

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**CARACTERÍSTICAS ESTOMÁTICAS ASSOCIADAS À EFICIÊNCIA DO USO DA
ÁGUA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA CLEOMACEAE E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

Júnio de Souza Isabel
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

JÚNIO DE SOUZA ISABEL

**CARACTERÍSTICAS ESTOMÁTICAS ASSOCIADAS À EFICIÊNCIA DO USO DA
ÁGUA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA CLEOMACEAE E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

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

Orientador: Adriano Nunes Nesi

Coorientador: Wagner Luiz Araujo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

I74c
2024

Isabel, Junio de Souza, 2000-

Características estomáticas associadas à eficiência do uso da água em espécies da família Cleomaceae e híbridos interespecíficos / Junio de Souza Isabel. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (58 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 2024.

Referências bibliográficas: f. 46-53.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.786>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fotossíntese. 2. Estômatos. 3. Dióxido de carbono.
4. Cleomaceae. I. Nesi, Adriano Nunes, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 572.46

JÚNIO DE SOUZA ISABEL

**CARACTERÍSTICAS ESTOMÁTICAS ASSOCIADAS À EFICIÊNCIA DO USO DA
ÁGUA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA CLEOMACEAE E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

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

APROVADA: 29 de agosto de 2024.

Assentimento:

Júnio de Souza Isabel
Autor

Adriano Nunes Nesi
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 28/11/2024 às 15:25:56 e pelo orientador em 28/11/2024 às 17:15:29. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **WNG4.FAWA.59KS** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa pela excelente infraestrutura e por toda a assistência oferecida durante a minha trajetória acadêmica.

A minha mãe Silvia e meus irmãos e à toda minha família por todo apoio durante todos esses anos.

A todos os meus familiares pelo incentivo.

As minhas amigas: Natália, Nicolle, Júlia, Raquel e Virgínia por todos os bons momentos juntos na UFV, por todas a amizade e bons conselhos.

À Priscilla por todo o suporte durante a condução dos experimentos e por todos os ensinamentos.

Às estagiárias do projeto: Ruth e Laila pelo auxílio durante a condução dos experimentos.

Ao meu orientador prof. Adriano Nunes Nesi pela confiança e ensinamentos.

Ao professor Wagner Luiz Araújo pelas discussões acerca dos resultados.

Ao professor Wagner Campos Otoni, a Elisandra e aos demais membros do Laboratório de Cultura de Tecidos II por todo suporte no trabalho de introdução e cultivo in vitro das espécies de Cleomaceae e híbridos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto.

Aos colegas da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), Julia, João, Welson, Julia Paiva, Isabela, Welder, Bianca, Lucas, Isabela e Yasmin.

Por fim a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e conclusão desta importante etapa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

ISABEL, Júnio de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Características estomáticas associadas à eficiência do uso da água em espécies da família Cleomaceae e híbridos interespecíficos.** Orientador: Adriano Nunes Nesi. Coorientador: Wagner Luiz Araujo.

Durante a fotossíntese, a energia luminosa é convertida em energia química na etapa fotoquímica, a qual é posteriormente utilizada em reações do ciclo de Calvin e Benson associadas com a fixação e redução do CO₂ atmosférico e produção de fotoassimilados. Para que a fotossíntese ocorra, o CO₂ é absorvido da atmosfera por estruturas especializadas chamadas de estômatos. Os estômatos são poros microscópicos cercados por duas células especializadas, as células-guarda, que controlam as trocas gasosas nas plantas e têm forte influência nas características associadas à fotossíntese. A caracterização do comportamento estomático é essencial para o entendimento da alta eficiência no uso da água (EUA) observado em algumas espécies de plantas. A fotossíntese C₄ otimiza as relações entre influxo de carbono e efluxo de água das plantas, permitindo altas taxas fotossintéticas com baixa condutância estomática (*g_s*) e assim alta EUA. Entre as espécies da família Cleomaceae, são encontradas espécies C₃ (*Tarenaya longicarpa*) e C₄ (*Gynandropsis gynandra*) que estão relacionadas à família Brassicaceae, a qual pertencem espécies de importância econômica. Entretanto, pouco se sabe sobre a anatomia e fisiologia dos estômatos de espécies da família Cleomaceae e suas relações com a EUA observada nas mesmas. Tendo em conta todas estas informações este trabalho teve como hipótese principal que devido à complexa interação entre a *g_s* e assimilação líquida de CO₂ em plantas com mecanismos concentradores de CO₂ distintos, acredita-se na existência de uma regulação estomática diferencial para otimizar a capacidade fotossintética e EUA entre espécies da família Cleomaceae. Assim, neste trabalho, para avaliar características anatômicas foliares associadas ao funcionamento dos estômatos e EUA, que geralmente é muito elevada em espécies exibindo mecanismo concentrador de CO₂ do tipo C₄, foram utilizadas as espécies *G. gynandra* e *T. longicarpa*, e três híbridos interespecíficos provenientes do cruzamento dessas duas espécies (*TlxGg02*, *TlxGg04*, *TlxGg05*). A EUA em híbridos e parentais foi avaliada em termos de características anatômicas e fisiológicas relacionadas aos estômatos. Os resultados obtidos mostram que, apesar de taxas fotossintéticas semelhantes, existem diferenças na *g_s*, com alta EUA na espécie C₄ em relação à C₃ e híbridos interespecíficos. Ademais, foi observada menor densidade e abertura estomática em *G. gynandra*, assim

como menores variações na *gs* em resposta à luz, CO₂ e ABA. Por outro lado, *T. longicarpra* apresentou variações rápidas e intensas em resposta a tais fatores. Verificou-se também que os híbridos apresentaram características anatômicas foliares distintas, assim como comportamento estomático diferencial em resposta ao CO₂, luz e ABA, com respostas intermediárias aos seus progenitores. Os resultados obtidos fornecem novas informações para melhorar a compreensão sobre os mecanismos fisiológicos e anatômicos que contribuem para a EUA observada em plantas de Cleomaceae e podem ser úteis para o entendimento e modulação desta característica em plantas com diferentes mecanismos concentradores de CO₂.

Palavras-chave: células-guarda; estômato; mecanismo concentrador de co₂; cleomaceae.

ABSTRACT

ISABEL, Júnio de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **Stomatal characteristics associated with water use efficiency in species of the Cleomaceae family and interspecific hybrids.** Adviser: Adriano Nunes Nesi. Co-adviser: Wagner Luiz Araujo.

During photosynthesis, light energy is converted into chemical energy in the photochemical stage, which is subsequently used in reactions of the Calvin-Benson cycle associated with the fixation and reduction of atmospheric CO₂ and the production of photoassimilates. For photosynthesis to occur, CO₂ is absorbed from the atmosphere by specialized structures called stomata. Stomata are microscopic pores surrounded by two specialized cells, the guard cells, which control gas exchange in plants and have a strong influence on characteristics associated with photosynthesis. Characterizing stomatal behavior is essential to understanding the high water-use efficiency (WUE) observed in some plant species. C₄ photosynthesis optimizes the relationship between carbon influx and water efflux in plants, allowing high photosynthetic rates with low stomatal conductance (*g_s*), and thus high WUE. Among species of the Cleomaceae family, both C₃ (*Tarenaya longicarpa*) and C₄ (*Gynandropsis gynandra*) species are found, which are related to the Brassicaceae family, to which economically important species belong. However, little is known about the anatomy and physiology of the stomata of Cleomaceae species and their relationship with the WUE observed in these plants. Taking all this information into account, the main hypothesis of this work was that due to the complex interaction between *g_s* and net CO₂ assimilation in plants with distinct CO₂ concentrating mechanisms, there might be a differential stomatal regulation to optimize photosynthetic capacity and WUE between species of the Cleomaceae family. Therefore, in this work, to evaluate leaf anatomical characteristics associated with stomatal function and WUE, which is generally very high in species exhibiting a C₄-type CO₂ concentrating mechanism, the species *G. gynandra* and *T. longicarpa* were used, along with three interspecific hybrids resulting from the crossing of these two species (*TlxGg02*, *TlxGg04*, *TlxGg05*). WUE in hybrids and parents was evaluated in terms of anatomical and physiological characteristics related to stomata. The results obtained show that, despite similar photosynthetic rates, there are differences in *g_s*, with high WUE in the C₄ species compared to the C₃ species and interspecific hybrids. Moreover, *G. gynandra* exhibited lower stomatal density and aperture, as well as smaller variations in *g_s* in response to light, CO₂, and ABA. On the

other hand, *T. longicarpa* showed rapid and intense variations in response to these factors. It was also found that the hybrids displayed distinct leaf anatomical characteristics, as well as differential stomatal behavior in response to CO₂, light, and ABA, with responses intermediate to those of their parents. The results provide new information to improve the understanding of the physiological and anatomical mechanisms that contribute to the WUE observed in Cleomaceae plants and may be useful for understanding and modulating this characteristic in plants with different CO₂ concentrating mechanisms.

Keywords: guard cells; stomata; co₂ concentrating mechanism; cleomaceae

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Trocas gasosas e fotossíntese: O papel central dos estômatos	10
1.2 Estratégias para otimização da fotossíntese em plantas C₄	11
1.3 Família Cleomaceae: modelo para estudos sobre desenvolvimento de mecanismos fotossintéticos.....	13
1.4 Regulação estomática em espécies C₃ e C₄: Mecanismos subjacentes.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Parentais e híbridos interespecíficos utilizados.....	15
2.2 Condições de cultivo	15
2.3 Perda de água em folha destacada e condutância cuticular mínima	16
2.4 Determinação da área foliar específica	17
2.5 Determinação da densidade de venação foliar	17
2.6 Morfometria foliar.....	17
2.7 Caracterização estomática	18
2.8 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas.....	18
2.9 Avaliação do comportamento estomático	19
2.10 Dinâmica do fechamento estomático após excisão foliar e aplicação de ABA	20
2.11 Avaliação da abertura estomática	20
2.12 Delineamento experimental e análise dos dados	20
3.RESULTADOS	22
3.1 Trocas gasosas	22
3.2 Perda de água em folhas destacadas e abertura estomática	24
3.3 Caracterização estomática	28
3.4 Comportamento estomático em resposta à transições na disponibilidade de luz	31
3.5 Comportamento estomático em resposta à variações na concentração de CO₂	34

4. DISCUSSÃO	38
4.1. Eficiência de uso da água em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos	38
4.2 Características anatômicas dos estômatos em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos	39
4.4 Condutância estomática e sensibilidade ao ABA em espécies da família Cleomaceae	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
6. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Trocas gasosas e fotossíntese: O papel central dos estômatos

Durante a fotossíntese, a energia luminosa é convertida em energia química que é posteriormente utilizada em reações do ciclo de Calvin e Benson, associadas com a fixação e redução do CO₂ atmosférico e produção de fotoassimilados (Cruz e Avenson, 2021). Para que a fotossíntese ocorra, CO₂ é absorvido da atmosfera por estruturas especializadas chamadas de estômatos, formados por duas células, denominadas de células-guarda, delimitando poros microscópicos localizados na epiderme das folhas. A abertura dos estômatos é essencial no controle das trocas gasosas, exercendo controle da absorção de CO₂ e perdas de água (Medeiros *et al.*, 2019). Quase todo o vapor de água perdido pelos vegetais no processo transpiratório se dá pelos poros estomáticos. Através da alteração na abertura do poro estomático, as plantas conseguem controlar a entrada de CO₂ na cavidade estomática e espaços intercelulares ao mesmo tempo em que minimizam a perda de água para a atmosfera (Bertolino; Caine; Gray, 2019).

A condutância estomática (g_s), regula as trocas gasosas (perda de vapor de água e absorção de CO₂ pela folha) (Fanourakis *et al.*, 2015). Entretanto, a relação entre a g_s , absorção de CO₂ e fotossíntese não é tão simples na natureza, pois depende da espécie de planta e do ambiente (Kusumi *et al.*, 2012). A longo prazo, a regulação da g_s depende do desenvolvimento estomático, do número e tamanho dos estômatos que por sua vez determinam a condutância estomática máxima (g_{smax}), já, a curto prazo, a regulação estomática depende da velocidade de abertura e fechamento dos estômatos (Franks e Beerling, 2009).

Geralmente, os estômatos se abrem em resposta ao aumento de volume das células-guarda impulsionado por diminuições no potencial hídrico das mesmas como resultado do acúmulo de osmólitos e posteriormente pelo influxo de água. Durante o fechamento estomático, o efluxo de solutos das células-guarda reduz o potencial hídrico das células subsidiárias e, por sua vez, causa o efluxo de água em direção às mesmas (Silva-Alvim *et al.*, 2023).

A regulação dos movimentos estomáticos é um mecanismo associado com a ação de diversos transportadores e canais presentes nas membranas celulares e modificações no metabolismo das células mesofílicas e células-guarda (Daloso *et al.* 2015; Medeiros *et al.*, 2019). Os movimentos estomáticos são regulados pelos solutos que geram pressão de turgor

no par de células-guarda que formam o poro estomático. Potássio (K^+) e cloreto (Cl^-) são os principais íons que coordenam os movimentos dos estômatos (Medeiros *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2019; Ankit *et al.*, 2022).

Os estômatos são sensíveis a mudanças na concentração atmosférica de CO_2 . Enquanto elevadas concentrações de CO_2 induzem o fechamento estomático, baixas concentrações de CO_2 promovem a abertura estomática (Hunt e Gray, 2009). A abertura estomática induzida por baixo CO_2 é mediada por uma complexa interação entre diferentes genes e fitohormônios, a exemplo do Ácido abscísico (ABA) (Hiyama *et al.*, 2017). As diferenças nas respostas estomáticas entre plantas com distintos mecanismos concentradores de CO_2 a esses fatores permanecem pouco exploradas (Israel *et al.*, 2022). As plantas C_4 mantêm suas altas taxas fotossintéticas mesmo com pequena abertura estomática (Israel *et al.*, 2022). Todavia, dados sobre expressão de genes e sinalização hormonal nas células-guarda das mesmas permanessem escassos (Duarte *et al.*, 2019).

Apesar das informações referentes ao controle da abertura e fechamento dos estômatos, ainda existem várias questões sobre a regulação estomática que necessitam de respostas. Assim, o entendimento da regulação estomática representa uma etapa importante para aumentar a eficiência no uso da água (EUA) em plantas (Medeiros *et al.*, 2019). Muitos esforços vêm sendo feitos para caracterizar as alterações metabólicas em células-guarda e células mesofílicas em resposta à variações ambientais (Lima *et al.*, 2019). O conhecimento do metaboloma das células guarda tem aumentado consideravelmente (Lima *et al.*, 2019; Medeiros *et al.*, 2019). Entretanto, ao compreender como fatores ambientais e intrínsecos modulam o comportamento estomático e o metabolismo das células-guarda, podemos desenvolver estratégias para otimizar a EUA, especialmente em condições de estresse hídrico.

1.2 Estratégias para otimização da fotossíntese em plantas C_4

Após sua entrada na cavidade estomática, o CO_2 é fixado pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e, posteriormente, o carbono fixado é reduzido, formando as trioses fosfatadas pelas reações da etapa de redução do Ciclo de Calvin e Benson. Em condições de alta temperatura, luminosidade e baixo CO_2 , além da atividade carboxilásica, a RuBisCO também catalisa atividade oxigenásica que por sua vez leva à produção de 2-fosfoglicolato (2-PG) (Bathellier *et al.*, 2018; Busch, 2020; Von Caemmerer, 2020). O 2-PG é um metabólito tóxico capaz de inibir enzimas do Ciclo de Calvin e Benson (Levey *et al.*, 2019). Para evitar o seu acúmulo, o 2-PG é reciclado a 3-fosfoglicerato (3-PGA) por uma série

de reações enzimáticas e etapas de transporte em um processo metabólico chamado fotorrespiração (Peterhansel e Maurino, 2011). Esse processo requer gasto energético e perda de CO₂, o que implica em menor eficiência fotossintética, levando à menor produção das plantas C₃ em ambientes com elevadas temperaturas, alta luminosidade e baixa disponibilidade hídrica (Schulze *et al.*, 2013; Weber & Bar-Even, 2019). Assim, fotorrespiração é um dos principais fatores que contribuem para a menor eficiência fotossintética sob estas condições, pois de forma estequiométrica recupera apenas 75% do carbono contido no 2-PG (Weber & Bar-Even, 2019). Desse modo, elevadas taxas de fotorrespiração reduzem consideravelmente a produção dos cultivos.

Apesar da redução na eficiência da fotossíntese e produção das plantas, a fotorrespiração é considerada um processo essencial para a sobrevivência das plantas C₃ em ambientes com baixa concentração de CO₂ (Segura Broncano *et al.*, 2023). Nesse sentido, alguns grupos de plantas desenvolveram estratégias visando reduzir a fotorrespiração e compensar seus efeitos negativos, como é o caso dos mecanismos concentradores de CO₂ presentes em plantas C₄ (Schuler; Mantegazza; Weber, 2016). Plantas que apresentam o mecanismo fotossintético do tipo C₄ possuem anatomia Kranz, caracterizada pela presença de duas classes de células especializadas, as células mesofílicas (CM) e as células da bainha do feixe vascular (CBFV). Esta configuração anatômica possibilita o estabelecimento de um sistema de dupla carboxilação, sendo a primeira realizada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase) no citosol das células CM e a segunda carboxilação realizada pela enzima RuBisCO no estroma dos cloroplastos das CBFV (Von Caemmerer; Ghannoum; Furbank, 2017). Esse mecanismo garante uma alta concentração de CO₂ nas CBFV que inibe a atividade oxigenásica da RuBisCO, e por sua vez, inibe a fotorrespiração. Além disso, este mecanismo permite que plantas C₄ mantenham altas taxas fotossintéticas mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica (Way *et al.*, 2014), fazendo com que elas apresentem alta EUA.

