



MELINA KARLA ARANTES

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA ANATOMIA
FOLIAR DE POÁCEAS COM METABOLISMOS C3, C3
PROTO-KRANZ E C4**

**LAVRAS – MG
2020**

MELINA KARLA ARANTES

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA ANATOMIA
FOLIAR DE POÁCEAS COM METABOLISMOS C3, C3
PROTO-KRANZ E C4**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Ecofisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestra.

Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa
Orientador

Dra. Ane Marcela das Chagas Mendonça
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Arantes, Melina Karla.

Efeitos da restrição hídrica na anatomia foliar de poáceas com
metabolismos C3, C3 *proto*-Kranz e C4 : Effects of water
restriction on the foliar anatomy of poaceae with C3, C3 *proto*-
Kranz and C4 metabolisms / Melina Karla Arantes. - 2019.

45 p. : il.

Orientador(a): João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa.

Coorientador(a): Ane Marcela das Chagas Mendonça.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Ecofisiologia vegetal. 2. Metabolismo de transição. 3.
Estresse hídrico. I. Barbosa, João Paulo Rodrigues Alves Delfino.
II. Mendonça, Ane Marcela das Chagas.

MELINA KARLA ARANTES

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA ANATOMIA FOLIAR DE POÁCEAS
COM METABOLISMOS C3, C3 PROTO-KRANZ E C4**

**EFFECTS OF WATER RESTRICTION ON THE FOLIAR ANATOMY OF
POACEAE WITH C3, C3 PROTO-KRANZ AND C4 METABOLISMS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Ecofisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestra.

APROVADA em 03 de julho de 2019.

Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa – UFLA/MG

Prof. Dr. Pedro Lage Viana – Museu Emílio Goeldi, Belém/PA

Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães – UFLA/MG

Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa

Orientador

Dra. Ane Marcela das Chagas Mendonça

Co-orientadora

LAVRAS – MG

2020

*À minha família, que com todo amor me apoia e
sempre me apoiou a ir em busca dos meus sonhos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Deus, minha eterna gratidão!

A meus maravilhosos e amados pais, Lúcia e Carlos, a quem tanto devo e agradeço, pela criação, educação e amor que recebi. Ela, que sempre me apoiou e nunca mediu esforços para esse sonho se tornar realidade. Ele, por ser para mim o maior exemplo de dedicação, honestidade e trabalho, e o impulso que preciso para me tornar uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos Milena, Rudney e Mylla, pela nossa amizade e cumplicidade e por toda paciência e compreensão quando minha ausência se fez necessária. E às minhas sobrinhas Maitê e Antonella, anjos na Terra que trazem o céu para mais perto de mim.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Setor de Fisiologia Vegetal pelo acolhimento e pela oportunidade de realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG - pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, professor João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa, obrigada pelos ensinamentos, paciência, atenção e por ter me recebido tão bem no Laboratório de Ecofisiologia.

À minha co-orientadora e amiga, Ane Marcela, pelo apoio incondicional durante todo o desenvolvimento e execução do trabalho. Agradeço por sua amizade, paciência, empatia ao ouvir minhas lamentações e por todas as risadas compartilhadas. Você é uma pessoa admirável e eu sou muito grata por tê-la conhecido.

Ao João Paulo Penacchi, pela ajuda com as análises estatísticas, disponibilidade e paciência a me atender e sanar minhas inúmeras dúvidas.

À Debora, por nossa amizade e principalmente pelo apoio incondicional. Seu incentivo foi uma mola propulsora para que eu aventurasse nos ramos da Fisiologia Vegetal. Muito obrigada!

Aos queridos amigos que a Fisiologia Vegetal me trouxe: Mayra, Afonso, Daniel, Layane, Josy, Joyce, Zulma, Andrea, Antônia, Paulo Cássio e Lissa Izabel. Obrigada por me ajudarem a enxergar que não estou sozinha nessa caminhada, por serem meus amigos, dando-me assistência nos momentos que quase desabei e por toda a alegria compartilhada. Vocês tornaram tudo muito mais leve!

À equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA, em especial à Aline e ao professor Eduardo Alves, por toda disponibilidade em me auxiliar a fixar os materiais e a utilizar a estrutura.

À Sarah, muito obrigada pela cumplicidade, carinho, compreensão, amizade e incentivo. Você é incrível e me faz crer que eu sou também. É muito bom sorrir contigo e melhor ainda é sentir estamos crescendo juntas!

Aos ex/eternos professores que contribuíram para meu desenvolvimento e aprendizado e que, de certa forma, despertaram em mim admiração e inspiração para seguir seus passos.

À banca examinadora, por aceitar participar da defesa com sua contribuição para o aprimoramento do documento.

À Salete, por ser tão gentil e paciente em todas as vezes que precisei de auxílio. Profissional admirável que sempre tratou todos com muito carinho e atenção.

Ao Joel e ao Odorêncio, pelas risadas e pelo auxílio e preparo do material para executar o experimento.

À Melissa, por ser, desde que me entendo por gente, uma ótima amiga. Obrigada por compartilhar a casa, a comida, as risadas e o carinho comigo. Sua presença em minha vida é uma dádiva e me sinto muito privilegiada por ter sua amizade!

E por último e não menos importante, agradeço a todos os meus amigos que, mesmo distantes, nosso amor continuou presente. Amo muito vocês.

Muito obrigada!

“Que tenhamos sempre alegria e gratidão em nossos corações pelas ervas que, em Seu amor por nós, o Grande Criador de todas as coisas colocou nos campos para nossa cura.” (Edward Bach)

RESUMO

Estudos relacionados a evolução, a distribuição de plantas e a ecologia tem como alvo compreender como as mudanças climáticas e os estresses abióticos afetam plantas de diferentes metabolismos fotossintéticos. O principal objetivo deste estudo foi determinar a influência da disponibilidade hídrica sobre as variações da anatomia foliar de poáceas C3, C3 proto-Kranz e C4. Nesta pesquisa, três espécies de plantas representantes dessas vias assimilatórias de carbono, *Oryza sativa*, *Homolepis isocalycia* e *Andropogon gayanus*, respectivamente, foram submetidas a três regimes hídricos. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x3, considerando duas variedades de arroz, uma suscetível e outra tolerante à seca – Soberana e Douradão, respectivamente. Foram determinadas as seguintes variáveis: distância e número de células entre os feixes vasculares (μm), área coberta por células da bainha do feixe vascular (BFV), área coberta por células do mesofilo (M), área total da epiderme (AEPID), espessura da epiderme superior e inferior da face adaxial (EADAX) e da face abaxial (EABAX), área coberta por células buliformes (CB), área do espaço intercelular (EI), área do xilema (X) e área do floema (F). Determinou-se o percentual de células buliformes (pBULIF), percentual de espaço intercelular (pEI), percentual de área de assimilação do carbono em células do mesofilo, percentual de área de redução do carbono na bainha do feixe vascular e razão da área de assimilação do carbono no mesofilo pela área de redução do carbono na bainha do feixe vascular (M:BFV). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o software *R Studio*. Foi possível verificar que quanto mais específica for a anatomia foliar da espécie, como no caso da *A. gayanus* (C4), menos variações anatômicas ocorrem, independentemente da condição hídrica. O comportamento anatômico foliar da espécie intermediária *H. isocalycia* se assemelhou tanto às espécies C3 como às C4 em determinadas características analisadas, como área do mesofilo, número de células, densidade estomática, espessura da epiderme abaxial, área do floema e do espaço intercelular. Quando submetidas à restrição hídrica, o rearranjo anatômico foi semelhante às plantas de arroz na distância entre feixes vasculares e área de células buliformes; e semelhante às plantas C4 na relação de células do mesofilo por células da bainha do feixe vascular (M:BFV).

Palavras-chave: Ecofisiologia vegetal. Metabolismo intermediário. Estresse hídrico. Fisiologia do estresse. Metabolismo de transição.

ABSTRACT

Studies related to evolution, plants distribution and ecology aim to understand how climatic changes and abiotic stress affect plants with different photosynthetic metabolisms. The aim objective of this study was to determine the influence of water availability on leaf anatomy variations of C₃, C₃ proto-Kranz and C₄ poaceae. In this research, three species representatives the carbon assimilatory pathways, *Oryza sativa*, *Homolepis isocalyca* and *Andropogon gayanus*, respectively, were submitted to three water regimes. The design was completely randomized design in a 4x3 factorial scheme, considering two rice varieties, susceptible and the drought tolerant – Soberana and Douradão, respectively. The following variables were determined: distance and number of cells between vascular bundles (μm), area covered by vascular bundle sheath cells (BFV), area covered by mesophyll cells (M), total epidermis area (AEPID), thickness of the upper and lower epidermis on the adaxial (EADAX) and the abaxial (EABAX) face, area covered of the buliform cells (CB), intercellular space area (EI), xylem area (X) and phloem area (F). Was determined the percentage of buliform cells (pBULIF), percentage of intercellular space (pEI), percentage of carbon assimilation area in the mesophyll cells, percentage of carbon reduction area in the vascular bundle sheath and ratio of carbon assimilation area in the mesophyll for carbon reduction area in the vascular bundle sheath (M:BFV). The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test ($P < 0.05$) using R Studio software. It was possible to verify that the more specific the leaf anatomy of the species is, as in the case of *A. gayanus* (C₄), less anatomical variations it occur, regardless of the water condition. The foliar anatomical behavior of the intermediate species *H. isocalyca* resembled both C₃ and C₄ species in certain characteristics analyzed, such as the mesophyll area, number of cells, stomatal density, abaxial epidermal thickness, phloem area and intercellular space. When subjected to water deficit, anatomical rearrangement was similar to rice plants at the distance between vascular bundles and buliform cells area; and similar to C₄ plants in the ratio of mesophyll cells to vascular bundle sheath cells (M: BFV).

Keywords: Plant ecophysiology. Intermediate metabolism. Water stress. Stress physiology. Transition metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Temperatura e umidade relativa durante o período experimental.....	22
Figura 2 – Médias das temperaturas diurna e noturna e médias da umidade relativa diurna e noturna durante o período experimental.....	22
Figura 3 – Potencial hídrico mínimo e máximo avaliado ao final do período experimental. .	23
Figura 4 - Secções foliares transversais de plantas das espécies C3, C3 proto-Kranz e C4 sob três regimes de hidratação.	27
Figura 5 – (a) Distância entre dois feixes vasculares (μm) e (b) Número de células entre feixes vasculares (μm) em espécies aparentadas com metabolismos fotossintéticos diferentes sob diferentes regimes hídricos.....	27
Figura 6 – (a) Tecido de redução do carbono na bainha do feixe vascular (μm) e (b) tecido de assimilação primária de carbono no mesofilo (μm) em espécies com metabolismos fotossintéticos diferentes sob diferentes regimes hídricos.	29
Figura 7 – Razão área da célula do mesofilo: área de célula da bainha do feixe vascular para as espécies C3 (<i>Oryza sativa</i> var. Soberana e Douradão), C3 proto-Kranz (<i>Homolepis isocalycia</i>) e C4 (<i>Andropogon gayanus</i>) sob diferentes tratamentos hídricos.....	30
Figura 8 – (a) Área de células buliformes (μm) e (b) espaço intercelular (μm) em espécies aparentadas com metabolismos fotossintéticos diferentes sob diferentes regimes hídricos. ...	31
Figura 9 – (a) Espessura da epiderme adaxial (μm) e (b) espessura da epiderme adaxial (μm) de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.....	32
Figura 10 – Secções foliares paradérmicas de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.....	33
Figura 11 – (a) Densidade estomática (μm) e (b) razão diâmetro polar: diâmetro equatorial de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.	34
Figura 12 – Espessura do mesofilo (μm) de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.....	34
Figura 13 – Secções foliares transversais mostrando o xilema e floema das espécies de <i>Oryza sativa</i> , <i>Homolepis isocalycia</i> e <i>Andropogon gayanus</i> sob diferentes regimes de hidratação...	35
Figura 14 – (a) Área do floema (μm) e (b) área do xilema (μm) de plantas C3 (<i>Oryza sativa</i> variedades Soberana e Douradão), C3 proto-Kranz (<i>Homolepis isocalycia</i>) e C4 (<i>Andropogon gayanus</i>) cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Vias de Assimilação do Carbono em Plantas	15
2.2 Plasticidade Fenotípica	17
2.3 Déficit hídrico	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Área de estudo, material vegetal e ambiente de cultivo	20
3.2 Disponibilidade Hídrica	21
3.3 Delineamento Experimental	21
3.4 Caracterização das condições ambientais da casa de vegetação	21
3.5 Potencial Hídrico	23
3.6 Anatomia foliar	23
3.7 Análises Estatísticas	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÕES	38
6. REFERÊNCIAS	39
7. ANEXOS	42

1. INTRODUÇÃO

As plantas assimilam o CO₂ por diferentes vias metabólicas. Essas vias de assimilação são resultadas de modificações anatômicas, fisiológicas e estruturais das folhas e seus metabólitos. Por exemplo, as plantas do tipo C₃, C₄ e CAM usam diferentes enzimas e modos de assimilação de carbono. As modificações climáticas, por sua vez, tiveram certa influência sobre essa necessidade das plantas em adaptar seu mecanismo fotossintético. O aumento da temperatura, a queda da concentração de CO₂ na atmosfera, longos regimes de seca e a aridez são alguns exemplos dos fatores que contribuíram para essa evolução. Além disso, existe uma certa plasticidade fenológica entre os tipos de assimilação, o que está intimamente relacionada às variações ambientais.

