

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Efeito do elevado CO₂ e do aquecimento
sobre o balanço hídrico e a temperatura foliar de
Panicum maximum Jacq., uma espécie forrageira
tropical C₄**

André de Souza Rodrigues

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Efeito do elevado CO₂ e do aquecimento
sobre o balanço hídrico e a temperatura foliar de
Panicum maximum Jacq., uma espécie forrageira
tropical C₄**

André de Souza Rodrigues

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Carlos Alberto Martinez y Huaman

RIBEIRÃO PRETO – SP
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rodrigues, André de Souza

Efeito do elevado CO₂ e do aquecimento sobre o balanço hídrico e a temperatura foliar de *Panicum maximum* Jacq., uma espécie forrageira tropical C4

p.54: il.; 30 cm

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Martines y Huaman

Mudanças climáticas, elevado CO₂, elevada temperatura, balanço hídrico, *Panicum maximum*.

Agradecimentos:

- **A Renata, minha companheira sempre presente.**
- **A minha família, por todo apoio dado à minha formação.**
- **Ao professor Carlos, pelas oportunidades e caminhos abertos.**
- **Aos membros do laboratório de fisiologia vegetal, pelo companheirismo.**
- **A Matheus Bianconi, pela dedicação e paciência sobre-humanas, sem as quais eu não poderia ter chegado tão longe.**
- **Aos órgãos de fomento: CNPq (bolsa de iniciação científica) e FAPESP (financiamento do projeto).**

“Antes tarde do que nunca.”
Autor desconhecido

Resumo

Um abrupto aumento na concentração de CO₂ atmosférica ocorreu a partir do século XIX até os dias atuais, em ritmo de crescimento que, se mantido, elevará esta concentração para 600ppm até 2050 provocando um aumento na temperatura média global, previsto entre +1,5 °C e +2,0 °C. Esta mudança terá efeito direto sobre os ecossistemas, principalmente através de mudanças fisiológicas nas plantas. Elevadas concentrações de CO₂ induzem fechamento estomático, conseqüentemente aumentando reduzindo o uso da água, isso associado ao fato de que a água é um dos maiores limitantes para o desenvolvimento vegetal, denota a importância da investigação da influência destas mudanças sobre o balanço hídrico das plantas. Neste trabalho foram utilizados os sistemas miniFACE de enriquecimento de CO₂ e o sistema T-FACE de aquecimento para o estabelecimento de ambientes com elevada concentração de CO₂, Temperatura elevada e com CO₂ e temperatura elevados. Os 3 ambientes citados mais o grupo controle formaram os 4 tratamentos do trabalho. Indivíduos da espécie forrageira *Panicum maximum* Jacq. cv.Mombaça foram submetidos aos quatro tratamentos por 26 dias, tendo a condutância estomática, a taxa transpiratória, a temperatura foliar e o conteúdo relativo de água da folha monitorados em curso diurno e a biomassa de raiz aferida ao fim do experimento. O CO₂ elevado esboçou maior influência sobre os parâmetros avaliados, com destaque para a redução da condutância estomática e taxa transpiratória, e o aumento da proporção entre a massa da raiz e a massa total. A temperatura elevada influenciou positivamente na temperatura foliar quando associado ao CO₂ elevado e promoveu efeito de ganho no aumento da proporção de massa de raiz induzido pelo CO₂ elevado. Os resultados obtidos em todas as avaliações indicaram que o elevado CO₂ otimiza a utilização e captação de água, o que em um ambiente futuro poderá aliviar os efeitos de uma possível redução na disponibilidade de água, porém um melhoramento no status hídrico das plantas não foi observado, e para um projeto futuro, a indução de estresse hídrico deve ser considerada.

Lista de figuras.

Figura 1. (a) Imagem de satélite e (b) Vista geral da área experimental.....	8
Figura 2. Esquema da distribuição dos tratamentos em função dos blocos.	9
Figura 3. Vista externa (a) e interna (b) da unidade de controle central do sistema miniFACE.....	11
Figura 4. Parcela experimental do sistema miniFACE	12
Figura 5. Tanque de CO ₂ com capacidade para 12 toneladas e sua unidade vaporizadora, à direita.	13
Figura 6. Unidade de controle central do sistema T-FACE.....	14
Figura 7. Painel elétrico que controla a distribuição de energia aos aquecedores infravermelho de cerâmica.....	15
Figura 8. Aquecedores infravermelho de cerâmica	16
Figura 9. Termômetro infravermelho.....	17
Figura 10. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 15 ^o e 16 ^o dias.....	21
Figura 11. Curvas horárias de condutância estomática (gs) nos quatro tratamentos para o 15 ^o e 16 ^o dias	21
Figura 12. Regressão linear da resposta do estômato à variação no DPV encontrada às 10h30 nos 15 ^o e 16 ^o dias de experimento.	23
Figura 13. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 25 ^o e 26 ^o dias.....	24
Figura 14. Curvas horárias de condutância estomática (gs) nos quatro tratamentos para o 25 ^o e 26 ^o dias.....	24
Figura 15. Regressão linear da resposta do estômato à variação no DPV encontrada às 11h nos 25 ^o e 26 ^o dias de experimento.....	26
Figura 16. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 15 ^o e 16 ^o dias.....	28
Figura 17. Curvas horárias de taxa transpiratória (E) nos quatro tratamentos para os 15 ^o e 16 ^o dias.....	28
Figura 18. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 25 ^o e 26 ^o dias.....	Erro! Indicador não definido. 30
Figura 19. Curvas horárias de taxa transpiratória (E) nos quatro tratamentos para os 25 ^o e 26 ^o dias.....	30
Figura 20. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 21 ^o e 23 ^o dias.....	33
Figura 21. Curvas horárias de temperatura foliar(T _f) nos quatro tratamentos para os 21 ^o e 23 ^o dias.....	33
Figura 22. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 21 ^o e 23 ^o dias.....	36

Figura 23. Curvas horárias de Conteúdo Relativo de Água (CRA) nos quatro tratamentos para os 21 ^o e 23 ^o dias.	36
Figura 24. Proporção de massa seca de raiz em relação à massa tota	39

Lista de tabelas.

Tabela 1. Resposta da condutância estomática aos tratamentos durante o curso diurno nos 15 ^o e 16 ^o dias de experimento.	22
Tabela 2. Resposta da condutância estomática aos tratamentos durante o curso diurno nos 25 ^o e 26 ^o dias de experimento.	25
Tabela 3. Resposta da taxa transpiratória aos tratamentos durante o curso diurno nos 15 ^o e 16 ^o dias de experimento.	29
Tabela 4 Resposta da taxa transpiratória aos tratamentos durante o curso diurno 25 ^o e 26 ^o dias de experimento.	31
Tabela 5. Resposta da temperatura foliar aos tratamentos durante o curso diurno nos 11 ^o e 13 ^o dias de experimento.	34
Tabela 6. Resposta do Conteúdo Relativo de Água foliar durante o curso diurno nos 11 ^o e 13 ^o dias de experimento.	37
Tabela 7. Biomassa de Raiz, Caules e Folha aferida ao fim do experimento e estimada por perfilho.	39

Sumário

1. Introdução	1
2. Hipóteses	5
3. Objetivos	5
3.1. Gerais	5
3.2. Específicos	6
4. Material e Métodos	7
4.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo	7
4.2. Área Experimental	7
4.3. Delineamento experimental	8
4.4. Sistema miniFACE	9
4.5. Sistema T-FACE	13
4.6. Estação Microclimática	18
4.6.1. Cálculo de DPV	18
4.7. Avaliações em curso diurno	18
4.7.1. Avaliação de Condutância Estomática e Taxa transpiratória	18
4.7.2. Monitoramento do Conteúdo Relativo de água	19
4.7.3. Temperatura foliar	19
4.8. Quantificação de biomassa	19
4.9. Análises Estatísticas	20
5.1. Condutância Estomática (g_s)	21
5.1.1. 15º e 16º dias de experimento	21
5.1.2. 25º e 26º dias de experimento	24
5.2. Taxa Transpiratória (E)	28
5.2.1. 15º e 16º dias de experimento	28
5.2.2. 25º e 26º dias de experimento	30
5.3. Temperatura Foliar	33
5.4. Conteúdo Relativo de Água	36
5.6. Observação geral dos dados	40
6. Conclusão	41
7. Considerações Finais	41
8. Referências Bibliográficas:	43

1. Introdução

O clima no planeta Terra está em constante mudança. Por este motivo, tem sido feito um grande esforço para avaliar a direção e intensidade desta mudança prevendo cenários futuros e possíveis dificuldades a serem enfrentadas em decorrências delas. Estudos realizados através da análise de gelo polar revelaram que nos últimos 160 mil anos a concentração atmosférica média de gás carbônico (C_a) flutuou entre 190 e 300 ppm, mantendo-se estável em 280 ppm do término da última glaciação no Pleistoceno até início do século XIX (PETIT et al., 1999). Com o advento da revolução industrial, iniciou-se um grande fluxo do carbono, outrora fixado por seres vivos, da litosfera de volta à atmosfera alimentado pela emissão de gases resultantes da queima de combustíveis fósseis, acarretando num abrupto aumento da C_a , claramente observado a partir do século XIX até os dias atuais, de 280 para 390 ppm. Mantida esta tendência, um dos possíveis cenários seria a elevação da C_a para até 600ppm ao início da segunda metade do século e a até 1100ppm ao final do século (LAL, 2008). Como consequência direta deste aumento na C_a , em combinação com a emissão de vários outros gases estufa, é previsto um aumento da temperatura média global (T_{mg}) entre 1,5°C e 2°C (IPCC, 2013).

Tendo em vista a inevitabilidade desta mudança e que a associação entre o aumento da C_a e da T_{mg} terá grande influência no balanço dos ecossistemas, principalmente através de mudanças fisiológicas nas plantas (KÖRNER, 2000), torna-se crucial a compreensão da extensão destes efeitos e como eles podem impactar em atividades antrópicas, como a agricultura e a pecuária.

Uma grande quantidade de experimentos, em diversas frentes de pesquisa, tem sido realizada buscando simulações de condições ambientais futuras ou apenas traçando o padrão de respostas de organismos a variáveis relacionadas a estas mudanças. Os primeiros experimentos que visaram o estabelecimento de um ambiente com elevada concentração de CO₂, se utilizaram de câmaras em que o objeto de estudo, como por exemplo uma planta, seria inserido e posteriormente seria circulado de ar previamente ajustado para a concentração de CO₂ desejada (BROWN; ESCOMBE, 1902). Este método tem sido amplamente utilizado em diversos trabalhos na área da fisiologia vegetal, porém, ele impõe grande limitação espacial, principalmente quando se deseja acompanhar plantas de médio a grande porte até sua maturidade, além da necessidade da utilização de vasos para a aplicação desse método, o que pode limitar o crescimento da raiz, por vezes mascarando alguma resposta que a planta venha a apresentar em decorrência do tratamento (AINSWORTH; LONG, 2005).

Tendo em vista estas limitações, certas circunstâncias demandam a utilização de métodos alternativos de enriquecimento de CO₂, a exemplo dos sistemas de enriquecimento de CO₂ ao ar livre (FACE, *Free Air CO₂ Enrichment*). Os sistemas FACE tem sido utilizados desde o início da década de 90 (HENDREY; LEWIN; NAGY, 1993), tais sistemas são capazes de manter um ambiente com [CO₂] elevado a níveis específicos sem a utilização de estruturas de clausura, permitindo assim que experimentos sejam executados em plenas condições de campo utilizando uma gama maior de espécies sem interferir com as variáveis climáticas como radiação, precipitação e temperatura.

A diversidade vegetal poder ser dividida em três principais grupos fotossintéticos, as plantas de tipo fotossintético C₃, C₄ e CAM. Plantas CAM e C₄ apresentam menor biodiversidade em relação às plantas C₃. Em geral, as plantas do tipo C₄ são em média mais produtivas, sendo responsáveis pela quarta parte da produtividade global, tendo 11 representantes dentro das 12 espécies vegetais mais produtivas do planeta (GHANNOUM et al., 2000; LARCHER, 2000; VON CAEMMERER; FURBANK, 2003; EDWARDS et al., 2010) e sendo largamente utilizadas como alimento por populações humanas e como forragem para gado.

As plantas C₄, apresentam importantes diferenças estruturais e bioquímicas com relação às C₃, alojando a enzima Rubisco, responsável pela assimilação de CO₂, em células especializadas adjacentes ao tecido vascular, as células da bainha, e a enzima PEPcarboxilase, nas células do mesófilo. A PEPcarboxilase é capaz de fixar CO₂ na forma de ácidos C₄, os quais são descarboxilados no interior das células da bainha, induzindo elevadas [CO₂] no sítio da Rubisco (até 10 vezes maior que a ambiente), atingindo assim altas taxas de assimilação de carbono (FURBANK; HATCH, 1987; VON CAEMMERER; FURBANK, 2003).

