. 2004. Structural and biochemical bases of photorespiration in C4 plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. *Planta* 220:307-317.

YU, G-R.; WANG, Q-F.; ZHUANG, J. 2004. Modeling the water use efficiency of soybean and maize plants under environmental stress: application of a synthetic model of photosynthesis-transpiration based on stomatal behavior. *J. Plant Physiol.* 161: 303-318.

ANEXO

A complexidade ambiental afeta o desempenho fisiológico de *Glycine max* em condições de deficiência hídrica.

Suzana Chiari Bertolli^{1,2} e Gustavo Maia Souza¹

¹Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

,RESUMO

Os impactos causados por um determinado tipo de perturbação ambiental no desempenho da planta resultam das interações entre a planta e os diversos fatores ambientais. Porém, uma grande quantidade de estudos desenvolvidos sobre estresses abióticos são realizados sob condições controladas em laboratório e não reflete a complexidade dos eventos que ocorrem em ambientes naturais. O objetivo desse estudo foi caracterizar as respostas fisiológicas de *Glycine max* submetida à deficiência hídrica em ambientes com maior (ambiente semi-controlado – A_{SC}) e menor (ambiente controlado – A_C) variabilidade ambiental. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (A_{SC}) e câmara de crescimento (A_C) sob dois regimes de reposição de água evapotranspirada (100% e 30% de reposição) por 30 dias. A variabilidade ambiental foi monitorada diariamente por sensores de coleta automática de temperatura, umidade e irradiância e as respostas fisiológicas das espécies foram analisadas por trocas gasosas foliares, fluorescência da clorofila *a* e parâmetros de crescimento. De forma geral, a deficiência hídrica provocou reduções significativas nos parâmetros fisiológicos avaliados. A maior variabilidade ambiental do A_{SC} causou danos mais extensivos às biomembranas, independente do regime de irrigação quando comparado ao A_C , o que provavelmente deve ter aumentado o custo energético de manutenção e reparo. A menor variabilidade de A_C promoveu uma maior eficiência de produção de biomassa total em ambos os regimes de irrigação, quando comparados ao A_{SC} . Portanto, nossos resultados suportam a tese que condições ambientais mais variáveis podem limitar o crescimento de *G. max* em função da maior flutuação de recursos, e assim amplificar o efeito da deficiência hídrica.

Introdução

Plantas em ambientes naturais encontram uma combinação de fatores de estresses decorrentes da variabilidade de diversos recursos ambientais (Chapin, 1991; Sultan et al., 1997). O impacto causado por um determinado tipo de perturbação ambiental no desempenho da planta é o resultado da interação entre a planta e diversos fatores ambientais, funcionando num sistema controlado de acordo com a informação genética e com os estímulos ambientais (Chaves, 1991). Particularmente a água tem sido considerada o principal fator que, de forma isolada ou combinada com outros fatores ambientais, limita a produtividade agrícola ao redor do mundo (Flexas et al, 2009; Murchie et al., 2008; Chaves e Oliveira, 2004). Alguns estudos que abordam o estresse hídrico têm sido documentados com a combinação de um segundo fator abiótico (Jiang e Huang, 2001; Reynolds-Henne et al., 2010) e de até três fatores (Wertin et al. 2010). Esse tipo de estudo, considerando uma maior complexidade ambiental, tem revelado que determinadas combinações de fatores são únicas. Por exemplo, recentemente foi mostrado que a resposta das plantas à combinação de seca e estresse térmico é única, e não pode ser diretamente extrapolada a partir de respostas de plantas aos fatores de estresse aplicados individualmente, sobretudo considerando que os mecanismos que conferem a aclimatação dessas plantas à combinação de múltiplos fatores ambientais não são bem conhecidos (Rizhsky et al., 2004; Mittler and Blumwald, 2010; González-Cruz and Pastenes, 2012).

Muitos estudos identificaram as respostas fisiológicas das plantas frente à deficiência hídrica (Lawlor and Tezara, 2009; Pinheiro and Chaves, 2011), porém pouco se sabe sobre como a variabilidade do ambiente em que se dá essa deficiência hídrica pode influenciar essas respostas. As interações entre os eventos de estresses abióticos e a produtividade de uma cultura são talvez os mais críticos para a produção agrícola, e deveriam ser consideradas no desenvolvimento de espécies transgênicas com um desempenho de campo superior (Mittler and Blumwald, 2010).

As respostas fisiológicas das plantas à seca e aos outros fatores ambientais são altamente complexas. Essas respostas envolvem o modo como as diferentes partes da planta interagem entre si e as diferentes escalas de tempo em relação ao seu desenvolvimento (Chaves et al., 2009). A intensidade, a duração e a taxa de progressão dos eventos de estresses também influenciam as respostas da planta, bem como o estágio de desenvolvimento e a

sensibilidade da planta aos diferentes fatores ambientais (Pinheiro & Chaves, 2011, Shannon, 1997).

Segundo Mittler (2006) o fato é que uma grande quantidade de estudos desenvolvidos sobre estresses abióticos são realizados sob condições controladas em laboratório e não refletem as condições atuais que ocorrem no campo. Por exemplo, dentro de um determinado campo pode ocorrer grandes flutuações de seca, salinidade, temperaturas extremas e até mesmo condições anaeróbicas. Como consequência, um alto grau de heterogeneidade entre os níveis de estresses que causam impacto em diferentes plantas nesse mesmo campo pode estar presente. Essa heterogeneidade, por sua vez, pode afetar o desempenho da planta e o seu rendimento (Mittler and Blumwald, 2010). Com isso pode existir uma lacuna considerável entre o conhecimento obtido por estudos em condições controladas e o conhecimento necessário para o desenvolvimento de culturas que adquirem tolerância em condições de campo. Essa lacuna pode explicar porque algumas das plantas transgênicas desenvolvidas sob condições controladas, que apresentam uma tolerância melhorada a uma condição de estresse em particular, falham em mostrar a tolerância adquirida quando testadas no campo (Mittler, 2006).

A soja (*Glycine max* L. Merr.) é uma das culturas de maior importância econômica no Brasil e no mundo. Todavia, a ocorrência de adversidades climáticas ainda é um fator de risco e de insucesso no cultivo de soja. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi caracterizar as respostas fisiológicas (fotossíntese e crescimento) da cultura de soja submetida à deficiência hídrica em ambientes com maior e menor variabilidade ambiental, e com isso avaliar a influência do ruído ambiental (variações aleatórias de fatores físicos do ambiente, que não a falta de água) sobre as respostas à deficiência hídrica.