O mecanismo fotossintético do tipo C₄ otimiza as relações entre influxo de carbono e efluxo de água das plantas, permitindo altas taxas fotossintéticas com baixa *gs* (Zhao *et al.*, 2022). Os estômatos há muito tempo são considerados elementos fundamentais para o funcionamento do mecanismo fotossintético C₄, considerando que permitem baixa *gs* (ou seja, redução da perda de água) sem comprometer a assimilação de carbono (Zhao *et al.*, 2022). Do ponto de vista biotecnológico, existe grande interesse na determinação do conjunto mínimo

de genes necessários para criação de um protótipo funcional C_4 (Lin *et al.*, 2020).

1.3 Família Cleomaceae: modelo para estudos sobre desenvolvimento de mecanismos fotossintéticos

Estudos envolvendo espécies da família Cleomaceae têm aumentado nos últimos anos (Bayat *et al.*, 2018). Essa família compreende espécies com mecanismo C_3 , intermediários C_3 - C_4 e C_4 , além de estar estreitamente relacionada à família Brassicaceae, família da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* e outros gêneros de importância econômica (Bayat *et al.*, 2018). A comparação dos genomas e transcriptomas de espécies dentro da família Cleomaceae pode auxiliar na identificação de um conjunto de genes necessários para o estabelecimento do mecanismo fotossintético C_4 (Bayat *et al.*, 2018).

Acredita-se que a fotossíntese C_4 surgiu independentemente mais de 60 vezes em diferentes famílias botânicas (Sage, 2004). A evolução do mecanismo C_3 para C_4 é intermediada por fenótipos fotossintéticos intermediários, por exemplo, o desenvolvimento de uma anatomia Proto-Kranz nas fases iniciais do processo de evolução do mecanismo C_4 (Sage, 2021), sendo que o estudo e avaliação desses fenótipos intermediários é de extrema importância para elucidar o estabelecimento do mecanismo fotossintético do tipo C_4 .

A evolução do mecanismo fotossintético C_4 envolve uma série de modificações na expressão de genes e propriedades enzimáticas (Gowik e Westhoff, 2011). Primeiramente ocorre o desenvolvimento da anatomia Kranz, com aumento na densidade de nervuras. Adicionalmente, intermediários C_3 - C_4 possuem o transporte de glicolato fotorrespiratório que bombeia CO_2 para dentro das células da bainha do feixe (Bauwe, 2010). Os últimos passos envolvem o aumento nos níveis de anidrase carbônica e PEPC no citosol das CM, e a separação espacial das duas reações de carboxilação em um ciclo C_4 verdadeiro (Gowik e Westhoff, 2011).

Assim, devido à sua proximidade filogenética com as Brassicaceae, a família Cleomaceae torna-se promissora em estudos acerca da evolução do mecanismo fotossintético C_4 (Voznesenskaya *et al.*, 2007; Bayat *et al.*, 2018). Nesse sentido, híbridos interespecíficos provindos do cruzamento da espécie C_4 *G. gynandra* e da espécie C_3 *T. longicarpa*, ambas da família Cleomaceae, foram gerados (Gomes, 2021). Análises fisiológicas e metabólicas dos híbridos gerados sugerem que características da espécie parental C_4 foram transferidas para as linhas híbridas na geração F1 e F2 (Gomes, 2021). Desse modo, espera-se que tais híbridos possuam características anatômicas e fisiológicas que os confirmem EUA intermediárias aos dois parentais.

1.4 Regulação estomática em espécies C₃ e C₄: Mecanismos subjacentes

O mecanismo fotossintético C₄, ao permitir uma fixação mais eficiente do CO₂, permite também que tais espécies de plantas apresentem menor *g_s*, o que favorece a manutenção de altas taxas fotossintéticas sob altas temperaturas e baixa disponibilidade hídrica (Song *et al.*, 2023). Neste contexto, muitos esforços vêm sendo realizados com o objetivo de entender como as plantas C₄ evoluíram para manter uma alta EUA. Uma série de adaptações nos estômatos dessas espécies auxilia a otimizar o seu uso da água em comparação às plantas C₃ (Song *et al.*, 2023). Dentre elas podemos elencar: 1) menor condutância estomática (Silva-Alvim *et al.*, 2023); 2) menor densidade estomática (Zhao *et al.*, 2022); 3) estômatos geralmente maiores (Zhao *et al.*, 2022); e 4) estômatos mais resilientes às flutuações nas concentrações de CO₂ e disponibilidade de luz (Bernardo *et al.*, 2023; Israel *et al.*, 2022).

Estudo recente comparou o comportamento estomático de *G. gynandra* e *A. thaliana* em resposta às variações na intensidade luminosa (Silva-Alvim *et al.*, 2023). Verificou-se que a cinética estomática acelerada de *Gynandropsis* está relacionada às propriedades biofísicas de um transportador de K⁺, podendo se tornar um alvo para estudos acerca da regulação estomática em plantas C₄. Entretanto, estudos adicionais com espécies filogeneticamente próximas são ainda necessários para comprovar tal mecanismo. Assim, este projeto visa expandir o conhecimento atual associado com fisiologia dos estômatos e EUA em espécies de Cleomaceae com diferentes mecanismos concentradores de CO₂ e seus híbridos interespecíficos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Parentais e híbridos interespecíficos utilizados

Foram utilizadas as espécies *Gynandropsis gynandra* (Gg) e *Tarenaya longicarpa* (Tl), ambas da família Cleomaceae e três híbridos interespecíficos provenientes do cruzamento dessas duas espécies (TlxGg02, TlxGg04, TlxGg05) previamente gerados e caracterizados (Gomes, 2021). Os acessos dos parentais foram obtidos através de coletas previamente realizadas em parques estaduais e nacionais brasileiros como descrito previamente (Parma, *et al.* 2022). O acesso *G. gynandra* (porte herbáceo) foi coletado em Mossoró, Rio Grande do Norte, e o acesso *T. longicarpa* (porte arbustivo) foi coletado em Picos, Piauí. As sementes foram multiplicadas e armazenadas em baixa temperatura na Unidade de Crescimento de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UCP/UFV).

As linhas híbridas foram previamente geradas em casa de vegetação da UCP/UFV, conforme previamente descrito (Gomes, 2021). De forma breve, os cruzamentos foram realizados ao amanhecer, antes da abertura dos botões florais para evitar a autopolinização. Após a emissão dos botões florais, foi realizada a emasculação deles no genitor feminino, através da remoção das anteras. Em seguida, foi realizada a polinização do estigma das flores no genitor feminino (*T. longicarpa*) utilizando-se pólen recém-colhido das anteras do genitor masculino (*G. gynandra*).

2.2 Condições de cultivo

Para evitar a utilização de plantas segregantes, as plantas utilizadas nos experimentos deste estudo foram obtidas a partir de microestacas, de plantas matrizes na geração F1 no caso dos híbridos, procedentes de casa de vegetação, propagadas *in vitro* como descrito a seguir. A radiação fotossinteticamente ativa máxima no ambiente onde os experimentos foram instalados era de $1.500 \mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com temperatura média de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A casa de vegetação onde os experimentos foram realizados está localizada na UCP/UFV. Durante os experimentos as plantas receberam os devidos tratos culturais e foram irrigadas periodicamente, mantendo o solo na capacidade de campo.

Para a propagação do material *in vitro*, foram coletados segmentos nodais de plantas em fase de crescimento vegetativo. A desinfestação dos explantes foi feita por meio da imersão por 1 minuto em álcool 70%, seguido de imersão por 20 minutos em hipoclorito de sódio (a 1% de cloro ativo) e, posteriormente, lavadas em água destilada estéril. Os explantes nodais foram introduzidos em tubos de ensaio de 100 mL, contendo aproximadamente 12,5 mL de meio, 4,43

g L⁻¹ de meio basal e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 5,5 g de ágar. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e o meio autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

Posteriormente, na fase de multiplicação, foi utilizado 4,43 g L⁻¹ de meio basal e vitaminas MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 5,5 g L⁻¹ de ágar. Os subcultivos foram realizados em meio básico MS na ausência de reguladores de crescimento até que as plantas apresentassem um sistema radicular desenvolvido.

A aclimatização do material foi feita em casa de vegetação, durante uma semana. As plantas provenientes do cultivo *in vitro* permaneceram cobertas com saco plástico em copos descartáveis contendo substrato comercial Mecplant[®] durante 15 dias em casa de vegetação (irradiância máxima incidente de 1.500 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com temperatura média de 25 ± 2 °C). Após esse período de aclimatização, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 5 L, fertilizadas a cada 15 dias com 15 g de NPK por vaso, na formulação 4-14-8. As plantas permaneceram por um período de quatro semanas até a determinação dos parâmetros fisiológicos e coleta de material vegetal para análises bioquímicas.

2.3 Perda de água em folha destacada e condutância cuticular mínima

Para este experimento, foram utilizadas plantas de quatro semanas de cultivo em pleno período vegetativo. Destas plantas foram retiradas oito folhas de cada genótipo, coletadas com o pecíolo submerso em tampão MES-KCl (5 mM KCl, 10 mM MES, 50 $\mu\text{M CaCl}_2$, pH 6.15) e incubadas sob irradiância de 150 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C e umidade relativa de aproximadamente 60%. De modo a otimizar a abertura estomática, as folhas foram mantidas nessas condições por 90 minutos. Após este período foi adicionado ácido abscísico (ABA) à solução tampão de quatro folhas à concentração final de 50 μM e incubadas por mais 30 minutos. Assim, ao final de duas horas, quatro folhas de cada genótipo foram avaliadas na presença de ABA e quatro folhas na ausência do regulador.

Posteriormente, as folhas foram retiradas da solução tampão, os pecíolos foram envoltos com parafilme e então foram pesadas em balança de precisão analítica em intervalos de 10 minutos, durante 4 horas. Posteriormente, foi calculada a porcentagem de perda de água (PPA), com base no peso fresco obtido no início do experimento (tempo 0), na presença e ausência de ABA a fim de verificar sua influência na abertura estomática e na perda de água.

A condutância cuticular mínima (g_{min}) foi estimada para as folhas através da perda de

massa fresca das folhas destacadas submetidas ao tratamento com ABA. Durante as 4 horas de pesagem a temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas a cada pesagem para calcular o déficit de pressão de vapor (DPV). A área foliar foi obtida a partir de imagens digitalizadas em *scanner* e medidas com auxílio do software Image Pro Plus® (versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). A condutância cuticular mínima (perda mínima de água pela cutícula) foi calculada utilizando os valores de perda de massa fresca, o DPV (mol mol^{-1}) e a área foliar inicial e final (m^2).

2.4 Determinação da área foliar específica

Para essa avaliação as folhas utilizadas na pesagem para avaliação da perda de água foram digitalizadas seguindo a metodologia descrita acima. Em seguida, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C até atingir massa seca constante. Posteriormente, a área foliar específica (AFE) foi determinada pela razão entre a área foliar inicial (m^2) e a massa seca (kg) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{AFE} (\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}) = \text{área foliar inicial} (\text{m}^2) / \text{massa seca das folhas (kg)}$$

2.5 Determinação da densidade de venação foliar

Para esta análise, discos foliares foram coletados do folíolo central, em plantas com quatro semanas. A diafanização do material foi realizada segundo a metodologia proposta por Zsögön *et al.* (2015), através da incubação das folhas em metanol (95%) por 48 horas e em seguida em ácido láctico (100%). Quando incubadas em ácido láctico, as folhas foram deixadas em estufa de 40 °C até apresentarem um aspecto completamente translúcido. As amostras foram montadas em lâminas de vidro e as imagens obtidas com o auxílio de um sistema de captura de imagem em cores, Axiovision® 105, acoplado ao fotomicroscópio Zeiss Axio Scope A1.

Para a determinação da densidade de venação foi utilizado o folíolo central de folhas da porção mediana da planta, sendo coletadas uma folha de cada planta totalizando inicialmente 5 repetições por genótipo. Dentro de cada repetição foram fotografadas 25 regiões da folha coletada, totalizando 125 regiões fotografadas e mensuradas para cada genótipo, a densidade de nervuras foi definida como a medição do comprimento das nervuras numa dada área foliar. A quantificação foi realizada no software Image Pro-Plus® (versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

2.6 Morfometria foliar

Para o corte transversal, folhas totalmente expandidas foram coletadas da porção mediana da planta e fixadas em FAA50 (formaldeído, ácido acético, etanol 50% na proporção de 5:5:9 v/v), por 48h, desidratadas em série etanólica e incluídas em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha). O material foi cortado transversalmente (5 μm) em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, LEICA, Heidelberg, Alemanha) com a utilização de navalhas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'brien, Feder, & Mccully, 1964) por 1 min e montadas entre lâminas e lamínulas.

As fotografias foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss (MC-80). A quantificação da espessura foliar, espessura da epiderme abaxial e adaxial, espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso foi realizada no software Image Pro-Plus®, para isso foram fotografadas 25 lâminas de cada genótipo (5 folhas e 5 fotografias por folha) e dentro de cada fotografia foram realizadas 10 medições para cada uma.

2.7 Caracterização estomática

Para caracterização estomática foram utilizadas folhas completamente expandidas da porção mediana da planta nas quais impressões epidérmicas foram feitas na superfície abaxial e adaxial, utilizando-se um molde de silicone de condensação odontológico conforme previamente descrito (Von Groll *et al.*, 2002). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, dentro de cada repetição foram fotografadas cinco regiões dentro da impressão, totalizando 20 campos para quantificação da densidade estomática para cada genótipo. Sobre esse molde foi passada uma base incolor e com isso foi possível a visualização da impressão das células da epiderme (Vongroll *et al.*, 2002).

As imagens foram registradas utilizando-se uma câmera digital (AxiocamMRc) acoplada ao microscópio fotomicroscópio Zeiss (MC-80). As medições foram feitas com o auxílio do software Image ProPlus®. Para densidade estomática a partir desses moldes, foram contabilizados os estômatos por unidade de área de ambas as faces foliares (abaxial e adaxial).

2.8 Determinação dos parâmetros de trocas gasosas

A fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s), a concentração interna de CO_2 (C_i) e a taxa de transpiração foliar (E) foram medidos no folíolo central da terceira folha completamente expandida a partir do ápice da planta. Para isto foi utilizado um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto modelo LI6400XT (LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA). As medições foram realizadas no período das 8 às 12 h, sob irradiância de 1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em casa de vegetação com concentração de CO_2 de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$.

(DaMatta *et al.*, 2016). Foi aplicada 10% de luz azul da densidade do fluxo fotossintético para maximizar a abertura estomática.

2.9 Avaliação do comportamento estomático

Para esta análise foi utilizado o analisador de gases descrito acima, utilizando-se o folíolo central de folhas da parte mediana da planta. O aparelho foi programado para realizar medições a cada 30 segundos durante 120 minutos, registrando os valores de g_s , C_i e A nesses intervalos. Cada dinâmica de luz foi examinada por 100 min, no entanto, o tempo registrado após as transições de luz de claro para escuro e de escuro para claro dependia do genótipo. O tempo foi definido baseado em testes previamente realizados.

Para avaliar o efeito de alterações na concentração de CO_2 no ambiente sobre a g_s , o aparelho foi ajustado inicialmente para manter a concentração de CO_2 de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ por 10 minutos de medição. Após este tempo a concentração de CO_2 foi elevada para $800 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ por 60 min e finalmente o CO_2 foi novamente reduzido para $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ por mais 50 min. Desta forma foi possível avaliar o comportamento da g_s durante a transição das concentrações de CO_2 . Foram avaliadas quatro plantas por genótipo e todas as medições foram realizadas em casa de vegetação no período das 8 às 12 h, sob irradiância de $1000 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com 10% de luz azul da densidade do fluxo fotossintético para maximizar a abertura estomática.

Para avaliar o comportamento dos estômatos em resposta a luz foi utilizado o mesmo equipamento e folíolo descritos acima. O aparelho foi programado para realizar medições a cada 30 segundos durante 150 min, registrando assim os valores de g_s , C_i e A nesses intervalos. Inicialmente o aparelho foi regulado com sob irradiância de $1000 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com 10% de luz azul nos primeiros 10 min de medição para que as medidas se estabilizassem. Posteriormente, a luz foi desligada por 50 min. Na sequência, a irradiância foi regulada para $1000 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com 10% de luz azul por mais 90 min. Desta forma foi possível avaliar o comportamento da g_s durante a transição de claro/escuro/claro.

Para verificar a velocidade de resposta estomática em cada espécie durante as transições de CO_2 ou luz, a velocidade dos movimentos estomáticos foi estimada. Para a abertura estomática, esse valor foi determinado pela inclinação máxima da zona linear (Sl_{max}) de aumento da g_s (800 a $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de CO_2 e transições de escuro para claro), e para o fechamento estomático pela inclinação máxima da zona linear (Sl_{max}) após diminuição da g_s (400 a $800 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de CO_2 e transições de claro para escuro). Foram avaliados folíolos provenientes de quatro plantas de cada genótipo e todas as medições foram realizadas em casa

de vegetação durante a manhã, no período das 8 às 13 h, à $400\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$.

2.10 Dinâmica do fechamento estomático após excisão foliar e aplicação de ABA

Para registrar a dinâmica de fechamento estomático após excisão foliar, uma folha de cada planta, de quatro indivíduos foram usados. As folhas foram coletadas pela manhã, e o pecíolo cortado debaixo de solução tampão MES-KCl (5 mM KCl, 10 mM MES, 50 μM CaCl_2 , pH 6.15) em placa de petri. A g_s foi monitorada após a excisão foliar a cada 30 segundos durante 35 minutos. As condições dentro da câmara foliar foram mantidas constantes durante o experimento (irradiância incidente de $1000 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração de CO_2 a $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Após a leitura da g_s durante 5 minutos, uma alíquota de solução estoque de ABA foi adicionado a placa para ter uma concentração final de 5 μM , conforme Omena-Garcia *et al.*, 2019 e Cândido-Sobrinho *et al.*, 2022. A g_s foi monitorada por mais 30 minutos a cada 30 segundos. Para verificar a velocidade de resposta estomática em cada genótipo ao ABA, a velocidade dos movimentos estomáticos foi estimada. Esse valor foi determinado pela inclinação máxima da zona linear (Sl_{max}) de diminuição da g_s após a aplicação do ABA.