Nas plantas C₃, a enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase, conhecida comumente como Rubisco, atua tanto na captação do dióxido de carbono como na de oxigênio, a depender das condições que favorecem suas funções carboxilase ou oxigenase. Atuando como carboxilase, a rubisco utiliza a oxi-redução entre o CO₂ e a Ribulose-1,5-bifosfato, gerando 2 trioses-fosfato. Essa via assimilatória C₃ é considerada a mais primitiva, tendo surgido há cerca de 2500×10^{-6} anos, em um cenário onde a atmosfera da Terra ainda era pobre em oxigênio. Com o aumento ao longo do tempo das concentrações de O₂ na atmosfera devido à fotossíntese, a Rubisco então passou a exercer sua função oxigenase, catalisando as reações entre Ribulose-1,5-bifosfato e o oxigênio, resultando no que é conhecido como fotorrespiração. Esse processo é muito importante por dissipar o excesso de energia que é produzida na forma de ATP e NADPH quando a planta está sob alta intensidade de radiação, temperatura ou estresse hídrico. Quando potencializada pelo aumento da temperatura, a fotorrespiração é responsável por diminuir a produtividade de espécies C₃, como o arroz (*Oryza sativa* Linnaeus)¹, por exemplo. O aumento desse processo fotorrespiratório pode ter sido uma forte razão para o surgimento de outras vias de assimilação do carbono, como por exemplo a via C₄, que é considerada um dos fenômenos evolutivos mais complexos da história do planeta Terra.

Na via assimilatória do tipo C₄, atividade de carboxilação das plantas ocorre em compartimentos específicos, o que a separa dos demais processos metabólicos. Essa

¹ Classificada na tribo Oryzeae, subfamília Ehrhartoideae, que pertence ao clado BEP (GPGW II, 2012).

separação espacial é denominada *Anatomia Kranz*. Essas plantas também fixam o CO₂ através da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), que catalisa nas células do mesofilo (M) a reação de HCO₃⁻ com fosfoenolpiruvato (PEP). Os ácidos orgânicos formados de quatro carbonos – por diferentes subunidades enzimáticas – fluem para as células da bainha do feixe vascular (BFV), onde então são descarboxilados. Assim, o CO₂ que se concentra ao redor do sítio da Rubisco é refixado e, como consequência, a fotorrespiração é reduzida. Embora essa via fotossintética tenha menos representantes em comparação às demais (das 250.000 espécies de plantas, somente 7.500 apresentam a via C4), ela responde por cerca de 25% da produtividade primária bruta. Além do mais, diferentemente da Rubisco, a enzima PEPcase é específica quanto a assimilação do CO₂ atmosférico, o que contribui para que as plantas C4 tenham maior capacidade fotossintética quando comparadas aquelas C3, principalmente em ambientes secos e sob alta temperatura.

Algumas plantas apresentam a chamada plasticidade fenotípica, que é quando, sob condições adversas, manifestam estados alternativos em busca do equilíbrio. Em outras palavras, visando a homeostase, as plantas podem assumir diferentes fenótipos em função das oscilações do ambiente. E foi devido a essa capacidade plástica das plantas que houve a transição dos metabolismos fotossintéticos. Isso se deu de forma gradativa e independente ao longo do tempo, em diferentes ordens e diferentes linhagens. Por exemplo, as poáceas tem representantes com metabolismos fotossintéticos C3, C4 e também apresentam indivíduos com metabolismos transitórios como C2, C3 proto-Kranz e também *C4-like*. No entanto, essas informações ainda estão escassas para espécies nativas com vias metabólicas intermediárias.

No que tange à transição das vias fotossintéticas para a via C4, as primeiras modificações que ocorreram em nível foliar culminaram na formação da *Anatomia Kranz*, que consiste em camadas de células concêntricas ao redor dos feixes vasculares para otimizar a assimilação do carbono. A camada interna é composta por células da bainha do feixe vascular (BFV), e a camada externa por células do mesofilo (M). Em geral, células BFV são responsáveis pela redução do carbono e células do mesofilo pela assimilação. É fundamental que BFV e M estejam próximas para concentrar o carbono ao redor da Rubisco e otimizar sua assimilação. Para tanto, houve o aumento do tamanho das células da bainha e da densidade dos feixes vasculares, além de diminuição da distância entre os feixes, o que são consideradas as primeiras etapas para a transição C4. Assim, espécies consideradas de metabolismo intermediário, como

a *Homolepis isocalycia*, que representam etapas dessa evolução, apresentam essas características anatômicas.

Certamente, a disponibilidade de água é um dos fatores ambientais mais limitantes e importantes para o crescimento, estabelecimento e desenvolvimento das plantas. Várias alterações e diferenças fenotípicas são observadas quando uma mesma espécie é colocada sob diferentes regimes de hidratação. Sob condições de restrição hídrica, observa-se redução do crescimento e outros efeitos como maior densidade de vasos, menor distância entre feixes vasculares e diminuição da área do mesofilo e do feixe vascular, assim como menor área de células buliformes, entre outras modificações.

Assim, partindo da premissa de que diferentes disponibilidades de água causam diferentes ajustes estruturais e anatômicos por conta dessa capacidade plástica, a hipótese deste trabalho é que, sob ótimas condições de hidratação, as espécies nativas intermediárias com metabolismos C3 proto-Kranz comportam-se semelhantes às plantas C3. Além do mais, sob restrição hídrica, as mesmas tem anatomia semelhante às C4. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência da disponibilidade hídrica sobre as características anatômicas foliares de poáceas C3, C3 proto-*Kranz* e C4.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vias de Assimilação do Carbono em Plantas

A maioria das plantas tem metabolismo fotossintético C3, no qual a enzima Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase, popularmente conhecida como Rubisco, é a pioneira na fixação do CO₂ no processo fotossintético. Essa enzima, como o próprio nome diz, tem afinidade tanto para o carbono como para o oxigênio, e que, a depender da temperatura e da concentração atmosférica de CO₂, exerce atividade oxigenase em vez da carboxilase, promovendo então a fotorrespiração em detrimento da fotossíntese. Quando ela surgiu, não havia obstáculo algum para o rendimento fotossintético, pois a atmosfera do planeta tinha uma concentração mais elevada de CO₂ em relação aos dias de hoje – atualmente é cerca de 400 ppm – o que favorecia a fotossíntese. Mas desde que a concentração atmosférica do planeta foi diminuindo, sua atividade oxigenase favoreceu no aumento da fotorrespiração. Em ambientes de climas quentes com baixa latitude, as plantas C3 tem seu rendimento consideravelmente reduzido devido a atividade fotorrespiratória, pois a molécula de fosfoglicolato produzida pela Rubisco precisa ser reciclada, e nesse processo há o consumo de ATP ao liberar uma molécula de CO₂ por uma de O₂.

O arroz (*O. sativa*) é um dos alimentos mais cultivados e mais consumidos pela população mundial e pode ser cultivado tanto em condições irrigadas ou de sequeiro. Existe uma necessidade global estimada de mais de 116 milhões de toneladas de arroz até 2035. Embora os rendimentos continuem aumentando em várias partes do globo, a produção em outras grandes áreas não melhoram, o que exige novos investimentos. Uma das preocupações quanto às modificações climáticas é em relação às perdas produtivas das culturas que utilizam a via C3, como o arroz, por exemplo. O aumento dos períodos de seca e da temperatura favorecem nessas plantas a fotorrespiração em detrimento da fotossíntese. Uma alternativa proposta para sanar esses prejuízos seria a inserção da via metabólica C4 em plantas C3 para aumentar sua produtividade (VON CAEMMERER; QUICK; FURBANK, 2012). Para tanto, é preciso compreender melhor como ocorreu a evolução entre essas vias fotossintéticas.

Para compensar o baixo rendimento e as taxas de fotorrespiração muito altas, algumas plantas desenvolveram ao longo do processo evolutivo alguns mecanismos anatômicos e bioquímicos para aumentar a concentração de CO₂ em volta da Rubisco, suprimindo assim a fotorrespiração, de forma que se tornaram muito mais eficientes fotossinteticamente que as

plantas C3 sob altas temperaturas (BETTI et al., 2016; BUSCH et al., 2013; LUNDGREN et al., 2016).

A transição evolutiva da via fotossintética C3 para C4 ocorreu de forma gradual. Alguns estudos filogenéticos demonstram que algumas linhagens sofreram eventos independentes e em ordens diferentes. Apesar da sequência das etapas evolutivas não ser igual, a ocorrência de espécies com metabolismos considerados intermediários, classificados como C2 (tipos I e II), C3 proto-Kranz e C4-like, é comum entre várias linhagens. No melhor modelo de evolução para a via C4, a Anatomia Kranz progrediu de espécies C3 com maior número de células da bainha, maior densidade de vasos e um deslocamento evidente da mitocôndria para a parede interna da bainha. Essas modificações formaram uma versão primária, a anatomia C2 kranz, que é denominada proto-Kranz. Essa etapa foi a primeira proposta para eliminar o CO₂ fotorrespiratório, trazendo benefícios de fitness em ambientes com alta temperatura e, por isso, representa um estágio fundamental da evolução das formas C2 e C4 da Anatomia Kranz. Além disso, a transição da via C3 para proto-Kranz é considerada universal em todas as linhagens. Nesse estágio, a distância entre os feixes vasculares é menor, a bainha do feixe já tem participação na fotossíntese, há mais organelas e elas estão reposicionadas, a enzima Glicina descarboxilase (GDC) tem expressão restrita, o que acarreta na expressão diferenciada de PEPcase e da Rubisco entre as células da bainha e do mesofilo. O clado *Homolepis/Mesosetum* apresenta etapas entre as vias C3 e C4 e a espécie *Homolepis isocalycia* apresenta um conjunto de características anatômicas e bioquímicas que classificam-na como C3 proto-Kranz (MENDONÇA, 2017). Além dos padrões de distribuição ambiental, essa espécie apresentou todas as principais etapas evolutivas, como diminuição da distância entre os feixes vasculares, utilização do CO₂ fotorrespiratório e metabolismo da glicina restrito às células da bainha do feixe vascular (MENDONÇA, 2017).

Já a via fotossintética C4 é considerada um dos fenômenos evolutivos mais complexos da Terra, a qual tem mecanismos especializados para a incorporação do CO₂ atmosférico. Essa incorporação do CO₂ é realizada por células especializadas e em compartimentos diferentes, as células do mesofilo (M) e as células da bainha do feixe vascular (BFV), o que é conhecido como Anatomia Kranz (HATCH; AGOSTINO; BURNELL, 1988; LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014; SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). Além disso, independente do subtipo bioquímico, apenas o CO₂ atmosférico é assimilado – o que aumenta consideravelmente a capacidade fotossintética –, formando então ácidos orgânicos de quatro carbonos – por isso o nome C4. A enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) assimila o CO₂ nas células do

mesófilo, formando oxaloacetato (OAA), que pode então ser rapidamente convertido a malato ou aspartato, dependendo da enzima. A conversão a malato se dá no cloroplasto do mesófilo pela enzima málica dependente de NADP (NADP-ME), enquanto a conversão a aspartato ocorre no citosol, tanto pela NAD-ME ou PEPCK (enzima málica dependente de NAD e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, respectivamente). Posteriormente, esses açúcares são transportados para serem descarboxilados no cloroplasto (via NADP-ME), mitocôndria (via NAD-ME) ou no citosol (via PEPCK) das células da bainha do feixe vascular (FURBANK, 2011; VON CAEMMERER; QUICK; FURBANK, 2012). Assim, o CO₂ fica concentrado ao redor da Rubisco para ser refixado, inibindo conseqüentemente a fotorrespiração (LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014; SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014).

Andropogon gayanus Kunth é uma gramínea C4 nativa da África que se caracteriza por um extenso sistema radicular que acessa água e nutrientes a maiores profundidades no perfil do solo, o que lhe confere notável resistência à seca e propriedades de crescimento diferenciadas (ROSSITER-RACHOR et al., 2009). Assim, essa espécie é reconhecida por seu sucesso invasivo e alta persistência em savanas de algumas regiões do mundo, ao apresentar características diferenciadas em relação às gramíneas nativas dessas regiões, como altas taxas fotossintéticas, maior uso de água no solo, maior período de crescimento na estação seca e maior absorção e eficiência no uso do nitrogênio (ROSSITER-RACHOR et al., 2008; ROSSITER-RACHOR et al., 2009). A avaliação das respostas fisiológicas desta espécie, melhora a compreensão dos ajustes estruturais e anatômicos apresentados em plantas C4 em resposta a diferentes regimes de disponibilidade hídrica.