Materiais e métodos

Plantas de *G. max* cv. Codetec 202 foram obtidas de sementes germinadas em condições de casa de vegetação em vasos contendo 12 kg de solo tipo argissolo vermelho/amarelo eutrófico de textura arenosa-média e substrato agrícola (casca de amendoim e de pinus triturados e torrados) na proporção 2:1 em condições de capacidade de campo, e o solo corrigido segundo necessidades apontadas em análise química, corrigido a saturação de bases para 60%.

Os regimes hídricos iniciaram quando as plantas atingiram a fase fenológica V4. Foram duas condições de irrigação, uma com 100% de reposição da água evapotranspirada e outra com 30% de reposição, durante 30 dias de cultivo, em condições de casa de vegetação. A reposição de água foi realizada por método gravimétrico, com pesagem diária dos vasos. A cada dia a água era repostada de acordo com os tratamentos, considerando a variação de peso do vaso de um dia para outro em função da evapotranspiração.

O ambiente com menor amplitude de variação (ambiente controlado) foi estabelecido em câmara de crescimento com controle de luz ($600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura dia/noite (30/23 °C), umidade (60%) e fotoper\u00edodo com 16 horas de luz. Enquanto o ambiente com maior variabilidade (ambiente semi-controlado) foi estabelecido em condi\u00e7\u00f5es de casa de vegeta\u00e7\u00e3o. As varia\u00e7\u00f5es ambientais do ambiente controlado (A_C) e semi-controlado (A_{SC}) foram monitoradas diariamente a cada 10 minutos por um sistema HOBO (modelo H08-004-02, EUA) de coleta autom\u00e1tico de temperatura, luz e umidade. As medidas de todas as vari\u00e1veis fisiol\u00f3gicas foram realizadas ap\u00f3s 30 dias de cultivo das plantas em cada ambiente de crescimento e regime de irriga\u00e7\u00e3o

Os tratamentos foram arranajados de forma inteiramente casualizada no esquema fatorial 2 x 2, dois regimes de irriga\u00e7\u00e3o e dois ambientes, totalizando quatro tratamentos. Para cada tratamento foram realizadas 7 repeti\u00e7\u00f5es (plantas).

Par\u00e2metros avaliados

1. Conte\u00fado relativo de \u00e1gua e integridade das biomembranas

O conte\u00fado relativo de \u00e1gua (CRA) foi utilizado para avaliar o estado h\u00eddrico das plantas. O CRA \u00e9 uma estimativa direta da porcentagem de \u00e1gua na folha e \u00e9 calculado como (Larcher, 2000)

$$CRA = (M_f - M_s) / (M_{sat} - M_s) \times 100 (\%)$$

onde M_f corresponde \u00e0 massa fresca da folha medida imediatamente ap\u00f3s a coleta; M_{sat} corresponde a massa da folha sob satura\u00e7\u00e3o de \u00e1gua, ap\u00f3s imers\u00e3o durante 12h em \u00e1gua destilada; e M_s corresponde a massa seca obtida ap\u00f3s secagem das folhas em estufa a 60°C at\u00e9 obten\u00e7\u00e3o de massa constante.

A integridade das biomembranas foi avaliada pelo extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) (adaptado de Matos *et al.*, 2010). Dez discos de tecidos foliares frescos foram coletados de folhas totalmente expandidas e de forma aleatória em cada repetição de todos os tratamentos. Em seguida os discos, de peso seco conhecido, foram colocados em um recipiente plástico com 10 mL de água deionizada, os recipientes com a solução foram tampados e mantidos à temperatura de 25° C por 24 horas. Após a incubação, a condutividade do meio foi determinada (X_i) com o auxílio de um medidor portátil de condutividade elétrica (LTLutron, modelo CD-4301). Essa técnica permite avaliar a integridade das membranas celulares visto que quanto menor a condutividade elétrica da solução, menor é a quantidade de eletrólitos que extravasam das membranas indicando seu grau de integridade.

2. Curvas A/C_i

As curvas A/C_i foram realizadas variando-se a concentração de CO_2 ambiente dentro da câmara de amostragem de um analisador de gases por infra-vermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA) entre 0 e 1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Long e Bernacchi, 2003). As medidas foram realizadas sob irradiância de 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (definida pela curva $A/DFFF$) e déficit de pressão de vapor em torno de 1,5 kPa, mantida com um gerador de ponto de orvalho (modelo Li-610, Li-Cor) acoplado ao Li-6400XTR; a temperatura da folha foi ajustada para 30 °C. As curvas foram ajustadas conforme modelo proposto por Monteiro e Prado (2006)

$$A = A_{maxCO_2} (1 - e^{-c(C_i - P_{comCO_2})}),$$

onde A é a assimilação de CO_2 momentânea, A_{maxCO_2} é o potencial fotossintético, e é a constante de Euler, c é a constante relativa à convexidade da curva, C_i concentração momentânea de CO_2 , P_{comCO_2} é o ponto de compensação da fotossíntese ao CO_2 .

As variáveis derivadas das curvas A/C_i analisadas foram: potencial fotossintético (A_{maxCO_2}); ponto de saturação da fotossíntese ao CO_2 (P_{satCO_2}), que foi estimada calculando os valores do eixo X quando A atingiu 90% de A_{maxCO_2} ; e limitação estomática relativa da fotossíntese (L_s), calculada segundo Farquhar e Sharkey (1982)

$$L_s = [(A' - A)/A'] * 100,$$

onde A' é a assimilação de CO_2 quando C_i equivale à concentração atmosférica de CO_2 ($370 \pm 10 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e A é a assimilação de CO_2 quando a concentração de CO_2 na câmara de amostragem for similar a concentração atmosférica. Além disso, a fotorrespiração (F_R) e a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) foram calculadas conforme o modelo proposto para plantas de metabolismo C3 (Sharkey, 1988; Sharkey et al., 2007).

3. Curvas $A/DFFF$

A fotossíntese em plantas pode ser descrita quantitativamente pelas curvas de $A/DFFF$ (assimilação de CO_2 por densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) que discriminam alguns pontos: capacidade fotossintética (A_{maxL}); ponto de compensação da fotossíntese à luz (P_{comL}); ponto de saturação da fotossíntese à luz (P_{satL}) calculado quando A atinge 90% de A_{maxL} ; eficiência quântica aparente (EQA), correspondendo ao declive da região linear inicial da curva $A/DFFF$; e respiração da folha (R_d) quando o $DFFF$ for igual a $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores de concentração de CO_2 intercelular (C_i), condutância estomática (g_s) e transpiração (E) foram obtidos no ponto de saturação da fotossíntese à luz para cada regime de irrigação e ambiente de crescimento. A eficiência intrínseca do uso de água ($Eiua$) foi calculada como a relação entre o A_{maxL} e a condutância estomática (g_s).