2.11 Avaliação da abertura estomática

Para verificar a abertura estomática foi utilizado o procedimento descrito por Araújo *et al.*, 2011 e Medeiros *et al.*, 2017 com pequenas alterações. De forma breve, folhas totalmente expandidas de plantas com quatro semanas de idade foram imersas em tampão de abertura estomática contendo KCl 5 mM, 50 μM CaCl_2 e 5 mM MES-Tris (pH 6,15) por 2 h sob luz ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para otimizar a abertura dos estômatos. Depois, ABA foi adicionado ao tampão de abertura até a concentração final de 5 e 10 μM respectivamente. Após 2 h de incubação as imagens de fragmentos da epiderme isolados foram imediatamente registradas e a abertura estomática foi avaliada utilizando-se uma câmera digital (AxiocamMRc) acoplada ao fotomicroscópio Zeiss (MC-80). Foram avaliadas folhas de quatro plantas diferentes e a abertura de pelo menos 25 estômatos por folha foi medida totalizando pelo menos 100 estômatos por genótipo.

2.12 Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 4-5 repetições. Todas as variáveis analisadas foram comparadas entre as espécies parentais e as três linhas de híbridos interespecíficos. Os resultados foram testados quanto às pressuposições da análise da

variância e então submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa Rstudio e Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA). Os resultados de trocas gasosas, densidade estomática e de resposta a transições nas concentrações de CO₂ e disponibilidade de luz também foram submetidos a uma análise multivariada utilizando o método de Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando o software Rstudio.

3.RESULTADOS

3.1 Trocas gasosas

Devido às diferentes características observadas nos dois parentais quanto aos parâmetros de fotossíntese (Gomes, 2021), buscou-se verificar se essas características fisiológicas eram observadas nas plantas híbridas. Verificou-se que os híbridos interespecíficos manifestam valores pontuais de trocas gasosas muito semelhantes ao parental C_3 (Figura 1). As diferenças mais pronunciadas foram vistas para plantas das linhas híbridas *TlxGg04* e *TlxGg05* em relação à g_s , $\sim 0,378$ e $0,427 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente. Nota-se que tais valores são intermediários em relação aos seus dois parentais. A g_s média de *G. gynandra* foi de $0,180 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto em *T. longicarpa* o valor médio de g_s foi de $0,484 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 1B). De maneira geral, *G. gynandra* exibiu os menores valores de g_s (Figura 1B), concentração interna de CO_2 (Figura 1C) e transpiração (Figura 1D) em relação aos demais genótipos.

De forma interessante, valores de fotossíntese líquida foram semelhantes entre *G. gynandra*, *T. longicarpa* e híbridos F1 (Figura 1A). Entretanto, para manutenção dessas taxas fotossintéticas foram necessárias maiores g_s em plantas híbridas e no parental *T. longicarpa*. A g_s no parental C_4 foi aproximadamente 62,5% menor em relação à *T. longicarpa* e *TlxGg02*. Estas diferenças indicam uma EUA intrínseca e instantânea superiores em *G. gynandra* em comparação à *T. longicarpa* e híbridos F1 (Figuras 1E,F).

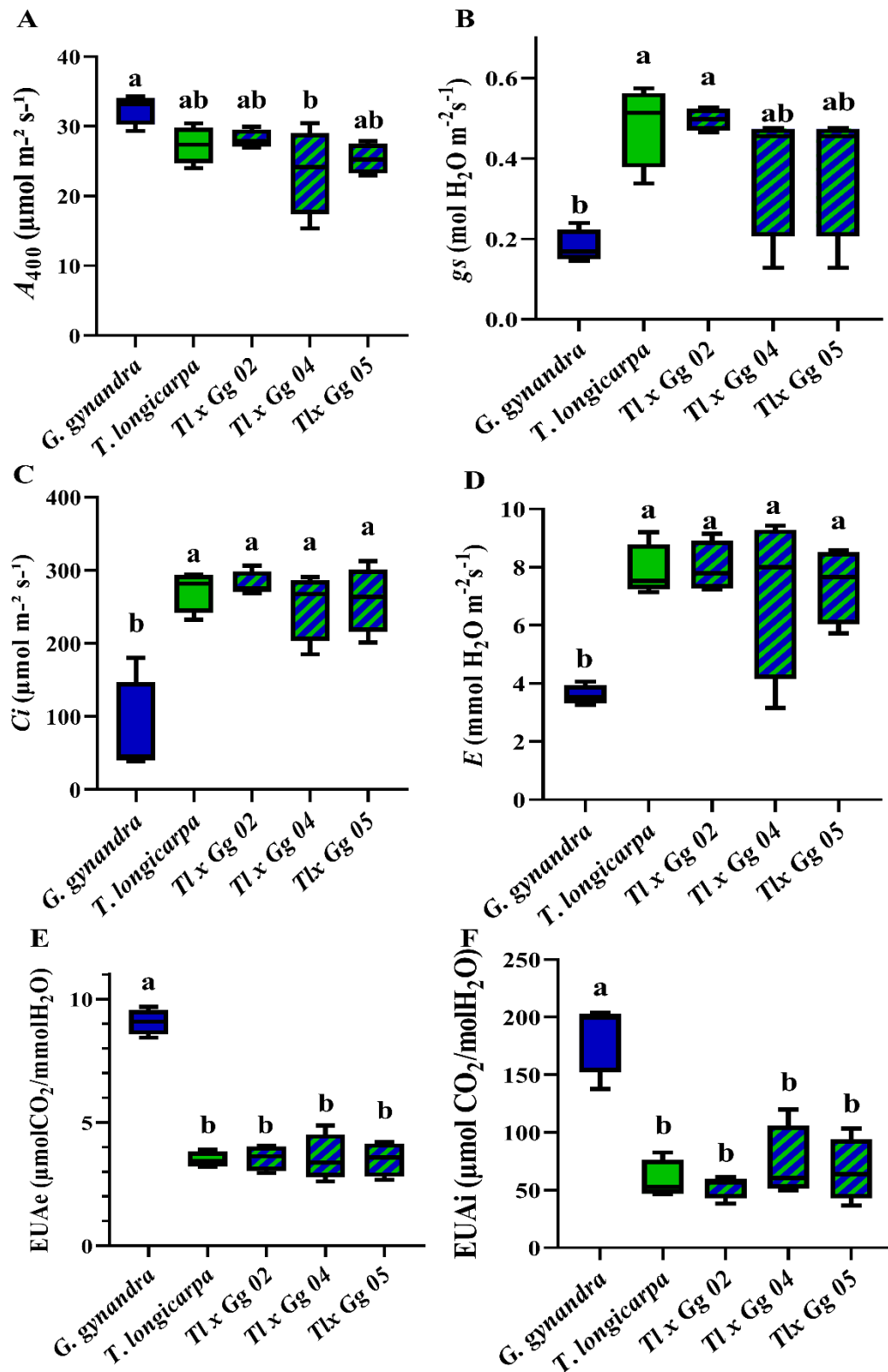


Figura 1. Parâmetros de trocas gasosas em plantas das espécies *G. gynandra* (C_4), *T. longicarpa* (C_3) e seus híbridos interespecíficos (*TLxGg02*, *TLxGg04*, *TLxGg05*). (A) Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A); (B) condutância estomática (g_s); (C) concentração interna de CO_2 (C_i); (D) transpiração foliar (E); (E) eficiência instantânea do uso da água (A/E ; EUAe); (F) eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s ; EUAi). Dispersões seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=4$).

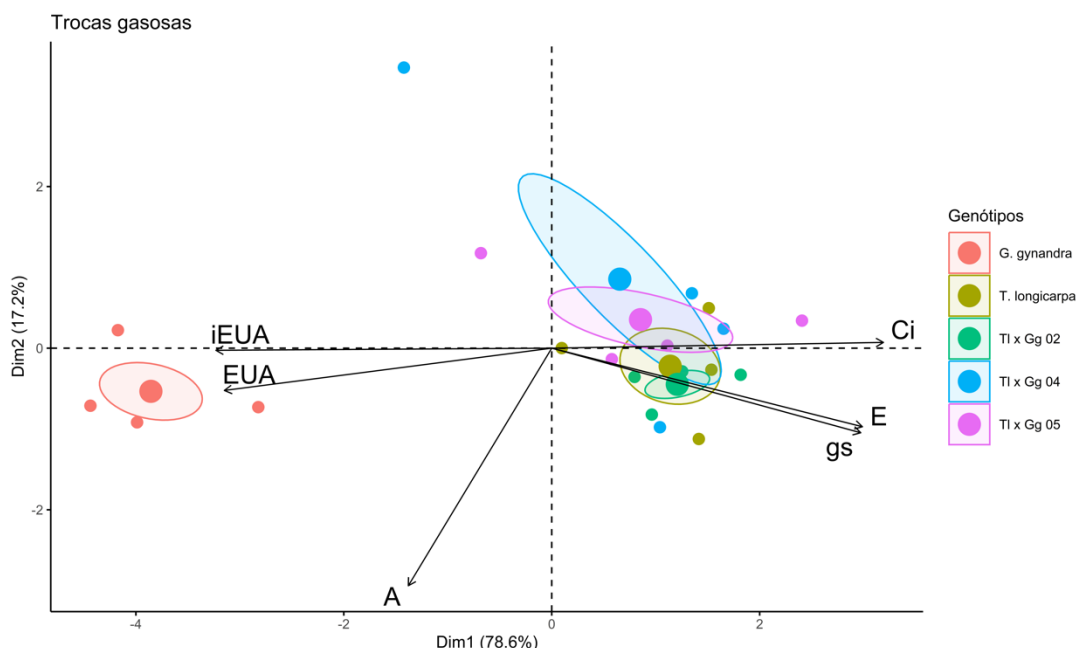


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) representando diferenças nos parâmetros de trocas gasosas para *G. gynandra* (C_4), *T. longicarpa* (C_3), e seus híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05*). Taxa de assimilação líquida de CO_2 (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO_2 (*Ci*), transpiração foliar (*E*), eficiência instantânea do uso da água (*A/E*; *EUAe*), eficiência intrínseca do uso da água (*A/g_s*; *EUAi*). Quanto maior a distância entre a variável e a origem, melhor essa variável está representada em relação à dimensão 1 (primeiro componente principal) e à dimensão 2 (segundo componente principal). Variáveis negativamente correlacionadas são exibidas em lados opostos da origem.

Para verificar a se os parâmetros de trocas gasosas diferenciavam híbridos e parentais em grupos distintos, foi feita uma análise multivariada pelo método dos componentes principais (Figura 2). Observou-se que *T. longicarpa* e híbridos interespecíficos se separaram de *G. gynandra* no PC1, mas não entre si no PC2. Os dois componentes principais explicaram 95,8 % da variação total nos dados originais. O primeiro componente foi responsável por explicar 78,6 % da variação total das amostras, e esteve mais influenciado pelas variáveis *iEUA* e *Ci*. O segundo componente explicou 17,2% da variação, e as variáveis que mais contribuíram foram *A* e *gs*. Verificou – se que a *EUA* e *iEUA* se correlacionam negativamente com a *gs*, *E* e *Ci*

3.2 Perda de água em folhas destacadas e abertura estomática

Ao se avaliar a taxa de perda de água nas folhas pode-se obter informações sobre a eficiência do fechamento estomático e a capacidade da planta de regular a sua transpiração.

Além disso, é possível avaliar como os hormônios, a exemplo do ABA, influenciam o fechamento estomático e a perda de água.

Para compreender as diferenças na EUA observadas entre as espécies e seus híbridos, e a influência dessa característica na separação dos genótipos (Figura 2), experimento complementar foi realizado. Folhas de plantas de cada genótipo, cultivadas em condições ótimas foram incubadas na presença e ausência de 50 μM de ABA, avaliando-se a perda de água ao longo do tempo (Figura 3). Percebeu-se que folhas de *G. gynandra* apresentaram taxas de perda de água semelhantes as observadas em *T. longicarpa* quando incubadas na ausência de ABA (Figura 3A). Verificou-se também que incubação com ABA não alterou de forma significativa as taxas de perda de água observadas nas folhas de *G. gynandra* em relação ao controle. De forma contrastante, em *T. longicarpa*, *TlxGg02* e *TlxGg04* evidenciou-se o efeito do fechamento estomático sobre a perda de água foliar desde os primeiros minutos do experimento. Entretanto, de forma similar a *G. gynandra*, as folhas de plantas *TlxGg05* durante as quatro horas de avaliação, apresentaram baixas taxas de perda de água (Figura 3E).

Ao final do período de avaliação foram evidenciadas menores taxas de perda de água nos híbridos *TlxGg 02* e *TlxGg 05*. Adicionalmente verificou-se uma redução de $\sim 43,7\%$ na perda final em *T. longicarpa* quando as folhas foram tratadas com ABA e uma redução de $\sim 11,76$; $19,2$ e $26,5$ para *G. gynandra*, *TlxGg 02* e *TlxGg 04* respectivamente.

Para verificar as diferenças na perda de água entre os genótipos estudados, um novo experimento foi realizado para avaliar a influência do ABA na abertura dos estômatos através de curvas de resposta a diferentes doses do hormônio. Para isso avaliou-se a abertura estomática em resposta ao mesmo (Figura 4A) e acompanhou-se as alterações na *gs* após a aplicação de ABA em folhas destacadas (Figura 4B-F). Diminuições mais pronunciadas na abertura estomática e *gs* de *T. longicarpa* e híbridos interespecíficos em resposta à aplicação de 5 μM de ABA foram vistas ao final dos experimentos (Figura 4). Notou-se um atraso no fechamento estomático na redução na *gs* para *G. gynandra* e híbridos interespecíficos (Figuras 4B,D,E,F) em relação à *T. longicarpa* (Figura 4C). O Sl_{max} de fechamento estomático em resposta à aplicação de 5 μM de ABA foi de 0,003; 0,016; 0,006; 0,007 e 0,009 para *G. gynandra*, *T. longicarpa*, *TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05* respectivamente (Figura suplementar 1).

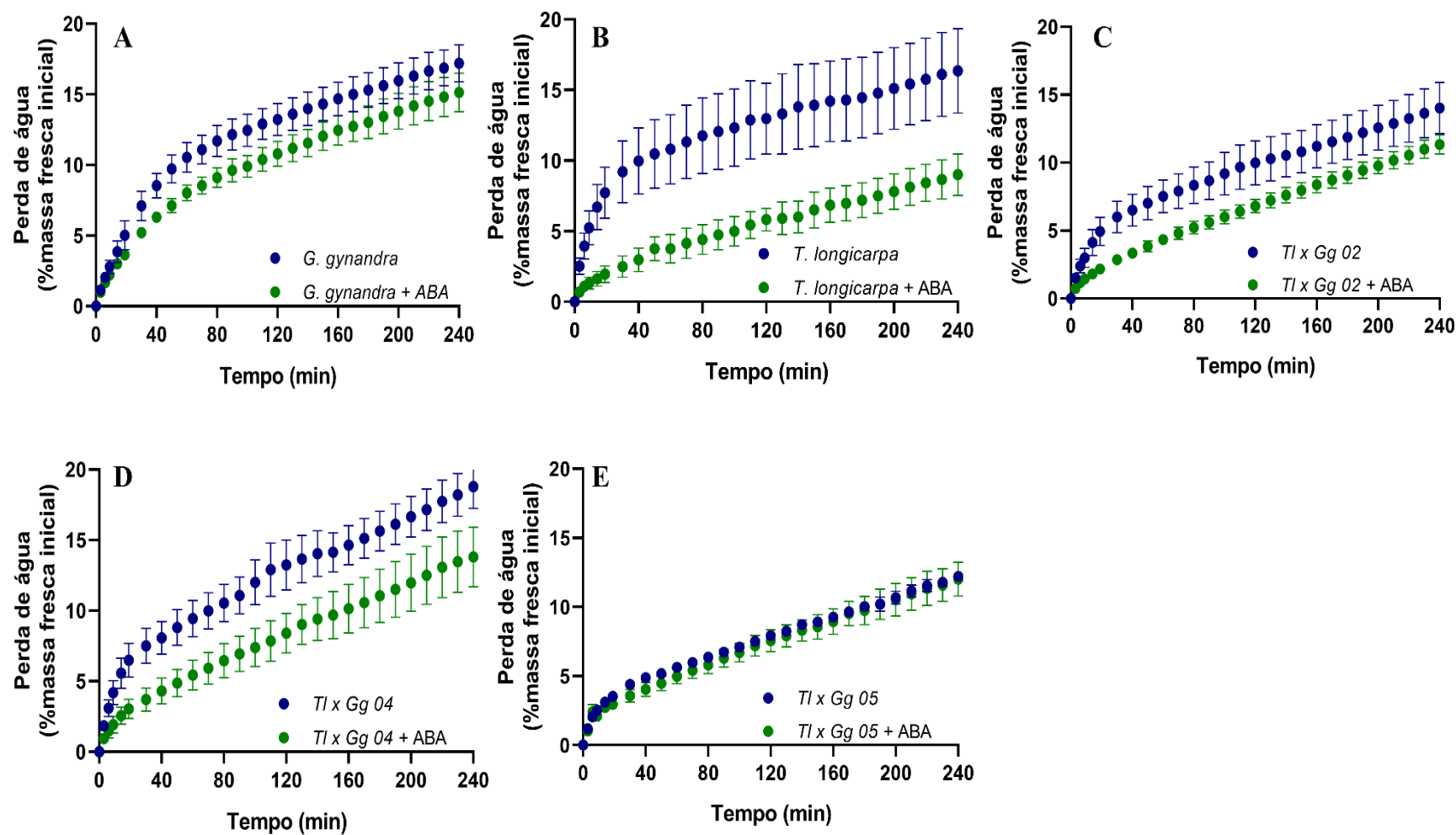


Figura 3. Curvas de perda de água em folhas destacadas durante 240 minutos sem e com aplicação de 50 μ M de ABA das espécies (A) *G. gynandra*, e (B) *T. longicarpa*, e (C) *TlxGg04*, (D) *TlxGg02* e (E) *TlxGg05*. Dados referentes à perda de massa fresca em relação à massa fresca inicial, média $\pm$ EP (n = 4).