2.2 Plasticidade Fenotípica

Um conceito básico na biologia evolutiva e em genética é o da plasticidade fenotípica, que se trata da capacidade de um genótipo em expressar diferentes fenótipos à medida em que o ambiente muda. Especificamente em plantas, a plasticidade é um atributo muito importante, pois, por serem organismos sésseis e estarem sujeitas a intempéries, elas apresentam uma notável capacidade de se ajustar às diversas condições ambientais (BRADSHAW, 1965; MAESTRE et al., 2007; MATESANZ; GIANOLI; VALLADARES, 2010; RAMÍREZ-VALIENTE et al., 2010).

Esses ajustes abrangem uma ampla gama de características funcionais, visto que diferentes alterações no ambiente afetam diferentes características e comportamentos. O aumento do CO₂ e da temperatura, a fragmentação do habitat, a poluição, a seca ou ainda a combinação destes fatores são alguns dos exemplos de modificações climáticas que induzem a plasticidade nas plantas, fazendo com que elas se reajustem em busca do equilíbrio sob essas novas condições (MATESANZ; GIANOLI; VALLADARES, 2010; SCHLICHTING, 2002).

Diversos estudos apontam que uma das mais onipresentes formas de plasticidade fenotípica é a alteração na fenologia em resposta às alterações do clima, com modificações morfológicas, fisiológicas e anatômicas. As modificações morfológicas correspondem as alterações nas características estruturais, como ajustes dos órgãos e organelas fotossintetizantes, mudanças na proporção dos tecidos fotossintetizantes e na espessura da lâmina foliar. Já as alterações fisiológicas compreendem modificações como diminuição do teor de água nas células, ajustes na condutância estomática, aumento da eficiência do uso da água, modificações nos padrões de crescimento e na alocação de biomassa. Essas modificações, quando combinadas ou não, influenciam na capacidade fotossintética e, por isso, as plantas podem apresentar vantagens no estabelecimento em diversos ecossistemas, sendo caracterizadas como mais ou menos plásticas quando comparadas com outras espécies de metabolismos diferentes sob as mesmas condições (MATESANZ; GIANOLI; VALLADARES, 2010; MONSON; MOORE, 1989; SCHLICHTING, 2002).

Mesmo que convencionalmente considerada vantajosa às plantas, a plasticidade fenotípica tem custos que devem ser considerados, o que podem ocasionalmente superar essas vantagens (DEWITT et al., 1998). Há estudos que demonstram que algumas características exclusivas das espécies C₄ podem afetar e reduzir seu potencial de plasticidade e aclimatação fotossintética quando comparadas a espécies de metabolismo C₃ (SAGE; MCKOWN, 2006). Isso porque quanto maior a especialização dos organismos, menor tende a ser a plasticidade fenotípica. Consequentemente, quanto mais especializada for a espécie, mais restrita pode ser sua distribuição geográfica (RAMÍREZ-VALIENTE et al., 2010).

O estresse hídrico é um importante fator que determina a distribuição das plantas e, consequentemente, as respostas a diferentes níveis de água tem sido alvo de inúmeros estudos (CARMO-SILVA et al., 2009). As plantas C₄, quando submetidas a déficit hídrico, apresentam menor plasticidade ao aparelho fotossintético por terem menor capacidade de regulá-lo sob estresses (SAGE; MCKOWN, 2006). Já sob condições ótimas de hidratação, elas têm menor

recuperação nas taxas fotossintéticas, e, por isso, estudos com restrição hídrica contribuem para a compreensão da dinâmica das alterações fisiológicas.

Portanto, analisar a plasticidade fenotípica é muito relevante para compreender a capacidade de modificação dos fenótipos sob diferentes disponibilidades de água em espécies aparentadas mas com mecanismos diferentes de assimilação de carbono.

2.3 Déficit hídrico

A água é um dos fatores mais importantes e mais limitantes à sobrevivência, crescimento, estabelecimento das plantas e produtividade agrícola (CARMO-SILVA et al., 2009; FRACASSO; TRINDADE; AMADUCCI, 2016). A condição de estresse é determinada por algum fator essencial para a manutenção das plantas, que esteja em excesso em falta no ambiente, ou pelo ataque de micro-organismos. O estresse hídrico afeta diretamente a sobrevivência das plantas em várias regiões do globo, principalmente em regiões com períodos prolongados de seca (GHANNOUM, 2009; HABERMANN et al., 2019).

O estresse hídrico inicia quando a água disponível no solo é menor que a demanda hídrica exigida pelo vegetal. A transpiração associada à menor disponibilidade hídrica e sem a reposição de água pela chuva ou por irrigação são fatores que desencadeiam a desidratação dos tecidos ao decorrer do tempo (HABERMANN et al., 2019).

As respostas das plantas ao estresse hídrico envolvem mecanismos morfofisiológicos, bioquímicos e reações moleculares e podem ser diferentes entre as espécies C3 e C4 (GHANNOUM, 2009; OSAKABE et al., 2014). O fechamento estomático é a primeira resposta ao déficit hídrico em ambas espécies (HABERMANN et al., 2019) e esse mecanismo de proteção para evitar a perda de água para reduzir a transpiração também causa redução na condutância estomática (HABERMANN et al., 2019).

A mudança no volume de água da célula como a perda de turgor, juntamente com a redução do potencial hídrico e osmótico também são consequências do estresse hídrico (BRAY, 1997). Além disso, Além disso, o déficit hídrico pode acarretar na concentração de solutos, mudança da forma da membrana, ruptura da coluna d'água e desnaturação de proteínas (BRAY, 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo, material vegetal e ambiente de cultivo

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia entre os meses de maio a setembro de 2018. As análises do material vegetal foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e Funcionamento de Ecossistemas, Laboratório de Anatomia Vegetal e no Laboratório Interdisciplinar de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°13'40" S e 44°57'31" W GRW).

Como já descrito anteriormente, foram escolhidas três espécies como objeto de estudo: *Oryza sativa*, *Homolepsis isocalyca* (G. Mey) e *Andropogon gayanus* Kunth var. *bisquamulatus* (Hochst) Hack, com metabolismos fotossintéticos descritos como C3, C3-Proto-Kranz e C4, respectivamente.

As espécies de *Andropogon gayanus* Kunth var. *bisquamulatus* (Hochst) Hack e *Homolepsis isocalyca* (G. Mey.) foram obtidas do Setor Experimental da Zootecnia (Universidade Federal de Lavras) e da Serra do Cipó (-19.168889, -43.713889), respectivamente. As plantas de *Oryza sativa*, nas variedades Douradão e Soberana, foram obtidas e propagadas a partir de sementes gentilmente cedidas pelo Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Da germinação ao estabelecimento das plantas de arroz, foram cultivadas duas plântulas por vaso. Utilizou-se o método de semeadura direta em recipientes de 15 cm de diâmetro por 35 cm de altura, em um volume de substrato de 4 L. O substrato foi composto por areia lavada e não foi realizado nenhum tipo de tratamento pré-germinativo. As espécies *H. isocalyca* e *A. gayanus* foram propagadas através dos rizomas utilizando os mesmos recipientes, substrato e condições descritas anteriormente.

A fertilização das plantas foi realizada quinzenalmente com NPK 04-14-08 e suplementadas com MgSO₄, Ca (NO₃)₂, KNO₃ e MAP até o fim do experimento. Os nutrientes foram fornecidos em conjunto à água de irrigação.

3.2 Disponibilidade Hídrica

A capacidade de campo (CC) foi calculada por método gravimétrico e determinada em $0,21 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$. Antes do plantio, todos os citropotes cheios de areia foram encharcados com água até atingir o ponto de saturação e cobertos por 12 horas para que toda a água fosse percolada. Depois desse tempo, somente a água aderida às partículas do substrato permaneceu e, assim, os citropotes foram pesados. Determinou-se, então, o peso de cada vaso em uma condição de 100% CC.

Depois de todas as plantas estabelecidas, foram impostas três condições de disponibilidade de água, que consistia na manutenção das plantas irrigadas a 92,5%, 70,9% e 53% da capacidade de campo (L1, L2 e L3, respectivamente). Durante todo o período experimental, cada vaso era irrigado sobre uma balança do modelo Elgin Excel S/A para que fosse hidratado até atingir o peso ideal de acordo com a capacidade de campo determinada.

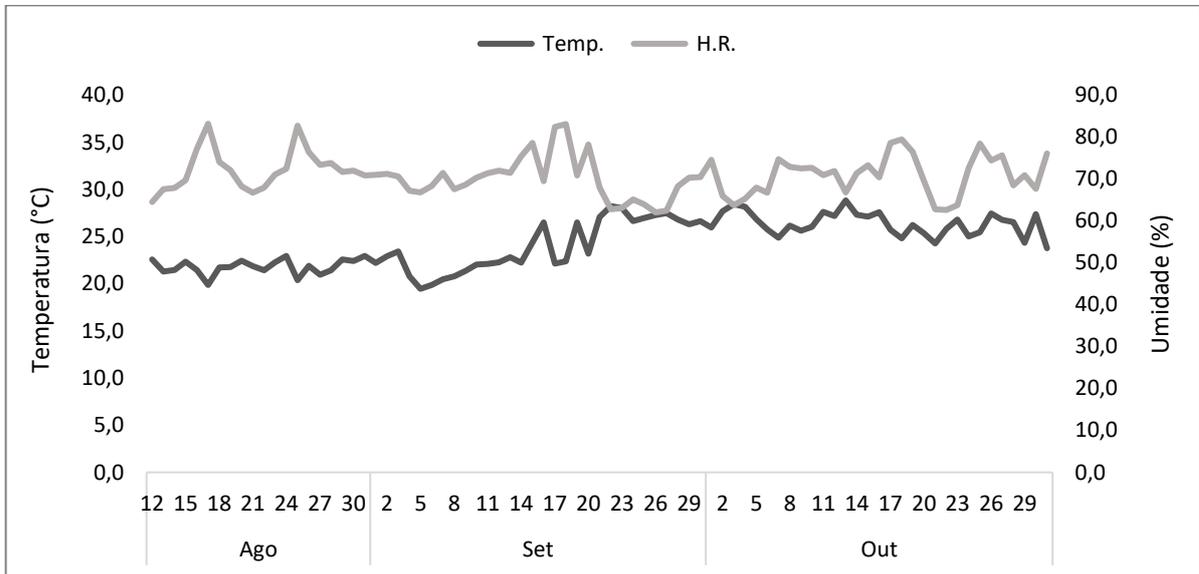
3.3 Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x3, utilizando as quatro variedades descritas das espécies e três lâminas de irrigação, com dez repetições por tratamento, totalizando 120 plantas.

3.4 Caracterização das condições ambientais da casa de vegetação

Foram mensurados os dados de temperatura mínima, temperatura média, temperatura máxima ($T \text{ } ^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar (UR%) durante todo o período de estudo com o termohigrômetro Extech Instruments, modelo RHT10. A temperatura média foi de $29^\circ\text{C}/19^\circ\text{C}$ (dia/noite) e a média da umidade relativa foi 59% de dia e 84% à noite (Figuras 1 e 2).

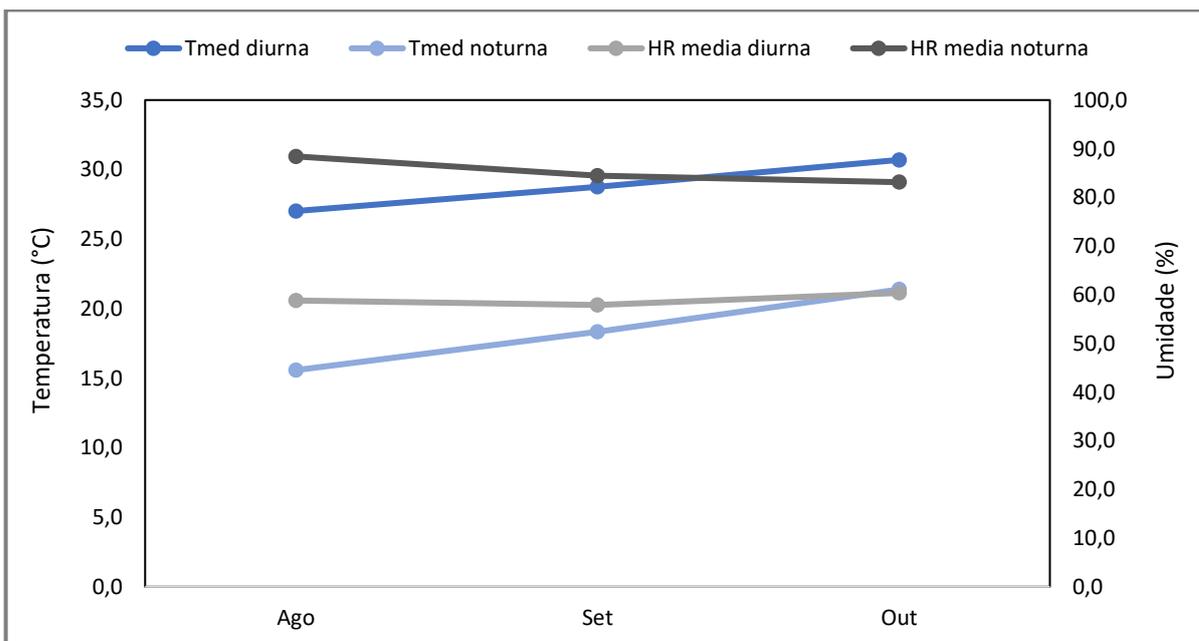
Figura 1 – Temperatura e umidade relativa durante o período experimental.