Folhas sadias e totalmente expandidas foram submetidas a diferentes intensidades de $DFFF$, desde 2000 até $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 3 a 6 minutos, dependendo da velocidade de estabilização das leituras, sendo registradas as leituras ao final de cada etapa. Durante estas medições, a concentração de CO_2 na câmara de amostragem do Li-6400XTR foi mantida em $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$, a temperatura da folha foi ajustada para $30 \text{ }^\circ\text{C}$, e o déficit de pressão de vapor mantido em torno de $1,5 \text{ kPa}$ com auxílio de um gerador de ponto de orvalho (modelo Li-610, Li-Cor) acoplado ao Li-6400XTR. A luz para as curvas foi fornecida com uma fonte de LEDs de emissão no espectro do vermelho e 10% de azul, acoplada a câmara de amostragem do Li-6400XTR.

As curvas de resposta $A/DFFF$ foram ajustadas de acordo com a equação de Prado & Moraes (1997)

$$A = A_{maxL} (1 - e^{-c(DFFF - P_{comL})}),$$

onde A é a assimilação de CO_2 momentânea; A_{maxL} é capacidade fotossintética; $DFFF$ é a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos momentâneo; e P_{comL} é o ponto de compensação da fotossíntese à luz.

Todas as curvas A/C_i e $A/DFFF$ foram realizadas em sete plantas por tratamento em cada experimento das 9:00 as 14:00h.

4. Fluorescência da clorofila a e índice de conteúdo de clorofila.

A avaliação da atividade fotoquímica, por meio da análise de fluorescência da clorofila a , foi realizada simultaneamente às curvas $A/DFFF$ com o fluorômetro de luz modulada (LI-6400-40) acoplado ao Li-6400XTR. Os parâmetros determinados foram: eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva ($\Delta F/F_m'$) do FSII, coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e não-fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] da fluorescência, e a taxa de transporte de elétrons ($ETR = DFFF * \Delta F/F_m' * 0,5 * 0,84$) (Bilger e Björkman, 1990). Os valores de F_m e F_v indicam, respectivamente, as fluorescências máxima e variável, determinadas após 30 minutos de adaptação ao escuro. F_m' e F_s são, respectivamente, as fluorescências máxima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, e F_0' representa a fluorescência basal após a excitação do FSII.

O dreno alternativo de elétrons (DAE) foi calculado como a relação entre a eficiência quântica efetiva do FSII no ponto de saturação da fotossíntese à luz ($\Delta F/F_m'$) e a eficiência quântica de fixação de CO_2 (ϕCO_2), conforme proposto por Ribeiro et al. (2003):

$$DAE = \frac{\Delta F/F_m'}{\phi\text{CO}_2}$$

ϕCO_2 foi calculado de acordo com Edwards & Baker (1993)

$$\phi\text{CO}_2 = \frac{(A_{maxL} + R_d)}{(P_{satL} \times 0,84)}$$

O índice de teor de clorofila (*ICC*) foi estimado por um medidor de teor de clorofila (CCM-200 Opti-Sciences, Tyngsboro, Massachusetts, USA) baseado na absorvância em comprimento de onda de 660 e 950 nm.

5. Recuperação da capacidade fotossintética

Após as determinações do estado hídrico das plantas, integridade das biomembranas e as análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, as plantas que permaneceram em regime de deficiência hídrica foram submetidas a um período de reidratação por 15 horas (entre 17:00 h e 9:00 h) para avaliação do grau de recuperação de A_{maxL} em relação às plantas bem irrigadas. Após as medidas de A_{maxL} , as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes e as folhas foram excisadas para as avaliações de crescimento.

6. Parâmetros de crescimento

A área foliar total (*AF*) foi medida com um integrador portátil de área foliar (modelo LI-3000A, Li-Cor, USA), e a massa específica foliar (*MEF*) foi obtida pela relação entre a massa seca (MS_F) e a *AF*. Para a quantificação da massa seca (g), as folhas (MS_F); caules e pecíolos (*G. max*) e colmos (*B. brizantha*) (MS_C); e raízes (MS_R) foram armazenados em sacos de papel, identificadas e mantidas em estufa sob uma temperatura constante de 70 °C até obtenção de massa constante.

Análise estatística dos resultados

Para as variáveis ambientais, foram calculados os valores médios e o coeficiente de variação. Os resultados de cada variável fisiológica para cada espécie foram analisados por meio de análise de variância (two-way ANOVA, $p = 0,05$), considerando o esquema fatorial do experimento, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

Resultados

1. Variabilidade dos ambientes

Apesar de as médias de irradiância diária ($DFFF_{dia}$) e da temperatura (T) terem sido aproximadamente as mesmas nos dois ambientes (tabela 1), o coeficiente de variação (CV) dos fatores ambientais medidos foi consistentemente baixo no ambiente controlado (A_C) quando comparado ao ambiente semi-controlado (A_{SC}), indicando que a variabilidade ambiental foi reduzida em A_C . Os valores médios da umidade relativa (UR) foram relativamente maiores no A_{SC} , apresentando um CV elevado quando comparado ao A_C (tabela 1).

Em A_C a $DFFF_{dia}$ não apresentou variabilidade, visto que a fonte de luz da câmara fornece iluminação constante ao longo do fotoperíodo. Enquanto isso, o CV da irradiância ao longo do dia em A_{SC} foi de 50%.

Tabela 1: Valores médios e coeficientes de variação (CV) das condições ambientais da câmara de crescimento (A_C) e da casa de vegetação (A_{SC}), onde as espécies foram cultivadas. Considerando os seguintes parâmetros em cada período do dia: $DFFF_{dia}$, irradiância diária ($\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$); T , temperatura ($^{\circ}\text{C}$); UR , umidade relativa do ar (%).

	Variabilidade Ambiental					
	A_C			A_{SC}		
	$DFFF_{dia} / CV$	T / CV	UR / CV	$DFFF_{dia} / CV$	T / CV	UR / CV
Dia	30,2 - 0	33 - 5	40 - 14	32,1 - 50	33 - 18	50 - 42
Noite	-	23 - 3	70 - 10	-	23 - 13	88 - 13

2. Estado h\u00eddrico das plantas e integridade das biomembranas

Ambas as esp\u00e9cies reduziram o CRA quando foram mantidas sob defici\u00eancia h\u00eddrica (tabela 2), no entanto esse efeito foi maior em A_{SC} que reduziu 32%, enquanto que em A_C a redu\u00e7\u00e3o foi de 10%. O extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) n\u00e3o apresentou varia\u00e7\u00f5es significativas quando as plantas foram submetidas \u00e0 defici\u00eancia h\u00eddrica. Por outro lado, os valores de EM_{MS} foram significativamente menores quando as plantas foram mantidas no A_C , independente do regime de irriga\u00e7\u00e3o.

