



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, CONSERVAÇÃO E MANEJO DA
VIDA SILVESTRE

TESE DE DOUTORADO

**Efeitos do aumento da concentração de CO₂ atmosférico e da elevação
da temperatura em plantas e suas interações biológicas**

LEANDRA BORDIGNON

Orientador: Prof. Geraldo Wilson Fernandes

Belo Horizonte/MG

Abril/ 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, CONSERVAÇÃO E MANEJO DA
VIDA SILVESTRE

**Efeitos do aumento da concentração de CO₂ atmosférico e da elevação
da temperatura em plantas e suas interações biológicas**

LEANDRA BORDIGNON

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre.

Orientador: Prof. Geraldo Wilson Fernandes

Belo Horizonte/MG

Abril/ 2016

Assinaturas

Apoio Financeiro:



Apoio Institucional:



Dedicatória

Aos meus pais, Ernesto e Nilda (*in memoriam*),
aos quais o amor e a gratidão serão eternos.

A minha tia Bernadete, que descobriu em mim uma bióloga ainda na infância,
incentivando-me nos primeiros experimentos, com joaninhas e vaga-lumes.

A professora Regina, por ter confirmado essa descoberta no ensino médio.

A todos os pesquisadores, que perceberam os indícios e o perigo das mudanças
climáticas, por não desistirem frente às argumentações dos céticos.

A todos os que lutam para mitigar as mudanças climáticas, aos que lutam para
conhecer seus efeitos e aos que contribuem diariamente, através de seus impostos, para
que possamos continuar pesquisando.

Agradecimentos

Muitas pessoas contribuíram para este trabalho das mais variadas formas. Algumas por facilitarem a troca de experiências quando isso ainda era um ‘projeto’, outras por terem permitido que ele se tornasse realidade, ou ainda, pelo apoio amigo tão imprescindível nos momentos menos animadores deste trabalho. A todos o meu sincero agradecimento. Em particular,

Ao professor Geraldo Wilson Fernandes, pelo melhor presente de aniversário de 2011, quando enviou um e-mail convidando-me para esta aventura. Obrigada por ter aceito minha contraproposta e pelas oportunidades de evolução ao longo desses anos.

A todas as mulheres que lutaram no passado, para que hoje eu pudesse frequentar uma academia científica. Sintam-se todas homenageadas através da minha banca, feminina e étnica, de exame de qualificação: Yumi, Ana Carolina, Simone e Ana Paula, grata pelas valiosas sugestões e contribuições. À profa. Soraia pelo empurrão para que eu voltasse a fazer parte deste mundo. À profa. Tatiana, minha tutora de tese, pelo exemplo que é para mim, e pela disponibilidade em ajudar. À minha irmã, Liane, por me fazer acreditar sempre que posso ir mais longe.

Aos meus queridos estagiários, aos quais o carinho e a gratidão é imensurável. Obrigada de coração por abraçarem essa causa. Em especial, Áurea, Érika, Mariana, Lucas, Marcela, Gabriela, Laila e Marina. Eu não posso deixar de agradecer ao café especial do Lucas, que me manteve acordada nos muitos dias de estufa, aos deliciosos bolos de cenoura da carinhosa “*mamãe Áurea*” que adoçava a equipe toda. A disponibilidade da Érika, que mesmo sendo estagiária de outro projeto nos ajudou muito. E o que eu seria sem a organização da Mari, Marcela e Gabriela? Meus braços direitos e cabeça! Nina, sem você a estufa não seria a mesma (rsrs), obrigada a você e à

Laila por virem somar a este grupo. À querida Fabiola, pela amizade que permitia contar com sua ajuda até na véspera de Natal. Obrigada também aos Pedros, I e II, ao Nezito, ao Rodrigo, à Mayara, Raquel, Natalici, Brenda, Ana Carolina, Thaíse, Maira, Geanne e tantos outros deram apoio em algum momento lá na estufa. Obrigada por terem tornado os meus dias de *elevado CO₂* e *alta temperatura* melhores.

À botânica, o departamento que generosamente me acolheu. Sou muito grata ao prof. Marcel por ser tão solícito, por toda troca de experiência e ensinamentos. À Socorro por toda atenção e presteza em ajudar-me desde o preparo de soluções até a manipulação de equipamentos. Ao prof. Pires e profa. Luzia pelos equipamentos e laboratório emprestados. E em especial à Ana Paula, por toda ajuda e tudo que veio a somar neste trabalho, obrigada também por sua valiosa amizade.