Legenda: Temp. – Temperatura; H.R – Umidade relativa.

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 2 – Médias das temperaturas diurna e noturna e médias da umidade relativa diurna e noturna durante o período experimental.



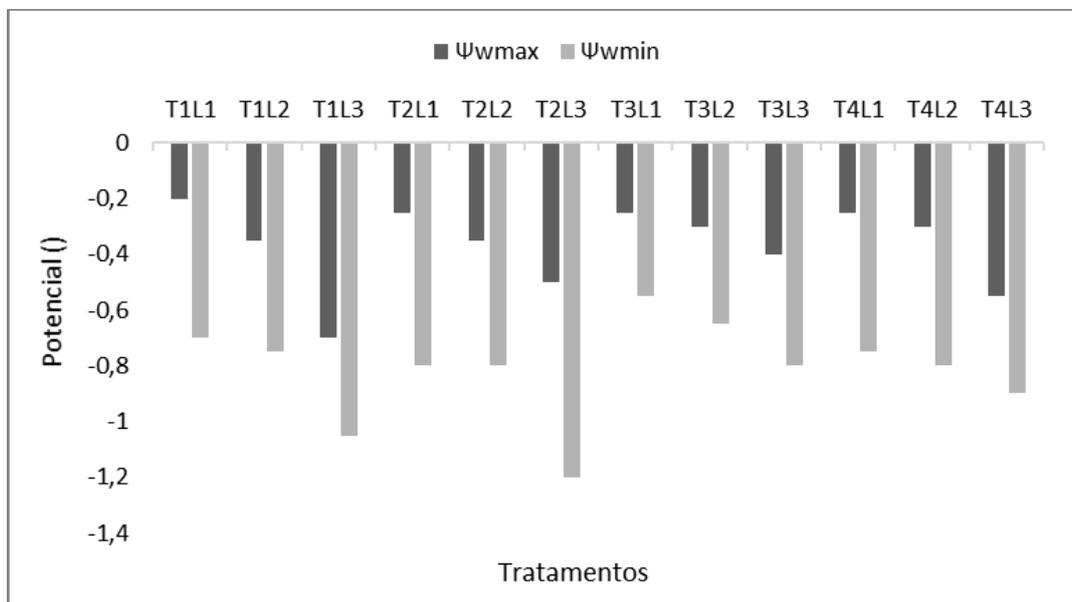
Legenda: Tmed – Temperatura média; HR – Umidade relativa.

Fonte: Da Autora (2020)

3.5 Potencial Hídrico

O estado hídrico das plantas foi avaliado ao final do experimento pelo potencial hídrico, que foi medido com a câmara de pressão Scholander entre 04 horas e 05 horas (antemanhã, potencial hídrico máximo) e ao meio dia (potencial hídrico mínimo) (Figura 3).

Figura 3 – Potencial hídrico mínimo e máximo avaliado ao final do período experimental.



Legenda: Ψ_{wmax} – Potencial hídrico máximo; Ψ_{wmin} – Potencial hídrico mínimo.

Fonte: Da Autora (2020).

3.6 Anatomia foliar

Folhas novas, completamente expandidas e livres de injúrias de três indivíduos de cada planta de *A. gayanus*, *H. isocalycia*, *O. sativa* var. Douradão e *O. sativa* var. Soberana foram coletadas. O tecido da região média da folha foi fixado em solução de paraformaldeído 1%, glutaraldeído 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05M e em seguida foi emblocado em *London Resin White* (LRWhite).

Para obtenção de secções transversais para as análises anatômicas, os blocos foram seccionados (2-3 μ m) com auxílio do ultramicrotomo rotativo UC7 equipado com

estereomicroscópio Leica M80 e os cortes corados com azul de toluidina 1%. Para cada um dos três indivíduos, foram utilizadas três secções, das quais obtiveram-se cinco imagens, totalizando 45 imagens por tratamento. Através das imagens obtidas, foram determinadas a distância e o número de células entre os feixes vasculares (μm) – partindo do centro de cada feixe –, a área coberta por células da bainha do feixe vascular (BFV), a área coberta por células do mesofilo (M), a área total da epiderme (AEPID) e a espessura da epiderme adaxial (EADAX) e abaxial (EABAX), a área do esclerênquima (ESC), área das células buliformes (CB) e do espaço intercelular (EI), a área do xilema (X), do floema (F) e da bainha do feixe vascular (BF). Foram determinados o percentual de células buliformes pela razão da área de células buliformes pela área total, percentual de espaço intercelular pela razão da área do espaço intercelular pela área total, percentual de área de assimilação do carbono no mesofilo pela área total e percentual de área de redução do carbono na bainha do feixe vascular pela área total e razão da área de assimilação do carbono no mesofilo pela área de redução do carbono na bainha do feixe vascular (DENGLER, 1994).

Para os cortes paradérmicos, foram utilizadas 2 secções de 1cm^2 do meio da folha de cada um dos três indivíduos e fixadas em FAA (formalina 3,7%, etanol 53% e ácido acético 5%). Em seguida, fez-se a impressão da epiderme foliar em lâmina de vidro, com éster de cianoacrilato (Super Bonder[®]) para obtenção de lâminas semipermanentes. As observações e as imagens foram realizadas em fotomicroscópio. Das duas secções, obtiveram-se três imagens, totalizando 18 imagens por cada tratamento. Em seguida, foram quantificados o número de estômatos, diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos e densidade estomática.

Todas as quantificações foram obtidas utilizando o software de imagem ImageJ versão 1.52 a. O valor final para cada variável foi a média proveniente dos cinco e três campos observacionais para os cortes transversais e paradérmicos, respectivamente.

3.7 Análises Estatísticas

Os dados de anatomia foliar foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o software R Studio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie de metabolismo intermediário (*H. isocalycia*) sob 71% CC apresentou o maior valor (203.000 μm) para a distância entre feixes vasculares, seguida por *O. sativa* var. *Douradão* (184.667 μm). Os menores valores foram observados na espécie C4 (*A. gayanus*), que apresentou 70.333 μm , sem distinção entre a disponibilidade hídrica (Figuras 4 e 5).

Quanto ao número de células entre dois feixes vasculares, os menores valores também foram observados na espécie C4 (*A. gayanus*) sem distinção entre o regime hídrico (2.400 μm). Enquanto que o maior valor foi observado no arroz tolerante à seca (*Douradão*) a 93% CC (14.800 μm) (Figura 5). Menores valores de distância e número de células são observados para plantas C4 por conta de suas características estruturais, que potencializam as taxas de transporte de metabólitos entre os tecidos de assimilação e de redução, garantindo a concentração de CO_2 na bainha do feixe vascular (DENGLER, 1994). Uma vez que as células da bainha do feixe são responsáveis pela redução do carbono fotossintético em quase todas as poáceas, o volume do tecido de assimilação o mesofilo diminui, o que resulta em distâncias cada vez menores entre os feixes (DENGLER, 1994). A condição de menor disponibilidade hídrica pode provocar a redução da distância entre os feixes vasculares nas plantas, e conseqüentemente, aumenta a densidade de vasos, o que é considerado uma das formas de pré-adaptação para a fotossíntese C4 (CHRISTIN et al., 2011; CRABBE; LAMB; EDWARDS, 2019; WAY et al., 2014). Os resultados apresentados corroboram com os de Sage e McKown (2006), que observaram que a distância média entre feixes vasculares em plantas C3 (280 μm) é mais que o dobro da distância observada em plantas C4 (120 μm), e que estes valores são correlacionados com a diminuição na relação de M:BFV.

Figura 4 – Secções foliares transversais de plantas das espécies C3, C3 proto-Kranz e C4 sob três regimes de hidratação. (Continua)

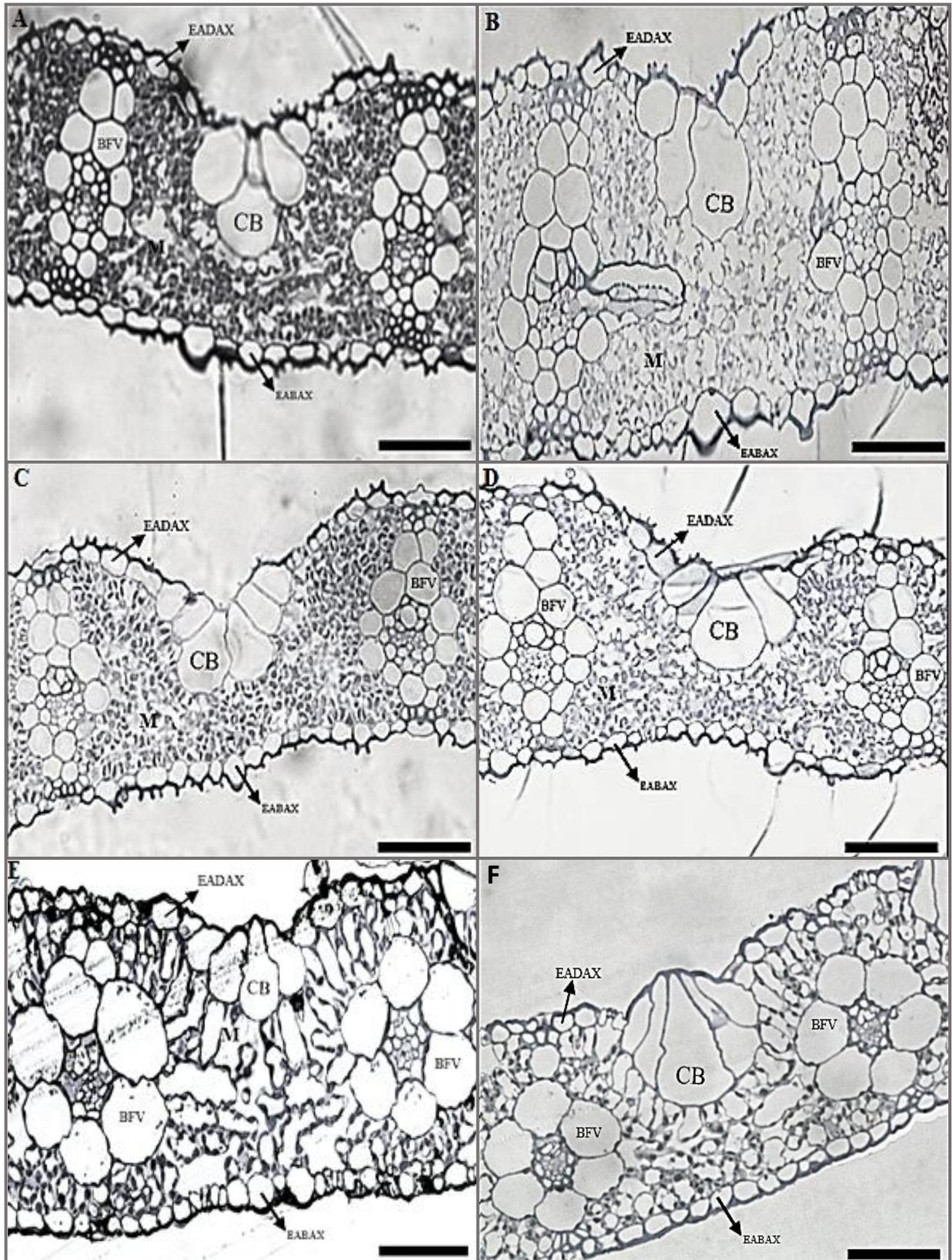
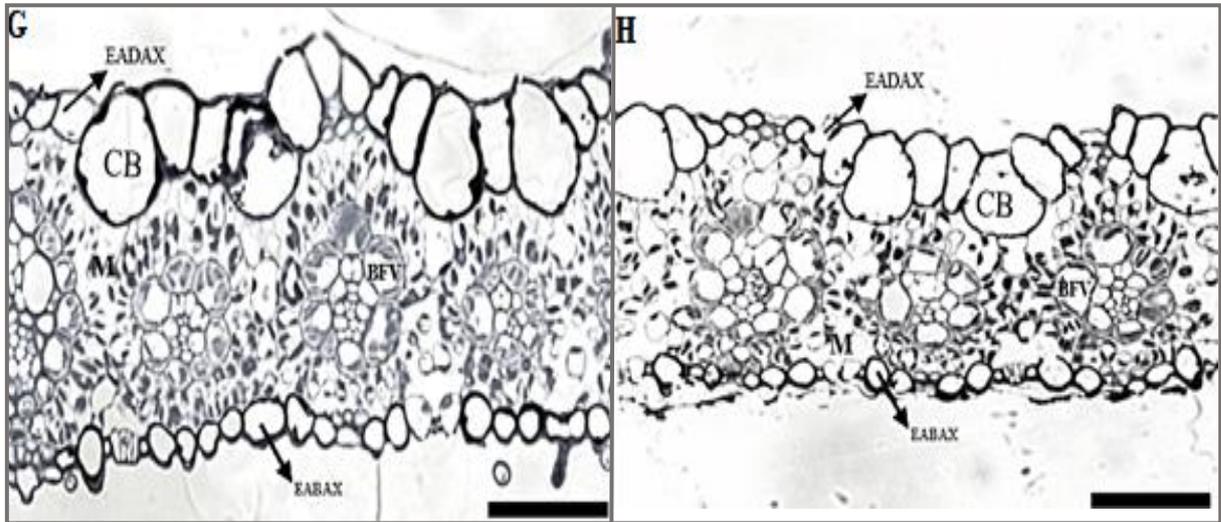