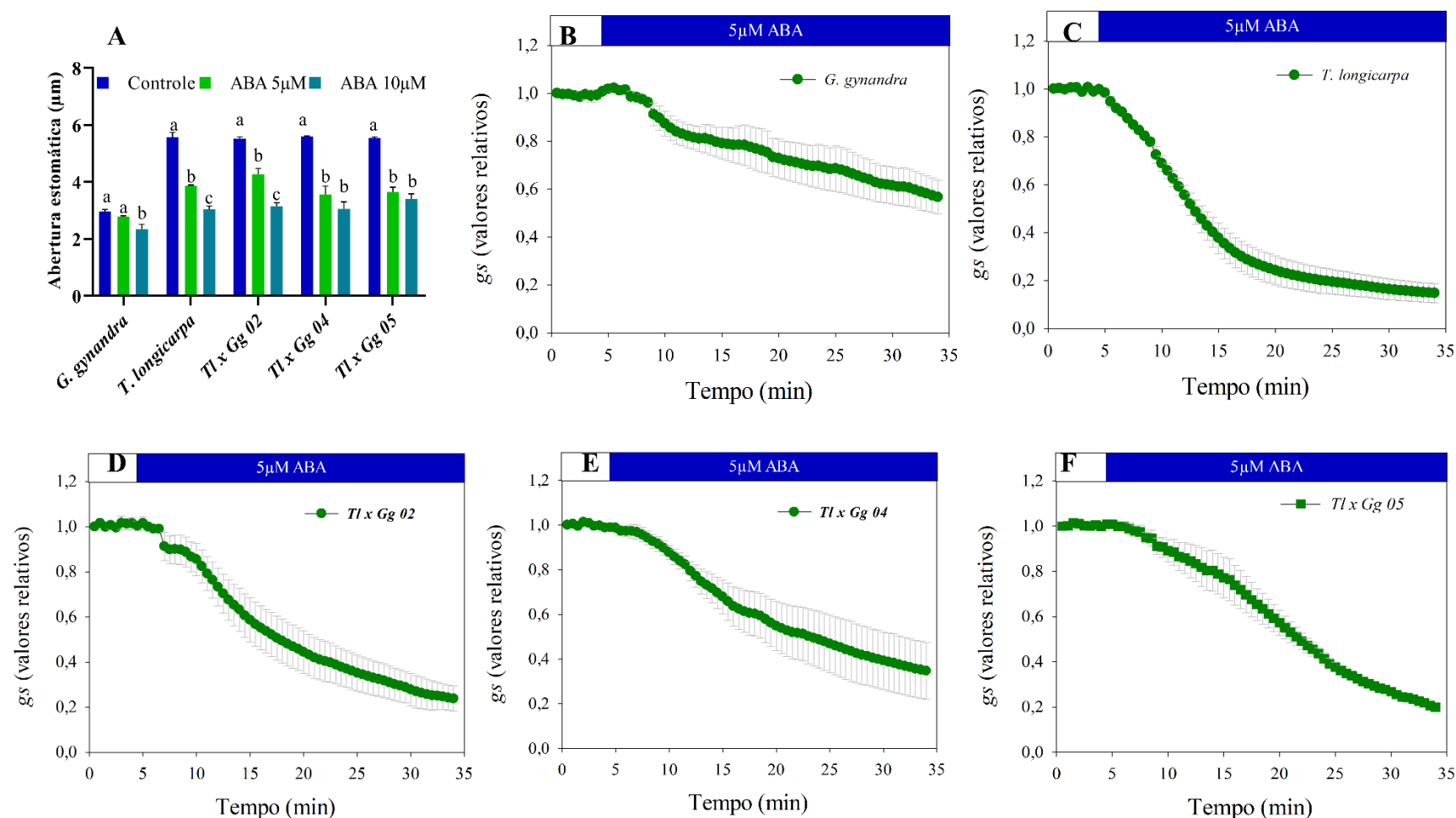


Figura 4. Resposta da abertura e condutância estomática (gs) em folhas de *G. gynandra*, *T. longicarpa* e seus híbridos a aplicação de diferentes concentrações de ácido abscísico (ABA). (A) Avaliação da abertura estomática após 120 minutos de incubação com 5 e 10 μM de ABA. As avaliações foram realizadas em pelo menos 25 estômatos por folha, totalizando pelo menos 100 estômatos por genótipo. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=4$). Valores relativos de condutância estomática (gs) em função do tempo para (B) *G. gynandra*, (C) *T. longicarpa*, (D) *TlxGg02*, (E) *TlxGg04* e (F) *TlxGg05* após aplicação de 5 μM de ABA na solução tampão de abertura estomática ao longo de um período de 30 minutos, média $\pm$ EP ($n = 4$).

3.3 Caracterização estomática

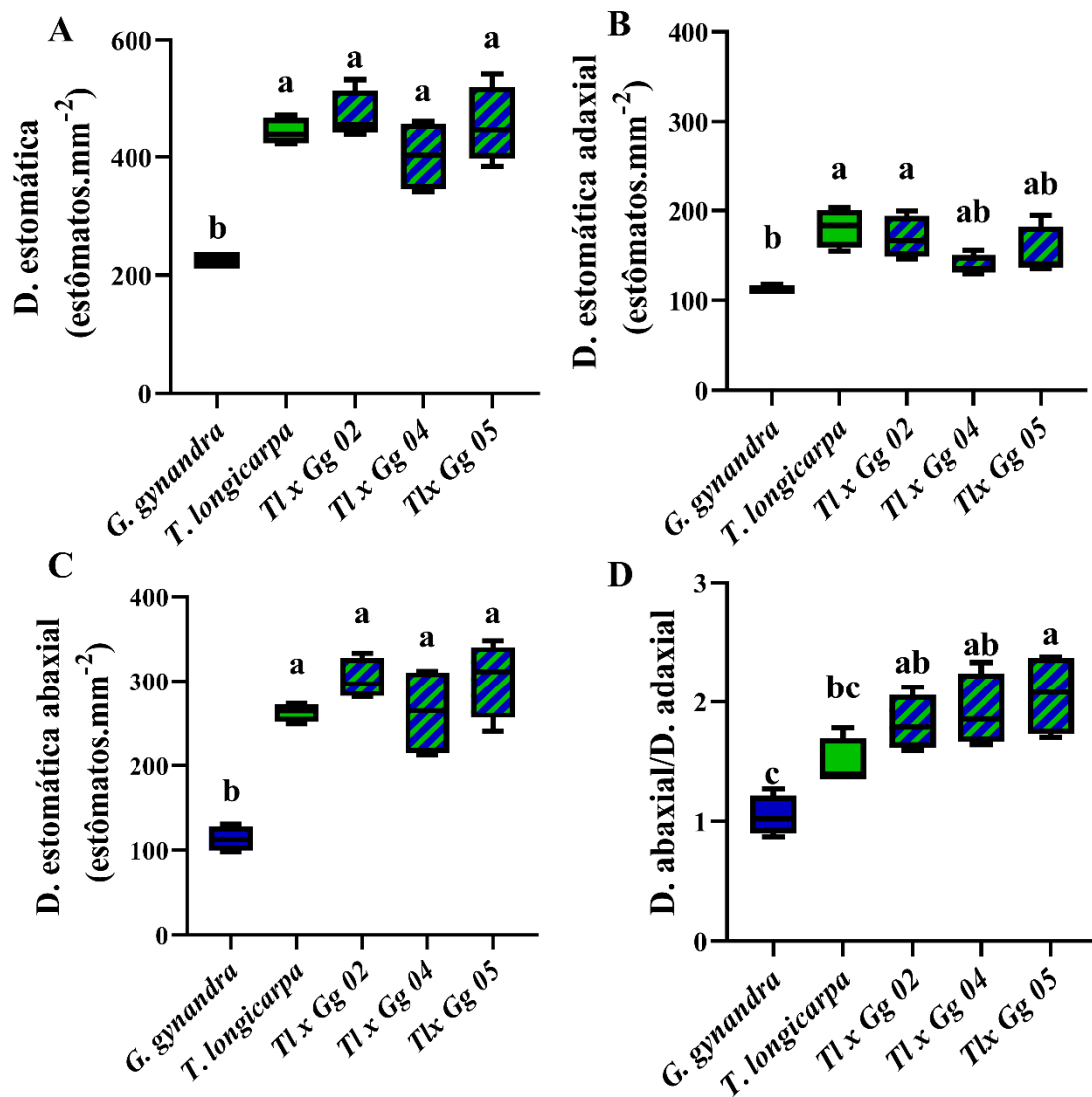


Figura 5. Parâmetros de densidade estomática para as espécies *G. gynandra* (C₄), *T. longicarpa* (C₃) e híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04*, *TlxGg05*). **(A)** Densidade estomática, **(B)** Densidade estomática adaxial, **(C)** Densidade estomática abaxial, **(D)** Razão entre densidade estomática abaxial e adaxial. Dispersão de caixas seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=4$).

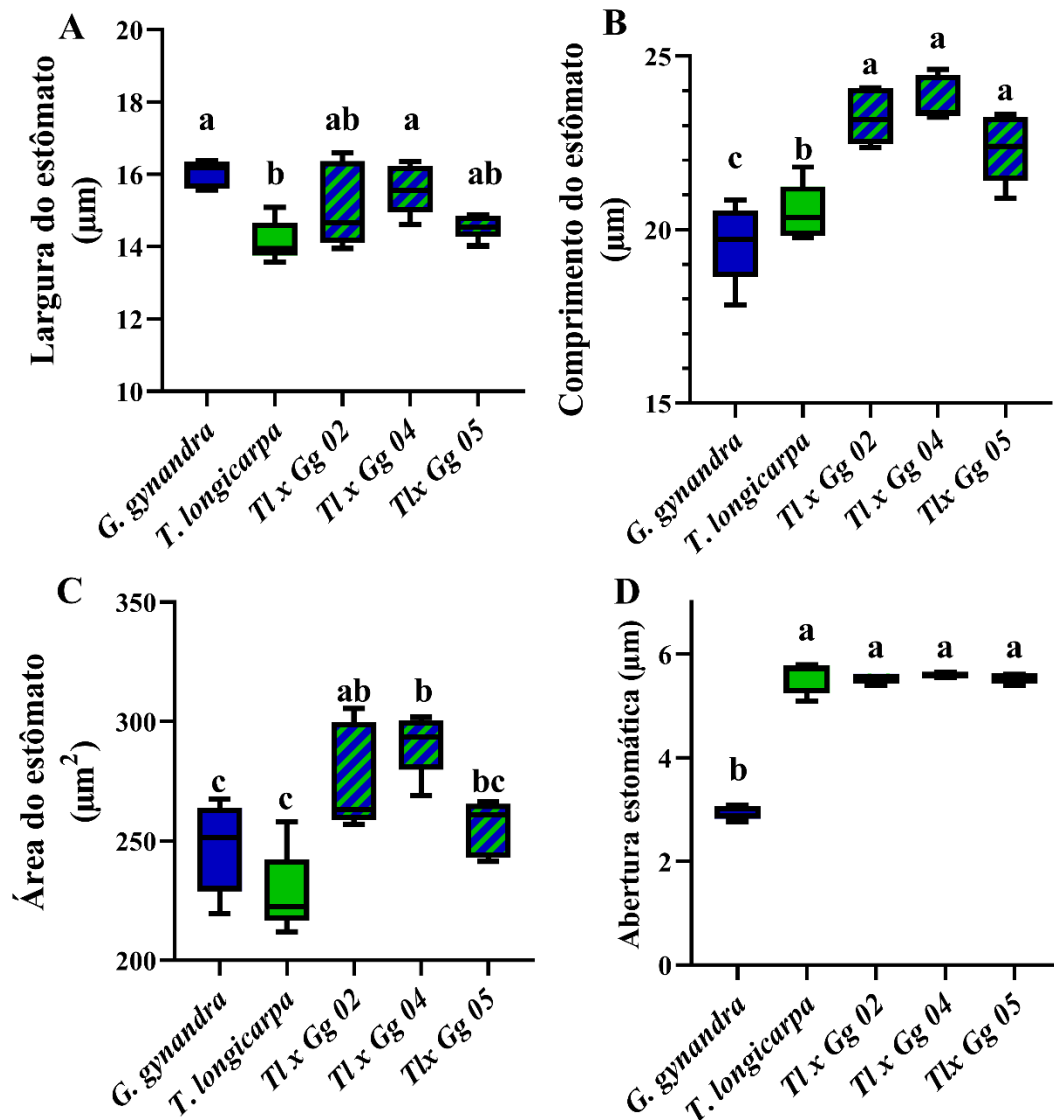


Figura 6. Parâmetros morfométricos associados aos estômatos para as espécies *G. gynandra* *T. longicarpa* e híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05*). (A) Largura, (B) comprimento, (C) área dos estômatos, (D) abertura estomática. Dispersão de caixas seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=4$).

De forma semelhante à *gs* e aberturas estomáticas (Figuras 1B e 6D), *T. longicarpa* e os três híbridos interespecíficos exibiram maiores densidades estomáticas em relação à *G. gynandra* (Figura 5A). Diferenças na densidade estomática entre *T. longicarpa* e híbridos F1 foram apenas detectadas na face adaxial da folha (Figura 5B), onde *TlxGg04* e *TlxGg05* exibiram menor densidade em comparação ao parental. Também foram observadas diferenças entre a razão da densidade estomática abaxial e adaxial (Figura 5D). Folhas de *G. gynandra* exibiram uma razão de 1,04 enquanto em *T. longicarpa* a razão foi significativamente superior, 1,48, indicando um maior número de estômatos na face abaxial (Figura 5C). De forma

interessante, folhas de plantas dos três híbridos interespecíficos registraram maior razão média, em torno de 1,9; significativamente superior aos valores relatados em ambos os parentais.

Para entender melhor a velocidade de resposta dos estômatos aos estímulos como ABA, luz e CO₂, investigou-se os parâmetros biométricos dos mesmos. As áreas estomáticas e o comprimento estomático dos híbridos interespecíficos aumentaram em relação aos dois parentais (Figuras 6B,C). Além disso houve aumento da largura dos estômatos nos híbridos interespecíficos em comparação à *T. longicarpa*, apresentando valores intermediários aos seus parentais (Figura 6A).

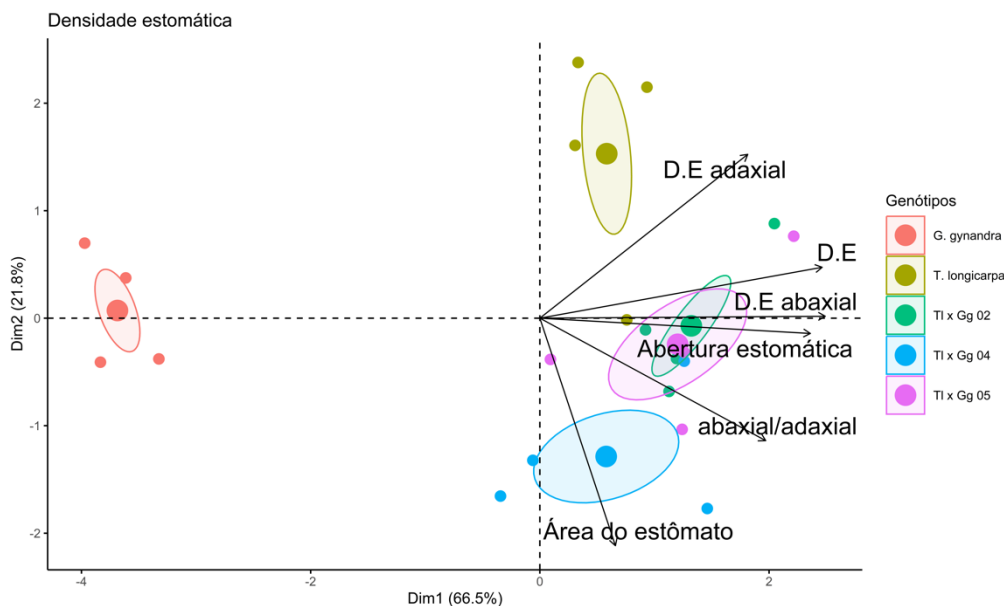


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) representando diferenças nas características relacionadas à densidade e desenvolvimento estomático para *G. gynandra* (C₄), *T. longicarpa* (C₃) e seus híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05*). Densidade estomática (D.E.). Quanto maior a distância entre a variável e a origem, melhor essa variável está representada em relação à dimensão 1 (primeiro componente principal) e à dimensão 2 (segundo componente principal). Variáveis negativamente correlacionadas são exibidas em lados opostos da origem.

Para verificar a contribuição das características relacionadas aos estômatos na diferenciação dos parentais e híbridos interespecíficos, foi feita uma análise multivariada pelo método dos componentes principais (Figura 7). Observou-se que *T. longicarpa* e híbridos interespecíficos se separaram de *G. gynandra* no PC1 e entre si no PC2. Os dois componentes principais explicaram 88,3% da variação total nos dados originais. O primeiro componente foi responsável por explicar 66,5% da variação total das amostras, e esteve mais influenciado pelas

variáveis densidade estomática abaxial e densidade estomática total. O segundo componente explicou 21,8% da variação, e as variáveis que mais contribuíram foram a área do complexo estomático e densidade estomática adaxial.