Aos meus colegas de classe e laboratório. Em especial aos que se tornaram amigos e pude compartilhar também bons momentos fora da academia. Lore e Paulinha, obrigadíssima pela mais divertida terapia de grupo sobre teses. Aninha, obrigada pela doce existência em minha vida, pelas contribuições e incentivo. Ana Claudia, minha teacher querida, love you! Marina, a minha gratidão vai muito além das ajudas com o R, te admiro e considero muito. À Carol, pela acolhida no Leeb e parceria em tantas disciplinas. Thaíse, o México não seria o mesmo sem a parceria Bordignon & Bahia! À Dulce, minha querida amiga sem fronteiras, obrigada por todo apoio e carinho. À Elaine querida, minha eterna mamãezinha, obrigada pelos sábios concelhos. Às queridas amigas, Marieli, Kellen e Ana Claudia, que vieram até BH dar uma força. À Yumi pelos anos de convivência, por toda ajuda e ensinamentos. À Tânia, mal sabíamos que o destino nos prepararia essa deliciosa surpresa de nos reencontrarmos em terras tão distantes. “Many thanks” por tudo o que significou ter sua amizade imprescindível nos seis meses de Austrália. Ao Dr. Daniel, amigo de longa data, pela consultoria

agronômica prestada e inoculantes. À Dona Ester por abrir sua casa e me receber muito bem na chegada a BH, obrigada também por sua amizade e carinho nos dias de Solar 360. Enfim, aos amigos da vida, de perto, de longe, do colégio, da faculdade, do MSc, Dr, RS, MT, MG, SP, Mx, Au. Obrigada pela atenção e tempo dispensados a mim, sobretudo no momento mais delicado, quando perdi minha mãe.

Aos professores e membros das bancas, coordenação e secretaria do Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, muito obrigada pela atenção ao meu trabalho, pela oportunidade de aprendizado e crescimento. À UFMG e seus colaboradores, obrigada pelas demandas resolvidas. Ao CNPq, que em meio a tantas boas propostas escolheu apoiar este projeto. Obrigada também à Fapemig e ao CNPq pela bolsa de estudos nacional e de doutorado sandwich (SWE), e à Capes pelos auxílios para cursos e divulgação deste trabalho em eventos.

Aos professores do curso de campo “Interacciones Multitróficas y Análisis de Redes Complejas” aos quais agradeço em nome do Prof Armando Aguirre Jaimes, obrigada por todo conhecimento repassado. E ao Instituto de Ecología – Inecol pela oportunidade de participar deste curso.

À Embrapa Soja e Embrapa Milho e Sorgo, às quais agradeço em nome de Vanoli e Simone, pelas sementes utilizadas nos experimentos e toda atenção dispensada.

Ao Ronaldo Moreno e sua equipe, pela atenção e assistência prestada ao sistema de Câmaras de Topo Aberto durante todos os experimentos.

Ao prof. James Cook, muita gratidão por ter me recebido no doutorado sandwich na Austrália. Ao Hawkesbury Institute for the Environment e Western Sydney University pela recepção e oportunidade de compartilhar conhecimentos sobre mudanças climáticas com tantos pesquisadores. Agradecimentos especiais a Sarah, Dra. Jane, prof. Ben, aos colegas do M14, aos técnicos: Gavin, Pushpinder, Kerri, Vinod.

Aos profs. Jeff e Remko, pelo excelente curso de análises estatísticas no Software em R. Ao prof. Norman Lee, pelas ótimas classes para *improvement* do meu inglês, pela ajuda com o inglês no artigo/relatório/tese e ainda pela animação que expressa ao ler meus resultados.