Devido a característica da plantas C₄ em concentrar CO₂ no sítio da fixação do carbono, por algum tempo priorizou-se o estudo dos efeitos do elevado CO₂ sobre a fisiologia de plantas C₃, acreditando-se que as plantas C₄ não apresentariam resposta expressiva na taxa fotossintética (BOWES, 1993), no entanto estudos mais recentes comprovam que estas, de fato, apresentam resposta ao elevado CO₂ (ZISKA; SICHER; BUNCE, 1999; SOUZA et al., 2008).

As respostas encontradas em plantas C_4 ao elevado CO_2 são explicadas pela fisiologia básica do estômato, o qual é extremamente sensível a diversos fatores, como a umidade relativa do ar, temperatura e a $[CO_2]$ intracelular. Este último fator está intimamente relacionado a fotossíntese e é diretamente afetado pela $[CO_2]$, que, quando elevada, pode rapidamente modular a abertura estomática, induzindo a entrada de osmólitos para o interior das células guarda (células responsáveis pelo fechamento estomático), as quais recebem um conseqüente influxo de água, reduzindo abertura estomática (BUCKLEY; MOTT, 2013)

Esta dinâmica pôde ser observada em experimentos realizados com plantas C_4 , revelando efeitos significativos sobre sua fisiologia, como a redução na condutância estomática (g_s) e conseqüente redução da taxa transpiratória (E), levando a uma maior economia de água e modificação do status hídrico geral da planta (LONG et al., 2004; AINSWORTH et al., 2012). A intensidade de tal resposta, entretanto, é bastante variável e está condicionada por outros fatores tais como temperatura, solo e a espécie em questão (KIMBALL; KOBAYASHI; BINDI, 2002; YOSHIMOTO; OUE; KOBAYASHI, 2005; BERNACCHI et al., 2007).

Neste contexto, destaca-se a importância das espécies vegetais C_4 para a atividade antrópica, extensamente empregadas na produção agropecuária como forragem para gado, e a relevância de que se estude seu comportamento hídrico frente às alterações previstas para a T_{mg} e na C_a , em vista de que a água é um dos maiores limitantes para produtividade líquida de espécies vegetais, principalmente em atividades de cultivo (LARCHER, 2000).

Dentro ainda deste contexto, este trabalho se faz relevante, no papel de contribuir com o avanço do uso da tecnologia FACE (*Free-air Carbon dioxide Enrichment*) na América do Sul, ainda recente e pouco difundida, e ainda de contribuir com um estudo que avalie o efeito da elevada [CO₂] combinada com o aquecimento sobre a fisiologia do balanço hídrico de plantas tropicais em condições de campo, visto que ainda não existem estudos deste tipo na América do Sul. Assim, o presente trabalho pretende criar tratamentos que simulem estas condições, com o auxílio de um sistema FACE associado a um sistema de aquecimento por infravermelho T-FACE, (*Temperature Free-air Controlled Enhancement*), visando a avaliação da resposta de exemplares de *Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça (C4), na hipótese de que estes tratamentos apresentarão influência sobre parâmetros relacionados ao balanço hídrico dos mesmos.

2. Hipóteses

A: A elevada concentração de CO₂ ambiente (C_a) provoca fechamento estomático e conseqüente redução da taxa transpiratória induzindo aumento do conteúdo hídrico da folha.

B: A temperatura elevada em 2°C modifica a resposta do estômato à elevada C_a.

3. Objetivos

3.1. Gerais

Caracterizar o efeito independente e combinado do elevado CO₂ e da elevada temperatura sobre o estado hídrico de indivíduos de *P. maximum* em

condições de campo, com a ajuda do sistema miniFACE de injeção sônica de CO₂ e do sistema T-FACE de aquecimento por infravermelho, afim de obter informações preditivas sobre as possíveis alterações no balanço hídrico de *P. maximum* em resposta às mudanças climáticas previstas para um futuro próximo.

3.2. Específicos

Em tratamentos cruzados de elevadas concentração de CO₂ e temperatura:

- Determinar os cursos diurnos da Condutância Estomática (g_s).
- Determinar os cursos diurnos da Taxa Transpiratória (E).
- Determinar os cursos diurnos da Temperatura Foliar (T_f).
- Determinar os cursos diurnos do Conteúdo Relativo de Água foliar (CRA).
- Determinar a sensibilidade do estômato ao Déficit de Pressão de Vapor (DPV).
- Determinar a razão de distribuição de massa entre raízes, caule e folhas.

4. Material e Métodos

4.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

Sementes de *Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça (Poaceae), uma forrageira tropical C₄ (subtipo PCK) largamente utilizada na América do Sul e na África como forragem, foram plantadas em maio de 2013 na área experimental descrita a seguir. Onze semanas após a germinação foi realizado um primeiro corte de uniformização das plantas a 35cm do solo. O início dos tratamentos com aquecimento e elevado CO₂, conforme descrito posteriormente, se iniciou três semanas depois, após um segundo corte de uniformização na mesma altura. Vale mencionar que as plantas cresceram em consórcio com uma leguminosa forrageira comumente utilizada para este fim, *Stylosanthes capitata*, devido a sua capacidade de alojar bactérias fixadoras de nitrogênio.

4.2. Área Experimental

O plantio e a instalação do experimento foram realizados em uma área de 3000 m² dentro do campus da USP de Ribeirão Preto à S 21° 10' 8" W 47° 51' 48,2" em altitude média de 580m (Figura 1). A região apresenta solo do tipo latossolo vermelho distrófico. Análises de solo foram realizadas previamente pela equipe do laboratório de fisiologia vegetal e foram utilizadas para a correção nutricional e a adequada homogeneização da área experimental com calcário calcinado (2,5 ton/ha) e com adubo NPK 8-30-8 (1 ton/ha) a fim de suprir a deficiência de fósforo do solo.

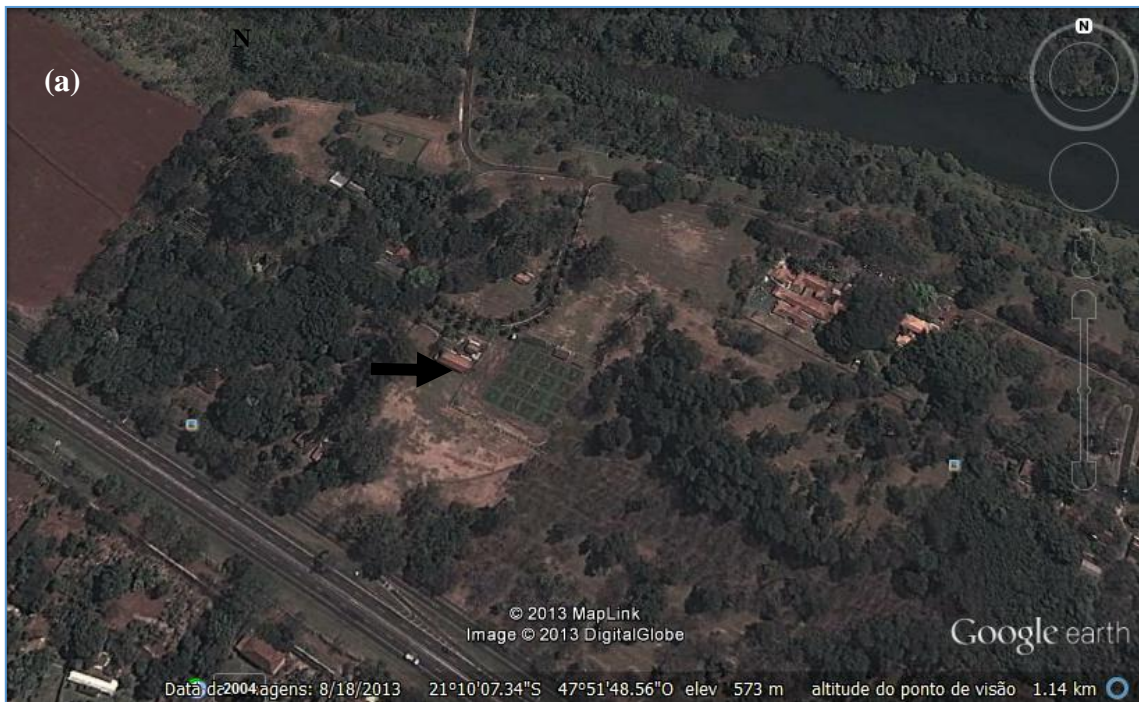


Figura 1. (a) Imagem de satélite (imagem de 2013; fonte: Google Earth) e (b) Vista geral da área experimental (foto: Carlos Martinez, 2013).

4.3. Delineamento experimental

O efeito independente e combinado do elevado CO_2 e do aquecimento foi estudado através de delineamento em blocos casualizados, com 2 fatores (CO_2 e Temperatura) com dois níveis cada (elevado e ambiente) totalizando

quatro tratamentos com quatro repetições por tratamento, os quais são: (1) [CO₂] elevada (600ppm) + temperatura ambiente (eC); (2) [CO₂]ambiente + temperatura elevada (+2°C) (eT); (3) [CO₂] elevada (600ppm) + temperatura elevada (+2°C)(eC+eT); (4) [CO₂] ambiente + temperatura ambiente (Ctrl.) (Figura 2).

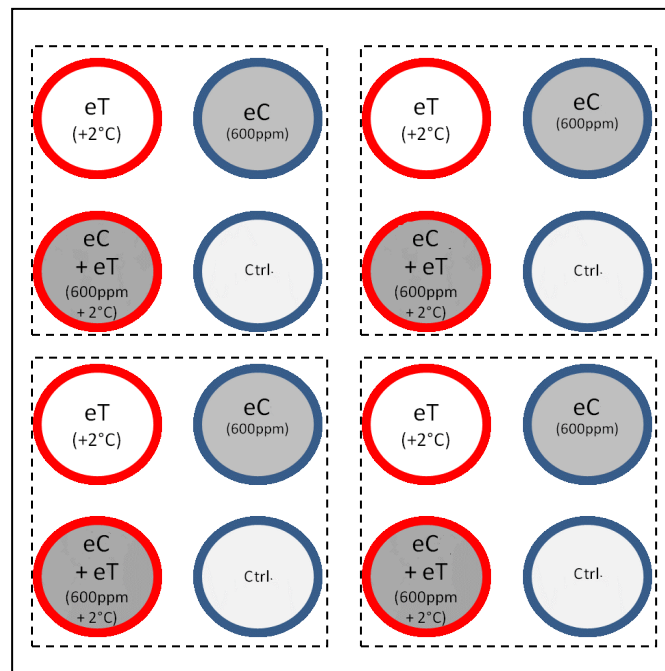


Figura 2. Esquema da distribuição dos tratamentos em função dos blocos. As linhas tracejadas delimitam virtualmente os quatro blocos experimentais. eT = tratamento de aquecimento, com temperatura elevada em 2°C em relação ao controle, eC= tratamento de elevado CO₂, com [CO₂] =600ppm, eC+eT = combinação dos tratamentos eT e eC.

4.4.Sistema miniFACE

O sistema miniFACE de enriquecimento de CO₂ ao ar livre utilizado neste estudo é uma modificação do sistema de injeção sônica de CO₂ puro denominado POPFACE (MIGLIETTA et al., 2001), em pequena escala, uma

vez que a unidade experimental tem 2m de diâmetro. O desenho e a coordenação da montagem deste sistema foram feitos pelo Prof. Franco Miglietta (IBMet, Firenze, Itália), que tem ampla experiência com a tecnologia FACE, tendo sido responsável pela montagem de importantes sistemas em vários países, como o SoyFACE nos EUA e o POPFACE na Itália (MIGLIETTA et al., 2001; ORT et al., 2006).

O sistema foi implementado no campus da USP em Ribeirão Preto, SP, e consiste em cinco componentes principais: (1) uma unidade de controle central, (2) anéis de fumigação, (3) sensores de CO₂ (IRGAs – Infrared Gas Analyser), (4) tanque de CO₂ puro com controle central da pressão do gás no sistema e (5) computador com acesso remoto a unidade de controle central.

A unidade de controle central é o principal componente do sistema. Ela tem a função de regular, através de válvulas solenóides individuais, a quantidade de CO₂ injetada em cada parcela para manter a concentração desejada, utilizando, para tal, a informação integrada enviada pelos sensores de CO₂ de cada parcela e por um anemômetro central (Figura 3).