3.4 Comportamento estomático em resposta à transições na disponibilidade de luz

Visando melhorar nossa compreensão sobre como espécies com diferentes mecanismos concentradores de CO₂ e seus híbridos respondem a luz, analisou-se a resposta da *gs* durante as transições de claro para escuro e escuro para claro. Todos os genótipos responderam significativamente às mudanças de luz, embora o padrão de resposta tenha sido variável (Figura 8). Como esperado, a *gs* diminuiu após a transição de luz para escuro e aumentou após o retorno às condições de luz inicial. O tempo para atingir o estado estacionário no escuro e em condições de luz foi diferente entre os genótipos (Figuras 9C,D). Em folhas de *G. gynandra* observou-se menor tempo, cerca de 10 minutos para atingir estabilidade no escuro, enquanto para *T. longicarpa* e híbridos foram necessários aproximadamente 20 minutos.

Adicionalmente, evidenciou-se que as respostas dos híbridos interespecíficos foram diferentes comparados aos parentais, tanto para fechamento quanto para abertura dos estômatos (Figuras 9A-D). Em folhas de plantas de *T. longicarpa* e híbridos observou-se respostas estomáticas relativamente maiores durante o fechamento e abertura estomática em comparação à *G. gynandra* (Figura 8). Devido à menor *gs* de *G. gynandra* em relação a *T. longicarpa* e aos híbridos interespecíficos (Figura 9E), valores relativos foram aplicados para facilitar a interpretação dos resultados durante as transições de disponibilidade de luz (Figura 8).

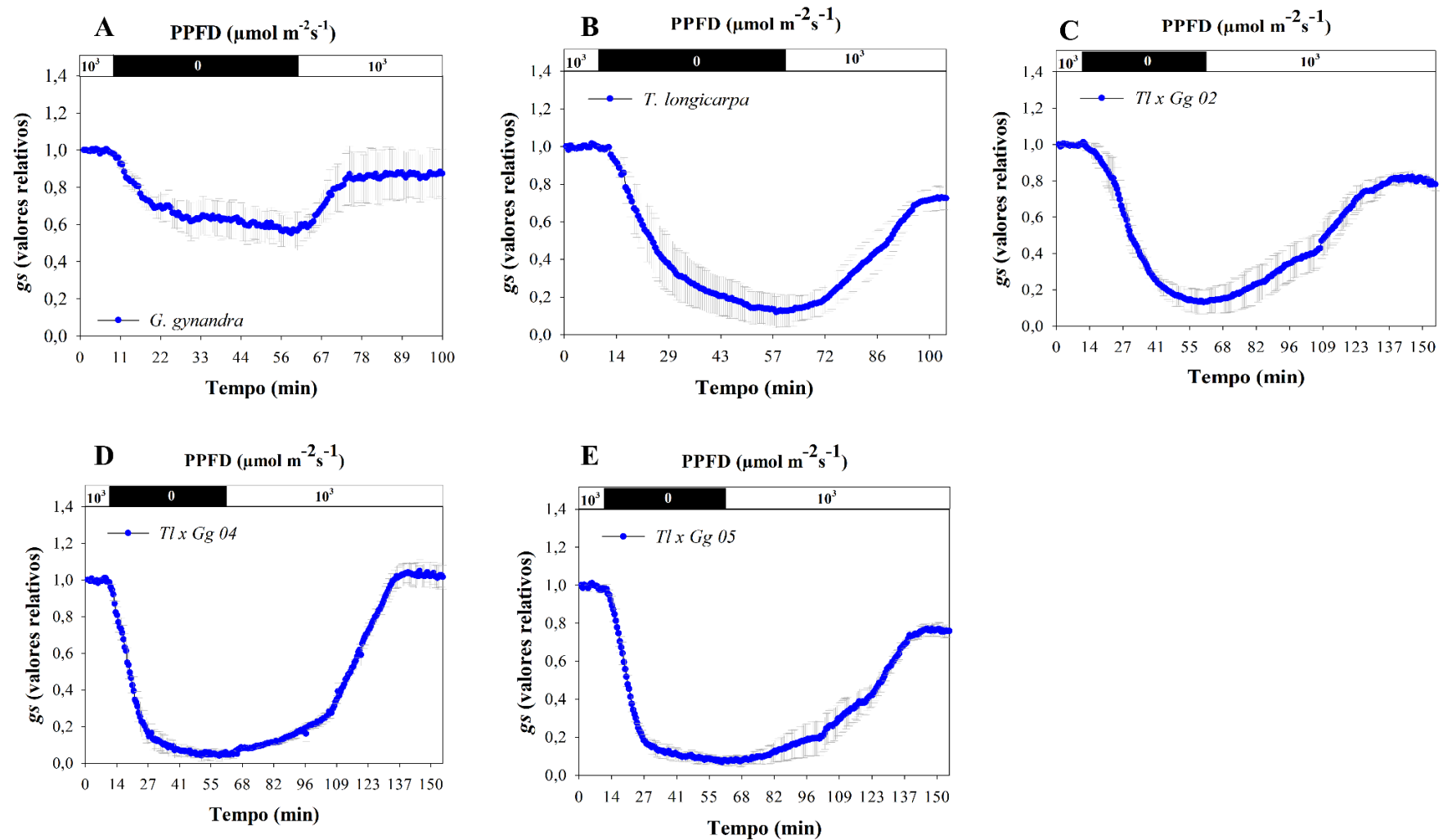


Figura 8. Comportamento estomático em resposta a variações na disponibilidade de luz para os genótipos (A) *G. gynandra*, (B) *T. longicarpa*, (C) *TlxGg02*, (D) *TlxGg04* e (E) *TlxGg05*. A condutância estomática (g_s) foi monitorada durante 100 minutos para os parentais e 150 minutos para os híbridos interespecíficos em intervalos de 30 segundos, os períodos de observação visavam garantir que o estado estável fosse alcançado após cada transição de luz. Os dados representam a média $\pm$ EP ($n = 4$).

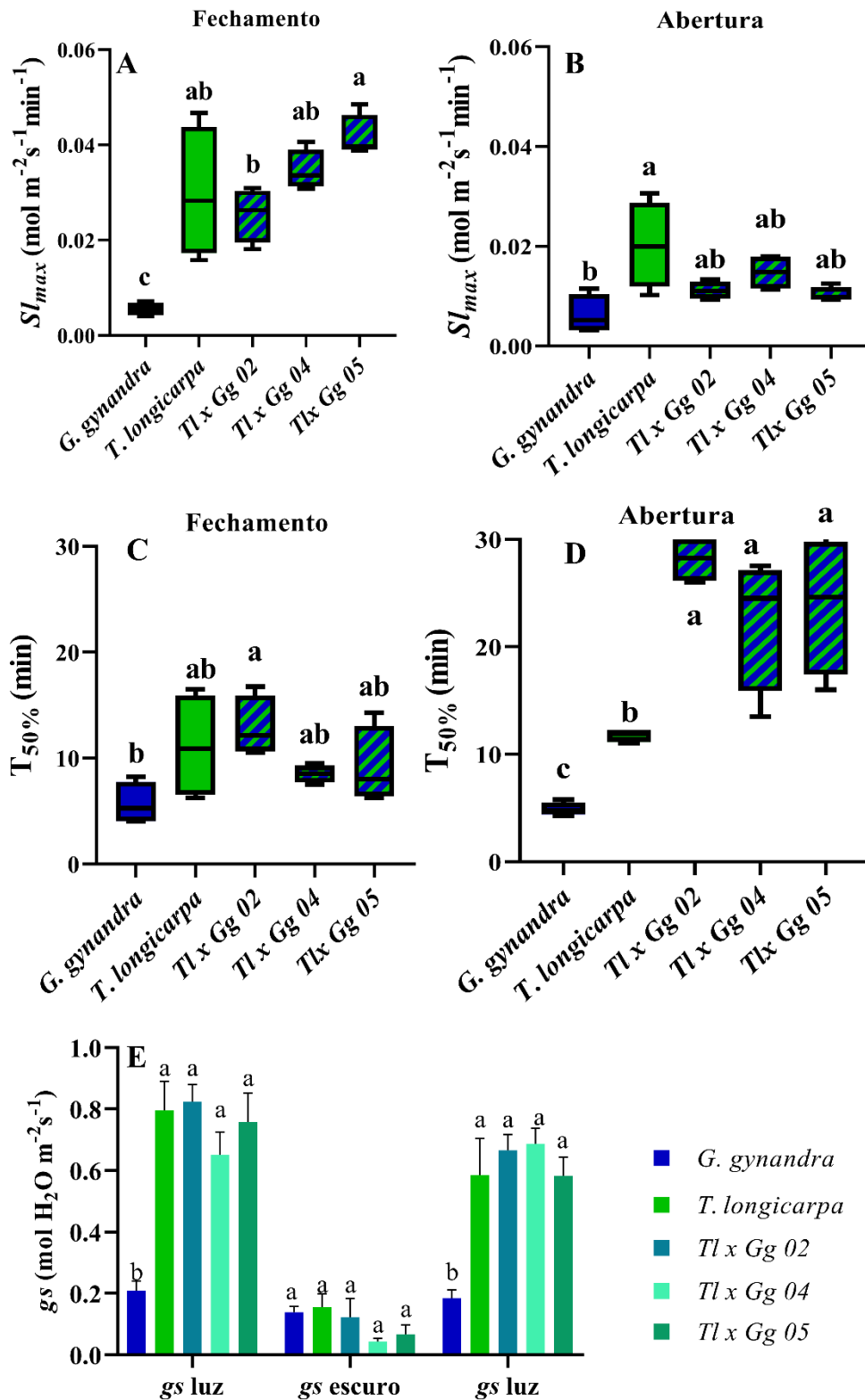


Figura 9. Velocidade das respostas estomáticas à luz. Inclinação máxima (SL_{max}) da resposta da condutância estomática (gs) às mudanças na disponibilidade de luz para fechamento (A) e abertura (B) dos estômatos em *G. gynandra*, *T. longicarpa* e seus híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05*). A (SL_{max}) do fechamento estomático foi obtida durante a transição de luz para escuro, enquanto a (SL_{max}) da abertura estomática foi obtida durante a transição de escuro para luz. Tempo necessário para

atingir metade do valor de g_s em um estado estável durante o fechamento (C) e abertura (D) dos estômatos. (E) Mudanças absolutas na g_s durante as transições luz/escuro/luz. A inclinação máxima (Sl_{max}), foi obtida a partir do coeficiente angular de uma equação de primeiro grau ajustada com coeficiente de determinação R^2 superior a 0,9. Dispersão de caixas seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=4$) e médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o mesmo teste.

3.5 Comportamento estomático em resposta à variações na concentração de CO₂

Entender como as plantas com diferentes mecanismos concentradores de CO₂ respondem a mudanças na concentração do mesmo pode revelar como elas se adaptam a flutuações nas condições do ambiente, como aquelas causadas por mudanças na luz, temperatura ou umidade. Estômatos que respondem rapidamente podem ajudar a planta a otimizar a fotossíntese enquanto minimizam a perda de água.

Como esperado, todos os genótipos avaliados apresentaram uma clara redução na g_s em resposta ao aumento de CO₂ de 400 para 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e um aumento após a redução de 800 para 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Figura 10). Entretanto, a alteração de de 400 para 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ gerou diferentes respostas, no qual os híbridos interespecíficos tipicamente apresentaram uma transição gradual e mais lenta entre o estado estacionário a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ em comparação à *T. longicarpa*. Adicionalmente, o tempo para atingir o estado estacionário após cada transição de concentração de CO₂ variou entre as espécies (Figura 11C,D). Assim, *TlxGg04* e *TlxGg05* mostraram um tempo mais longo para responder ao aumento na concentração de CO₂ em relação aos parentais (Figura 11C). De maneira antagonica, depois de *G. gynandra* foram os dois genótipos que apresentaram menor tempo de resposta após a redução da concentração de 800 para 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Figura 11D). O menor tempo de resposta dos mesmos esteve associado à menores variações na g_s .

Em adição, para melhor visualização das alterações no comportamento estomático, calculou-se a inclinação máxima (Sl_{max}) das respostas estomáticas à variações na concentração do CO₂ (Figuras 11A,B). Foi observada maior velocidade de fechamento em *T. longicarpa* em comparação aos demais genótipos (Figura 11A). Nenhuma diferença significativa entre os genótipos foi verificada na inclinação máxima (Sl_{max}) na transição de 800 para 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Figura 11B). Apesar da velocidade de resposta semelhante aos outros genótipos, o tempo necessário para que *G. gynandra* e *TlxGg05* atingissem novamente um estado estacionário foi menor (Figura 11D).

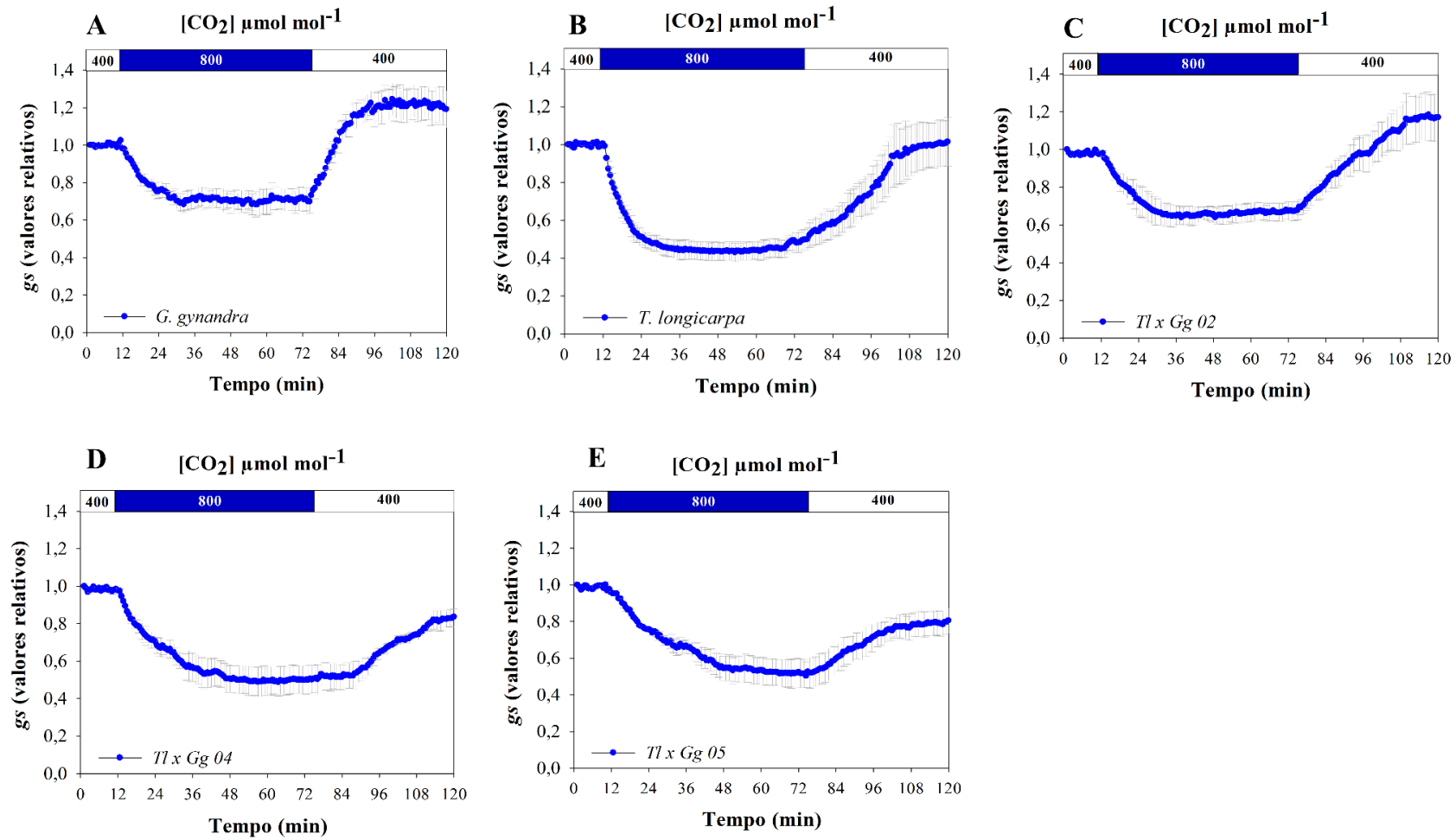


Figura 10. Comportamento estomático em resposta a variações na concentração de CO_2 de 400/800/400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para os genótipos (A) *G. gynandra*, (B) *T. longicarpa*, (C) *TlxGg02*, (D) *TlxGg04* e (E) *TlxGg05*. A condutância estomática (g_s) foi monitorada durante 120 minutos em intervalos de 30 segundos. Os dados representam a média $\pm$ EP ($n = 4$)