À minha grande família, obrigada a todos que torceram para que eu chegasse até aqui. Meu reconhecimento e carinho por tudo que fizeram por mim ao longo da vida. Uma gratidão sem fim pela Lili e Daniel, pelo apoio incondicional, pela solidariedade de passar um final de ano em BH cuidando de experimentos, pelo apoio na submissão do sanduíche, por terem ido até a Austrália conferir se estava tudo bem, por todas as nossas conversas sobre o futuro e por me fazerem acreditar que posso chegar lá. Um abraço especial para Lucrecia (minha agrônoma de plantão) e André pela troca de experiências ao longo do experimento, e também pela visita em BH na companhia dos queridos sobrinhos Regina e Pedro. A Lúcia e o Jura, obrigada pela visita. À querida sobrinha Maira, que veio visitar/estagiar e acabou pegando no pesado, *sorry baby*, obrigada pela diversão daqueles dias. A minha irmã Lisiane e meus queridos Julia e João Vitor, a tia bem sabe o quanto vocês queriam ter ido a BH, à Austrália... Obrigada pelo carinho sempre! E aos meus pais, Ernesto e Nilda, que me ensinaram desde pequena a plantar com amor, obrigada por sempre me deixarem seguir livre para cultivar meus sonhos, tenho certeza que toda coragem que tenho herdei de vocês.

Ao Marcus, espero retribuir o apoio incondicional, carinho e amor demonstrados ao longo dos anos mais desafiadores. Obrigada por abraçar esta e outras causas comigo. Obrigada também à acolhedora e carinhosa família Pelegrini.

Enfim, sou imensamente grata a todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho e com a minha evolução como pessoa. Obrigada! Gracias! Thanks! =)

Sumário

Resumo	13
Abstract	14
Introdução Geral	15
Referências	16
CAPÍTULO I. Simulações do mundo futuro: respostas das espécies às mudanças climáticas	24
Pesquisas em desenvolvimento	26
Resultados obtidos em pesquisas brasileiras	27
Cenário futuro	30
Sugestões de leitura	30
Figuras	31
CAPÍTULO II. Efeito do aumento do CO ₂ e da temperatura nas interações biológicas de soja <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	35
Resumo	36
Introdução	37
Materiais e métodos	42
Resultados	45
Discussão	46
Considerações finais	49
Agradecimentos	50

Referências	51
Figuras	62
Tabelas	67

CAPÍTULO III. Efeitos sinérgicos do aumento de CO₂ e das ondas de calor na termotolerância fotossintética da soja em um cenário de mudanças climáticas69

Resumo	70
Introdução	71
Materiais e métodos	73
Resultados	78
Discussão	79
Agradecimentos	83
Referências	83
Figuras	88
Tabelas	93

CAPÍTULO IV. Impacts of elevated CO₂ and temperature on tolerance to water deficit and acute heat shock in two C₄ species of agricultural interest96

Abstract	97
Introduction	98
Materials and methods	100
Results	104
Discussion	106

Conclusions	111
Acknowledgements	112
References	112
Figures	118
Table	124
Online resources	125
Condições finais	132

Resumo

Nesta tese foram avaliados alguns dos efeitos do aumento do CO₂ atmosférico e da temperatura em espécies de interesse agrícola e suas interações. A tese foi estruturada em quatro capítulos: no capítulo I é apresentado o cenário atual de mudanças climáticas e como vem sendo realizadas as pesquisas sobre este tema no Brasil. O capítulo II avalia o impacto do aumento do CO₂ e da temperatura nas interações biológicas de soja *Glycine max* (L.) Merr. No capítulo III foi estudado o efeito do aumento do CO₂ e temperatura previsto para 2100 na tolerância do fotossistema II de plantas de soja ao choque térmico agudo *in vitro*. E no capítulo IV são avaliadas as respostas fisiológicas ao déficit hídrico induzido e choque térmico agudo *in vitro* em duas espécies de plantas C4 (milho e milheto) cultivadas sob elevada concentração de CO₂ e temperatura. Os resultados destes estudos indicam que cada espécie responde diferentemente ao aumento do CO₂ atmosférico e da temperatura. A soja apresentou diferenças na qualidade nutricional de folhas cultivadas sob aumento do CO₂ e temperatura, e isso afetou as interações com fungos endofíticos e a lagarta *Spodoptera frugiperda*. Porém, as alterações climáticas estudadas diminuíram a termotolerância do fotossistema II da soja, o que resultou na redução da temperatura de queda de 50% do rendimento quântico máximo. Entretanto, a elevação da concentração de CO₂ atmosférico e da temperatura melhoraram a tolerância celular ao déficit hídrico e ao choque térmico agudo das espécies com metabolismo C4. O milho se beneficiou mais da elevada concentração de CO₂, enquanto o milheto, da elevada temperatura. Estes resultados poderão somar aos conhecimentos sobre os efeitos destes fatores de mudanças climáticas em espécies agrícolas, além de auxiliar na tomada de decisões para propor ações mitigadoras.