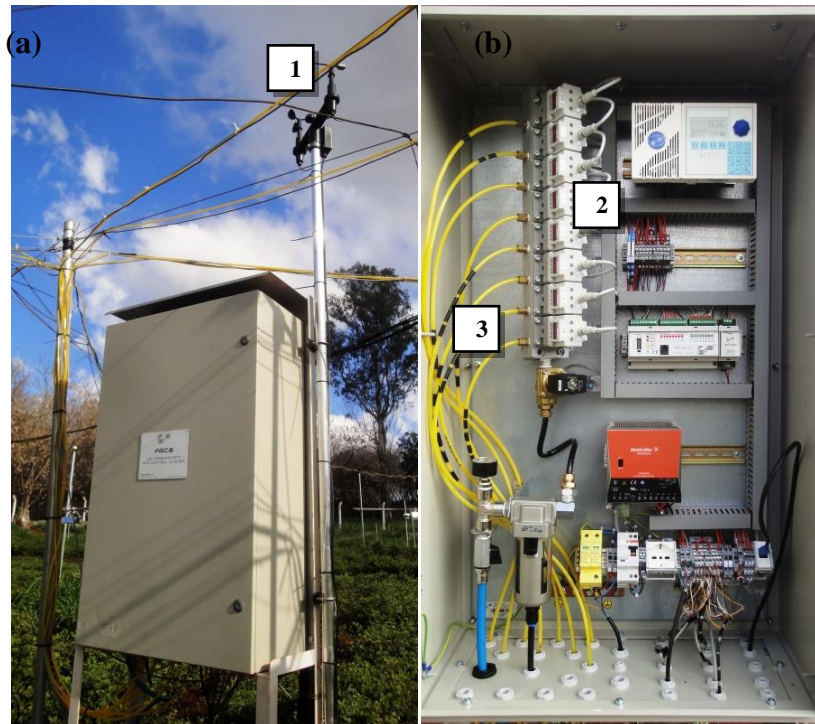


Figura 3. Vista externa (a) e interna (b) da unidade de controle central do sistema miniFACE, instalada na região central da área experimental. 1. Anemômetro, 2. Válvulas solenoide, 3. Tubos que levam o gás até a parcela.

Os anéis de fumigação de CO₂ são feitos de PVC, com 2m de diâmetro, e contêm micro-furos (3mm) feitos a laser em sua face externa. Eles ficam suspensos à altura do dossel das plantas, delimitando a parcela experimental e é possível movimentá-los verticalmente, de forma a acompanhar o crescimento das plantas (Figura 4). O gás é conduzido da unidade de controle central até os anéis através de tubos de polietileno flexíveis. As parcelas experimentais que não possuem fumigação de CO₂ são delimitadas por tubos PVC de mesmo diâmetro (1/2") em forma de anel.

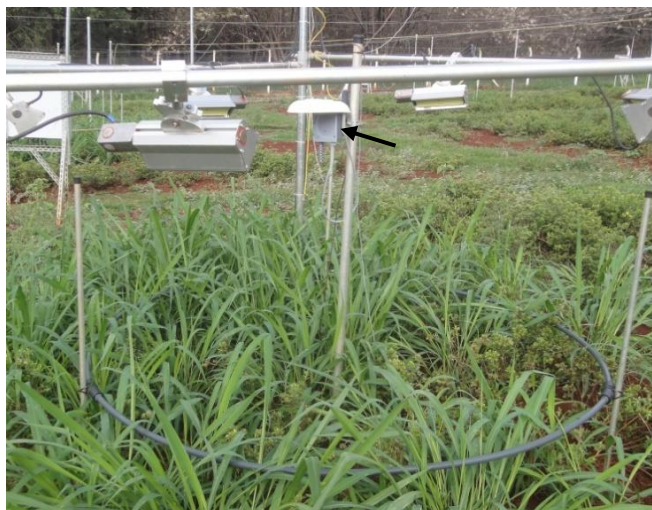


Figura 4. Parcela experimental do sistema miniFACE, delimitada pelo anel de fumigação de CO₂. No centro da parcela há um sensor que mede a concentração de CO₂ (IRGA) (apontado pela seta). Durante o experimento tanto o anel como o IRGA são ajustados à altura do dossel das plantas.

A concentração atmosférica de CO₂ foi monitorada individualmente através de um analisador de gases por infravermelho (IRGA, *Infrared gas analyzer*), modelo GTM220 (Vaisala, Finlândia), instalado no centro de cada parcela experimental (Figura 4) e conectado à unidade de controle central via cabo.

O gás utilizado pelo sistema foi armazenado em um tanque de CO₂ líquido criogênico (-180°C) com capacidade para 12 toneladas (Figura 5). O CO₂ se torna gasoso ao percorrer uma unidade de vaporização e atinge a unidade de controle central à pressão de 6Bar.



Figura 5. Tanque de CO₂ com capacidade para 12 toneladas e sua unidade vaporizadora, à direita.

O funcionamento do sistema miniFACE pode ser resumido da seguinte forma. A concentração atmosférica de CO₂ é amostrada no centro de cada anel através de um IRGA. A informação é passada para o computador da unidade de controle central, que a integra com a velocidade do vento e estima a intensidade de fumigação para cada parcela e envia esta informação para a válvula solenoide, para que seja injetada a quantidade de gás necessária para atingir a concentração atmosférica de CO₂ desejada. A fumigação com CO₂ ocorreu diariamente apenas no período diurno, com início às 6:00 e fim às 18:00.

4.5.Sistema T-FACE

O aquecimento para os tratamentos com temperatura elevada foi propiciado por um sistema T-FACE, o qual foi desenhado e teve a instalação coordenada pelo Prof. Bruce Kimball (USDA, Arizona, USA) (KIMBALL, 2005; KIMBALL et al., 2008; KIMBALL; CONLEY; LEWIN, 2012). O sistema pode ser dividido em 5 parte: (1) unidade de controle central, (2) unidade de controle da

distribuição de energia nas parcelas experimentais sob aquecimento, (3) aquecedores infravermelho de cerâmica, (4) termômetros infravermelho, (5) computador com acesso remoto a unidade de controle central.

A unidade de controle central está localizada no centro da área experimental e é alimentada por um painel solar instalado junto a unidade (Figura 6).



Figura 6. Unidade de controle central do sistema T-FACE. * Painel solar.

Ao lado cada parcela com tratamento aquecimento foi posicionado um painel elétrico responsável pelo fornecimento de energia e regulação de voltagem dos aquecedores infravermelho de cerâmica (Figura 7).

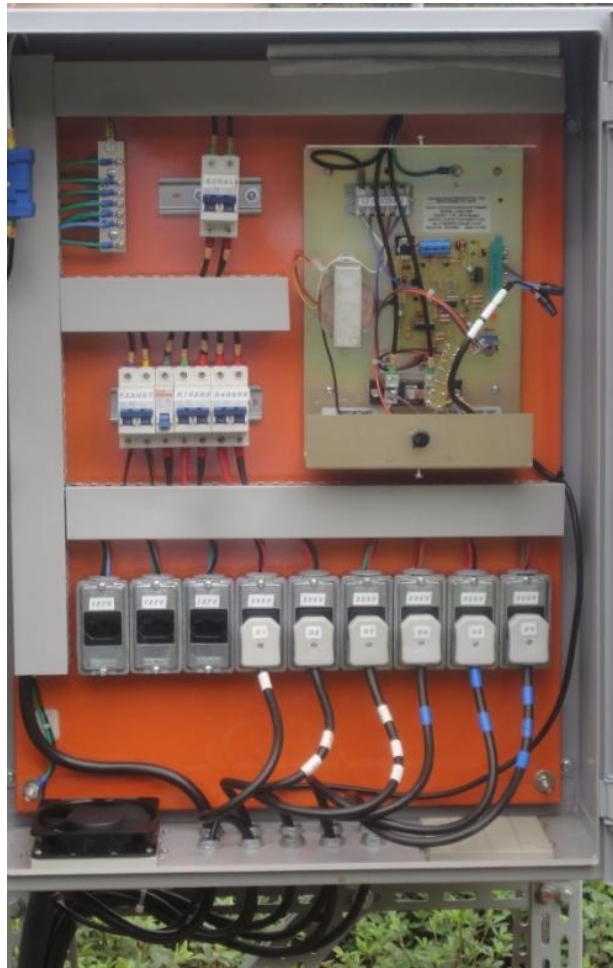


Figura 7. Painel elétrico que controla a distribuição de energia aos aquecedores infravermelho de cerâmica

As parcelas sob tratamento foram aquecidas por aquecedores infravermelho de cerâmica de 750W (modelo FTE-750-240, *Salamander Ceramic Infrared Heating Element*, Mor Electric, USA) (Figura 8). Cada parcela contém seis aquecedores suspensos distribuídos de forma hexagonal a 70cm do dossel por meio de uma estrutura triangular de alumínio ao redor do anel que delimita a área experimental de cada parcela. Os aquecedores encontram-se instalados em refletores de alumínio ajustáveis (modelo Salamander ALEX, Mor Electric, USA).

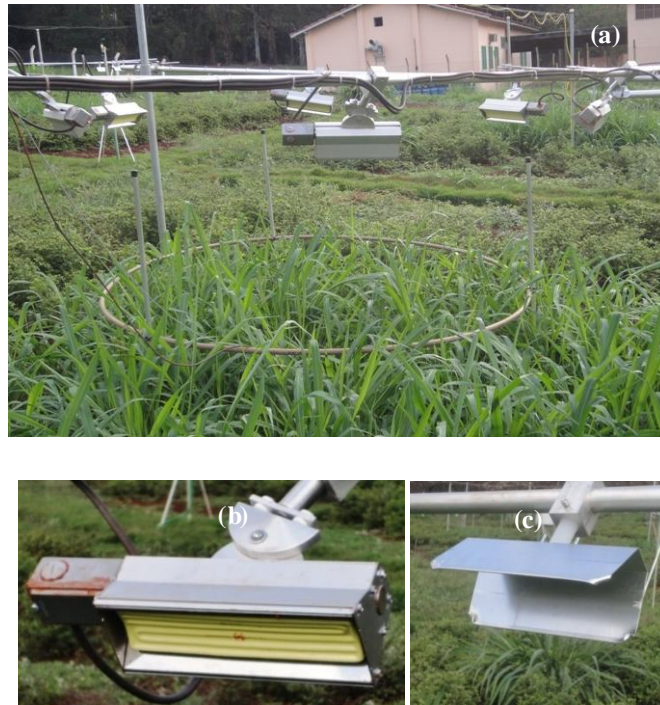


Figura 8. Aquecedores infravermelho de cerâmica instalados nas parcelas sob tratamento de aquecimento (+2°C). (a) Visão geral da parcela e da estrutura que suporta os refletores que contém os aquecedores de cerâmica, (b) Detalhe do aquecedor no interior do refletor, (c) Peça de alumínio instalada nas parcelas controle, simulando o sombreamento dos refletores.

O monitoramento contínuo da temperatura de cada parcela experimental é realizado por um termômetro infravermelho (modelo SI-1H1-L20, *Apogee Instruments*, USA), o qual está instalado numa estrutura de alumínio móvel e orientado no sentido norte-sul (Figura9).



Figura 9. Termômetro infravermelho utilizado para o monitoramento da temperatura do dossel de cada parcela experimental.

Para ambos os sistemas FACE e T-FACE foram instalados computadores exclusivos para o acesso remoto as unidade centrais dos sistemas. Através de um software de interface é possível monitorar em tempo real e registrar a temperatura de cada parcela, a voltagem que é enviada aos aquecedores de cerâmica, além de outros parâmetros do sistema.

A lógica de funcionamento do sistema T-FACE é semelhante à do sistema miniFACE. A temperatura do dossel de uma parcela de referência (tratamento controle) é enviada via cabo ao datalogger da unidade de controle central. Este integra essa informação com a velocidade do vento e a temperatura da parcela sob aquecimento, que o retransmite para o painel elétrico específico de cada parcela experimental sob aquecimento. Através deste controle automático, a voltagem enviada a cada conjuntos de aquecedores é controlada em tempo real, buscando sempre a manutenção da temperatura 2°C acima das parcelas não aquecidas do mesmo bloco. Diferentemente do sistema miniFACE, o T-FACE funciona 24h ininterruptamente.

4.6. Estação Microclimática

Uma estação microclimática automática (WS-HP1), conectada a um datalogger DL2e (Delta-T Devices, UK), monitorou e armazenou continuamente dados climáticos ao longo de todo o experimento (temperatura, umidade relativa, radiação e precipitação).

4.6.1. Cálculo de DPV

Para o cálculo de DVP foram utilizados, os dados de temperatura do ar de cada parcela (T), fornecidos pelo sistema T-FACE) e a umidade relativa do ar central da área (RH) (estação microclimática), obtidos através da relação $DVP = ((100 - RH) / 100) (610,7 \times 10^{7,5 \times T / (237,3 + T)}) / 1000$ (MURRAY, 1967).

4.7 Avaliações em curso diurno

Devido ao elevado número de parcelas (16 divididas em 4 blocos), todas as avaliações em curso diurno foram realizadas ao longo de dois dias, sendo amostrados 2 blocos em cada dia.