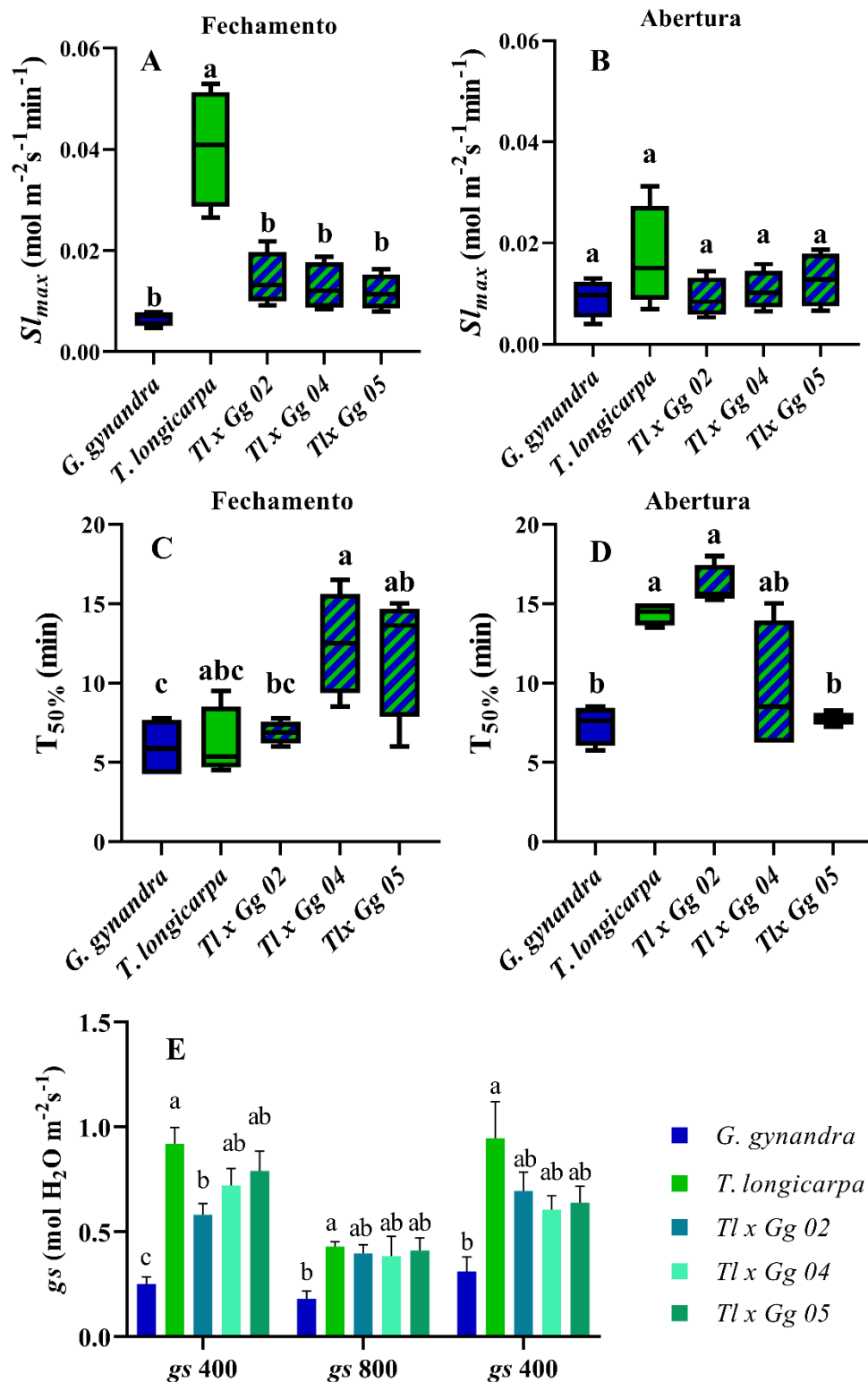


Figura 11. Velocidade das respostas estomáticas ao CO_2 . Inclinação máxima (SI_{max}) da resposta da condutância estomática (gs) às mudanças na concentração de CO_2 para fechamento (A) e abertura (B) dos estômatos em *G. gynandra*, *T. longicarpa* e seus híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05*). A (SI_{max}) do fechamento estomático foi obtida durante a transição de $400 \mu\text{mol. mol}^{-1}$ para $800 \mu\text{mol. mol}^{-1}$, enquanto a (SI_{max}) da abertura estomática foi obtida durante a transição de $800 \mu\text{mol. mol}^{-1}$ para $400 \mu\text{mol. mol}^{-1}$. Tempo necessário para atingir metade do valor de gs em um estado estável para fechamento (C) e abertura (D) dos estômatos. (E) Mudanças absolutas na gs durante as transições

400/800/400 $\mu\text{mol. mol}^{-1}$. A inclinação máxima (Sl_{max}), foi obtida a partir do coeficiente angular de uma equação de primeiro grau ajustada com coeficiente de determinação R^2 superior a 0,9. Dispersão de caixas seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=4$) e médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o mesmo teste.

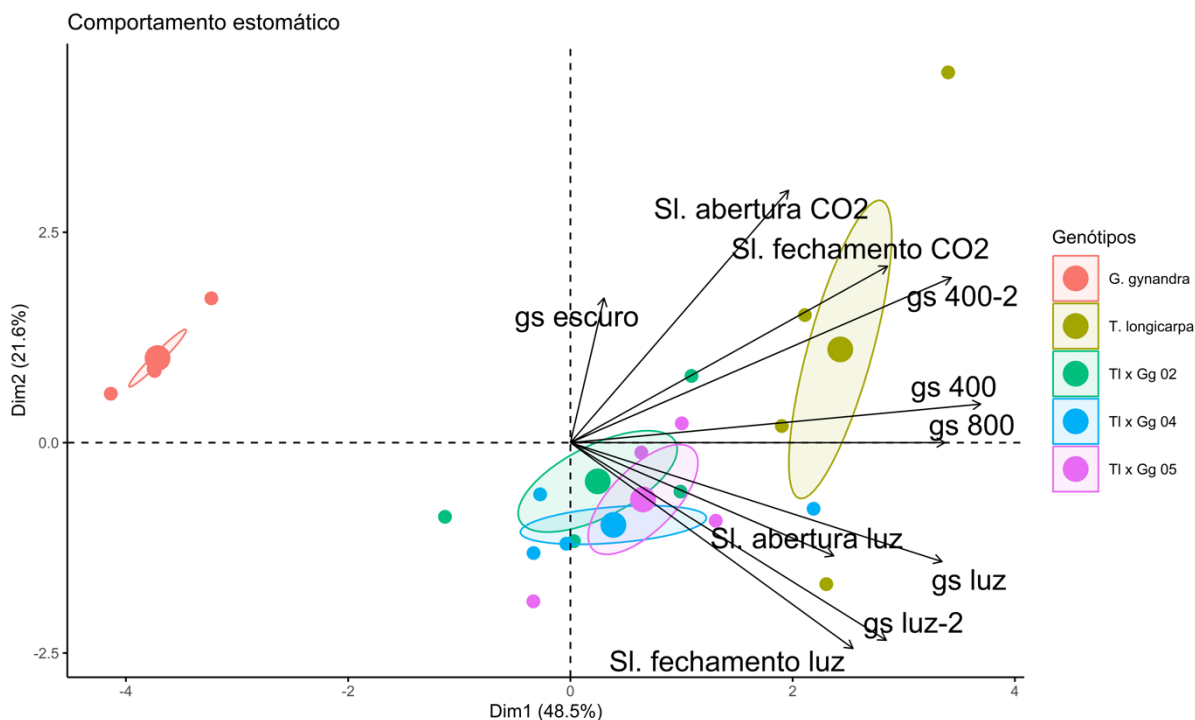


Figura 12. Análise de componentes principais (PCA) para *G. gynandra* (C_4), *T. longicarpa* (C_3) e seus híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05*). Representação das diferenças nas velocidades das respostas estomáticas: inclinação máxima (Sl_{max}) da resposta da gs às mudanças na concentração de CO_2 e disponibilidade de luz e valores de gs em um estado estável. Quanto maior a distância entre a variável e a origem, melhor essa variável está representada em relação à dimensão 1 (primeiro componente principal) e à dimensão 2 (segundo componente principal). Variáveis negativamente correlacionadas são exibidas em lados opostos da origem.

Para verificar as diferenças relacionadas às respostas do comportamento dos estômatos em relação ao CO_2 e à luz nos parentais e híbridos interespecíficos, foi realizado outro PCA. *T. longicarpa* e híbridos interespecíficos se separaram de *G. gynandra* no PC1 e se separaram entre si no PC2. Os dois componentes principais, que explicaram 70,1% da variação total nos dados originais. O primeiro componente foi responsável por explicar 48,5% da variação total das amostras, e esteve mais influenciado pela gs a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, antes e após a elevação para 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. O segundo componente explicou 21,6% da variação, e as variáveis que mais contribuíram foram o Sl_{max} de abertura em resposta CO_2 e Sl_{max} de fechamento em resposta ao escuro.

4. DISCUSSÃO

4.1. Eficiência de uso da água em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos

A EUA há muito tempo tem sido reconhecida como uma característica importante para a melhoria das culturas. Portanto, EUA é alvo dos programas de melhoramento vegetal porque descreve quanta produtividade pode ser alcançada por quantidade de água usada pela cultura (Ferguson *et al.*, 2024). Embora a via C₄ esteja presente em apenas 3% das espécies de angiospermas, ela contribui com aproximadamente 25% da produção primária de biomassa na Terra (Sedelnikova *et al.*, 2018). As plantas que apresentam o mecanismo fotossintético C₄ são geralmente mais resilientes a condições de estresse do que as plantas C₃, e seus estômatos são regulados de forma a manter uma baixa perda de água e uma consequente baixa concentração de CO₂ na folha (Silva-Alvim *et al.*, 2023). Assim, estudar e entender como espécies de plantas C₄ otimizam EUA em relação as plantas C₃ se faz importante no contexto das mudanças climáticas a nível global, devido a previsões de maior frequência de eventos de seca nas áreas agricultáveis (Terán *et al.*, 2024).

Estudos recentes sugerem que os estômatos podem desempenhar um papel importante na evolução da fotossíntese C₄ (Taylor *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2022). No entanto, a relação entre as características associadas aos estômatos e a EUA ao longo da evolução do mecanismo C₃ para C₄ permanece pouco conhecida (Way, 2012). Apesar das taxas de perda de água serem semelhantes entre os genótipos estudados (Figura suplementar 1), a perda de peso fresco em folhas destacadas pode não refletir a situação na planta, pois há perda da conexão com o sistema radicular, perda da sinalização hormonal e alterações na pressão de turgor das mesmas (Medeiros *et al.*, 2016). Além disso, folhas de *G. gynandra* e híbridos interespecíficos evidenciaram maior espessura em comparação à *T. longicarpa* (Figura suplementar 3A). Além disso, verifica-se que a espessura da epiderme de *G. gynandra* é aproximadamente 2 vezes maior do que a observada nos outros genótipos avaliados (Figura suplementar 3B). Assim, hipotetiza-se que essas características podem ter contribuído para uma maior resistência à perda de água na folha e maior EUA observados nos genótipos *TlxGg 04* e *TlxGg 05* (Figura suplementar 1).

As medidas instantâneas dos parâmetros fisiológicos apresentaram valores similares aos já relatados para espécies de Cleomaceae (Gomes 2021; Parma, *et al.* 2022; Bernardo *et al.*, 2023; Silva-Alvim *et al.*, 2023). Os resultados indicam que *G. gynandra* é capaz de manter altas taxas fotossintéticas mesmo sob baixa *gs*. Esses resultados reforçam as conclusões de trabalhos

prévios sugerindo que de forma geral espécies C_4 alcançam alta assimilação de carbono com menor g_s em relação aos seus correspondentes C_3 (Israel *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022). Uma vez que espécies C_4 mantêm taxas fotossintéticas elevadas mesmo com baixa g_s em comparação aos seus similares C_3 , a fotossíntese C_4 permite maior EUA (Way *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2022). É importante destacar que, neste estudo, EUA permitiu clara diferenciação de *G. gynandra* dos outros genótipos (Figura 2). Conforme observado em estudos prévios (Gomes, 2021) os híbridos interespecíficos estudados exibem respostas similares ao parental C_3 , *T. longicarpa*, para a maioria dos parâmetros analisados, à exceção da g_s que foi ligeiramente menor em *TlxGg 04* e *TlxGg 05* (Figura 1B). Entretanto, nenhuma diferença foi verificada em relação à EUA (Figuras 1E,F). Apesar das alterações anatômicas observadas nos híbridos interespecíficos, indicando o possível estabelecimento de uma anatomia proto-Kranz (Gomes 2021), ainda não existem modificações bioquímicas capazes de levar a um ciclo C_4 funcional nos mesmos, o que explica a iEUA semelhante à *T. longicarpa*. Apenas intermediários C_4 -Like apresentam iEUA semelhante à uma planta C_4 (Vogan e Sage, 2011).

4.2 Características anatômicas dos estômatos em espécies de Cleomaceae e híbridos interespecíficos

É consensualmente aceito que a g_s pode ser diretamente relacionada à densidade estomática (DE) e inversamente correlacionada ao tamanho dos estômatos (Franks e Beerling, 2009). De fato, a menor g_s de *G. gynanadra* esteve associada a uma menor DE e abertura do poro estomático (Figuras 5A, 6D). Da mesma forma as maiores condutâncias em *T. longicarpa* e híbridos interespecíficos estiveram relacionadas à maiores DE e aberturas estomáticas (Figuras 5A, 6D). As características anatômicas dos estômatos (densidade e dimensões dos poros) e sua distribuição na superfície foliar influenciam a g_s operacional (Fanourakis *et al.*, 2015).

Apesar das diferenças na morfometria dos estômatos na geração F1 de híbridos interespecíficos e parentais da família Cleomaceae, associar características anatômicas dos estômatos à EUA é potencialmente desafiador porque tais diferenças podem não estar diretamente associadas à abertura do poro estomático. A contribuição das duas características parece variar entre espécies e até mesmo entre genótipos da mesma espécie, ou distintas condições ambientais. Essa variação na g_s é o resultado de interações complexas entre DE, tamanho do complexo estomático e abertura estomática (Franks e Beerling, 2009), que são altamente influenciadas por condições ambientais (Hiyama *et al.*, 2017).

A $g_{s_{\max}}$, calculada com base no tamanho dos estômatos, pode ser um indicador fraco da g_s operacional (estimado com base nas dimensões dos poros). Fanourakis *et al.*, 2015 observaram que estômatos do mesmo tamanho frequentemente apresentaram diferenças de 3 a 4 vezes na área dos poros. De forma semelhante, apesar das diferenças aqui observadas nas dimensões dos estômatos, elas não se mantiveram em relação à largura do poro estomático.

A anatomia estomática também se diferencia ao longo da transição de C_3 para C_4 , com espécies C_4 apresentando $g_{s_{\max}}$ mais baixa (devido à menor densidade estomática ou tamanho menor dos estômatos) do que seus parentes C_3 (Taylor *et al.*, 2012; Way *et al.*, 2014). Em estudos anteriores, menores DE estiveram acompanhadas de aumentos no tamanho do complexo estomático em diferentes espécies (Li *et al.*, 2021; Franks *et al.* 2015). No presente estudo não foram evidenciadas diferenças no tamanho do complexo estomático entre *G. gynandra* e *T. longicarpa* (Figura 6C). Apesar de plantas C_4 frequentemente apresentarem estômatos menores (Way, 2012), tal característica pode estar associada a outros fatores, como tamanho do genoma nuclear e nível de ploidia das células (Simonin e Roddy, 2018). *G. gynandra* é uma espécie diploide (Omondi *et al.*, 2017) e *T. longicarpa* uma espécie tetraploide (Inda *et al.*, 2008). Mesmo que houvesse diferenças muito pronunciadas, elas poderiam estar associadas à ploidia e não necessariamente ao mecanismo fotossintético das espécies.

A variação nas características anatômicas dos estômatos ou na regulação da largura dos poros estomáticos influencia as trocas gasosas de diversas maneiras e pode ser influenciada tanto por fatores genéticos quanto por condições de crescimento (Fanourakis *et al.*, 2015). Além disso, elas podem estar associadas à velocidade de resposta dos estômatos a flutuações ambientais (Drake *et al.*, 2013).

A relação entre a g_s e as características anatômicas dos estômatos, como densidade estomática (DE) e abertura dos poros, é complexa e multifacetada. Para as espécies de Cleomaceae aqui estudadas, essas duas características explicam as diferenças observadas na $iEUA$. O maior número e a maior abertura dos estômatos ao permitirem maior influxo de CO_2 , permitem em *T. longicarpa* e híbridos taxas fotossintéticas semelhantes à *G. gynandra*, contudo, é necessário que haja grande perda de vapor de água para que isso ocorra, levando à menor $iEUA$ nas mesmas.

4.3 *G. gynandra* mantém variações menores e mais rápidas na condutância estomática

Comparações de respostas estomáticas entre espécies C_4 e C_3 podem ser demasiadamente complexas, pois a distância filogenética entre as espécies pode levar a interpretações errôneas dos resultados, não necessariamente associadas ao mecanismo fotossintético associado a espécie (Taylor *et al.*, 2012; Bernardo *et al.*, 2023). Assim, poucos estudos foram dedicados a compreender as respostas diferenciais do comportamento estomático em espécies relacionadas C_3 e C_4 . Alguns desses estudos sugerem que os estômatos de plantas C_4 abrem e fecham mais rapidamente do que as espécies C_3 em resposta à disponibilidade e qualidade da luz (Zhen e Bugbee, 2020; Israel *et al.*, 2022; Bernardo *et al.*, 2023; Silva-Alvim *et al.*, 2023). Adicionalmente, devido à complexa interação entre g_s e fotossíntese nas plantas de espécies com metabolismo fotossintético C_3 e C_4 , acredita-se na existência de uma regulação estomática diferencial para otimizar a capacidade fotossintética e a EUA entre essas espécies. No entanto, pouco se sabe sobre as sensibilidades estomáticas de espécies com diferentes mecanismos fotossintéticos a variações na disponibilidade de luz e CO_2 .