Abstract

This thesis evaluated some of the effects of increased atmospheric CO₂ and temperature on selected agricultural species and their interactions. The thesis was structured into four chapters: Chapter I presents the current scenario of climate change and how the research on this topic in Brazil has been done; Chapter II assesses the impact of increased CO₂ and temperature on soybean *Glycine max* (L.) Merr biological interactions; Chapter III studies the effect of increased CO₂ and temperature predicted for the year 2100, on the photosystem II tolerance of soybean plants to acute heat shock *in vitro*; Chapter IV evaluates the physiological responses to drought and acute heat shock induced *in vitro* in two C4 plants species (maize and millet) grown under increased CO₂ concentration and temperature. The results of these studies indicate that each species respond differently to an increase of atmospheric CO₂ and temperature. Soybean showed differences in the nutritional quality of leaves grown under increased CO₂ and temperature, and it affected interactions with endophytic fungi and the caterpillar *Spodoptera frugiperda*. However, the studied climatic change decreased the thermotolerance of photosystem II soybean, resulting in the reduction of the temperature of 50% of the maximum quantum yield. However, the increase in atmospheric CO₂ concentration and temperature improved cell tolerance to water deficit and acute thermal shock of C4 metabolism species. Corn benefited most from the high CO₂ concentration, while millet, high temperature. These results will add to the knowledge about the effects of these climate change factors in agricultural species, and assist in decision making to propose mitigating actions.

Introdução Geral

A concentração de CO₂ atmosférico tem aumentando gradativamente nos últimos tempos (IPCC 2007, 2013, 2014) e é amplamente aceito que as principais causas deste aumento estão associadas às emissões decorrentes da queima de combustíveis fósseis e mudança do uso dos solos (Souza et al., 2008). O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) estima que até o fim do século XXI as alterações climáticas globais, causadas pelo constante emissão de gases de efeito estufa, levarão a um aumento da concentração do CO₂ atmosférico para mais de 800 μmol/mol⁻¹. E, associado ao aumento do CO₂, espera-se que ocorram variações na temperatura, para a qual as previsões são de aumento entre 1,8 e 5°C em algumas regiões do globo neste mesmo período (IPCC 2013).

Os efeitos biológicos das mudanças climáticas globais decorrentes do aumento do CO₂ atmosférico estão entre as grandes preocupações atuais (Coviella & Trumble 1999). Apesar do crescente número de estudos sobre mudanças climáticas, ainda não se tem claro como as espécies vegetais responderão ao aumento da temperatura e aos períodos mais extensos de estiagem somados a estas ondas de calor (IPCC, 2013). Nas plantas, a intensidade destas mudanças poderá causar estresse, alterações no crescimento e na composição nutricional, bem como nas relações mutualísticas e antagonísticas com diversos organismos (Chapin III et al., 2000). Desta forma, o aumento do CO₂ atmosférico e da temperatura podem gerar impactos substanciais na estrutura dos ecossistemas e na dinâmica de interações (Brosi et al., 2010; Cornelissen, 2011).

Vários estudos já realizados com plantas indicaram que o enriquecimento do CO₂ atmosférico tem efeito direto nas taxas de fotossíntese, propiciando um aumento na

assimilassão de carbono que, conseqüentemente, leva a um aumento do crescimento, da biomassa, da proporção de C:N e gera alterações nas concentrações dos metabólitos secundários (como o terpeno e taninos) das folhas (Ceulemans & Mousseau, 1994; Curtis & Wang, 1998; Peñuelas & Estiarte, 1998; Norby et al., 1999; DeLucia et al., 2005; Cornelissen, 2011). A elevação da temperatura, por sua vez, pode acelerar o metabolismo vegetal e potencializar os efeitos gerados pelo aumento do CO₂ em plantas cultivadas (Cowling & Sage, 1998; Ziska, 1998; Hakala, 1998; Newman et al., 2003). Estas modificações observadas na planta hospedeira alteram a ocorrência e o desenvolvimento de outros organismos, como os microrganismos endofíticos, que habitam assintomaticamente o interior de seus tecidos (Petrini, 1991; Schulz & Boyle, 2006), e também interferem no consumo por herbívoros (Veteli, 2003). Estudos recentes especificam que a mudança do clima até o final deste século terá um efeito deletério sobre o rendimento das colheitas e/ou seus lucros (Deschenes & Greenstone, 2012; Medelli'n-Azuara et al., 2011).