Tabela 2: Valores médios de extravazamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) e conteúdo relativo de água (CRA) em plantas submetidas à 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água; e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes.

	100%		30%	
	A _C	A _{SC}	A _C	A _{SC}
EM_{MS} (mS/g)	0,55 ^{Ab}	5,19 ^{Aa}	1,23 ^{Ab}	5,69 ^{Aa}
CRA	87,3 ^{Ab}	92,8 ^{Aa}	79,3 ^{Ba}	63,5 ^{Bb}

3. Fluorescência da clorofila *a*

Os dados da análise de fluorescência da clorofila *a* obtidos no ponto de saturação da fotossíntese à luz para cada tratamento e ambiente (tabela 3), indicam que as plantas sob deficiência hídrica no A_{SC} aumentaram de forma significativa a eficiência quântica efetiva do PSII ($\Delta F/F_m'$) ao passo que o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) foi reduzido, em relação às plantas bem irrigadas. Por outro lado, os valores dos mesmos parâmetros em plantas sob deficiência hídrica do A_C não apresentaram variações significativas em relação às plantas bem irrigadas. Além disso, enquanto a taxa de transporte de elétrons (ETR) permaneceu estável nas plantas dos dois regimes de irrigação, o dreno alternativo de elétrons (DAE) aumentou nas plantas sob deficiência hídrica cultivadas nos dois ambientes, sobretudo em A_{SC} onde os valores de DAE dobraram. Foi observado um aumento no índice de teor de clorofila (ICC) nas plantas submetidas à deficiência hídrica (tabela 3) em relação às plantas bem irrigadas, embora os valores de ICC das plantas em A_C fossem menores do que os valores observados em A_{SC}, para ambos os regimes de irrigação.

Tabela 3: Valores médios da eficiência quântica potencial e efetiva do FSII (F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, respectivamente), coeficiente de extinção fotoquímico e não fotoquímico (qP e NPQ , respectivamente), taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), dreno alternativo de elétrons (DAE), e índice de teor de clorofila (ICC) em plantas submetidas à 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes.

	Fluorescência da clorofila <i>a</i>			
	100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
F_v/F_m	0,731 ^{Aa}	0,788 ^{Aa}	0,745 ^{Ab}	0,817 ^{Aa}
$\Delta F/F_m'$	0,302 ^{Aa}	0,273 ^{Ba}	0,388 ^{Aa}	0,404 ^{Aa}
qP	0,657 ^{Aa}	0,596 ^{Aa}	0,830 ^{Aa}	0,760 ^{Aa}
NPQ	1,65 ^{Ab}	2,07 ^{Aa}	1,63 ^{Aa}	1,70 ^{Ba}
ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	63,05 ^{Ab}	89,88 ^{Aa}	70,7 ^{Ab}	86,78 ^{Aa}
DAE	14,5 ^{Ba}	10,7 ^{Ba}	18,5 ^{Aa}	21,8 ^{Ab}
ICC	10,9 ^{Bb}	16,9 ^{Ba}	18,8 ^{Ab}	37,7 ^{Aa}

4. Curva A/C_i

Nos dados obtidos da curva A/C_i (tabela 4), o potencial fotossintético (A_{maxCO_2}) e o ponto de saturação da fotossíntese ao CO_2 (P_{satCO_2}) reduziram quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica nos dois ambientes de crescimento. Entretanto, enquanto a redução de A_{maxCO_2} no A_C foi de 39%, em A_{SC} essa redução foi maior que 60%. Além disso, os valores de A_{maxCO_2} e P_{satCO_2} foram significativamente maiores quando as plantas foram mantidas no A_C .

Tabela 4: Valores médios de taxa do potencial fotossintético (A_{maxCO_2}), pontos de compensação e saturação ao CO_2 (P_{comCO_2} e P_{satCO_2} , respectivamente), limitação estomática relativa da fotossíntese (L_S) em plantas submetidas à 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes.

	Curva A/C_i			
	100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
A_{maxCO_2} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	22,80 ^{Aa}	18,68 ^{Ab}	13,82 ^{Ba}	6,8 ^{Bb}
P_{comCO_2} ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	8,1 ^{Aa}	7,0 ^{Aa}	7,8 ^{Aa}	8,8 ^{Aa}
P_{satCO_2} ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	69,7 ^{Aa}	51,2 ^{Ab}	46,2 ^{Ba}	13,3 ^{Bb}
L_S (%)	23,35 ^{Aa}	27,92 ^{Aa}	30,46 ^{Aa}	28,77 ^{Aa}
V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	78 ^{Aa}	84 ^{Aa}	63 ^{Aa}	61 ^{Ba}

As plantas apresentaram manutenção na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) quando foram submetidas à deficiência hídrica no A_C , enquanto que em A_{SC} apresentaram decréscimos significativos (27%) no mesmo regime de irrigação. Por outro lado, o ponto de compensação da fotossíntese ao CO_2 (P_{comCO_2}) e a limitação estomática relativa da fotossíntese (L_S) não apresentaram variações significativas quanto ao tipo de irrigação e ambiente de crescimento, embora o L_S tendesse a aumentar sob deficiência hídrica nas plantas crescidas no A_C (30%).

5. Curva $A/DFFF$

De acordo com os dados obtidos no ponto de saturação da fotossíntese à luz (tabela 5), as plantas submetidas à deficiência hídrica nos dois ambientes apresentaram um aumento na eficiência intrínseca do uso de água (E_{iua}), ao passo que reduziram a eficiência quântica aparente (EQA), condutância estomática (g_s), concentração de CO_2 intercelular (C_i), taxa de assimilação máxima em luz saturante (A_{maxL}), ponto de saturação da fotossíntese à luz (P_{satL}), transpiração (E), fotorrespiração (F_R) e, particularmente em A_C , a respiração no escuro (R_d).

Em geral, comparando-se com A_{SC} , no ambiente com menor variabilidade (A_C) foram observados valores menores de EQA , F_R , A_{maxL} , P_{satL} e $Eiua$ e, por outro lado, em A_C foram observados maiores valores de C_i e, somente em plantas bem irrigadas, de g_s .

Tabela 5: Valores médios de eficiência quântica aparente (EQA), respiração no escuro (R_d), fotorrespiração (F_R), condutância estomática (g_s), concentração de CO_2 intercelular (C_i), capacidade fotossintética (A_{maxL}), pontos de compensação e saturação à luz (P_{comL} e P_{satL} , respectivamente), transpiração (E) e eficiência intrínseca do uso da água ($Eiua$) em plantas submetidas à 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes.