Os estômatos dos híbridos interespecíficos responderam mais lentamente do que *T. longicarpa* em resposta ao CO_2 (Figuras 11A-D). Tais diferenças são evidenciadas pelos menores valores de Sl_{max} nas transições de 400 para 800 $\mu mol\ mol^{-1}$ e pelo maior tempo necessário para retornar ao estado estacionário de g_s (Figuras 11A,D). Isso indica que os estômatos dos genótipos híbridos apresentam uma menor sensibilidade para responder as transições nas concentrações de CO_2 . Apesar dos valores de Sl_{max} dos híbridos serem similares aos de *G. gyanadra*, os baixos valores de Sl_{max} da espécie estão associados à sua menor g_s . Interessantemente, apesar de responderem mais lentamente ao aumento na concentração de CO_2 , os híbridos *TlxGg04* e *TlxGg05* foram os mais responsivos à transição claro/escuro e seus estômatos se fecharam completamente (Figura 9E). Esta velocidade de resposta é uma característica positiva por permitir maior conservação de água.

O menor tamanho das células-guarda aumenta a relação entre a área de superfície da membrana e o volume das células-guarda (Franks e Farquhar, 2007) permitindo assim movimentos estomáticos mais rápidos. Estômatos menores, devido a sua maior razão de superfície de membrana para volume, podem ter menores tempos de resposta em comparação a estômatos maiores. Em combinação com alta densidade estomática, esse mecanismo pode permitir que a folha atinja rapidamente uma alta g_s em condições favoráveis e reduza a condutância rapidamente quando as condições são desfavoráveis (Drake *et al.*, 2013).

As respostas da g_s durante o fechamento estomático em resposta à ausência de luz foram mais rápidas do que as aberturas em todos os genótipos, à exceção de *G. gynandra* onde não

houve clara diferença entre elas (Figuras 11A,B). O fechamento quase completo dos estômatos dos híbridos interespecíficos pode indicar que eles priorizaram a conservação da água em detrimento da maximização da captação de carbono, ao contrário do que ocorreu nos dois parentais (Figura 9E). Nota-se que estômatos de espécies C₄ como *G. gynandra* apresentam pouca variação em *g_s*. Da mesma forma, verifica-se que gramíneas C₄ operam com uma *g_s* muito menor em relação à *g_s* máxima do que as gramíneas C₃ (Israel *et al.* (2022). A menor DE e abertura dos estômatos pode ser um dos fatores que explicam os menores valores de *S_{lmax}* em *G. gynandra* (Figuras 9A,B 11A,B). Entretanto, essas características não são suficientes para explicar o comportamento estomático diferencial observado entre *T. longicarpa* e os híbridos interespecíficos pois apesar de apresentarem mesma densidade e abertura estomática, a velocidade de fechamento e abertura dos estômatos se diferencia entre os mesmos tanto em resposta ao CO₂, quanto ao ABA e à luz (Figuras 4,9 e 11).

Bernardo *et al.*, 2023 observaram em dicotiledôneas C₄ dos gêneros *Flaveria* e *Alloteropsis* e da família *Cleomaceae* que a abertura estomática é menos influenciada por variações na proporção luz azul/vermelha quando comparadas a espécies próximas com mecanismo fotossintético C₃. Aubry *et al.*, 2016 ao analisar o transcriptoma das células-guarda de *G. gynandra* (C₄) e *T. hassleriana* (C₃), ambas da família *Cleomaceae*, observou menor abundância de transcritos para fototropinas PHOT1 e PHOT2 nas células-guarda da primeira. Isto poderia explicar a menor sensibilidade da *g_s* a variações na qualidade da luz nas plantas C₄ (Bernardo *et al.*, 2023). Conforme Bernardo *et al.*, 2023, a resposta estomática à luz azul pode contribuir para a termorregulação das folhas das espécies dicotiledôneas C₃ e assim manter e reduzir as taxas de fotorrespiração mais baixa. Assim, na falta de resposta estomática à luz azul, como visto nas dicotiledôneas C₄, esse mecanismo poderia elevar a temperatura das folhas e, assim, estimular a taxa de assimilação de CO₂.

Apesar de as relações entre a dinâmica estomática, luz, CO₂ e ABA não serem adequadamente explicadas pela anatomia e densidade estomática, e os resultados aqui apresentados não poderem, por si só, explicar o comportamento estomático diferencial entre plantas com diferentes mecanismos concentradores de CO₂ dentro da família *Cleomaceae*, eles fornecem novos *insights* para entender as respostas estomáticas entre plantas C₃ e C₄. Adicionalmente, o presente estudo evidencia a importância de se considerar as características dos estômatos no desenvolvimento de novas culturas com fotossíntese C₄ porque pouca consideração foi dada a necessidade de combinar a assimilação de carbono com a

responsividade dos estômatos à fatores ambientais (McAusland *et al.*, 2016; Schlüter & Weber, 2020).

4.4 Condutância estomática e sensibilidade ao ABA em espécies da família Cleomaceae

O fechamento estomático induzido pelo ABA envolve mecanismos de sinalização dependentes e independentes de Ca^{2+} (Uzilday *et al.*, 2024). Uma compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares subjacentes ao fechamento estomático dependente do ABA pode abrir novas estratégias para o cultivo de plantas com melhor tolerância à seca (Huang *et al.* 2019; Pridgeon *et al.*, 2021). No presente estudo, os cinco genótipos estudados apresentaram diferenças nas respostas à aplicação exógena de ABA, tanto nas taxas de perda de água em folhas destacadas (Figura 3), quanto na abertura e condutância estomática (Figura 4). De maneira geral, a espécie C_3 exibiu maior responsividade ao ABA em comparação com a espécie C_4 e os híbridos. É importante destacar a possível existência de diferenças metabólicas, anatômicas e na atividade de transportadores e canais nas células-guarda que podem influenciar tais respostas, não estando unicamente associadas ao hormônio.

Devido ao tamanho variável dos estômatos e a resposta dinâmica limitada dos estômatos em epidermes isoladas, a avaliação do efeito do ABA na abertura estomática pode ser desafiadora e, em alguns casos, pode levar a resultados inconsistentes (Ceciliato *et al.*, 2019). Apenas uma pequena área da folha é avaliada usando imagens microscópicas e, além disso, sinais potenciais do mesofilo estão ausentes ao usar fragmentos epidérmicos para avaliar as respostas de abertura estomática (Ceciliato *et al.*, 2019). Dessa forma, no presente estudo, optou-se por avaliar a influência do ABA tanto na abertura estomática, quanto na g_s .

Os estômatos se fecham rapidamente após a aplicação de ABA extracelular (Huang *et al.* 2019). Os resultados obtidos se complementam ao notarmos menor redução da abertura estomática em *G. gynandra* e menor redução da g_s nas folhas destacadas (Figura 4). Apesar da resposta da abertura estomática semelhante entre *T. longicarpa* e híbridos F1, a velocidade de resposta da g_s no parental C_3 foi mais rápida (Figura suplementar 1). O rápido fechamento estomático em resposta à aplicação de ABA manifestado nas folhas destacadas (Figuras 4B-F) pode ser devido ao seu efeito já nos tecidos vasculares da folha. Pantin *et al.*, 2013 propuseram que o ABA promove o fechamento estomático atuando tanto nas células-guarda quanto nos tecidos vasculares. A sinalização desencadeada pelo ABA se propaga para os estômatos alterando a regulação hidráulica na folha a montante deles. Sob estresse hídrico do solo ou atmosférico, a concentração de ABA aumenta no parênquima vascular já que o ABA é

importado das raízes ou sintetizado localmente nas folhas (Tran *et al.*, 2007). Assim, a resposta diferencial dos genótipos ao ABA deve ser explorada de maneira abrangente, dado que os níveis endógenos do hormônio podem ser diferentes entre os genótipos avaliados, portanto é importante que haja sua quantificação, assim como a avaliação da expressão de genes de biossíntese e resposta poderiam contribuir para entender melhor essas respostas.

4. CONCLUSÕES

Em síntese, este estudo analisou características associadas aos estômatos em espécies C₃, C₄ e híbridos interespecíficos de Cleomaceae. *G. gynandra*, a espécie C₄, apresentou menor densidade e abertura estomática, refletindo-se em menor *gs* na mesma. A alta assimilação líquida de CO₂, acompanhada por uma baixa *gs* explica a alta iEUA da espécie. Os híbridos apresentaram características anatômicas foliares distintas, assim como interação diferencial com o CO₂, luz e ABA em relação aos seus parentais.

Em termos de trocas gasosas, os híbridos exibiram características similares ao parental *T. longicarpa*, que apresenta fotossíntese C₃. Esses resultados destacam a importância de avaliar características anatômicas e estomáticas para compreender a regulação da EUA em espécies de Cleomaceae. Adicionalmente, observou-se diferenças no comportamento estomático dos parentais e híbridos. Em plantas de *G. gynandra* verificou-se que a *gs* é menos sensível a alterações nos níveis de CO₂ e ABA, assim como em respostas a luz. Estudos futuros são ainda necessários e devem verificar a expressão de genes relacionados a regulação da abertura e fechamento estomatos, como os relacionados ao transporte de ácidos orgânicos (*ALMT6* e *QUAC1*), transporte de íons (*SLAC1* e *GORK*). Além disso, genes envolvidos na regulação de fitohormônios, como o ABA, também devem ser investigados, uma vez que desempenham um papel crucial na resposta das plantas à escassez de água.

Também é importante investigar em detalhes o metabolismo das células mesofílicas, células da bainha do feixe vascular e células-guarda. Tal conhecimento pode fornecer informações sobre as adaptações fisiológicas e bioquímicas relacionadas a regulação das respostas estomáticas. Compreender essas características metabólicas pode ajudar a identificar os mecanismos que conferem melhores respostas estomáticas à *G. gynandra*. A resposta diferencial dos híbridos interespecíficos em comparação aos parentais no que se refere à resposta da *gs* a variações na luz e concentração de CO₂ também deve ser explorada em experimentos futuros. Tomados em conjunto, esses resultados fornecem informações importantes sobre os mecanismos fisiológicos e anatômicos que contribuem para a EUA em espécies de Cleomaceae e podem ser úteis para o entendimento da EUA em plantas com diferentes mecanismos concentradores de CO₂.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ankit, A., Kamali, S. e Singh, A. (2022). Genomic & structural diversity and functional role of potassium (K^+) transport proteins in plants. *International journal of biological macromolecules*, 208, p. 844–857. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.179.

Araújo, W. L. et al. (2011). Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. *The plant cell*, 23(2), p. 600–627. doi: 10.1105/tpc.110.081224.

Aubry, S. et al. (2016). A specific transcriptome signature for guard cells from the C_4 plant *Gynandropsis gynandra*. *Plant physiology*, 170(3), p. 1345–1357. doi: 10.1104/pp.15.01203.

Bauwe, H. (2010). Chapter 6 Photorespiration: The Bridge to C_4 Photosynthesis. In: Raghavendra, A., Sage, R. (eds) C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 32. *Springer*, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9407-0_6

Bathellier, C. et al. (2018). Rubisco is not really so bad: Rubisco efficiency. *Plant, cell & environment*, 41(4), p. 705–716. doi: 10.1111/pce.13149.

Bayat, S. et al. (2018). Lessons from Cleomaceae, the sister of crucifers. *Trends in plant science*, 23(9), p. 808–821. doi: 10.1016/j.tplants.2018.06.010.

Bernardo, E. L. et al. (2023). A comparison of stomatal conductance responses to blue and red light between C_3 and C_4 photosynthetic species in three phylogenetically controlled experiments. *Frontiers in plant science*, 14, p. 1253976. doi: 10.3389/fpls.2023.1253976.

Bertolino, L. T., Caine, R. S. e Gray, J. E. (2019). Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. *Frontiers in plant science*, 10, p. 225. doi: 10.3389/fpls.2019.00225.

Busch, F. A. (2020). Photorespiration in the context of Rubisco biochemistry, CO_2 diffusion and metabolism. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 101(4), p. 919–939. doi: 10.1111/tpj.14674.

von Caemmerer, S. (2020). Rubisco carboxylase/oxygenase: From the enzyme to the globe: A gas exchange perspective. *Journal of plant physiology*, 252(153240), p. 153240. doi: 10.1016/j.jplph.2020.153240.

von Caemmerer, S., Ghannoum, O. e Furbank, R. T. (2017). C₄ photosynthesis: 50 years of discovery and innovation. *Journal of experimental botany*, 68(2), p. 97–102. doi: 10.1093/jxb/erw491.

Cândido-Sobrinho, S. A. et al. (2022). Metabolism-mediated mechanisms underpin the differential stomatal speediness regulation among ferns and angiosperms. *Plant, cell & environment*, 45(2), p. 296–311. doi: 10.1111/pce.14232.

Ceciliato, P. H. O. et al. (2019). Intact leaf gas exchange provides a robust method for measuring the kinetics of stomatal conductance responses to abscisic acid and other small molecules in Arabidopsis and grasses. *Plant methods*, 15(1). doi: 10.1186/s13007-019-0423-y.

Cruz, J. A. e Avenso, T. J. (2021). Photosynthesis: a multiscopic view. *Journal of plant research*, 134(4), p. 665–682. doi: 10.1007/s10265-021-01321-4.

Daloso, D. M. et al. (2015). Tobacco guard cells fix CO₂ by both Rubisco and PEPcase while sucrose acts as a substrate during light-induced stomatal opening: Isotope labelling kinetics in guard cells. *Plant, cell & environment*, 38(11), p. 2353–2371. doi: 10.1111/pce.12555.

DaMatta, F. M. et al. (2016). Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of experimental botany*, 67(1), p. 341–352. doi: 10.1093/jxb/erv463.

Drake, P. L., Froend, R. H. e Franks, P. J. (2013). Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of experimental botany*, 64(2), p. 495–505. doi: 10.1093/jxb/ers347.

Duarte, K. E. et al. (2019). Identification and characterization of core abscisic acid (ABA) signaling components and their gene expression profile in response to abiotic stresses in *Setaria viridis*. *Scientific reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-40623-5.

Fanourakis, D. *et al.* (2015). Pore size regulates operating stomatal conductance, while stomatal densities drive the partitioning of conductance between leaf sides. *Annals of botany*, 115(4), p. 555–565. doi: 10.1093/aob/mcu247.

Ferguson, J. N. *et al.* (2024) “Reducing stomatal density by expression of a synthetic Epidermal Patterning Factor increases leaf intrinsic water use efficiency and reduces plant water use in a C4 crop”, *Journal of experimental botany*. doi: 10.1093/jxb/erae289.

Franks, P. J. *et al.* (2015). Increasing water use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, 207, p. 188–195.

Franks, P. J. e Beerling, D. J. (2009). Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), p. 10343–10347. doi: 10.1073/pnas.0904209106.

Gomes, Priscilla Falchetto. Introdução de características do mecanismo fotossintético C4 em espécies C3 da família Cleomaceae. 2021. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2021

Gowik, U. e Westhoff, P. (2011). The path from C₃ to C₄ photosynthesis. *Plant physiology*, 155(1), p. 56–63. doi: 10.1104/pp.110.165308.

Hiyamaet, A. *et al.* (2017). Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. *Nature communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01237-5.

Huang, S. *et al.* (2019). Calcium signals in guard cells enhance the efficiency by which abscisic acid triggers stomatal closure. *The new phytologist*, 224(1), p. 177–187. doi: 10.1111/nph.15985.

Hunt, L. e Gray, J. E. (2009). The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Current biology: CB*, 19(10), p. 864–869. doi: 10.1016/j.cub.2009.03.069.

Inda, Luis A. *et al.* (2008). “Phylogeny of Cleome L. and Its Close Relatives Podandrogynae Ducke and Polanisia Raf. (Cleomoideae, Cleomaceae) Based on Analysis of Nuclear ITS Sequences and Morphology”. *Plant Systematics and Evolution* 274 (1–2): 111–26. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0026-y>.

Israel, W. K. et al. (2022). High intrinsic water use efficiency is underpinned by high stomatal aperture and guard cell potassium flux in C₃ and C₄ grasses grown at glacial CO₂ and low light. *Journal of experimental botany*, 73(5), p. 1546–1565. doi: 10.1093/jxb/erab477.

Kusumi, K. et al. (2012). Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein. *Journal of experimental botany*, 63(15), p. 5635–5644. doi: 10.1093/jxb/ers216.

Levey, M. et al. (2019). Efficient 2-phosphoglycolate degradation is required to maintain carbon assimilation and allocation in the C₄ plant *Flaveria bidentis*. *Journal of experimental botany*, 70(2), p. 575–587. doi: 10.1093/jxb/ery370.

Li, G. et al. (2021). Assessing the spatiotemporal dynamics of ecosystem water use efficiency across China and the response to natural and human activities. *Ecological indicators*, 126(107680), p. 107680. doi: 10.1016/j.ecolind.2021.107680.

Lima, V. F. et al. (2019). The sucrose-to-malate ratio correlates with the faster CO₂ and light stomatal responses of angiosperms compared to ferns. *The new phytologist*, 223(4), p. 1873–1887. doi: 10.1111/nph.15927.

Lin, H. et al. (2020). A partial C₄ photosynthetic biochemical pathway in rice. *Frontiers in plant science*, 11, p. 564463. doi: 10.3389/fpls.2020.564463.

McAusland, L. et al. (2016). Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *The new phytologist*, 211(4), p. 1209–1220. doi: 10.1111/nph.14000.

Medeiros, D. B. et al. (2016). Enhanced photosynthesis and growth in atqac1 knockout mutants are due to altered organic acid accumulation and an increase in both stomatal and mesophyll conductance. *Plant physiology*, 170(1), p. 86–101. doi: 10.1104/pp.15.01053.

Medeiros, D. B. et al. (2017). Impaired malate and fumarate accumulation due to the mutation of the tonoplast Dicarboxylate Transporter has little effects on stomatal behavior. *Plant physiology*, 175(3), p. 1068–1081. doi: 10.1104/pp.17.00971.

Medeiros, D. B. et al. (2019). Metabolomics for understanding stomatal movements. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 31(1), p. 91–102. doi: 10.1007/s40626-019-00139-9.