O sucesso da agricultura depende diretamente das condições climáticas. Desta forma, qualquer alteração no clima pode afetar não só a produtividade das culturas, mas também todo zoneamento agrícola. Estudos indicam que o setor produtivo da agricultura brasileira perderá muito com o aumento da temperatura. As principais plantações brasileiras, e de outros países tropicais, serão afetadas principalmente através da redução das áreas cultiváveis (Pinto et al., 2008). Estima-se que pode ocorrer uma redução entre 23 e 92% da produção, e dentre as culturas afetadas estão o milho, o feijão e o arroz (Pinto et. al. 2008), as quais são a base da alimentar da população brasileira. Modelos utilizados por Streck & Alberto (2006), levando em conta as mudanças climáticas para os próximos 100 anos no Estado do Rio Grande do Sul,

verificaram que o aumento da temperatura tende a acelerar o crescimento, com períodos vegetativos mais curtos, causando mudanças na duração do período reprodutivo e enchimento de grãos, prejudicando assim o potencial produtivo (Siqueira et al., 2001). Outras pesquisas avaliaram o efeito das mudanças climáticas em diferentes cultivos no Brasil, indicando alterações na época ideal de cultivo de batata (Fagundes et al., 2010) e redução da produtividade em milho (Silva et al., 2012). Levando em consideração o fato de que o Brasil é um país essencialmente agrícola e a importância deste setor para a economia nacional, torna-se fundamental a análise e estudo de fatores que possam interferir no seu desempenho (Zullo et al., 2006).

Assim, para que os problemas derivados das atuais mudanças climáticas globais possam ser minimizados, é indispensável a avaliação do atual funcionamento dos sistemas manejados e naturais. As áreas ocupadas por sistemas manejados representam uma grande parcela do território brasileiro, principalmente no Cerrado (Brandão et al., 2006), e a fronteira agrícola expande-se para novas áreas naturais. Desta forma, é imperioso o desenvolvimento de um conhecimento que sirva de referência tanto para garantir a produção dessas culturas quanto para conservação do meio ambiente.

Talvez um dos maiores desafios deste século será compreender como e quanto as espécies irão tolerar e interagir entre si sob os efeitos das mudanças climáticas globais. E, através dessa compreensão, avaliar como contornar o impacto nos ecossistemas, na produção de alimentos, na economia e na humanidade como um todo. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi estudar os efeitos do aumento da concentração de CO₂ atmosférico e da elevação da temperatura em plantas e em suas interações biológicas. Para conhecer os possíveis efeitos em ambientes manejados,

foram escolhidas três espécies agrícolas amplamente cultivadas e de grande importância econômica para o país: soja, milho e milheto.

A soja, destaca-se como a principal cultura mundial com previsão de área plantada de 33,4 milhões de hectares e produção de 1.764 milhões de sacas na safra 2015/2016 (USDA, 2015). Segundo o relatório “USDA Baseline Trade Projections” do Departamento de Agricultura norte-americano (USDA) (Westcott 2012), o Brasil será o maior exportador de soja do mundo na próxima década. Para o milho, nas últimas safras, o Brasil tem se destacado como terceiro maior exportador mundial (Duarte *et al.* 2011). Já o cultivo do milheto exerce um papel de extrema importância no agronegócio nacional, devido à sua ampla utilização em vários fins, seja na produção de grãos para pecuária, como forrageira, na cobertura para o plantio direto, no cultivo entre safras, na fabricação de farinha para o consumo humano, ou como biocombustível (Garcia & Duarte, 2011). O incremento da produção mundial destas *commodities* na última década deve-se em grande parte ao aumento da área plantada e avanço da fronteira agrícola sobre ambientes naturais (D’Ávila, 2006). E isso promove mudanças no uso do solo, fator esse que está diretamente ligado às alterações climáticas (IPCC, 2014). Assim, considerando a relevância destas espécies para economia do país, se torna imprescindível conhecer os possíveis impactos, sobre elas, do aumento de CO₂ e da temperatura previstos para as próximas décadas.