4.7.1. Avaliação de Condutância Estomática e Taxa transpiratória

Dois medidores de trocas gasosas em sistema aberto (modelos LCPro+ e LCProSD, ADC BioScientifics, UK) foram utilizados para medir a condutância estomática (g_s) e a taxa transpiratória (E). As medições foram realizadas com luz artificial ajustada à irradiação solar observada no momento das avaliações, CO_2 e temperaturas naturais da própria parcela, por três vezes na região mais elevada de uma folha expandida por parcela em quatro horários diferentes distribuídos ao longo do dia. Foi estabelecida a curva de resposta horária nos dois parâmetros para dois pares de dias (15º e 16º; 25º e 26º dias de experimento).

4.7.2. Monitoramento do Conteúdo Relativo de água

Para determinar o conteúdo relativo de água (CRA), discos foliares foram extraídos e prontamente pesados para obtenção da massa fresca (MF). Os mesmo discos foram mantidos imersos em água destilada por 24h à 4°C, sendo posteriormente pesados novamente para obtenção da massa túrgida (MT). Por fim, os mesmos discos foram secados em estufa por 72h a 60°C, obtendo-se então a massa seca (MS), para cálculo do conteúdo relativo de água da folha (CRA), através da relação $CRA = (MF - MT) / (MS - MT) \times 100$.

Foram coletados discos da região central de duas folhas expandidas de *P.maximum* por parcela em cinco horários diferentes distribuídos ao longo do curso diurno e um par de dias (21º e 23º dias de experimento).

4.7.3 Temperatura foliar

Foi usado um medidor de temperatura de superfície (Testo 905-T2) para a medição da temperatura foliar (T_f , °C). A temperatura foi aferida da mesma forma e na mesma folha coletada para avaliação de CRA, segundos antes da coleta.

4.8. Quantificação de biomassa

Ao fim do experimento foi coletada de três touceiras escolhidas ao acaso, toda a biomassa aérea (folhas+caule) e todas as raízes de uma cova de 40cm de diâmetro por 20cm de profundidade ao redor do eixo de cada touceira. Este material foi seco durante 72 horas a 60°C, separado entre folhas, caule e raízes e posteriormente pesado. Em posse destes dados foi feita a estimativa da massa (g) de estrato por perfilho.

4.9. Análises Estatísticas

Os dados foram analisados segundo delineamento experimental em blocos casualizados, com três fatores fixos (CO₂, temperatura e bloco), sendo dois níveis (ambiente e elevado) para os fatores CO₂ e temperatura e quatro níveis para o fator bloco (n=4). Foi feita a análise de variância para verificar a ocorrência de efeito dos fatores principais e da interação CO₂xTemperatura sobre as variáveis resposta, sob nível de significância de 10%. Todas as análises foram conduzidas através do software R (R core team, 2013).

5. Resultados e Discussão

Os resultados estão organizados por parâmetro avaliado e por par de dias amostrados, para efeitos comparativos, foi calculado o déficit de pressão de vapor (DPV) médio do curso diurno para cada par de dias (Figuras 10, 13,16,18, 20, 22) com base nos dados microclimáticos contínuos registrados pela estação microclimática, a discussão de cada variável será feita individualmente.

5.1. Condutância Estomática (g_s)

5.1.1. 15º e 16º dias de experimento

Os dados obtidos para este parâmetro foram resumidos em forma gráfica (Figura 11) e foi produzida uma tabela resumindo os resultados das análises estatísticas para cada horário (Tabela 1).

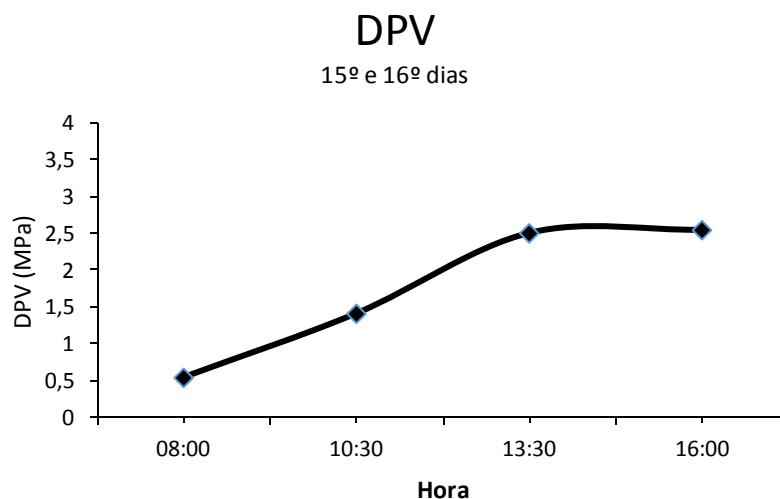


Figura 10. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 15º e 16º dias

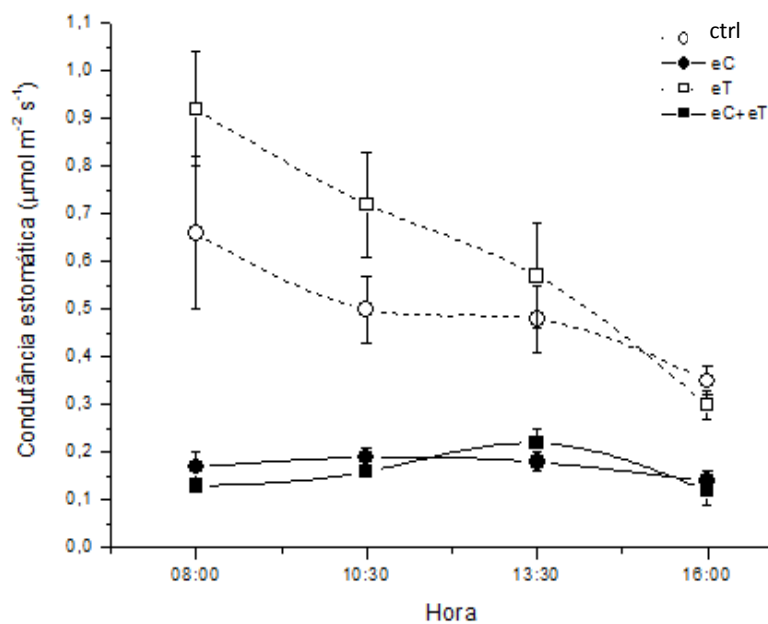


Figura 11. Curvas horárias de condutância estomática (g_s) nos quatro tratamentos para o 15º e 16º dias. **ctrl**=plantas sob CO_2 e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO_2 elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO_2 ambiente e temperatura elevada

(+2°C); **eT** = plantas sob CO₂ elevado e temperatura elevada. Os pontos representam o valor médio observado para cada tratamento ± erro padrão (barras verticais), n=4.

Tabela 1. Resposta da condutância estomática aos tratamentos durante o curso diurno nos 15^o e 16^o dias de experimento. **Ctrl**=plantas sob CO₂ e temperatura ambientes; **eCO₂**=plantas sob CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eT+eCO₂**= plantas sobre CO₂ elevado e temperatura elevada.

Hora do dia	g_s (mol m ⁻² s ⁻¹)				ANOVA
	Valores médios (erro padrão)				
	Ctrl	eCO ₂	eT	eT+eCO ₂	
8:00	0,68 (0,172)	0,19 (0,039)	0,82 (0,149)	0,13 (0,006)	F_B: 2,921 p=0,0927* F_C: 57,715 p<0,001*** F _T : 0,077 p=0,787 F _{C:T} : 1,638 p=0,232
10:30	0,46 (0,080)	0,20 (0,024)	0,60 (0,075)	0,15 (0,019)	F _B : 0,551 p=0,66 F_C: 48,581 p<0,001*** F _T : 0,167 p=0,692 F _{C:T} : 3,031 p=0,116
13:30	0,48 (0,070)	0,18 (0,020)	0,53 (0,099)	0,21 (0,021)	F _B : 0,369 p=0,778 F_C: 30,792 p<0,001*** F _T : 0,553 p=0,476 F _{C:T} : 0 p=0,986
16:00	0,37 (0,041)	0,13 (0,018)	0,29 (0,045)	0,12 (0,024)	F_B: 4,743 p=0,030* F_C: 71,491 p<0,001*** F _T : 3,107 p=0,112 F _{C:T} : 1,856 p=0,206

F_{B,C,T,C:T}=Valor F para os fatores Bloco, CO₂ e Temperatura e a Interação CO₂:Temperatura (n=4)
*p<0,1; **p<0,05; ***p<0,01

Nos 15^o e 16^o dias de experimento, foi observada influência extremamente significativa do fator CO₂ tanto na intensidade quanto no padrão da resposta, sendo a g_s observada em tratamentos com nível elevado deste fator em média 78,66%; 66,97%; 61,39% e 61,12% menores que nos tratamentos que tiveram nível ambiente, respectivamente nos horários das 6h, 10h30, 13h30 e 16h (Tabela 1), variando ao redor de 0,16 μmol m⁻² s⁻¹ (±0,045) nos tratamentos com CO₂ elevado, enquanto os tratamentos com CO₂ ambiente apresentaram maior variação ao redor de 0,55 μmol m⁻² s⁻¹ (±0,256).

De forma geral, nos tratamentos com fator CO₂ ambiente foi verificada diminuição da condutância estomática ao longo do dia, enquanto a g_s dos

tratamentos com este fator elevado se manteve constante em um nível baixo (Figura 11).

A resposta do estômato à variação no DPV, expressa a dinâmica do estomática quando em variada DPV, foi avaliada cruzando-se os dados de g_s com o DPV obtido individualmente para cada parcela em um mesmo horários entre os dois dias de coleta e a temperatura do ar em cada parcela (Figura 12).

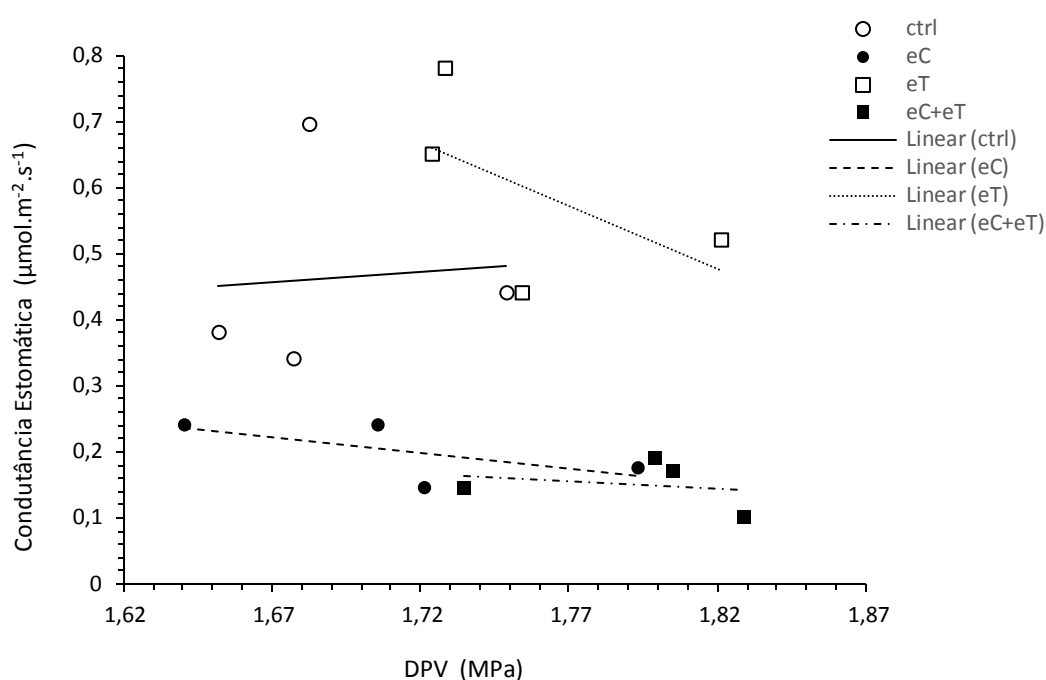


Figura 12. Regressão linear da resposta do estômato à variação no DPV encontrada às 10h30 nos 15^o e 16^o dias de experimento. **ctrl**=plantas sobre CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sobre CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2^oC); **eT** = plantas sobre CO₂ elevado e temperatura elevada. Os pontos representam os valores obtidos por parcela.

Esta resposta demonstrou-se linear e sempre com valores menores de g_s nos tratamentos com o fator CO₂ elevado, porém não é possível observar padrão de resposta ao fator temperatura elevada ou interação entre fatores aparentes nestes dois dias.

5.1.2. 25º e 26º dias de experimento

Os dados obtidos para este parâmetro foram resumidos em forma gráfica (Figura 14) e foi produzida uma tabela resumindo os resultados das análises estatísticas para cada horário (Tabela 2).