	Curva A/DFFF			
	100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
EQA	0,049 ^{Ab}	0,064 ^{Aa}	0,035 ^{Bb}	0,050 ^{Ba}
R_d ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	2,09 ^{Aa}	2,28 ^{Aa}	1,05 ^{Bb}	2,07 ^{Aa}
F_R ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	3,25 ^{Ab}	5,25 ^{Aa}	2,04 ^{Bb}	3,40 ^{Ba}
g_s ($mol H_2O m^{-2} s^{-1}$)	0,218 ^{Aa}	0,147 ^{Ab}	0,054 ^{Ba}	0,052 ^{Ba}
C_i (Pa)	297 ^{Aa}	183 ^{Ab}	204 ^{Ba}	138 ^{Bb}
A_{maxL} ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	10,1 ^{Ab}	17,3 ^{Aa}	5,65 ^{Bb}	10,98 ^{Ba}
P_{comL} ($\mu mol \text{ fóton } m^{-2} s^{-1}$)	39,2 ^{Aa}	32,4 ^{Aa}	29,2 ^{Aa}	39,6 ^{Aa}
P_{satL} ($\mu mol \text{ fóton } m^{-2} s^{-1}$)	483,6 ^{Ab}	633,4 ^{Aa}	315,6 ^{Bb}	496,9 ^{Ba}
E ($mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$)	3,47 ^{Aa}	3,45 ^{Aa}	0,95 ^{Ba}	1,44 ^{Ba}
$Eiua$ ($\mu mol CO_2 / mol H_2O$)	46,9 ^{Bb}	120,0 ^{Ba}	93,4 ^{Ab}	188,1 ^{Aa}

Foi observado que a reidratação propiciou a recuperação total da capacidade fotossintética (A_{maxL}) nos dois ambientes de crescimento, sobretudo em A_C (158% de recuperação) (Figura 3).

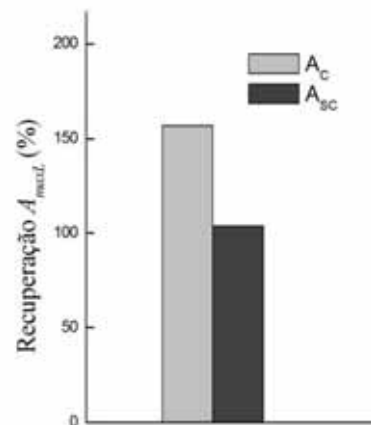


Figura 3: Porcentagem de recuperação da capacidade fotossintética (A_{maxL}) de plantas sob deficiência hídrica após um período de 14 horas de reidratação. A recuperação foi estimada em relação aos valores de A_{maxL} das plantas bem irrigadas (100% de reposição hídrica). Colunas cinzas representam a porcentagem de recuperação no A_C , e colunas pretas representam a porcentagem de recuperação no A_{SC} .

6. Análise de crescimento

A deficiência hídrica reduziu a massa seca das plantas como um todo bem como a área foliar total e a massa específica foliar, enquanto foi observado um aumento na relação parte aérea-raiz (tabela 6).

De forma geral, as plantas crescidas em A_C apresentaram um acúmulo de biomassa significativamente maior, quando comparadas às plantas do A_{SC} , de modo que os valores de MS_T das plantas nos dois regimes de irrigação em A_C foram o dobro dos observados em A_{SC} . Por outro lado, os valores de área foliar total (AF) das plantas no A_C foram menores que em A_{SC} , embora com massa específica foliar (MEF) em média 5 vezes maior (tabela 6).

Tabela 6: Valores médios de massa seca da raiz (MS_R), massa seca foliar (MS_F), massa seca do caule (MS_C), massa seca total (MS_T), relação parte aérea raiz (PA/R), área foliar total (AF) e massa específica foliar (MEF) em plantas submetidas à 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos de água; letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ambientes.

	Parâmetros de crescimento			
	100%		30%	
	A_C	A_{SC}	A_C	A_{SC}
MS_R (g)	59,3 ^{Aa}	21,7 ^{Ab}	11,9 ^{Ba}	4,2 ^{Ba}
MS_F (g)	59,2 ^{Aa}	21,6 ^{Ab}	16,0 ^{Ba}	7,5 ^{Ba}
MS_C (g)	62 ^{Aa}	29 ^{Ab}	13 ^{Ba}	8 ^{Ba}
MS_T (g)	180 ^{Aa}	72 ^{Ab}	41 ^{Ba}	19 ^{Ba}
PA/R	1,95 ^{Aa}	2,42 ^{Ba}	2,47 ^{Ab}	3,71 ^{Aa}
AF (m ²)	0,21 ^{Ab}	0,5 ^{Aa}	0,08 ^{Bb}	0,18 ^{Ba}
MEF (g m ⁻²)	272 ^{Aa}	43 ^{Ab}	190 ^{Ba}	41 ^{Ab}

Discussão

Nossos resultados indicaram que embora a deficiência hídrica reduzisse a quantidade de massa seca de forma similar nos dois ambientes de crescimento (cerca de 75%), o ambiente com menor variabilidade (A_C) favoreceu o crescimento das plantas em relação ao A_{SC} . Os resultados de extravasamento de eletrólitos (tabela 2) mostraram que o ambiente com maior variabilidade causou danos mais extensivos às biomembranas, independente do regime de irrigação quando comparado ao ambiente com menor variabilidade, o que provavelmente deve ter aumentado o custo energético de manutenção e reparo, desviando parte significativa do carbono assimilado, diminuindo a produção de biomassa nesse ambiente.

O nível de severidade da deficiência hídrica (30% de reposição de água evapotranspirada) foi suficiente pra reduzir os valores de CRA nos dois ambientes, principalmente em A_{SC} . Por outro lado, o extravasamento de membrana por unidade de massa seca (EM_{MS}) apresentou uma constância quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica, embora os valores observados no A_{SC} fossem nitidamente maiores que em A_C , independentemente do regime de irrigação. A desidratação pode induzir alterações

conformacionais na estrutura das membranas ao nível biofísico que, todavia, podem ser reversíveis logo que as condições ambientais se tornem mais favoráveis (Matos et al, 2010; Leshem, 1992). Assim, danos na estrutura das membranas dos tilacóides podem induzir mudanças no aparato fotoquímico, reduzindo a eficiência quântica e o transporte de elétrons (Sanda et al., 2011; Kaiser, 1987). Contrariamente, em nosso estudo houve manutenção na taxa de transporte de elétrons (*ETR*) das plantas sob deficiência hídrica (tabela 3), o que poderia ser justificado pela manutenção da integridade das membranas celulares. Assim, embora o estado hídrico (*CRA*) fosse reduzido sob deficiência hídrica, provavelmente não foi severo a ponto de desestruturar as biomembranas, particularmente dos tilacóides.