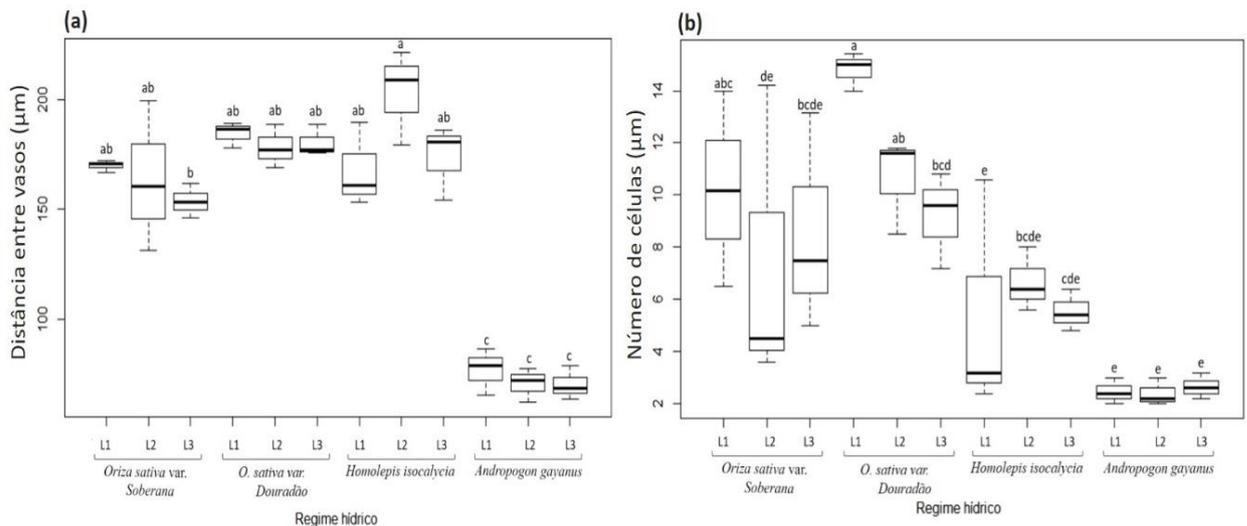
Figura 4 - Secções foliares transversais de plantas das espécies C3, C3 proto-Kranz e C4 sob três regimes de hidratação. (Conclusão)



Legenda: *Oryza sativa* – variedades Soberana (A – B) e Douradão (C – D); *Homolepis isocalyca* (E – F) e *Andropogon gayanus* (G – H). L1 (93% CC): A, C, G; L2 (71% CC): D, E; L3 (53% CC): B, F, H. M – células do mesofilo; BFV – células da bainha do feixe vascular; CB – células buliformes; EADAX – espessura da epiderme adaxial; EABAX – espessura da epiderme abaxial; Barras: 50 μm .

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 5 – (a) Distância entre dois feixes vasculares (μm) e (b) Número de células entre feixes vasculares (μm) em espécies aparentadas com metabolismos fotossintéticos diferentes sob diferentes regimes hídricos.



Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2020)

Quanto ao mesofilo, região onde há assimilação primária do carbono, os maiores valores foram observados nas plantas de arroz (*O. sativa*) var. Douradão sob 71% CC de irrigação e var. Soberana sob 53% CC (20.686,45 μm e 20193,95 μm , respectivamente) (Figura 6). Já as plantas C4 (*A. gayanus*) sob restrição hídrica (53% CC e 71% CC) apresentaram, além de feixes vasculares mais próximos e menos células entre eles (Figuras 4 e 5), menores médias de área de tecido de assimilação – M – (13.986,18 μm) e no tecido de redução – BFV – (3753,33 μm) (Figura 6). Em relação às intermediárias C3 proto-Kranz (*H. isocalyca*), todas, independente do regime de hidratação, apresentaram valores semelhantes às demais espécies bem hidratadas (93% CC) (Figura 6). As plantas C4 apresentaram valores de 39,72% de área de tecido de assimilação, enquanto as plantas de C3 e intermediárias apresentaram valores de 56% e 43%, respectivamente (Figura 6; Tabela 1, ANEXO). As plantas de arroz também apresentaram maiores valores quanto à relação M:BFV (6,07 para *O. sativa* var. Soberana), enquanto o menor valor foi de 1,96 observado na C3 proto-Kranz (*H. isocalyca*) sob 71% CC (FIGURA 7; Tabela 1, ANEXO).

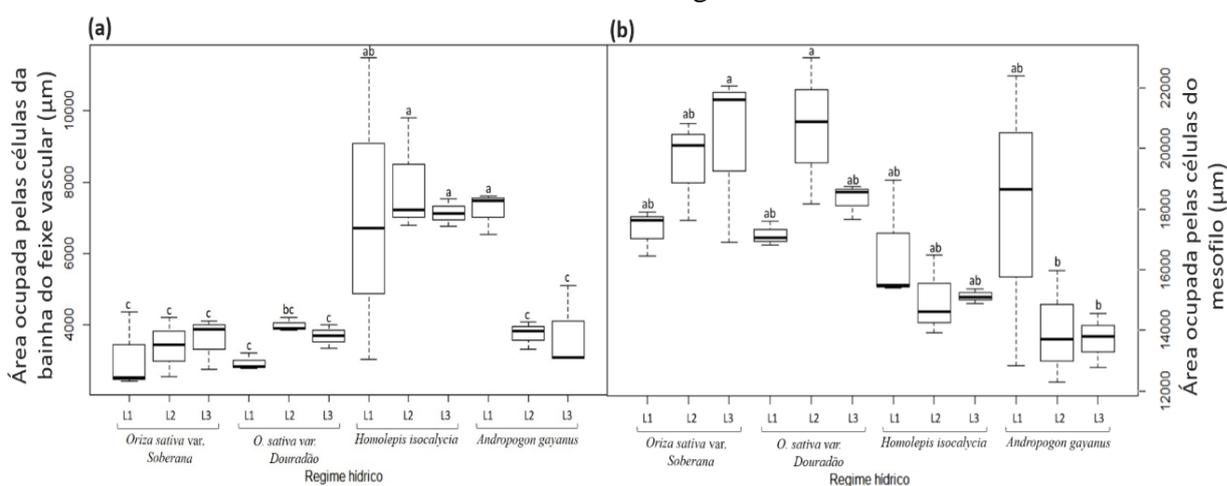
A inserção de vasos pode ter influência no sistema hidráulico das folhas (LUNDGREN et al., 2019). Simulações para outras espécies de plantas evidenciam que o aumento da densidade de vasos menores pode elevar a condutância hidráulica foliar (MCKOWN et al., 2010). Além disso, uma estratégia reconhecida de desenvolvimento em gramíneas C4 que têm a Rubisco dentro da bainha mestomática é o aumento da densidade de vasos para diminuir a razão M:BFV (LUNDGREN et al., 2019; UENO; HATAKEYAMA, 2018).

O maior investimento em tecido do mesofilo – independente da condição hídrica – foi nas plantas de arroz porque as plantas C3 realizam seu processo fotossintético predominantemente nas células do mesofilo (SAGE; MCKOWN, 2006; VON CAEMMERER; QUICK; FURBANK, 2012; WANG et al., 2017). As células da bainha do feixe não têm função fotossintética em espécies C3 pela sua incapacidade de regenerar a Ribulose-1,5- bifosfato, sendo nessas plantas relacionadas ao suprimento de água (BELLASIO; LUNDGREN, 2016; GRIFFITHS et al., 2013). Em relação às intermediárias, a baixa relação M:BFV pode ser causada pela redução da área do mesofilo e em contrapartida, um maior investimento em tecidos da bainha do feixe, provavelmente como uma estratégia para minimizar os danos devido ao estresse hídrico e para melhor metabolização da glicina, etapa fundamental para o surgimento evolutivo da via C4. (GRIFFITHS et al., 2013).

Os maiores valores de tecido de célula de bainha do feixe vascular foram observados em todas as plantas intermediárias e nas C4, mantidas em 93% CC. Já sob restrição hídrica, as C4 apresentaram os valores mais baixos junto com todas as plantas de arroz (Figura 6). Esses valores altos de BFV para C3 proto-Kranz podem ser porque as células da bainha podem estar envolvidas no processo fotossintético, no que se trata da metabolização de glicina; enquanto nas C4 seria pela sua função específica no mecanismo concentrador de CO₂ (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014; WAY et al., 2014). O tecido vascular é oneroso às plantas pois a lignina é uma das moléculas mais caras energeticamente para ser sintetizada (CARMO-SILVA et al., 2009).

Resultados semelhantes são observados nos trabalhos de Lundgren et al (2019), em que poáceas C4 (*Alloteropsis semialata*) também apresentaram menores taxas da relação de M:BFV devido ao investimento em área da bainha do feixe vascular em detrimento à área do mesofilo. As C4 têm folhas que necessitam de grande volume de células BFV para acomodar os cloroplastos, além de ter alta densidade de vasos e menor distância entre os feixes vasculares pela necessidade das células M e BFV estarem próximas para facilitar a transferência de metabólitos (LUNDGREN et al., 2019; LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014; SAGE; MCKOWN, 2006).

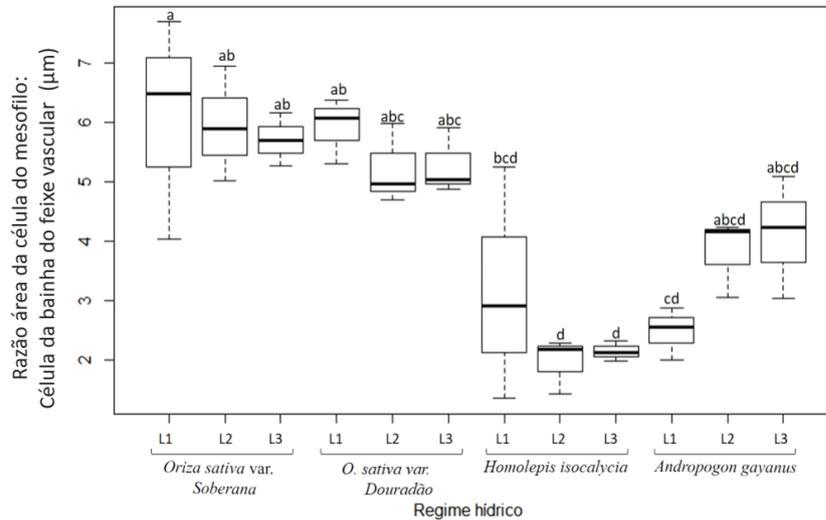
Figura 6 – (a) Tecido de redução do carbono na bainha do feixe vascular (μm) e (b) tecido de assimilação primária de carbono no mesofilo (μm) em espécies com metabolismos fotossintéticos diferentes sob diferentes regimes hídricos.



Legenda: L1 – 93% CC; L2 – 71% CC; L3 – 53% CC. Dados representados pelas médias. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora(2020).

Figura 7 – Razão área da célula do mesofilo: área de célula da bainha do feixe vascular para as espécies C3 (*Oryza sativa* var. Soberana e Douradão), C3 proto-Kranz (*Homolepis isocalyca*) e C4 (*Andropogon gayanus*) sob diferentes tratamentos hídricos.