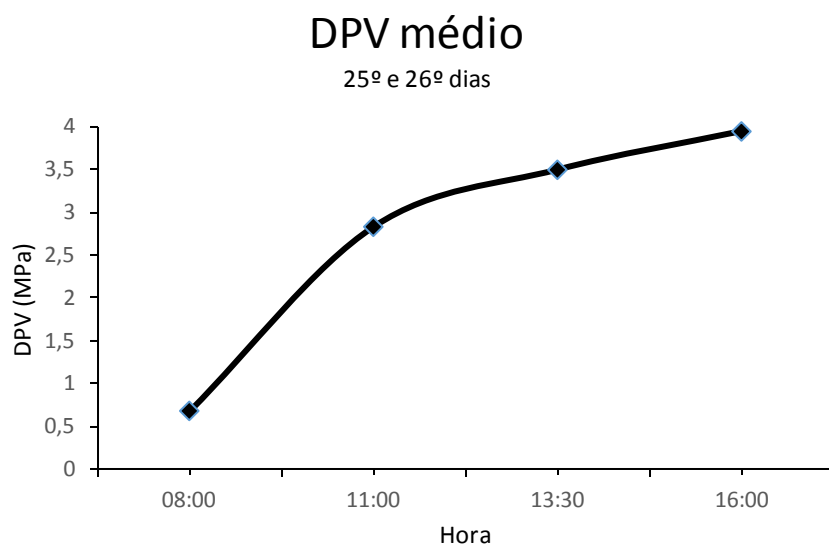


Figura 13. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 25º e 26º dias.

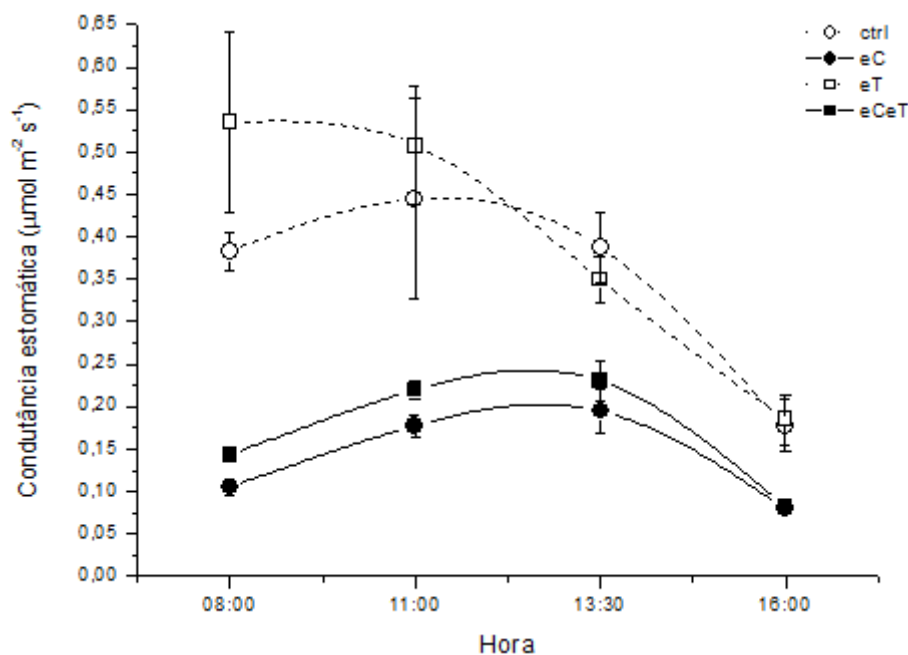


Figura 14. Curvas horárias de condutância estomática (g_s) nos quatro tratamentos para o 25º e 26º dias. **ctrl**=plantas sob CO_2 e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO_2 elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO_2 ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eCeT** = plantas sob CO_2 elevado e temperatura elevada. Os pontos representam o valor médio observado para cada tratamento \pm erro padrão (barras verticais), n=4.

Tabela 2. Resposta da condutância estomática aos tratamentos durante o curso diurno nos 25^o e 26^o dias de experimento. **Ctrl**=plantas sob CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2^oC); **eT+eC**= plantas sob CO₂ elevado e temperatura elevada.

Hora do dia	g_s (mol m ⁻² s ⁻¹)				ANOVA
	Valores médios (erro padrão)				
	Ctrl	eC	eT	eT+eC	
8:00	0,38	0,11	0,54	0,14	F _B : 0,806 p=0,521
	(0,023)	(0,009)	(0,107)	(0,007)	F _C : 66,843 p<0,001*** F _T : 4,044 p=0,075* F _{C:T} : 0,398 p=0,544
11:00	0,46	0,18	0,49	0,22	F _B : 19,11 p=0,198
	(0,118)	(0,012)	(0,088)	(0,013)	F _C : 21,139 p<0,001*** F _T : 0,798 p=0,395 F _{C:T} : 0,021 p=0,889
13:30	0,39	0,20	0,35	0,23	F _B : 1,137 p=0,385
	(0,041)	(0,026)	(0,027)	(0,023)	F _C : 28,074 p<0,001*** F _T : 0,002 p=0,967 F _{C:T} : 1,511 p=0,250
16:00	0,18	0,08	0,18	0,08	F _B : 10,324 p=0,002**
	(0,031)	(0)	(0,002)	(0,030)	F _C : 90,737 p<0,001*** F _T : 12,91 p=0,285 F _{C:T} : 1,354 p=0,274

F_{B,C,T,C:T}=Valor F para os fatores Bloco, CO₂ e Temperatura e a Interação CO₂:Temperatura (n=4)
*p<0,1; **p<0,05; ***p<0,01

Nos 25^o e 26^o dias de experimento o fator CO₂ elevado manteve-se como importante supressor da condutância estomática. Por efeito do fator CO₂ elevado foram observados redução da g_s em torno de 72,83%; 57,89%; 41,89% e 55,55% respectivamente nos horários das 8h, 11h, 13h30 e 16h em relação ao controle. Porém houve uma mudança no padrão de resposta com grande variação de em torno de 0,31 μmol m⁻² s⁻¹(±0,23) apresentando valores menores de g_s às 8h e às 16h.

O fator temperatura apresentou resposta significativa no horário das 8h, com g_s em média 38,76% maior nos tratamentos que apresentaram nível elevado deste fator.

A diferença observada no padrão de resposta da g_s ao CO₂ elevado entre o 25^o e 26^o dias e o 15^o e 16^o dias, certamente tem relação com a grande

diferença entre o DPV aferido entre os pares de dias, o qual manteve-se em torno do meio dia numa média de 1,96 Mpa no 15º e 16º dias e a 3,15 Mpa no 25º e 26º dias. A g_s foi mais afetada pelo fator CO_2 em DPVs maiores, sofrendo maior redução. Esta maior sensibilidade, já foi observada por outros trabalhos (OECHEL; STRAIN, 1985; TYREE; ALEXANDER, 1993; TALBOTT; RAHVEH; ZEIGER, 2003) e indica a tendência da elevada C_a a amenizar os efeitos do estresse hídrico para espécies vegetais.

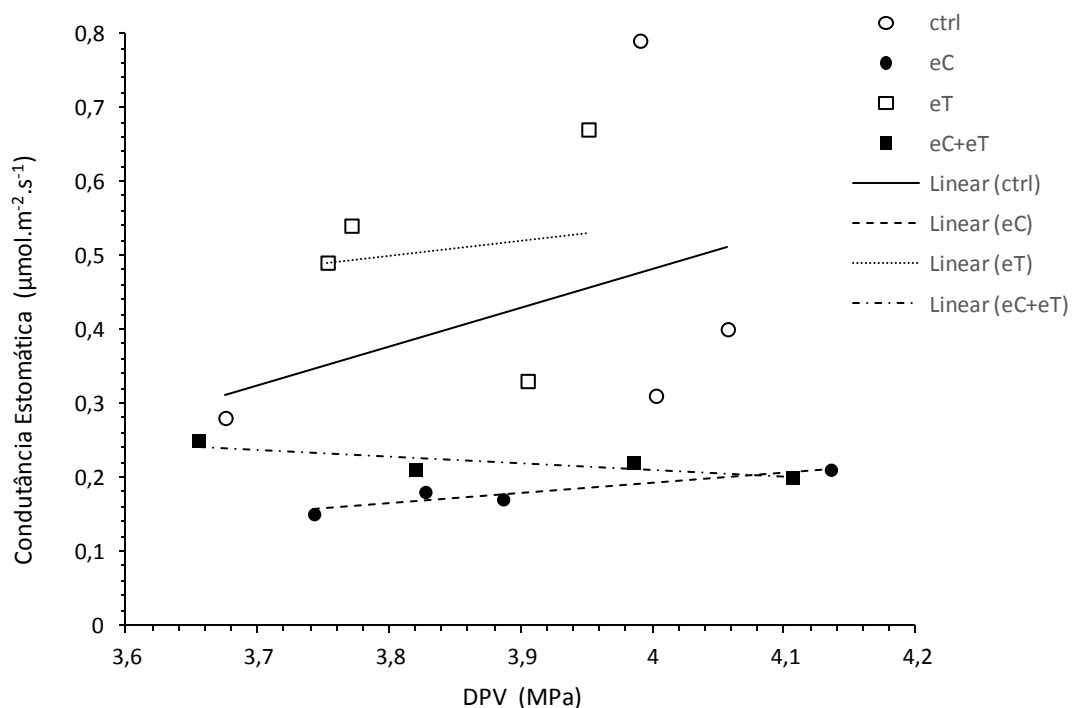


Figura 15. Regressão linear da resposta do estômato à variação no DPV encontrada às 11h nos 25º e 26º dias de experimento. **ctrl**=plantas sobre CO_2 e temperatura ambientes; **eC**=plantas sobre CO_2 elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO_2 ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eC+eT** = plantas sobre CO_2 elevado e temperatura elevada. Os pontos representam os valores obtidos por parcela.

Os 25º e 26º dias apresentaram maior amplitude nos valores observados de DPV, e sempre maiores que os observados nos 15º e 16º dias, isso pode ter permitido melhor visualização dos efeitos do tratamento.

A resposta estomática ao DPV (Figura 15), mostrou-se bastante semelhante à resposta obtida no primeiro par de dias, apresentando valores de g_s sempre menores em tratamentos com o fator CO₂ elevado. Neste caso foi observada interação entre os fatores CO₂ e Temperatura, existindo uma relação positiva entre DPV e g_s no tratamento apenas com o fator CO₂ elevado a qual se torna negativa com a adição do fator temperatura.

Já foi observada esta resposta do estômato ao DVP em diferentes concentrações de CO₂ a temperatura constante (MAHERALI; JOHNSON; JACKSON, 2003) e foi detectada mudança no padrão de resposta do estômato ao DVP em diferentes temperaturas a C_a ambiente (COLLATZ et al., 1991), porém sem efeito de inversão do padrão de resposta, como foi observado em no tratamento com Temperatura elevada comparado ao tratamento com Temperatura e CO₂ elevados.

5.2. Taxa Transpiratória (*E*)

5.2.1. 15º e 16º dias de experimento

Os dados obtidos para este parâmetro foram resumidos em forma gráfica (Figura 17) e foi produzida uma tabela resumindo os resultados das análises estatísticas para cada horário (Tabela 3).