A manutenção dos valores de EM_{MS} nas plantas sob deficiência hídrica dos dois ambientes também pode ter sido favorecida pelo aumento dos drenos alternativos de elétrons, como indicado pelo aumento nos valores de *DAE* das plantas do mesmo regime de irrigação (tabela 3). Segundo Lawlor e Cornic (2002), as principais rotas que compõe o *DAE* são: a fotorrespiração, ciclo água-água e metabolismo de nitrato e sulfato. Provavelmente, esse aumento no *DAE* foi devido ao ciclo água-água (Miyake et al., 2009, 2010; Lawlor & Tezara, 2009), uma vez que os valores de F_R foram reduzidos sob deficiência hídrica (tabela 5). Quando a de-excitação não radiativa de energia (*NPQ*) é insuficiente para lidar com o excesso de energia esses drenos alternativos atuam como uma rota de escape para o excesso da energia proveniente da cadeia de transporte de elétrons da etapa fotoquímica, protegendo as plantas das espécies reativas de oxigênio (ERO), que são compostos que apresentam o potencial de causar danos oxidativos ao reagir com biomoléculas (Smirnoff, 2005; Blokhina et al., 2003).

A manutenção dos valores de taxa de transporte de elétrons (*ETR*), eficiência quântica potencial do FSII (F_v/F_m) e coeficiente de extinção fotoquímico (*qP*) sugerem que o período em que as plantas foram submetidas aos regimes de irrigação nos dois ambientes de crescimento foi longo o bastante pra iniciar um processo de aclimação. Flexas et al. (2006) relatam que em muitos trabalhos os resultados das respostas fotossintéticas ao estresse hídrico provêm de plantas submetidas a períodos relativamente curtos de experimento, obtendo-se parâmetros de resposta imediata. Contudo, em condições naturais, o estresse hídrico se desenvolve gradualmente, de semanas a meses, podendo ocorrer um processo de aclimação nesse período. Plantas aclimatadas podem melhorar suas relações hídricas e fotossíntese em relação às plantas não-aclimatadas, levando a menores decréscimos do ganho de carbono e crescimento (Flexas et. al., 2006). Os resultados observados da recuperação da capacidade fotossintética após a reidratação (figura 3) reforçam essa hipótese de aclimação.

Quando a disponibilidade hídrica é baixa e a planta é forçada a operar com uma baixa condutância estomática (diminuindo o uso de água), o decréscimo na fotossíntese pode aumentar o teor de nitrogênio foliar (Chapin, 1987). Cheng e Fuchigami (2000) evidenciaram a relação entre o estado de ativação da Rubisco e o nitrogênio foliar. Aproximadamente 75% do nitrogênio foliar em plantas C3 são encontrados nos cloroplastos, e a maior parte dela é investida somente na Rubisco (Fredeen et al., 1991; Dordas and Sioulas, 2008). Ao considerar que a Rubisco gera custos em termos de investimento de nitrogênio (N), os recursos de N podem ser desperdiçados se o teor de Rubisco for maior que a quantidade necessária utilizada (Cheng and Fuchigami, 2000). Visto que o decréscimo na condutância estomática em plantas sob restrição hídrica pode reduzir a fotossíntese líquida, a utilização de triose fosfato e, conseqüentemente, a regeneração da RuBP, o estado de ativação da Rubisco diminui (Galmés et al. 2011). Essas conseqüências descritas anteriormente podem ser sugeridas pelo os valores da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), que reduziram em plantas sob deficiência hídrica do A_{SC} . Portanto, sugerimos que houve uma alocação da quantidade de N disponível para a produção de clorofila, como indicado pelo aumento dos valores de ICC em plantas sob deficiência hídrica. Esse aumento nos valores de índice de teor de clorofila (ICC) em plantas sob deficiência hídrica também pode indicar o processo de aclimação dessa espécie.

Os resultados obtidos em nosso estudo indicam que a limitação da fotossíntese das plantas sob deficiência hídrica ocorreu tanto por fatores estomáticos bem como não-estomáticos de origem bioquímica. Os valores de potencial fotossintético (A_{maxCO_2}) decaíram principalmente pela queda do V_{cmax} , indicando uma limitação bioquímica, apesar dos dados em A_C terem apresentado apenas uma tendência de redução dos valores de V_{cmax} . Além disso, se o estresse hídrico reduz a atividade da Rubisco de forma independente de C_i , tanto as reações de carboxilação e de oxigenação da Rubisco podem ser reduzidas em iguais proporções (Ghannoum 2009), como indicado pelos valores reduzidos da fotorrespiração (F_R) (tabela 5), suportando a hipótese de limitação bioquímica. Adicionalmente, quando uma planta é susceptível à indisponibilidade hídrica, a redução na condutância estomática (tabela 5) é necessária a fim reduzir a perda de água por transpiração (E), ao passo que também impede a difusão do carbono até o sítio de carboxilação ocasionando decréscimos significativos na fotossíntese líquida (Yu et al., 2003) e acréscimos da eficiência intrínseca do uso de água ($Eiua$), como pode ser observado nos valores obtidos de plantas sob deficiência hídrica dos dois ambientes (tabela 5). Assim, a redução da condutância estomática (g_s) em

plantas sob deficiência hídrica (reduções de 75% e 60% em A_C e A_{SC} , respectivamente) pode ter contribuído para a redução da capacidade fotossintética (A_{maxL}).

Os resultados indicaram que a redução nos valores de R_d em plantas sob deficiência hídrica no A_C , foram proporcionais às reduções de A_{maxL} (tabela 5), sugerindo que tanto a capacidade de consumo como a de assimilação de CO_2 foram afetados pela falta de água. De acordo com Atkin & Macherel (2009), a deficiência hídrica induz mudanças no fluxo respiratório podendo refletir mudanças na atividade máxima de enzimas da respiração, mudanças no suprimento de substrato (devido à redução das taxas de fixação de carbono e subsequente produção de açúcar) e/ou demanda para ATP (associado ao crescimento, manutenção celular e transporte de íons). Ainda segundo os autores, de forma geral, o fator mais importante para o balanço de carbono tornar-se desfavorável em plantas com deficiência hídrica, é a fotossíntese.

Por outro lado, alguns estudos relatam que a redução nos valores de F_R e R_d em plantas crescidas com baixa irradiância incidente são características capazes de reduzir a perda de carbono sob condições desfavoráveis (Souza et al., 2008; Chapin 1987), e assim o ganho de carbono fotossintético é usado de forma mais eficiente (Björkman, 1981). A redução desses parâmetros em A_C , principalmente em plantas sob deficiência hídrica, sugere que a constância desse ambiente favoreceu um balanço de carbono mais positivo, uma vez que o MS_T das plantas foi maior nesse ambiente. Enquanto isso, embora os valores médios de $DFFF_{dia}$ fossem aproximadamente os mesmos nos dois ambientes, o aumento da F_R e R_d nas plantas do ambiente com maior variabilidade deve ter contribuído para tornar o balanço de carbono menos favorável, visto que a amplitude de variação da irradiância incidente foi maior nesse ambiente, podendo ter propiciado momentos de luz excessiva.