Murashige, Toshio, e Folke Skoog. (1962). “A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures”. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473–97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

O’Brien, T. P., Feder, N. e McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59(2), p. 368–373. doi: 10.1007/bf01248568.

Omena-Garcia, R. P. et al. (2019). Growth and metabolic adjustments in response to gibberellin deficiency in drought stressed tomato plants. *Environmental and experimental botany*, 159, p. 95–107. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.12.011.

Omondi, E. O. et al. (2017) Mating biology, nuclear DNA content and genetic diversity in spider plant (*Cleome gynandra*) germplasm from various African countries. *Plant Breeding*, v. 136, n. 4, p. 578–589. <https://doi.org/10.1111/pbr.12485>

Pantin, F. et al. (2013). The dual effect of abscisic acid on stomata. *The new phytologist*, 197(1), p. 65–72. doi: 10.1111/nph.12013.

Parma, D. F. et al. (2022). New insights into the evolution of C₄ photosynthesis offered by the Tarenaya cluster of Cleomaceae. *Frontiers in plant science*, 12, p. 756505. doi: 10.3389/fpls.2021.756505.

Peterhansel, C. e Maurino, V. G. (2011). Photorespiration redesigned. *Plant physiology*, 155(1), p. 49–55. doi: 10.1104/pp.110.165019.

Pridgeon, A. J. e Hetherington, A. M. (2021). ABA signalling and metabolism are not essential for dark-induced stomatal closure but affect response speed. *Scientific reports*, 11(1), p. 1–12. doi: 10.1038/s41598-021-84911-5.

Sage, R. F. (2004). The evolution of C₄ photosynthesis. *The new phytologist*, 161(2), p. 341–370. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.00974.x.

Sage, R. F. (2021). Russ Monson and the evolution of C₄ photosynthesis. *Oecologia*, 197(4), p. 823–840. doi: 10.1007/s00442-021-04883-1.

Schlüter, U. e Weber, A. P. M. (2020). Regulation and evolution of C₄ photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 71(1), p. 183–215. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-040915.

Schuler, M. L., Mantegazza, O. e Weber, A. P. M. (2016). Engineering C₄ photosynthesis into C₃ chassis in the synthetic biology age. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 87(1), p. 51–65. doi: 10.1111/tpj.13155.

Schulze, S. et al. (2013). Evolution of C₄ photosynthesis in the genus flaveria: establishment of a photorespiratory CO₂ pump. *The plant cell*, 25(7), p. 2522–2535. doi: 10.1105/tpc.113.114520.

Sedelnikova, O. V., Hughes, T. E. e Langdale, J. A. (2018). Understanding the genetic basis of C₄ Kranz anatomy with a view to engineering C₃ crops. *Annual review of genetics*, 52(1), p. 249–270. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031217.

Segura Broncano, L. et al. (2023). Photorespiration is the solution, not the problem. *Journal of plant physiology*, 282(153928), p. 153928. doi: 10.1016/j.jplph.2023.153928.

Silva-Alvim, F. A. L. et al. (2023) “Speedy stomata of a C₄ plant correlate with enhanced K⁺ channel gating. *Plant, cell & environment*, 47(3), p. 817–831. doi: 10.1111/pce.14775.

Simonin, K. A. e Roddy, A. B. (2018). Genome downsizing, physiological novelty, and the global dominance of flowering plants. *PLoS biology*, 16(1), p. e2003706. doi: 10.1371/journal.pbio.2003706.

Song, Z. et al. (2023). The evolution and expression of stomatal regulators in C₃ and C₄ crops: Implications on the divergent drought tolerance. *Frontiers in plant science*, 14, p. 1100838. doi: 10.3389/fpls.2023.1100838.

de Sousa, L. F. et al. (2020). Improving water use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. *Physiologia plantarum*, 168(3), p. 576–589. doi: 10.1111/ppl.12983.

Taylor, S. H. et al. (2012). Photosynthetic pathway and ecological adaptation explain stomatal trait diversity amongst grasses. *The new phytologist*, 193(2), p. 387–396. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03935.x.

Terán, F. et al. (2024). Facing climate change: plant stress mitigation strategies in agriculture. *Physiologia plantarum*, 176(4). doi: 10.1111/ppl.14484.

Tran, L.-S. P. et al. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in

Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), p. 20623–20628. doi: 10.1073/pnas.0706547105.

Uzilday, B. et al. (2024). Role of abscisic acid, reactive oxygen species, and Ca^{2+} signaling in hydrotropism—drought avoidance-associated response of roots. *Plants*, 13(9), p. 1220. doi: 10.3390/plants13091220.

Vogan, P. J. e Sage, R. F. (2011). Water-use efficiency and nitrogen-use efficiency of C_3 - C_4 intermediate species of *Flaveria* Juss. (Asteraceae). *Plant, cell & environment*, 34(9), p. 1415–1430. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02340.x.

Von Groll, U., Berger, D. e Altmann, T. (2002). The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during Arabidopsis stomatal development. *The plant cell*, 14(7), p. 1527–1539. doi: 10.1105/tpc.001016.

Voznesenskaya, E. V. et al. (2007). Physiological, anatomical and biochemical characterisation of photosynthetic types in genus *Cleome* (Cleomaceae). *Functional plant biology: FPB*, 34(4), p. 247–267. doi: 10.1071/FP06287.

Way, D. A. (2012). What lies between: the evolution of stomatal traits on the road to C_4 photosynthesis: Commentary. *The new phytologist*, 193(2), p. 291–293. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04000.x.

Way, D. A. et al. (2014). Increasing water use efficiency along the C_3 to C_4 evolutionary pathway: a stomatal optimization perspective. *Journal of experimental botany*, 65(13), p. 3683–3693. doi: 10.1093/jxb/eru205.

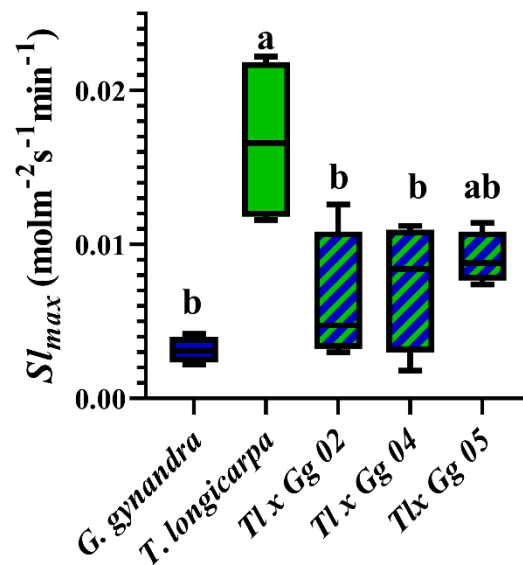
Weber, A. P. M. e Bar-Even, A. (2019). Update: Improving the efficiency of photosynthetic carbon reactions. *Plant physiology*, 179(3), p. 803–812. doi: 10.1104/pp.18.01521.

Zhao, Y.-Y. et al. (2022). The evolution of stomatal traits along the trajectory toward C_4 photosynthesis. *Plant physiology*, 190(1), p. 441–458. doi: 10.1093/plphys/kiac252.

Zhen, S. e Bugbee, B. (2020). Steady-state stomatal responses of C_3 and C_4 species to blue light fraction: Interactions with CO_2 concentration. *Plant, cell & environment*, 43(12), p. 3020–3032. doi: 10.1111/pce.13888.

Zsögön, A. *et al.* (2015). A mutation that eliminates bundle sheath extensions reduces leaf hydraulic conductance, stomatal conductance and assimilation rates in tomato (*Solanum lycopersicum*). *The new phytologist*, 205(2), p. 618–626. doi: 10.1111/nph.13084.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR



2

Figura suplementar 1. Velocidade das respostas estomáticas ao ABA. Inclinação máxima (Sl_{max}) da resposta da condutância estomática (gs) ao ABA em *G. gynandra*, *T. longicarpa* e seus híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04* e *TlxGg05*). A inclinação máxima (Sl_{max}), foi obtida a partir do coeficiente angular de uma equação de primeiro grau ajustada com coeficiente de determinação R^2 superior a 0,9. Dispersão de caixas seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=4$).

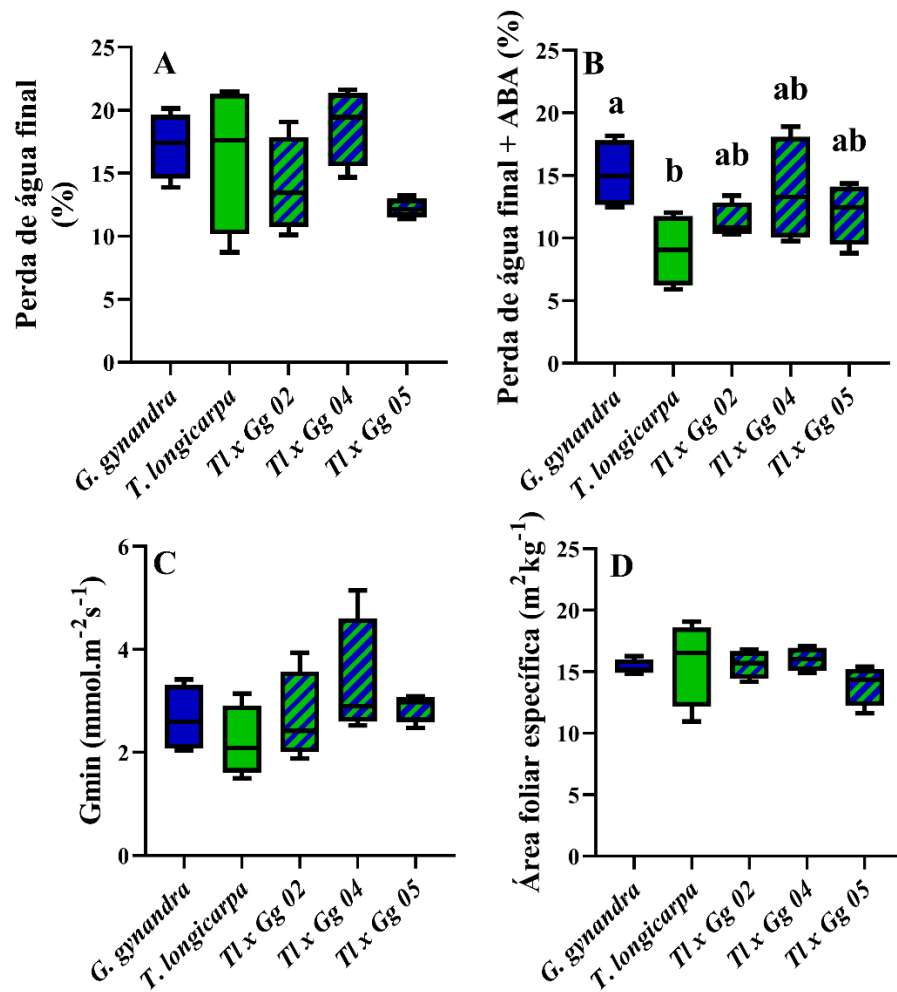


Figura suplementar 2. Avaliação dos parâmetros de perda de água para as espécies *T. longicarpa* (C₃), *G. gynandra* (C₄) e híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04*, *TlxGg05*). **(A)** Perda de água final, **(B)** Perda de água final após a aplicação de 50 µM de ABA, **(C)** Condutância cuticular mínima (mmol m²s⁻¹) **(D)** Área foliar específica (m² kg⁻¹). Dispersão de caixas e médias ± EP seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey (P ≤ 0,05; n=4).

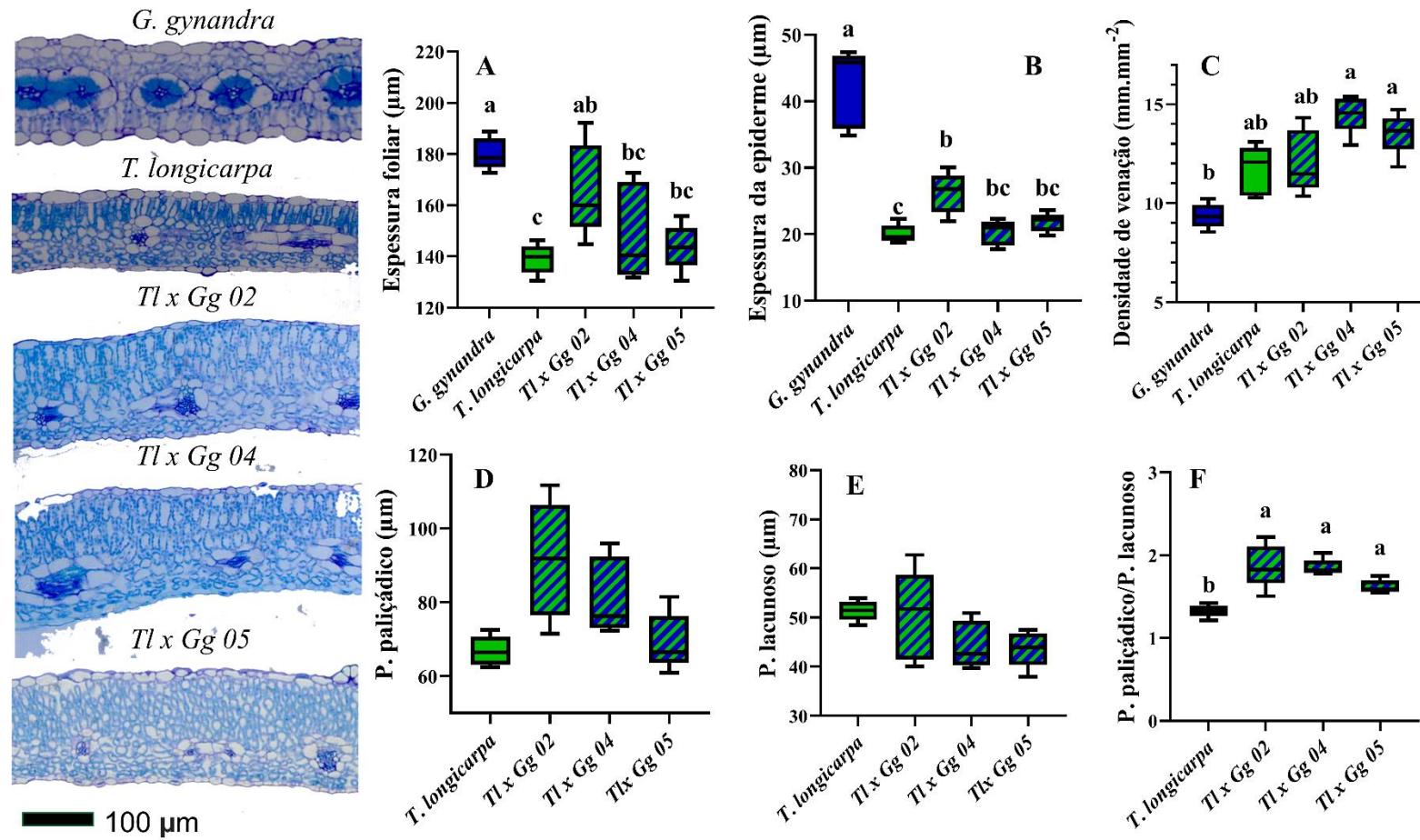


Figura suplementar 3. Morfometria foliar e densidade de venação para as espécies *T. longicarpa* (C3), *G. gynandra* (C4) e híbridos interespecíficos (*TlxGg02*, *TlxGg04*, *TlxGg05*). (A) Espessura foliar (μm), (B) Espessura da epiderme (μm), (C) Densidade de venação (mm de nervura mm⁻² de área foliar). (D) Espessura do parênquima paliçádico (μm), (E) Espessura do parênquima lacunoso (μm), (F) Razão entre os parênquimas paliçádico e lacunoso. Dispersão de caixas seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$; $n=5$).

Tabela S1: Contribuição das variáveis nos dois componentes principais. Os valores foram obtidos a partir de uma matriz de 6 variáveis fisiológicas x 20 indivíduos.

Variável	PC1	PC2
A_n	3.79	78.83
g_s	17.59	9.99
C_i	20.27	0.04
E	17.78	8.62
$iEUA$	20.78	0.006
EUA	19.75	2.49

Tabela S2: Contribuição das variáveis nos dois componentes principais. Os valores foram obtidos a partir de uma matriz de 6 características dos estômatos x 20 indivíduos.

Variável	PC1	PC2
D.E abaxial	24.37	0.003
D.E adaxial	12.92	27.84
D.E	23.84	2.68
Área do estômato	1.70	53.67
D.E abaxial/ D.E adaxial	15.25	15.55
Abertura estomática	21.89	0.24

Tabela S3: Contribuição das variáveis nos dois componentes principais. Os valores foram obtidos a partir de uma matriz de 10 variáveis do comportamento estomático x 20 indivíduos. *Representa a *gs* no estado estacionário após a transição de 800 para 400 $\mu\text{mol. mol}^{-1}$ e do escuro para o claro.

Variável	PC1	PC2
$S_{\text{I}_{\text{max}}}$ fechamento CO_2	10.15	12.31
$S_{\text{I}_{\text{max}}}$ abertura CO_2	4.80	25.19
$S_{\text{I}_{\text{max}}}$ fechamento luz	8.06	16.75
$S_{\text{I}_{\text{max}}}$ abertura luz	7.00	5.06
<i>gs</i> 400 $\mu\text{mol. mol}^{-1}$	17.00	0.58
<i>gs</i> 800 $\mu\text{mol. mol}^{-1}$	14.16	1.73×10^{-6}
<i>gs</i> 400-2* $\mu\text{mol. mol}^{-1}$	14.65	10.76
<i>gs</i> luz	13.94	5.59
<i>gs</i> escuro	0.11	8.27
<i>gs</i> luz 2*	10.07	15.44