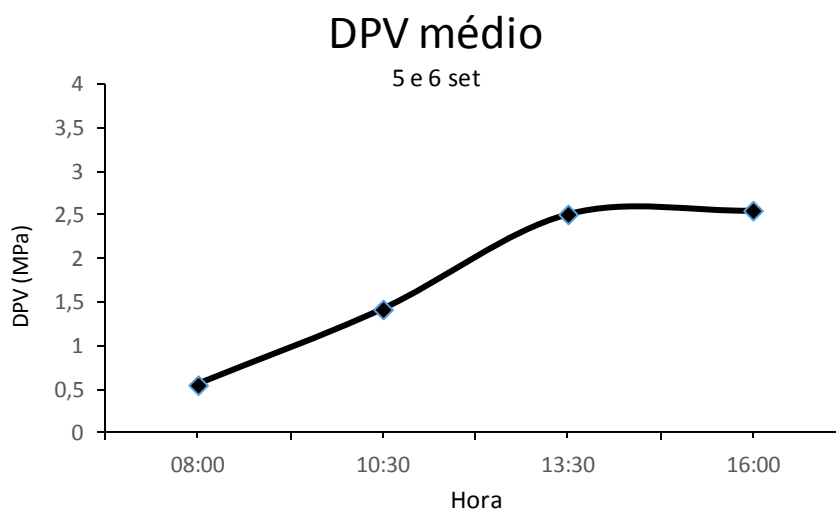


Figura 16. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 15º e 16º dias

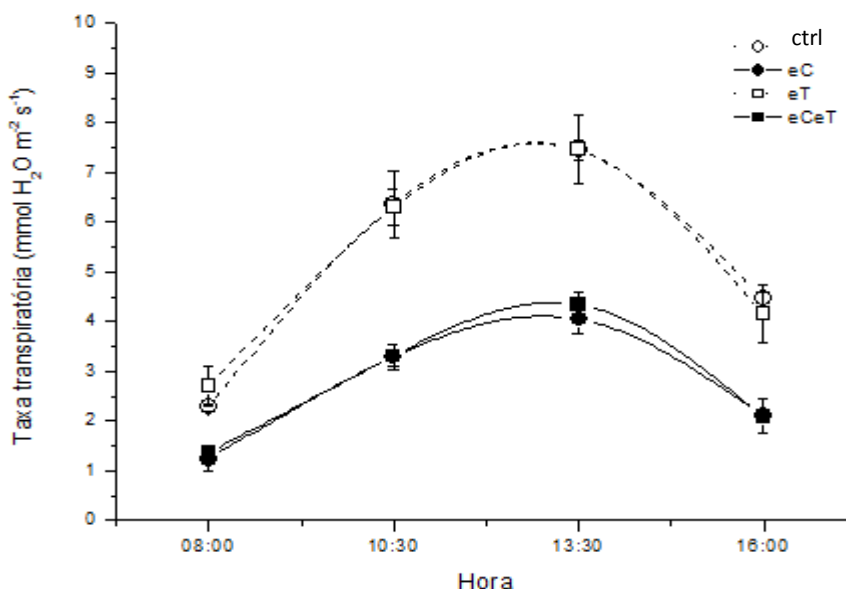


Figura 17. Curvas horárias de taxa transpiratória (*E*) nos quatro tratamentos para os 15º e 16º dias. **ctrl**=plantas sob CO_2 e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO_2 elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO_2 ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eCeT** = plantas sob CO_2 elevado e temperatura elevada. Os pontos representam o valor médio observado para cada tratamento \pm erro padrão (barras verticais), $n=4$.

Tabela 3. Resposta da taxa transpiratória aos tratamentos durante o curso diurno nos 15^o e 16^o dias de experimento. **Ctrl**=plantas sobre CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sobre CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eT+eC**= plantas sobre CO₂ elevado e temperatura elevada.

Hora do dia	E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)				ANOVA
	Valores médios (erro padrão)				
	Ctrl	eC	eT	eT+eC	
8:00	2,53	1,48	2,69	1,39	F_B: 5,895 p=0,017**
	(0,221)	(0,305)	(0,418)	(0,178)	F_C: 35,332 p<0,001*** F _T : 0,044 p=0,838 F _{C:T} : 0,4 p=0,543
10:30	6,35	3,3	6,43	3,33	F _B : 2,301 p=0,146
	(0,775)	(0,288)	(0,354)	(0,247)	F_C: 67,662 p<0,001*** F _T : 0,042 p=0,841 F _{C:T} : 0,013 p=0,912
13:30	7,63	3,9	7,3	4,36	F _B : 1,313 p=0,329
	(0,172)	(0,247)	(0,793)	(0,321)	F_C: 58,362 p<0,001*** F _T : 0,023 p=0,883 F _{C:T} : 0,823 p=0,388
16:00	4,32	2,02	4,21	1,72	F_B: 10,497 p=0,003**
	(0,347)	(0,322)	(0,644)	(0,314)	F_C: 105,107 p<0,001*** F _T : 0,771 p=0,403 F _{C:T} : 0,174 p=0,686

F_{B,C,T,C:T}=Valor F para os fatores Bloco, CO₂ e Temperatura e a Interação CO₂:Temperatura (n=4)
*p<0,1; **p<0,05; ***p<0,01

Em todos os horários avaliados nos 15^o e 16^o dias, foi observada influência significativa do fator CO₂ sobre a E , sendo nos tratamentos com CO₂ elevado em média 45,02%; 48,12%; 44,67% e 56,15% menores que nos tratamentos com CO₂ ambiente, nos horários das 8h, 10h30, 13h30 e 16h, respectivamente. No entanto não foi observado efeito significativo do fator Temperatura ou interação entre os fatores.

5.2.2. 25º e 26º dias de experimento

Os dados obtidos para este parâmetro foram resumidos em forma gráfica (Figura 19) e foi produzida uma tabela resumindo os resultados das análises estatísticas para cada horário (Tabela 4).

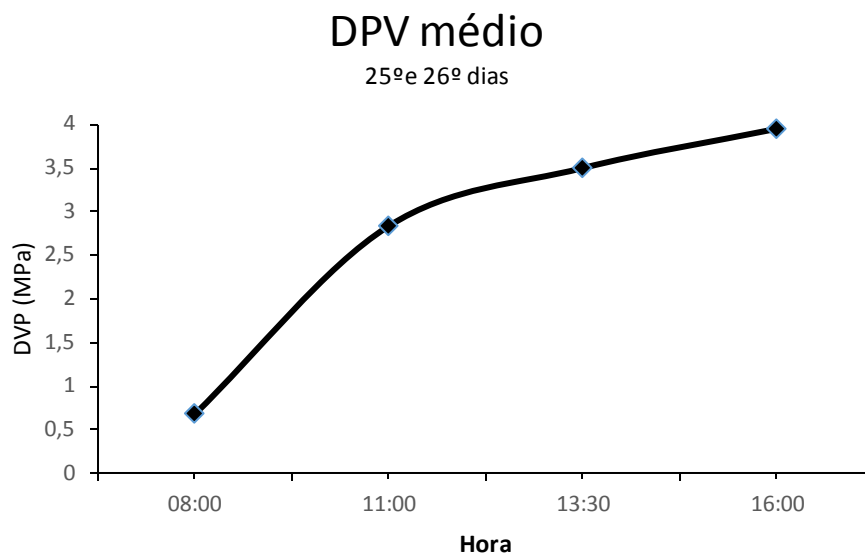


Figura 18. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 25º e 26º dias.

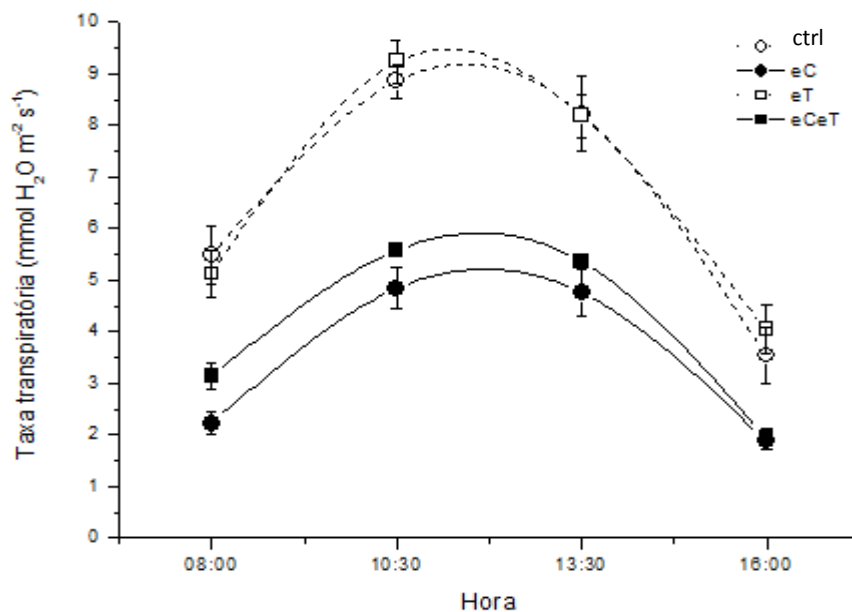


Figura 19. Curvas horárias de taxa transpiratória (E) nos quatro tratamentos para os 25º e 26º dias. **ctrl**=plantas sob CO_2 e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO_2 elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO_2 ambiente e temperatura elevada ($+2^\circ\text{C}$); **eCeT** = plantas sob CO_2 elevado e temperatura elevada. Os pontos representam o valor médio observado para cada tratamento \pm erro padrão (barras verticais), $n=4$.

Tabela 4 Resposta da taxa transpiratória aos tratamentos durante o curso diurno 25^o e 26^o dias de experimento. **Ctrl**=plantas sobre CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sobre CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2^oC); **eT+eC**= plantas sobre CO₂ elevado e temperatura elevada.

Hora do dia	<i>E</i> (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)				ANOVA
	Valores médios (erro padrão)				
	Ctrl	eC	eT	eT+eC	
8:00	5,45 (0,621)	2,17 (0,189)	5,13 (0,441)	3,17 (0,370)	F_B: 5,861 p=0,017** F_C: 95,344 p<0,001*** F _T : 3,037 p=0,115 F_{C:T}: 7,076 p=0,026**
11:00	8,42 (0,368)	4,91 (0,404)	9,35 (0,537)	5,50 (0,104)	F _B : 3,26 p=0,074 F_C: 141,572 p<0,001*** F_T: 6,11 p=0,036** F _{C:T} : 0,316 p=0,588
13:30	8,22 (0,734)	4,76 (0,461)	8,18 (0,424)	5,35 (0,134)	F_B: 11,98 p=0,002** F_C: 146,104 p<0,001*** F _T : 1,428 p=0,263 F _{C:T} : 1,025 p=0,388
16:00	3,52 (0,580)	1,85 (0,136)	4,01 (0,495)	1,85 (0,173)	F_B: 10,324 p=0,003** F_C: 90,737 p<0,001*** F _T : 1,291 p=0,285 F _{C:T} : 1,354 p=0,274

F_{B,C,T,C:T}=Valor F para os fatores Bloco, CO₂ e Temperatura e a Interação CO₂:Temperatura (n=4)
*p<0,1; **p<0,05; ***p<0,01

Nos 25^o e 26^o dias, a resposta da *E* ao fator CO₂ foi significativa e semelhante à dos 15^o e 16^o dias, demonstrando nos tratamentos em que este fator foi elevado, valores 49,53%; 41,42%; 44,68% e 50,86% menores do que os observados nos tratamentos com CO₂ ambiente, às 8h, 11h, 13h30 e 16h respectivamente. No horário das 8h foi observada interação significativa deste fator com o fator temperatura, sendo a *E* 46,08% maior no tratamento que apresenta nível elevado nos dois fatores, quando comparada com tratamento apenas com CO₂ elevado.

A influência do fator temperatura foi significativa apenas no horário das 11h, sendo a *E* 11,4% maior em tratamentos nos quais o fator foi elevado (eT e eT+eC). O padrão de resposta da *E* foi bastante semelhante ao da *g_s*, conforme o esperado, porém a redução provocada pelo fator CO₂ elevado na *E*

não foi tão intensa quanto na g_s , esta diferença pode ser explicada pela relação moduladora existente entre a E e a T_f , uma vez que uma redução na E induz aumento na T_f o que, por sua vez, promove aumento na E suprimindo, em parte, os efeitos de uma g_s reduzida (CURE; ACOCK, 1986).

5.3. Temperatura Foliar

21º e 23º dias de experimento.

Os dados obtidos para este parâmetro foram resumidos em forma gráfica (Figura 21) e foi produzida uma tabela resumindo os resultados das análises estatísticas para cada horário (Tabela 5).

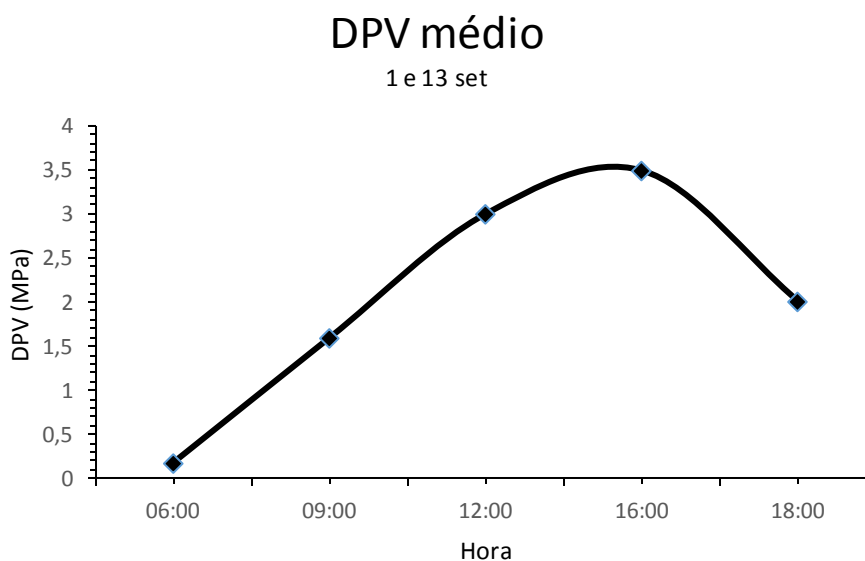


Figura 20. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 21º e 23º dias.