A manutenção no gasto energético (R_d) das plantas sob deficiência hídrica do A_{SC} indica que o custo energético pode ter sido destinado para a manutenção e reparo de danos causados pela maior variabilidade do ambiente. Outro dado que corrobora essa hipótese são os valores de EM_{MS} que foram muito maiores em A_{SC} , quando comparados ao A_C . Os maiores valores de EM_{MS} no ambiente com maior variabilidade (A_{SC}) sugerem que houve estresse oxidativo, de modo que o DAE não foi suficiente para garantir a integridade das biomembranas nesse ambiente. Assim, a maior variabilidade das mudanças aleatórias na disponibilidade de irradiância, em sinergia com maiores flutuações de temperatura, pode ter gerado um excesso de energia no aparato fotoquímico, aumentando a produção ERO e, conseqüentemente, os maiores danos nas biomembranas em A_{SC} .

Adicionalmente, o A_{SC} poderia conter algum tipo de estresse atmosférico capaz de provocar respostas estomáticas mais efetivas das plantas frente às variações ambientais (Chamont et al., 1995), como indicado pela redução de g_s em plantas bem irrigadas do A_{SC} , que apresenta maiores amplitudes de variação de UR , comparado às plantas irrigadas do A_C (tabela 1). A literatura evidencia que a dinâmica estomática pode ser diretamente sensível ao déficit de pressão de vapor, independente do potencial hídrico da planta (Franks et al., 1997; Schulze et al., 1972). Em termos de controle, isso é reconhecido como uma resposta de antecipação da planta frente às intempéries ambientais (Nobel, 1999).

Um resultado importante desse estudo foram as diferenças observadas entre os dados de respostas fotossintéticas e os de biometria em relação ao ambiente com maior (A_{SC}) e menor (A_C) variabilidade ambiental. Seria esperado que as plantas que tivessem um maior potencial fotossintético e eficiência dos processos fotoquímicos, como observado nas plantas do A_{SC} , apresentassem maiores valores de MS_T . Porém, o acúmulo de biomassa foi reduzido nesse ambiente. Assim, sugerimos que os fotoassimilados foram alocados para os mecanismos de manutenção e reparo, como descrito anteriormente, onde a amplitude de variação da irradiância, temperatura e umidade provavelmente foram mais estressantes. E, uma vez que os recursos foram desviados, o acúmulo de biomassa foi reduzido frente à provável atuação sinérgica dos fatores ambientais. Por outro lado, o aumento do potencial fotossintético e da eficiência do aparato fotoquímico das plantas do A_{SC} pode indicar um processo de aclimação dessa espécie, de modo que as respostas fisiológicas tenderam a aumentar a eficiência bioquímica e fotoquímica a fim de otimizar a produção dos recursos requeridos por essas plantas. Chapin et al. (1987) relatam alguns experimentos que evidenciam as respostas compensatórias à múltiplas limitações de recursos. Um deles menciona que as plantas respondem de forma sinérgica à adição de múltiplos recursos como, por exemplo, o aumento do crescimento em resposta a adição extra de nutrientes e luz (Peace and Grubb, 1982). Assim, um ambiente mais constante poderia oferecer maiores subsídios para o seu crescimento, como pode ser observado nas plantas mantidas no A_C . E, mesmo que o potencial fotossintético tenha sido baixo em plantas do A_C , os dados indicaram que grande parcela dos fotoassimilados deve ter sido direcionada para o acúmulo de biomassa, visto que os danos de membrana, e conseqüentemente o custo energético foram reduzidos nas plantas desse ambiente.

Por outro lado, as plantas cultivadas no A_C não apresentaram a mesma eficiência no crescimento da área foliar (AF). Considerando que os valores de A_{maxL} foram

significativamente menores quando foram mantidas no ambiente com menor variabilidade, os resultados sugerem diferentes estratégias de desenvolvimento para o melhor aproveitamento da irradiância incidente, demonstrando capacidade de aclimatação à ambientes com diferentes padrões de disponibilidade de luz (Souza et al. 2009). Assim, as plantas crescidas no ambiente com fornecimento homogêneo de luz de média irradiância ($600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) podem ter desenvolvido folhas capazes de reduzir o auto-sombreamento, aproveitando melhor a luz, enquanto que as plantas do A_{SC} tenderam aumentar a AF , gerando maior auto-sombreamento, e assim evitando os picos de irradiância incidente excessiva em alguns períodos do dia (Larcher 2000, Souza et al. 2009).

Resumindo, a deficiência hídrica provocou reduções significativas da quantidade de biomassa total das plantas de *G. max*. Porém, o ambiente com menor variabilidade (A_C) promoveu uma maior eficiência de produção de biomassa total em ambos os regimes de irrigação, quando comparados ao A_{SC} , apesar das diferenças observadas na capacidade fotossintética em cada ambiente. Nossos resultados suportam a tese que condições ambientais mais variáveis podem limitar o crescimento de *G. max* em função da maior flutuação de recursos, e assim amplificar o efeito da deficiência hídrica. Adicionalmente, nossos resultados evidenciam que a análise do impacto de uma deficiência hídrica deve considerar não somente a intensidade da restrição hídrica (moderada ou severa), mas, igualmente, a interação e os efeitos causados pela complexidade ambiental e a planta.

Referências Bibliográficas

- ATKIN, O. K.; MACHEREL, D. 2009. The crucial role of plant mitochondria orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany*. 103: 581-597.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxidative Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*. 91: 179-194.
- BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. 1990. Role of the xanthophylls cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*. 125: 173-185.
- BJÖRKMAN, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND C. B.; ZIEGLER, H. (ed). *Physiological Plant Ecology*. I. Responses to the Physical Environment. Springer-Verlag, Berlin, FRG.
- CHAPIN, F. S III. BLOOM, A. J.; FIELD C. B.; WARING, R. H. 1987. Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* 37: 49-57.