Legenda: L1 – 93% CC; L2 – 71% CC; L3 – 53% CC. Dados representados pelas médias. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

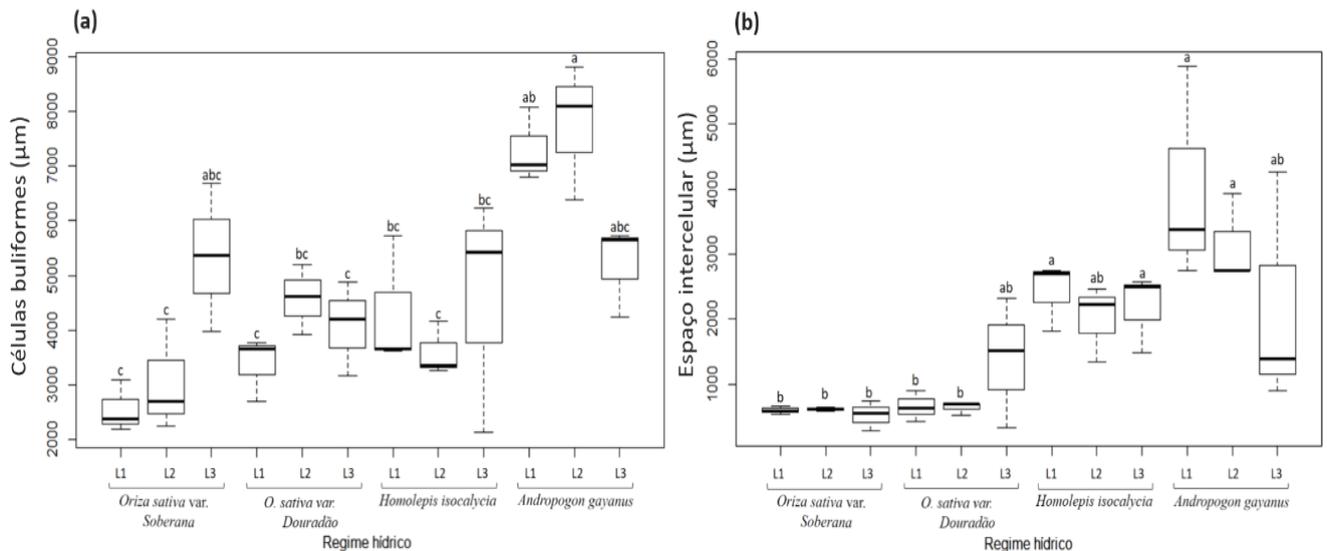
Fonte: Da Autora (2020).

Em relação a área de células buliformes (CB), o maior valor foi observado em *Andropogon gayanus* a 71% CC (7764,667 μm) enquanto que as plantas de arroz apresentaram as menores áreas independente da condição hídrica (Figura 8). Para a área de espaço intercelular, é possível observar nas figuras 8 e 9 que esse padrão se mantém, com o maior valor (33822 μm) observado na espécie C4 (*A. gayanus*) e os menores nas plantas de arroz independente das condições hídricas. Já as plantas C3 proto-Kranz apresentaram comportamento semelhante às C4, com altos valores tanto para área de células buliformes como para espaço intercelular, em todas as condições impostas.

As células buliformes são notoriamente reconhecidas pelo seu papel de manter a arquitetura da folha de acordo com o potencial hídrico. Quando a perda de água se intensifica, as células buliformes tornam-se flácidas e com isso as folhas se dobram ou enrolam (CARMO-SILVA et al., 2009; TAIZ et al., 2017; RAVEN et al., 2014). Foi possível observar nas espécies estudadas que as CB diferiram em sua posição em relação aos feixes vasculares. Nas folhas das plantas C3 sob todos os regimes hídricos e *H. isocalyca* sob déficit (53% CC), as CB se apresentaram na faixa central da folha, penetrando o mesofilo entre os feixes vasculares (Figura 8). Como consequência, houve um dobramento das folhas de arroz. As CB das plantas C4 estão espalhadas sobre a superfície e em algumas camadas do mesofilo, mas sem penetrar entre os

feixes vasculares (Figura 8). Carmo-Silva et al. (2009) observaram resultados semelhantes, em que *Cynodon dactylon* também apresentou CB aprofundando-se entre os feixes vasculares em resposta à diminuição da disponibilidade de água.

Figura 8 – (a) Área de células buliformes (μm) e (b) espaço intercelular (μm) em espécies aparentadas com metabolismos fotossintéticos diferentes sob diferentes regimes hídricos.

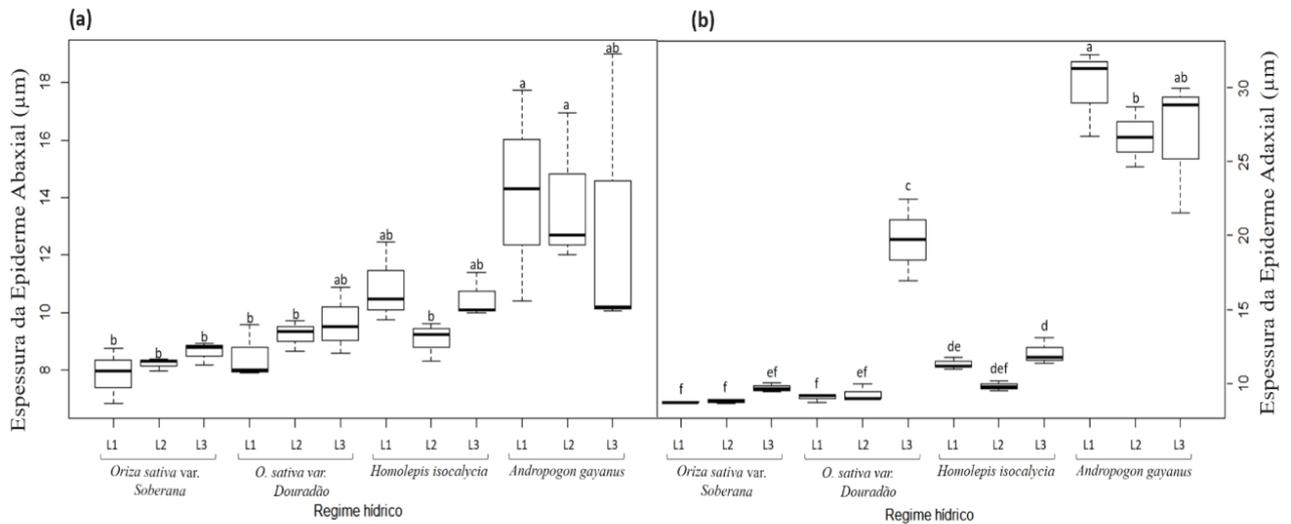


Legenda: L1 – 93% CC; L2 – 71% CC; L3 – 53% CC. Dados representados pelas médias. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2020).

Em relação à espessura da epiderme, tanto abaxial como adaxial, as espécies C4 foram as que apresentaram maiores valores (14,310 e 30,435 μm respectivamente), sem diferenças significativas entre a disponibilidade hídrica, enquanto os menores valores foram observados nas espécies C3, conforme exposto nas figuras 9. Já em relação às plantas com metabolismo de transição C3 proto-Kranz (*H.isocalyca*), foi possível observar que não houve diferenças estatísticas significativas entre elas e as demais espécies, com exceção da cultivada sob restrição de 71% CC, que apresentou a espessura da epiderme abaxial semelhante à das plantas de arroz (Figura 9).

Figura 9 – (a) Espessura da epiderme adaxial (μm) e (b) espessura da epiderme adaxial (μm) de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.

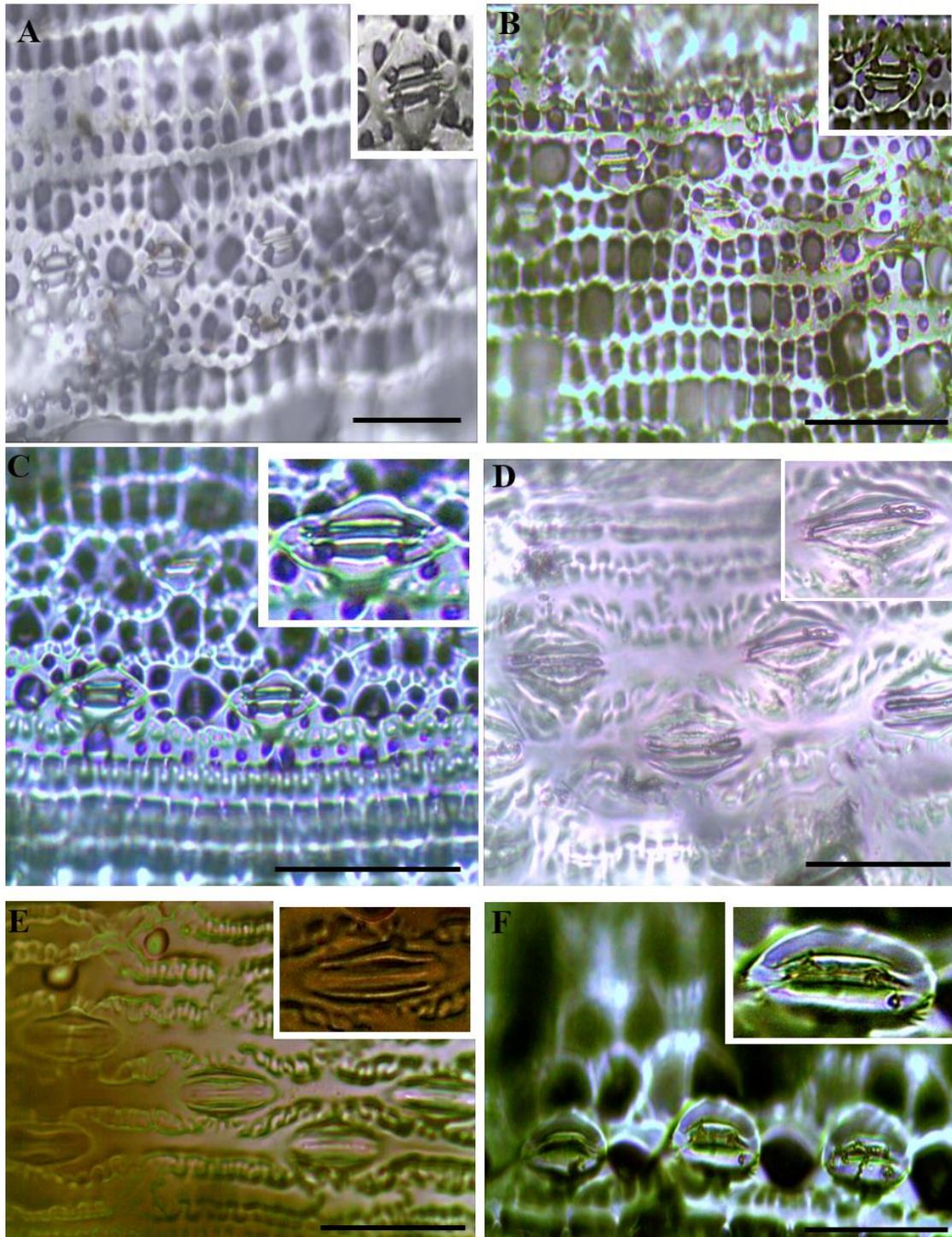


Legenda: L1 – 93% CC; L2 – 71% CC; L3 – 53% CC. Dados representados pelas médias. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2020).

A espécie C3- proto-Kranz (*H.isocalyca*) sob restrição hídrica apresentou baixa densidade estomática ($160 \mu\text{m}$), aparentando semelhança na distribuição dos estômatos às espécies C4 que também estavam restritas à água ($154,3 \mu\text{m}$), enquanto as maiores densidades foram observadas nas plantas de arroz variedade Soberana a 71%CC (429,333), conforme as figuras 10 e 11. Já em relação à proporção do diâmetro polar: diâmetro equatorial, *H. isocalyca* apresentou os maiores valores (2,99), o que foi bem contrastante com o observado nas duas variedades de arroz, onde houve uma diminuição da razão DP:DE em todas as condições hídricas.

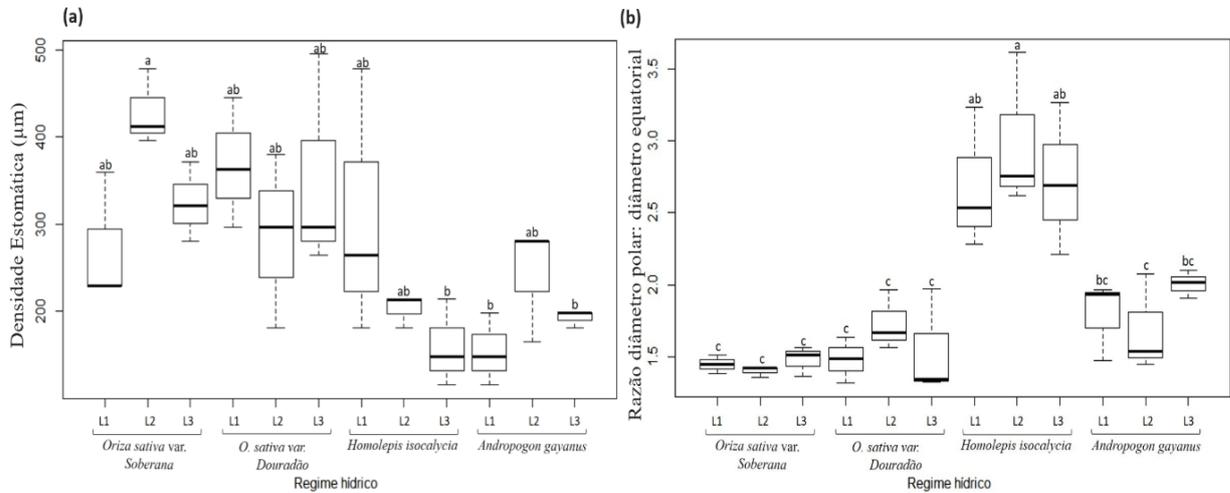
Figura 10 – Secções foliares paradérmicas de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.



Legenda: *Oryza sativa* variedades Soberana (A – B) e Douradão (C); *Homolepis isocalycia* (D – E); e *Andropogon gayanus* (F). L1 (93% CC): A, E, F; L2 (71% CC): C; e L3 (53% CC): B. Caixa superior à direita: estômatos evidenciados. Barras: 50 μ m.