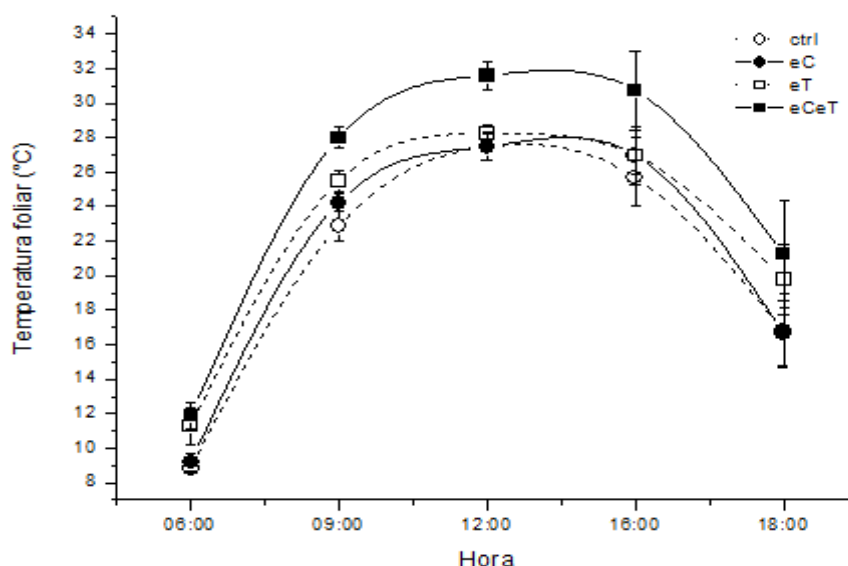


Figura 21. Curvas horárias de temperatura foliar (T_f) nos quatro tratamentos para os 21º e 23º dias. **ctrl**=plantas sob CO_2 e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO_2 elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO_2 ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eT** = plantas sob CO_2 elevado e temperatura elevada. Os pontos representam o valor médio observado para cada tratamento \pm erro padrão (barras verticais), $n=4$.

Tabela 5. Resposta da temperatura foliar aos tratamentos durante o curso diurno nos 21^o e 23^o dias de experimento. **Ctrl**=plantas sobre CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sobre CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2^oC); **eT+eC**= plantas sobre CO₂ elevado e temperatura elevada

Horário	T _f (°C) (erro padrão)				ANOVA
	Ctrl	eC	eT	eT+eC	
6:00	8,85 (0,264)	9,18 (0,492)	11,28 (1,037)	11,9 (0,775)	F_B: 8,457 p=0,006*** F _C : 1,398 p=0,267 F_T: 39,346 p<0,001*** F _{C:T} : 0,130 p=0,726
9:00	22,86 (0,854)	24,23 (0,507)	25,49 (0,62)	27,99 (0,627)	F _B :1,226 p=0,356 F_C: 8,935 p=0,015** F_T: 24,435 p<0,001*** F _{C:T} : 0,775 p=0,402
12:00	27,45 (0,808)	27,48 (0,795)	28,21 (0,528)	31,59 (0,789)	F_B: 2,589 p=0,118 F_C: 7,388 p=0,024** F_T: 15,188 p=0,004*** F_{C:T}: 7,172 p=0,025**
15:00	25,68 (1,596)	26,96 (1,702)	26,95 (1,111)	30,69 (2,295)	F_B: 30,893 p<0,001*** F_C: 17,284 p=0,002*** F_T: 17,779 p=0,002*** F_{C:T}: 3,695 p=0,087*
18:00	16,79 (2,113)	16,68 (1,894)	19,76 (2,025)	21,24 (3,148)	F_B: 19,403 p<0,001*** F _C : 0,471 p=0,510 F_T: 14,420 p=0,004** F _{C:T} : 0,640 p=0,444

F_B;C;T;C:T=Valor F para os fatores Bloco, CO₂ e Temperatura e a Interação CO₂:Temperatura (n=4)
*p<0,1; **p<0,05; ***p<0,01

A variação geral da T_f ao longo do dia seguiu o padrão lógico esperado, acompanhando o crescimento da intensidade luminosa e da temperatura ambiente (dados não apresentados) até o meio do dia e seu posterior declínio até fim do dia.

A resposta ao fator aquecimento foi positiva, apresentando-se significativamente maior em todos os horários, porém estando condicionada pelo horário em si, demonstrando valores variando de até 8,87% maiores ao meio-dia até extremos de 28,56% e 28,5% maiores às 6h e às 15h, respectivamente. Este padrão de resposta pode ser diretamente relacionado ao padrão de variação da E, a qual se eleva de forma acentuada ao meio dia,

produzindo efeito de arrefecimento (CLEMENTS, 1934), provavelmente atenuando os efeitos do aquecimento sobre aT_f .

O fator CO_2 elevado induziu alterações significativas em todos os horários exceto às 6h e às 18h, produzindo incremento na T_f de 8% às 9h, 6,13% ao meio-dia e de 7,95% às 15h, houve efeito interativo com o fator aquecimento, sendo observada resposta 14,96% maior ao meio-dia e 13,84% maior às 15h quando os fatores foram associados. O aumento da temperatura foliar em resposta ao fator CO_2 elevado pode ser explicado por seu efeito de redução na g_s , o que reduz a E , e conseqüentemente, a taxa de arrefecimento.

5.4. Conteúdo Relativo de Água

21º e 23º dias de experimento.

Os dados obtidos para este parâmetro foram resumidos em forma gráfica (Figura 22) e foi produzida uma tabela resumindo os resultados das análises estatísticas para cada horário (Tabela 6).

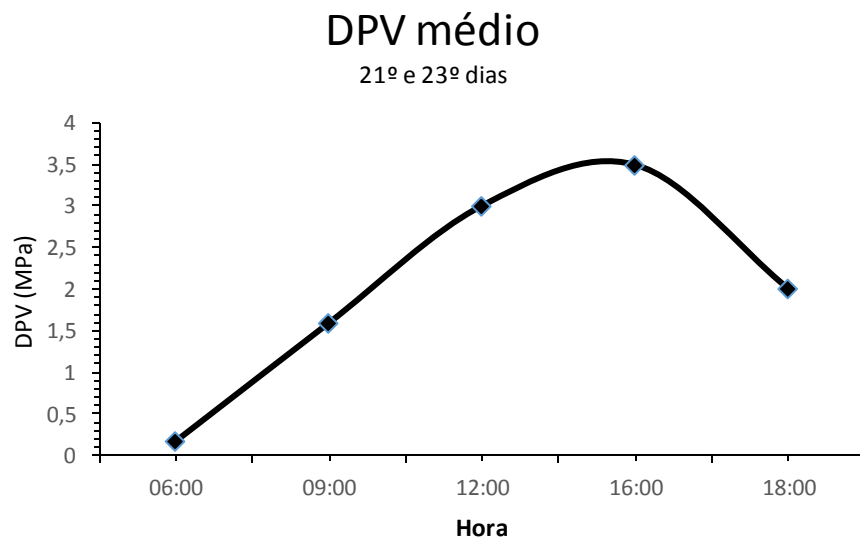


Figura 22. Déficit de Pressão de Vapor médio observado no curso diurno para os 21º e 23º dias.

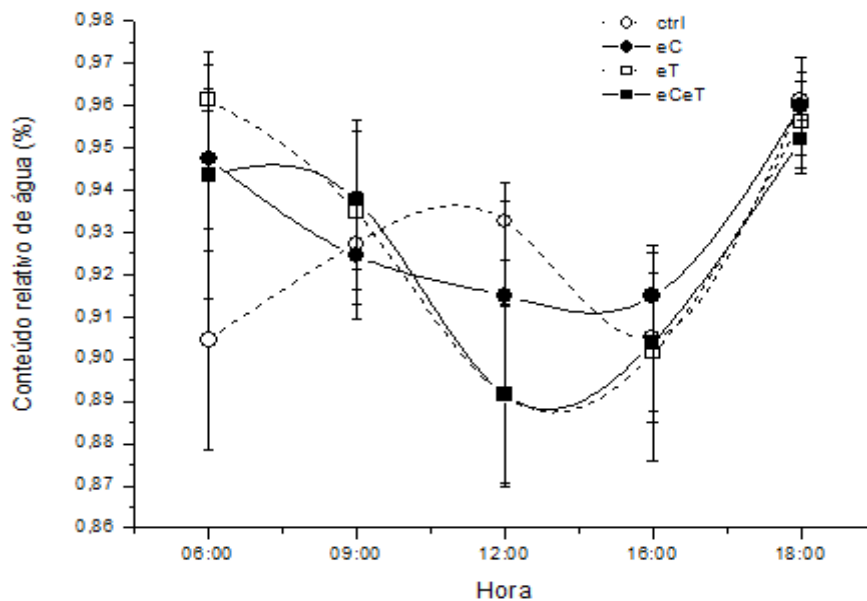


Figura 23. Curvas horárias de Conteúdo Relativo de Água (CRA) nos quatro tratamentos para os 21º e 23º dias. **ctrl**=plantas sob CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eT** = plantas sob CO₂ elevado e temperatura elevada. Os pontos representam o valor médio observado para cada tratamento ± erro padrão (barras verticais), n=4.

Tabela 6. Resposta do Conteúdo Relativo de Água foliar durante o curso diurno nos 11^o e 13^o dias de experimento. **Ctrl**=plantas sobre CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sobre CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2^oC); **eT+eC**= plantas sobre CO₂ elevado e temperatura elevada

Horário	CRA (%) (erro padrão)				ANOVA
	Ctrl	eC	eT	eT+eC	
6:00	0,9 (0,026)	0,95 (0,022)	0,96 (0,003)	0,94 (0,029)	F _B : 1,441 p=0,294 F _C : 1,273 p=0,288 F _T : 1,023 p=0,338 F _{C:T} : 0,041 p=0,845
9:00	0,94 (0,009)	0,92 (0,015)	0,95 (0,014)	0,94 (0,016)	F_B: 15,630 p<0,001*** F _C : 2,369 p=0,158 F_T: 3,671 p=0,087* F _{C:T} : 0,016 p=0,902
12:00	0,92 (0,007)	0,91 (0,021)	0,89 (0,022)	0,89 (0,022)	F_B: 14,795 p<0,001*** F _C : 0,009 p=0,928 F_T: 7,392 p=0,023** F _{C:T} : 0,014 p=0,907
15:00	0,91 (0,020)	0,91 (0,012)	0,91 (0,020)	0,90 (0,016)	F_B: 22,907 p<0,001*** F _C : 0,129 p=0,727 F _T : 0,273 p=0,613 F _{C:T} : 1,127 p=0,316
18:00	0,95 (0,006)	0,96 (0,012)	0,96 (0,012)	0,95 (0,007)	F_B: 5,180 p=0,023** F _C : 0,067 p=0,801 F _T : 0,386 p=0,549 F _{C:T} : 1,532 p=0,247

F_{B;C;T;C:T}=Valor F para os fatores Bloco, CO₂ e Temperatura e a Interação CO₂:Temperatura (n=4)
*p<0,1; **p<0,05; ***p<0,01

Durante o curso diurno, o CRA esboçou uma clara tendência de redução em direção ao meio do dia em todos os tratamentos (Figura 23), exceto o do grupo controle, e de recuperação desta perda em direção ao fim do dia. Este padrão de resposta é o esperado, visto que o horário do meio-dia é o que oferece maior estresse evaporativo (ENOCH; HURD, 1979).

A resposta diferenciada do grupo controle no curso diurno não aparenta ser significativa, visto que os conjuntos de dados obtidos às 6h apresentou grande variação (Tabela 6), variação esta que, em parte, pode ter sido causada

por alguma falha na metodologia de secagem da superfície foliar, visto que neste horário observou-se grande deposição de orvalho sobre as folhas, e uma secagem excessiva ou pouco efetiva pode alterar o CRA calculado negativa ou positivamente, respectivamente.

O fator aquecimento demonstrou efeito significativo sobre o CRA em alguns horários. Às 9h, foi observado efeito marginal deste fator com incremento de 1,6% no CRA em relação aos tratamentos sem temperatura elevada. Já às 12 horas, os tratamentos com temperatura elevada apresentaram valores de CRA 2,73% mais baixos. A resposta marginal obtida às 9h vai de encontro com o esperado para o fator aquecimento, visto que é conhecida a influência positiva do aquecimento no déficit hídrico de plantas, e além disto, esta resposta conflita com a resposta mais significativa, e esperada, obtida ao meio dia. A origem deste conflito de informações pode estar relacionada à grande variação de bloco encontrada nos horários influentes.