- CHAPIN, F. S III. 1991. Effects of multiple environmental stresses on nutrient availability and use. In: WINNER, E.; Pell, E.; Mooney, H. A. (eds) The response of plants to multiple stresses. Academic Press, New York, 67-88.
- CHAVES, M.M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.42, p.1-16,
- CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficit: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 55, 2365-2384.
- CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103: 551–560.
- CHAMONT, S.; STRAINCHAMPS, D.; THUNOT, S. 1995. Short- and long-term stomatal responses to fluctuations in environment in southern European greenhouses. *Annals of Botany*. 75: 39-47.
- CHENG, L.; FUCHIGAMI, L. 2000. Rubisco activation state decreases with increasing nitrogen content in apple leaves. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1687-1694
- DORDAS, C. A.; SIOULAS, C. 2008. Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. *Industrial crops and products*. 27: 75-85.
- EDWARDS, G.E.; BAKER, N.R. 1993. Can carbon dioxide assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis. *Photosynthesis Research*. 37: 89-102.
- FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 33: 317-345.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*. 127: 343-352.
- FLEXAS, J.; BARÓN, M.; BOTA, J.; DUCRUET, J.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; JIMÉNEZ, M.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAJNANI, C.; TOMÀS, M.; MEDRANO, H. 2009. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richer-110 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). *Journal of Experimental Botany*. 60: 2361-2377.
- FRANKS, P. J.; COWAN, I. R.; FARQUHAR, G. D. 1997. The apparent feedforward response of stomata to air vapour pressure deficit: information revealed by different experimental procedures with two rainforest trees. *Plant, Cell and Environment*. 20, 142-145.
- FREDEEN, A.L.; GAMON, J.A.; FIELD, C.B. 1991. Responses of photosynthesis and carbohydrate-partitioning to limitations in nitrogen and water availability in field-grown sunflower. *Plant, Cell and Environment*. 14: 963–970.

- GALMÉS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. 2011. Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *J. Experimental Botany*. 62, 653-665.
- GHANNOUM, O. 2009. C₄ photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*. 103, 635-644
- GONZÁLEZ-CRUZ, J.; PASTENES, C. 2012. Water-stress-induced thermotolerance of photosynthesis in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants: The possible involvement of lipid composition and xanthophyll cycle pigments. *Environmental and Experimental Botany*. 77: 127-140.
- JIANG, Y.; HUANG, B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop. Sci.* 41: 436-42.
- KAISER, W. M. 1987. Effects of Water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*. 71: 142-149.
- LAWLOR, D. W.; TEZARA, W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of process. *Annals of Botany*. 103: 561-579.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Traduzido por PRADO, C. H. B. A. RiMa Artes e textos, São Carlos.
- LESHEM, Y. Y.; SHEWFELT, R. L.; WILLMER, C. M.; PANTOJA, O. 1992. *Plant membranes: A biophysical approach to structure, development and senescence*. Kluwer Acad. Publi., Dordrecht - London
- LONG, S. P., BERNACCHI, C.J. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 54: 2393-2401.
- MATOS, M. C.; CAMPOS, P. S.; PASSARINHO, J. A.; SEMEDO, J. N.; MARQUES, N. M.; RAMALHO, J. C.; RICARDO, C. P. 2010. Drought effect on photosynthetic activity, osmolyte accumulation and membrane integrity of two *Cicer arietinum* genotypes. *Photosynthetica*. 48: 303-312.
- MONTEIRO, J. A.; PRADO, C. H. B. A. 2006. Apparent carboxylation efficiency and relative stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in an evergreen cerrado species during water stress. *Photosynthetica*, 44:39-45.
- MITTLER, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11: 15-19.
- MITTLER, R.; BLUMWALD, E. 2010. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 443-462
- MIYAKE, C.; AMAKO, K.; SHIRAISHI, N.; SUGIMOTO, T. 2009. Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system – relationship among the fraction of open PSII centers, non-photochemical quenching of chl fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark. *Plant and Cell Physiology*. 50: 730-743.

- MIYAKE, C. 2010. Alternative electron flow (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological function. *Plant and Cell Physiology*. 51:1951-1963.
- MURCHIE, E. H.; PINTO, M.; HORTON. 2008. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytologist*. 181: 532-552.
- NOBEL, P. 1999. *Plant Physiology*. (2^o ed.). Academic Press. San Diego, California.
- PEACE, W. J. H.; GRUBB, P. J. 1982. Interaction of light and mineral nutrient supply in the growth of *Impatiens parviflora*. *New Phytologist*. 90: 127-150.
- PINHEIRO, C; CHAVES, M. M. 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J. Experimental Botany*. 62: 869-882.
- REYNOLDS-HENNE, C.; LANGENEGGER, A.; MANI, J.; SCHENK, N.; ZUMSTEG, A.; FELLER, U. 2010. *Environmental and Experimental Botany*. 68: 37-43.
- RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. D.; OLIVEIRA, R. F. 2003. Early photosynthetic responses of sweet Orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62: 167-173.
- RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. 2004. When defense pathways collide: the response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol*. 134: 1683–96.
- SANDA, S.; YOSHIDA, K.; MASAYOSHI, K.; KAWAMURA, T.; MUNEKAGE, Y. N.; AKASHI, K.; YOKOTA, A. 2011. Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiologia Plantarum*. 142: 247-264.
- SHANNON, M. C. 1997. Adaptation of plants to salinity. *Adv. Agron*. 60: 75–120
- SHARKEY, T. D. 1988. Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiologia Plantarum*. 73: 147-152
- SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR G. D.; SINGSAAS, E. L. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell and Environment*. 30: 1035-1040.
- SCHULZE, E-D., LANGE, O. L.; BUSCHBOM, U.; KAPPEN, L.; EVENARI, M. 1972. Stomatal responses to changes in humidity in plants growing in the desert. *Planta*. 108, 259-270.
- SMIRNOFF, N. 2005. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing. University of Exeter – UK.
- SOUZA, G. M.; RIBEIRO, R. V.; SATO, A. M.; OLIVEIRA, M. S. 2008. Diurnal and seasonal carbon balance of four tropical tree species differing in successional status. *Brazilian Journal of Biology*. 68: 781-793.
- SOUZA, G. M.; BALMANT, B. D.; VITOLO, H. F.; GOMES, K. B. P.; FLORENTINO, T. M.; CATUCHI, T. A.; VIEIRA, W. L. 2009. Light utilization strategies and developmental

stability of *Cordia superba* Cham. (Boraginaceae) seedlings grown in different light environments. *Acta Botanica Brasilica*. 23: 474-485.

SULTAN, S. E.; WILCZEK, A. M.; BELL, D. L.; HAND, G. 1998. Physiological response to complex environments in annual *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *Oecologia*. 15: 564-578.

WERTIN T. M.; MCGUIRE, M. A.; TESKEY, R. O. 2010. The influence of elevated temperature, elevated CO₂ concentration and water stress on net photosynthesis of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) at northern, central and southern sites in its native range. *Global Change Biology*. 16: 2089-2103.

YU, G-R.; WANG, Q-F.; ZHUANG, J. 2003. Modeling the water use efficiency of soybean and maize plants under environmental stress: application of a synthetic model of photosynthesis-transpiration based on stomatal behavior. *Journal of Plant Physiology*. 161: 303-318