Fonte: Da Autora (2020).

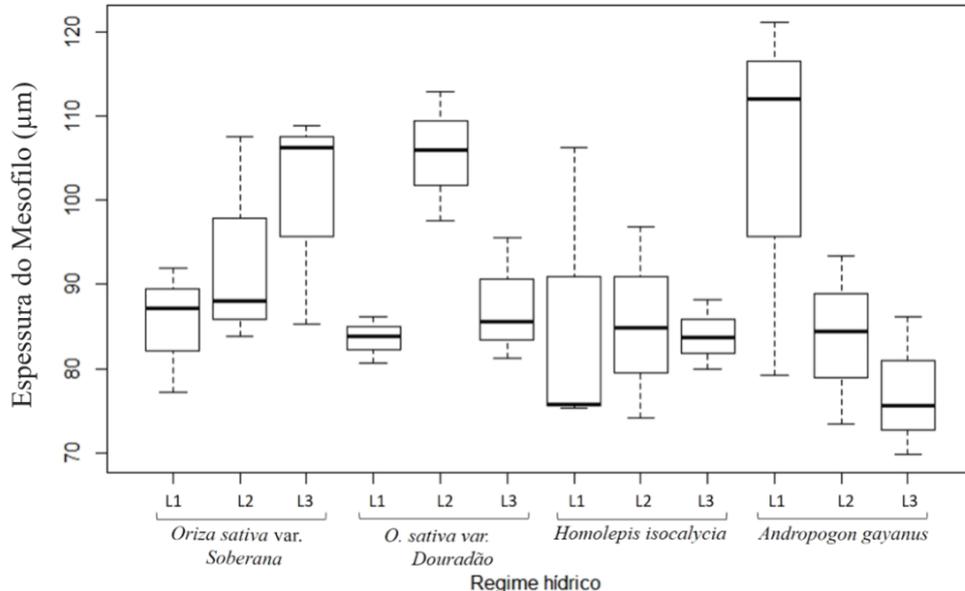
Figura 11 – (a) Densidade estomática (μm) e (b) razão diâmetro polar: diâmetro equatorial de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.



Legenda: L1 – 93% CC; L2 – 71% CC; L3 – 53% CC. Dados representados pelas médias. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 12 – Espessura do mesofilo (μm) de plantas C3, C3 proto-Kranz e C4 cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.



Legenda: L1 – 93% CC; L2 – 71% CC; L3 – 53% CC. Dados representados pelas médias.

Fonte: Da Autora (2020).

Quanto aos tecidos condutores, as plantas C3 proto-Kranz sob estresse hídrico (53% CC) apresentaram as menores áreas de xilema e floema (1011,667 μm e 496,667 μm , respectivamente) e a variedade do arroz tolerante à seca sob estresse apresentou maior área de floema (1371 μm). Entretanto, somente houve diferença significativa em relação à área de

floema entre as plantas de *O.sativa* var. Douradão e *H. isocalycia*, ambas sob 53% de restrição hídrica (Figuras 13 e 14; Tabela 1, ANEXO). Os demais tratamentos não se diferiram quanto à área do floema.

Em relação à área do xilema, as plantas C3 proto-Kranz (*H. isocalycia*) comportaram-se de modo semelhante às plantas C4 independente da condição hídrica e à *O. sativa* var. Soberana submetida ao estresse (53% CC), conforme exposto nas figuras 13 e 14. Além das C4 (*A.gyanus*) apresentarem semelhança na área do xilema com as C3 proto-Kranz, também assemelharam-se às duas variedades de arroz sob 93% CC e 53% CC (FIGURA 14; Tabela 1, ANEXO). Além do mais, foi possível observar que *H.isocalycia* sob ótima condição de hidratação (93% CC) apresentou similaridade às plantas de arroz tanto na variedade Soberana sob todas as condições hídricas como à variedade Douradão a 93% CC e 53% CC (FIGURA 14; Tabela 1, ANEXO).

Figura 13 – Secções foliares transversais mostrando o xilema e floema das espécies de *Oryza sativa*, *Homolepis isocalycia* e *Andropogon gyanus* sob diferentes regimes de hidratação. (Continua)

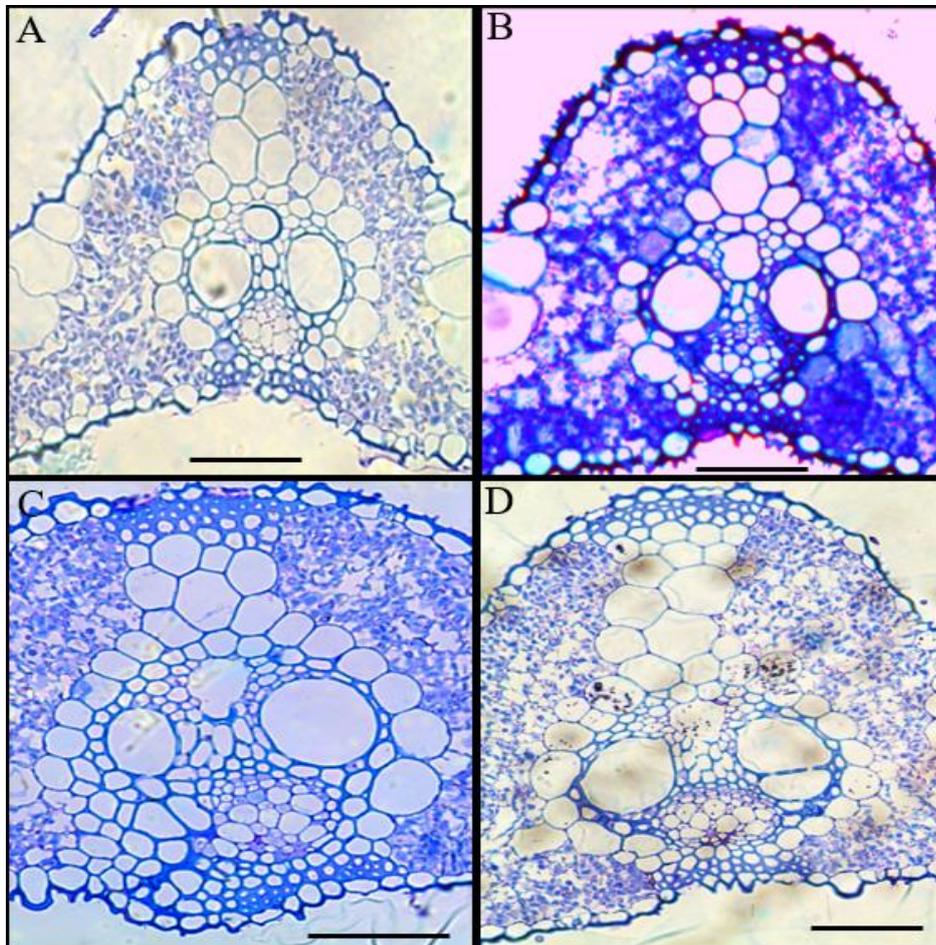
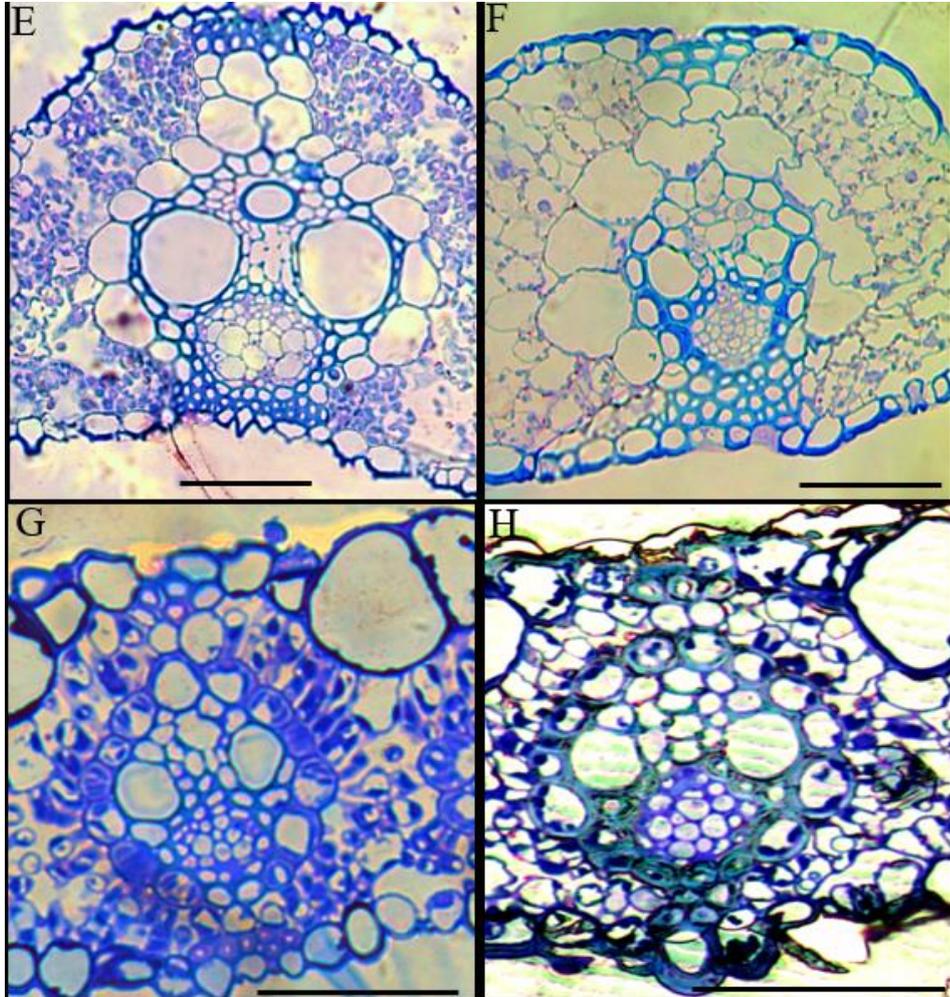


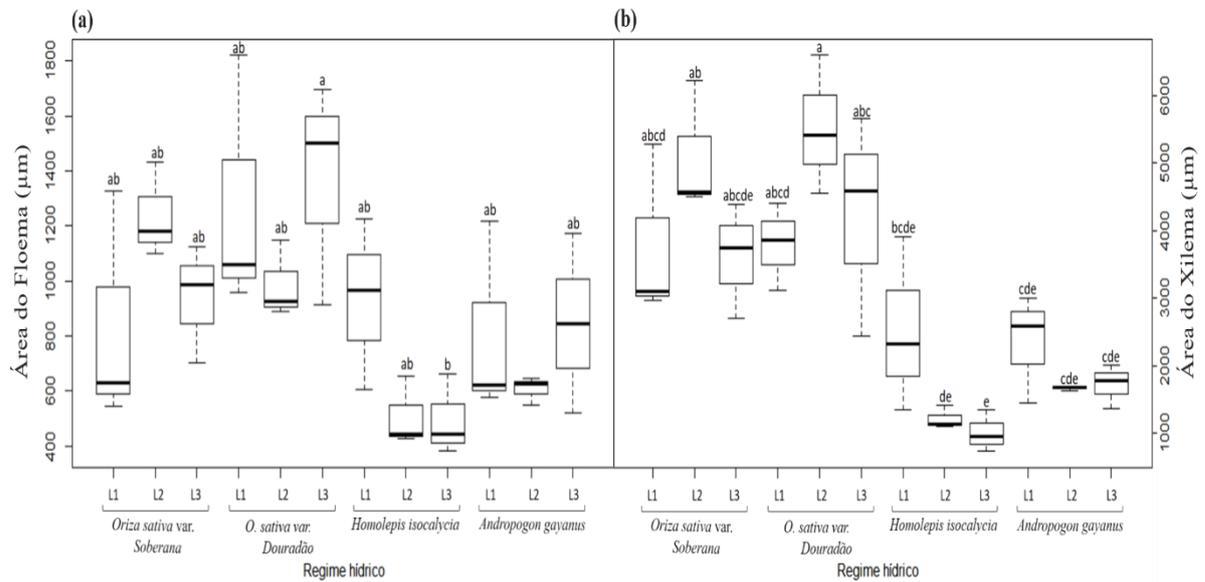
Figura 13 – Secções foliares transversais mostrando o xilema e floema das espécies de *Oryza sativa*, *Homolepis isocalyca* e *Andropogon gayanus* sob diferentes regimes de hidratação. (Conclusão)



Legenda: *Oryza sativa* variedades Douradão (A – B) e Soberana (C – D), *Homolepis isocalyca* (E – F) e *Andropogon gayanus* (G – H). L1 (93% CC): A, E, G; L2 (71% CC): C; e L3 (53% CC): B, D, F, H. Barras: 50 μ m.

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 14 – (a) Área do floema (μm) e (b) área do xilema (μm) de plantas C3 (*Oryza sativa* variedades Soberana e Douradão), C3 proto-Kranz (*Homolepis isocalyca*) e C4 (*Andropogon gayanus*) cultivadas sob diferentes tratamentos hídricos.