Neste parâmetro não foi observada resposta do fator CO_2 em nenhum momento do curso diurno, este fato é inesperado tendo em vista a resposta observada na g_s e na E , no entanto é explanável na esfera que leva em consideração o regime de rega adotado pelo experimento, o qual foi abundante. Vários trabalhos apontaram respostas do status hídrico a variação na C_a como sendo mais expressivas em plantas submetidas ao estresse hídrico, principalmente em plantas do tipo C_4 (TYREE; ALEXANDER, 1993; OWENSBY et al., 1997).

5.5. Biomassa

Tabela 7. Biomassa de Raiz, Caules e Folha aferida ao fim do experimento e estimada por perfilho. **Ctrl**=plantas sobre CO₂ e temperatura ambientes; **eCO₂**=plantas sobre CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sobre CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eT+eCO₂**=plantas sobre CO₂ elevado e temperatura elevada

Tratamento	Massa Seca (g por perfilho)			
	(% desvio em relação ao controle)			
	Raízes	Caules	Folhas	TOTAL
Ctrl	0,14	1,14	1,45	2,73
eC	0,21 (50)	1,47 (28)	1,29 (-12)	2,97 (8)
eT	0,19 (35)	1,7 (49)	1,88 (29)	3,77 (38)
eC+eT	0,33 (135)	1,7 (49)	1,97 (35)	4 (46)

Massa de raiz/Massa total

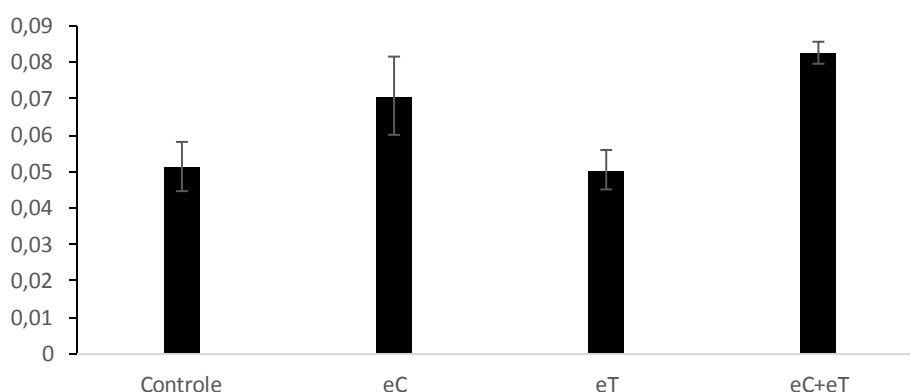


Figura 24. Proporção de massa seca de raiz em relação à massa total **Controle**=plantas sob CO₂ e temperatura ambientes; **eC**=plantas sob CO₂ elevado (600ppm) e temperatura ambiente; **eT**=plantas sob CO₂ ambiente e temperatura elevada (+2°C); **eT** = plantas sob CO₂ elevado e temperatura elevada. A colunas representam a proporção Massa Seca de Raiz/Massa Seca Total ± erro padrão (barras verticais no topo das coluna) n=4

O fator CO₂ demonstrou influência sobre o acúmulo de massa dos indivíduos de *P.maximum*, sendo que quando elevado resultou num incremento na biomassa total de em média 6,74% (Tabela 7), além de um significativo aumento na proporção de massa de raízes, 34,4% maior (Figura 24). Esta realocação de massa pode ser interpretada em vista do conhecido ganho na fotossíntese líquida em resposta a elevada C_a, o que promove uma maior produção de carboidratos e maior translocação de fotoassimilados para a raiz (TYREE; ALEXANDER, 1993).

5.6. Observação geral dos dados

O fator CO₂ quando elevado teve influência significativa sobre a g_s , estimulando sua redução independentemente do nível do fator temperatura. A intensidade desta resposta esteve condicionada pela combinação de fatores como, horário ou DPV, apresentando maior nível de resposta em horários próximos ao meio do dia e em situações de DPV mais elevado.

Esta supressão da abertura estomática refletiu negativamente sobre a E , produzindo o efeito de aumento na T_f em horários nos quais o DPV se demonstrou mais elevado. Estas alterações fisiológicas acarretaram em uma acentuada economia de água, que associada à realocação de biomassa para a raiz, contribuiria para a elevação do status hídrico da planta, porém, ao menos nas folhas, isto não aconteceu, não havendo diferença significativa no CRA foliar entre os níveis de CO₂.

6. Conclusão

Foi corroborada a hipótese de que a elevada concentração de CO₂ teria efeito de fechamento estomático e redução na taxa transpiratória, porém não foi observado aumento no conteúdo hídrico da folha.

A hipótese de que a temperatura elevada modificaria a resposta do estômato em elevada C_a foi refutada, esta interação não foi observada de forma significativa.

7. Considerações Finais

O experimento trouxe resultados relevantes sobre o comportamento hídrico de *P. maximum* em tratamento de Ca a 600ppm, o qual revelou importantes alterações em parâmetros relacionados ao uso da água.

De forma geral, o CO₂ provocou melhoria em parâmetros que viriam a aliviar os estresse hídrico da planta. A interação entre os fatores CO₂ e Temperatura não se demonstrou muito influente no padrão de resposta no parâmetros avaliados

Com relação a um possível ambiente futuro de elevadas C_a e T_{mg} as informações obtidas com este trabalho, sugerem melhoria no status hídrico de plantas C₄ o que poderia ter grande impacto sobre culturas não irrigadas e pastagens, aumentando a produtividade líquida em momentos de baixa disponibilidade hídrica. Porém esta melhoria no status hídrico da planta não foi observada durante o experimento em si, e isto pode ser explicado pelo regime abundante de rega adotado, visto que vários trabalhos já revelaram a resposta de plantas C₄ ao CO₂ como sendo mais expressiva em situações de estresse hídrico (TYREE; ALEXANDER, 1993; OWENSBY *et al.*, 1997).

Assim, destaca-se a necessidade de investigações futuras sobre a resposta de indivíduos de *P. maximum* ao CO₂ elevado e ao aquecimento, em situação de baixa disponibilidade de água.

8. Referências Bibliográficas:

AINSWORTH, E. A.; LONG, S. P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. **New Phytologist**, v. 165, n. 2, p. 351-372 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01224.x> >.

AINSWORTH, E. A. et al. The Effects of Tropospheric Ozone on Net Primary Productivity and Implications for Climate Change*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 637-661 2012. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-042110-103829> >.

BERNACCHI, C. J. et al. Decreases in Stomatal Conductance of Soybean under Open-Air Elevation of [CO₂] Are Closely Coupled with Decreases in Ecosystem Evapotranspiration. **Plant Physiology**, v. 143, n. 1, p. 134-144 2007. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/143/1/134.abstract> >.

BROWN, H. T.; ESCOMBE, F. The influence of varying amounts of carbon dioxide in the air on the photosynthetic process of leaves and on the mode of growth of plants. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 70, n. 459-466, p. 397-413 1902.

BUCKLEY, T. N.; MOTT, K. A. Modelling stomatal conductance in response to environmental factors. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 9, p. 1691-1699 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12140> >.

CLEMENTS, H. F. Significance of transpiration. **Plant physiology**, v. 9, n. 1, p. 165 1934.

COLLATZ, G. J. et al. Physiological and environmental regulation of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration: a model that includes a laminar boundary layer. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 54, n. 2-4, p. 107-136 1991. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168192391900028> >.

CURE, J. D.; ACOCK, B. Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 38, n. 1-3, p. 127-145 1986. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168192386900547> >.

EDWARDS, E. J. et al. The Origins of C₄ Grasslands: Integrating Evolutionary and Ecosystem Science. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 587-591 2010. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/328/5978/587.abstract> >.

ENOCH, H. Z.; HURD, R. G. The effect of elevated CO₂ concentrations in the atmosphere on plant transpiration and water use efficiency. A study with potted carnation plants. **International Journal of Biometeorology**, v. 23, n. 4, p. 343-351 1979. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01553106> >.

FURBANK, R. T.; HATCH, M. D. Mechanism of C4 Photosynthesis: The Size and Composition of the Inorganic Carbon Pool in Bundle Sheath Cells. **Plant Physiology**, v. 85, n. 4, p. 958-964 1987. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/85/4/958.short> >.

GHANNOUM, O. et al. The growth response of C4 plants to rising atmospheric CO2 partial pressure: a reassessment. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 9, p. 931-942 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00609.x> >.

HENDREY, G.; LEWIN, K.; NAGY, J. Free air carbon dioxide enrichment: development, progress, results. **Vegetatio**, v. 104, n. 1, p. 17-31 1993.

IPCC (2013). Working Group I contribution to the IPCC fifth assessment report climate change 2013: The physical science basis (Summary for policymakers). Disponível em: < http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGIAR5-SPM_Approved27Sep2013.pdf >

KIMBALL, B. A. Theory and performance of an infrared heater for ecosystem warming. **Global Change Biology**, v. 11, n. 11, p. 2041-2056 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.1028.x> >.

KIMBALL, B. A.; CONLEY, M. M.; LEWIN, K. F. Performance and energy costs associated with scaling infrared heater arrays for warming field plots from 1 to 100 m. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 108, n. 1-2, p. 247-265 2012.

KIMBALL, B. A. et al. Infrared heater arrays for warming ecosystem field plots. **Global Change Biology**, v. 14, n. 2, p. 309-320 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01486.x> >.

KIMBALL, B. A.; KOBAYASHI, K.; BINDI, M. Responses of agricultural crops to free-air CO2 enrichment. In: (Ed.). **Advances in Agronomy**: Academic Press, v. Volume 77, 2002. p.293-368. ISBN 0065-2113.

KÖRNER, C. Biosphere responses to CO2 enrichment. **Ecological Applications**, v. 10, n. 6, p. 1590-1619 2000. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[1590:BRTCE\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[1590:BRTCE]2.0.CO;2) >. Acesso em: 2011/10/11.

LAL, R. Carbon sequestration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 815-830 2008. Disponível em: < <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/363/1492/815.abstract> >.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, SP: Rima, 2000. 531.

LONG, S. P. et al. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants FACE the Future*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 591-628 2004. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141610> >.

MAHERALI, H.; JOHNSON, H. B.; JACKSON, R. B. Stomatal sensitivity to vapour pressure difference over a subambient to elevated CO₂ gradient in a C₃/C₄ grassland. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 8, p. 1297-1306 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01054.x> >.

MIGLIETTA, F. et al. Free-air CO₂ enrichment (FACE) of a poplar plantation: the POPFACE fumigation system. **New Phytologist**, v. 150, n. 2, p. 465-476 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00115.x> >.

MURRAY, F. W. On the Computation of Saturation Vapor Pressure. **Journal of Applied Meteorology**, v. 6, n. 1, p. 203-204 1967. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1175/1520-0450\(1967\)006<0203:OTCOSV>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1175/1520-0450(1967)006<0203:OTCOSV>2.0.CO;2) >. Acesso em: 2013/10/18.

OECHEL, W. C.; STRAIN, B. Native species responses to increased atmospheric carbon dioxide concentration. **Direct effects of increasing carbon dioxide on vegetation**, p. 117-154 1985.

ORT, D. et al. SoyFACE: the effects and interactions of elevated [CO₂] and [O₃] on soybean. In: (Ed.). **Managed Ecosystems and CO₂**: Springer, 2006. p.71-86. ISBN 3540312366.

OWENSBY, C. et al. Water vapour fluxes and their impact under elevated CO₂ in a C₄-tallgrass prairie. **Global Change Biology**, v. 3, n. 3, p. 189-195 1997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2486.1997.00084.x> >.

PETIT, J. R. et al. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. **Nature**, v. 399, n. 6735, p. 429-436 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/20859> >.

SOUZA, A. P. D. et al. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 8, p. 1116-1127 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01822.x> >.

TALBOTT, L. D.; RAHVEH, E.; ZEIGER, E. Relative humidity is a key factor in the acclimation of the stomatal response to CO₂. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 390, p. 2141-2147 2003. Disponível em: < <http://jxb.oxfordjournals.org/content/54/390/2141.abstract> >.

TYREE, M.; ALEXANDER, J. Plant water relations and the effects of elevated CO₂: a review and suggestions for future research. **Vegetatio**, v. 104-105, n. 1, p. 47-62 1993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00048144> >.

VON CAEMMERER, S.; FURBANK, R. T. The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. **Photosynthesis Research**, v. 77, n. 2-3, p. 191-207 2003. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/klu/pres/2003/00000077/f0020002/05141150> >.

YOSHIMOTO, M.; OUE, H.; KOBAYASHI, K. Energy balance and water use efficiency of rice canopies under free-air CO₂ enrichment. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 133, n. 1-4, p. 226-246 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016819230500208X> >.

ZISKA, L. H.; SICHER, R. C.; BUNCE, J. A. The impact of elevated carbon dioxide on the growth and gas exchange of three C₄ species differing in CO₂ leak rates. **Physiologia Plantarum**, v. 105, n. 1, p. 74-80 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105112.x> >.