Legenda: L1 – 93% CC; L2 – 71% CC; L3 – 53% CC. Dados representados pelas médias. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2020).

5. CONCLUSÕES

As características analisadas permitem afirmar que a espécie de metabolismo intermediário C3 proto-Kranz *Homolepis isocalycia* enfrenta e se rearranja anatomicamente da melhor forma às situações de restrição hídrica. Em geral, *H. isocalycia* se assemelha tanto às C3 como às C4 em algumas características como área do mesofilo, número de células, densidade estomática, espessura da epiderme abaxial, área do floema e espaço intercelular. Quando submetidas à restrição hídrica, tem comportamento semelhante apenas às plantas de arroz na distância entre feixes vasculares e área de células buliformes. Comportam-se anatomicamente semelhante às plantas C4 na relação de células do mesofilo por células da bainha do feixe vascular. As C4 não apresentaram variações anatômicas consideráveis de acordo com o nível de desidratação, o que permite afirmar que não são tão plásticas como as intermediárias em relação às variações de disponibilidade hídrica.

6. REFERÊNCIAS

- BELLASIO, C.; LUNDGREN, M. R. Anatomical constraints to C₄ evolution: light harvesting capacity in the bundle sheath. **The New phytologist**, v. 212, n. 2, p. 485–496, 2016.
- BETTI, M. et al. Manipulating photorespiration to increase plant productivity: Recent advances and perspectives for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 10, p. 2977–2988, 2016.
- BRADSHAW, A. D. Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. **Advances in Genetics**, v. 13, n. C, p. 115–155, 1965.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 2, p. 48–54, 1997.
- BUSCH, F. A. et al. C₃ plants enhance rates of photosynthesis by reassimilating photorespired and respired CO₂. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 1, p. 200–212, 2013.
- CARMO-SILVA, A. E. et al. Grasses of different C₄ subtypes reveal leaf traits related to drought tolerance in their natural habitats: Changes in structure, water potential, and amino acid content. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 7, p. 1222–1235, 2009.
- CHRISTIN, P. A. et al. Complex evolutionary transitions and the significance of c₃-c₄ intermediate forms of photosynthesis in molluginaceae. **Evolution**, v. 65, n. 3, p. 643–660, 2011.
- CRABBE, R. A.; LAMB, D. W.; EDWARDS, C. Discriminating between C₃, C₄, and Mixed C₃/C₄ pasture grasses of a grazed landscape using multi-temporal sentinel-1a data. **Remote Sensing**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2019.
- FRACASSO, A.; TRINDADE, L. M.; AMADUCCI, S. Drought stress tolerance strategies revealed by RNA-Seq in two sorghum genotypes with contrasting WUE. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2016.
- FURBANK, R. T. Evolution of the C₄ photosynthetic mechanism: Are there really three C₄ acid decarboxylation types? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3103–3108, 2011.
- GHANNOUM, O. C₄ photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635–644, 2009.
- GRIFFITHS, H. et al. You're so vein: Bundle sheath physiology, phylogeny and evolution in C₃ and C₄ plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 2, p. 249–261, 2013.
- HABERMANN, E. et al. Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C₄ tropical grass. **Physiologia Plantarum**, v. 165, n. 2, p.

383–402, 2019.

HATCH, M. D.; AGOSTINO, A.; BURNELL, J. N. Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C₄ plants: Activity and role of mitochondria in bundle sheath cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 261, n. 2, p. 357–367, 1988.

LUNDGREN, M. R. et al. Evolutionary implications of C₃–C₄ intermediates in the grass *Alloteropsis semialata*. **Plant Cell and Environment**, v. 39, n. 9, p. 1874–1885, 2016.

LUNDGREN, M. R. et al. C₄ anatomy can evolve via a single developmental change. **Ecology Letters**, v. 22, n. 2, p. 302–312, 2019.

LUNDGREN, M. R.; OSBORNE, C. P.; CHRISTIN, P. A. Reconstructing Kranz anatomy to understand C₄ evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 13, p. 3357–3369, 2014.

MAESTRE, F. T. et al. Individual vs. population plastic responses to elevated CO₂, nutrient availability, and heterogeneity: A microcosm experiment with co-occurring species. **Plant and Soil**, v. 296, n. 1–2, p. 53–64, 2007.

MATESANZ, S.; GIANOLI, E.; VALLADARES, F. Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1206, p. 35–55, 2010.

MONSON, R. K.; MOORE, B. D. On the significance of C₃–C₄ intermediate photosynthesis to the evolution of C₄ photosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, v. 12, n. 7, p. 689–699, 1989.

OSAKABE, Y. et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. March, p. 1–8, 2014.

RAMÍREZ-VALIENTE, J. A. et al. Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. **Tree Physiology**, v. 30, n. 5, p. 618–627, 2010.

ROSSITER-RACHOR, N.A. et al. Invasive *Andropogon gayanus* (gamba grass) is an ecosystem transformer of nitrogen relations in Australian savanna. **Ecological Applications**, v.19, n. 6, p. 1546-1560, 2009.

ROSSITER-RACHOR, N.A. et al. *Andropogon gayanus* (Gamba grass) Invasion increases Fire-mediated Nitrogen Losses in the Tropical Savannas of Northern Australia. **Ecosystems**, v.11, n. 1, p. 77-88. 2008.

SAGE, R. F.; KHOSHRAVESH, R.; SAGE, T. L. From proto-Kranz to C₄ Kranz: Building the bridge to C₄ photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 13, p. 3341–3356, 2014.

SAGE, R. F.; MCKOWN, A. D. Is C₄ photosynthesis less phenotypically plastic than C₃ photosynthesis? **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2 SPEC. ISS., p. 303–317, 2006.

SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity in plants. **Plant Species Biology**, v. 17, n. 2–3, p. 85–88, 2002.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal Diversidade vegetal**. [s.l: s.n.]. v. 6 ed.

UENO, O.; HATAKEYAMA, Y. Presence of chloroplasts in mesophyll sheath cells of the C₃ Pooid grass *Elymus tsukushiensis*. **Plant Production Science**, v. 21, n. 4, p. 322–327, 2018.

VON CAEMMERER, S.; QUICK, W. P.; FURBANK, R. T. The development of C₄ rice: Current progress and future challenges. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1671–1672, 2012.

WANG, Z. et al. Enhanced disease resistance and drought tolerance in transgenic rice plants overexpressing protein elicitors from *Magnaporthe oryzae*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–16, 2017.

WAY, D. A. et al. Increasing water use efficiency along the C₃ to C₄ evolutionary pathway: A stomatal optimization perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 13, p. 3683–3693, 2014.

7. ANEXOS

Tabela 1 – Características anatômicas foliares para as espécies *Oryza sativa* variedades Soberana e Douradão, *Homolepis isocalyca* e *Andropogon gayanus* sob três regimes de hidratação. (Continua)

Regime Hídrico	Espécie	Distância entre Nervuras (µm)	Número de Células entre Feixes	Área do Mesofilo (µm)	Bainha do Feixe Vascular (µm)	Razão M: BFV	% de Mesofilo	Células Buliformes (µm)	% de Células Buliformes	Espessura do Mesofilo (µm)	EEADAX (µm)	EEABAX (µm)
L1 (93% CC)	<i>Oryza sativa</i> var. Soberana	170.000 ab	10.233 abc	17322.14 ab	3107.000 c	6.07 a	0.550 a	2551.333 c	0.082 b	85.43 a	7.410 f	7.847 b
	<i>O. sativa</i> var. Douradão	184.667 ab	14.800 a	17159.27 ab	2946.000 c	5.92 ab	0.564 a	3379.333 c	0.111 b	83.53 a	7.740 f	8.497 b
	<i>Homolepis isocalyca</i>	168.000 ab	2.800 e	16608.41 ab	6718.000 ab	3.16 bcd	0.433 bcd	4336.333 bc	0.111 b	85.73 a	9.997 de	10.890 ab
	<i>Andropogon gayanus</i>	76.667 c	2.467 e	17959.44 ab	7216.000 a	2.47 cd	0.387 d	7299.66 ab	0.1650 ab	104.16 a	30.435 a	14.310 a
L2 (72% CC)	<i>Oryza sativa</i> var. Soberana	163.333 ab	4.05 de	19512.83 ab	3404.000 c	5.95 ab	0.562 a	3049.667 c	0.0917 b	93.17 a	7.477 f	8.233 b
	<i>O. sativa</i> var. Douradão	178.333 ab	10.633 ab	20686.45 a	3994.667 bc	5.22 abc	0.543 ab	4580.333 bc	0.1210 ab	105.43 a	7.983 ef	9.23 b
	<i>Homolepis isocalyca</i>	203.000 a	6.667 bcde	14999.48 ab	7011.500 a	1.96 d	0.417 cd	3595.667 c	0.100 b	85.30 a	8.660 def	9.06 b
	<i>Andropogon gayanus</i>	70.33333 c	2.400 e	13986.18 b	3753.333 c	3.81 abcd	0.373 d	7764.667 a	0.2057 a	83.77 a	24.360 b	13.890 a
L3 (53% CC)	<i>Oryza sativa</i> var. Soberana	153.667 b	6.250 bcde	20193.95 a	3582.333 c	5.71 ab	0.542 ab	5342.33 abc	0.14700000 ab	100.13 a	8.380 ef	8.630 b
	<i>O. sativa</i> var. Douradão	180.667 ab	9.200 bcd	18325.55 ab	3685.000 c	5.27 abc	0.502 abc	4081.667 c	0.1113 b	87.47 a	17.020 c	9.663 ab
	<i>Homolepis isocalyca</i>	173.667ab	5.533 cde	15120.44 ab	7133.000 a	2.14 d	0.409 cd	4593.333 bc	0.1227 ab	83.93 a	10.760 d	10.493 ab
	<i>Andropogon gayanus</i>	70.333 c	2.667 e	13708.03 b	3758.000 c	4.12 abcd	0.397 cd	5204.000abc	0.15000 ab	77.17 a	27.510ab	10.130 ab

Tabela 1 – Características anatômicas foliares para as espécies *Oryza sativa* variedades Soberana e Douradão, *Homolepis isocalycia* e *Andropogon gayanus* sob três regimes de hidratação. (Conclusão)

Regime Hídrico	Espécie	Xilema (µm)	Floema (µm)	Densidade Estomática (µm)	Nº de Estômatos (µm)	Área da Epiderme (µm)	E.I. (µm)	% Espaço Intercelular	Nº de Células entre Feixes	Razão M: BFV	RAZÃO DP/DE
L1 (93% CC)	<i>Oryza sativa</i> var. Soberana	3783 abcd	1279 ab	272.6667 ab	4.100 ab	7995 de	603 b	0.0201 cde	10.233 abc	6.073 a	1.443 c
	<i>O. sativa</i> var. Douradão	3799 abcd	1279 ab	368.6667 ab	7.433 a	7570 e	659 b	0.022 cde	14.800 a	5.920 ab	1.480 c
	<i>Homolepis isocalycia</i>	2532 bcde	932 ab	308.0000 ab	6.233 ab	7368 e	2419 a	0.062 ab	2.800 e	3.163 bcd	2.680 ab
	<i>A. gayanus</i>	2349 cde	806 ab	154.333 b	3.100000 ab	12927 a	3382 a	0.0883 a	2.467 e	2.476 cd	1.786 bc
L2 (72% CC)	<i>Oryza sativa</i> var. Soberana	5103 ab	1238 ab	368.667 ab	2.000000 b	7886 de	619 b	0.01817 de	4.05 de	5.950 ab	1.400 c
	<i>O. sativa</i> var. Douradão	5522 a	986 ab	286.333 ab	5.800000 ab	9865 bcd	642 b	0.0170 de	10.63 ab	5.220 abc	1.733 c
	<i>H. isocalycia</i>	1213 de	508 ab	203.667 ab	4.100000 ab	7515 e	2010.333 ab	0.0550 abcd	6.666 bcde	1.960 d	2.993 a
	<i>A. gayanus</i>	1669 cde	607 ab	242.333 ab	4.900000 ab	11701 ab	3137 a	0.083 a	2.400 e	3.813 abcd	1.687 c
L3 (53% CC)	<i>O. sativa</i> var. Soberana	3616 abcde	937 ab	324.333 ab	6.233333 ab	9752 bcd	530 b	0.014 e	6.250 bcde	5.710 ab	1.477 c
	<i>O. sativa</i> var. Douradão	4235 abc	1371 a	352.000 ab	7.100000 ab	8805 cde	1390 ab	0.0368 bcde	9.200 bcd	5.273 abc	1.543 c
	<i>H. isocalycia</i>	1011 e	496 b	160.000 b	3.200000 ab	10650 abc	2179 a	0.058 abc	5.533 cde	2.140 d	2.720 ab
	<i>A. gayanus</i>	1725 cde	846 ab	192.667 b	3.900000 ab	10941 ab	1149 ab	0.035 bcde	2.667 e	4.123 abcd	2.006 bc

Legenda: E.I. – Espaço intercelular. Dados representados pelas médias. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) **Fonte:** Da Autora (2020)