Esta tese está dividida em quatro capítulos, apresentados em formato de artigos. Os capítulos I já aceito, está formatado nas normas da revista Ciência Hoje onde será publicado. O capítulo II segue as normas revista Lundiana International Journal of Biodiversity, apenas para efeito de formatação. Os capítulos III e IV seguem a

formatação das revistas as quais serão submetidos, *Photosynthetica: International Journal for Photosynthesis Research* e *Climatic Change*, respectivamente.

Estruturação da Tese em capítulos/artigos:

Capítulo I – Simulações do mundo futuro: respostas das espécies às mudanças climáticas

Capítulo II – Efeito do aumento do CO₂ e da temperatura nas interações biológicas de soja *Glycine max* (L.) Merr.

Capítulo III – Efeitos sinérgicos do aumento de CO₂ e das ondas de calor sobre termotolerância fotossintética de soja em um cenário de mudanças climáticas

Capítulo IV – Impacts of elevated CO₂ and temperature on tolerance to water deficit and acute heat shock in two C4 species of agricultural interest

Referências bibliográficas

- Brandão, A. S. P.; Resende, G. C. & Marques R. W. C. 2006. Crescimento agrícola no período 1999/2004: a explosão da soja e da pecuária bovina e seu impacto sobre o meio ambiente. *Economia Aplicada*, 10(2): 249-266.
- Brosi, G. B.; McCulley, R. L.; Bush, L. P.; Nelson, J. A.; Classen, A. T. & Norby, R. J. 2011. Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. *New Phytologist*, 189:797–805.
- Ceulemans, R. & Mousseau, M. 1994. Tansley review No. 71 effects of elevated atmospheric CO₂ on woody plants. *New Phytologist*, 127:425–446.
- Chapin III, F. S.; Zavaleta, E. S.; Eviner, V. T.; Taylor, R. L.; Vitousek, P. M.; Reynolds, H. L.; Hooper, D. U.; Lavorel, S.; Sala, O.; Hobbie, S. E.; Mack, M. & Diaz, S. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405: 234-242.
- Cornelissen, T. 2011. Climate change and its effects on terrestrial insects and herbivory patterns. *Neotropical Entomology*, 40:155-163.
- Coumou, D. & Rahmstorf, S. 2012. A decade of weather extremes. *Nature Climate Change*, 2:491–496.
- Coviella, C. E. & Trumble, J. T. 1999. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. *Conservation biology*, 13:700-712.
- Cowling, S.A. & Sage, R.F. 1998. Interactive effects of low atmospheric CO₂ and elevated temperature on growth, photosynthesis and respiration in *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell and Environment*, 21: 427-435.
- Curtis, P. S. & Wang, X. 1998. A meta-analysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form and physiology. *Oecologia*, 113:299–313.
- D'avila, N. Desmatamento na Amazônia: O novo nome da soja. <http://www.comciencia.br/reportagens/agronegocio/14.shtml>. 02Mai.2006.
- Deschenes, O. & Greenstone, M. 2012. The Economic Impacts of Climate Change: Evidence from Agricultural Output and Random Fluctuations in Weather: Reply. *American Economic Review*, 102(7): 3761–3773.
- De Lucia, E. H.; Moore, D. J. & Norby, R. J. 2005. Contrasting responses of forest ecosystems to rising atmospheric CO₂: Implications for the global C cycle. *Global Biogeochemical Cycles*, 19:1-9.

- Duarte, J. O.; Garcia, J. C. & Miranda, R. A. 2011. Cultivo de milho: economia da produção. Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de Produção, Versão Eletrônica - 7ª edição Set./2011.
- Fagundes, J. D.; Streck, N. A.; Bisognin, D. A.; Swantes, A. P.; Alberto, C. M. 2010 Produtividade simulada de tubérculos de batata em cenários de mudanças climáticas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 45:351-360.
- Garcia, J. C. & Duarte, J. O. 2011. Cultivo do Milheto: importância econômica. Sistema de Produção 3. Embrapa Milho e Sorgo. Versão eletrônica. 2 ed. Set./2011. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milheto_2_ed/economia.htm>. Acesso em: 26 out 2015.
- Hakala, K. 1998. Growth and yield potential of spring wheat in a simulated changed climate with increased CO₂ and higher temperature. European Journal of Agronomy, 9: 41-52.
- IPCC 2007. Climate Change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Eds. Solomon, S.; Qin, D.; Manning, M.; Chen, Z.; Marquis, M.; Avery, K. B.; Miller, M. T. & H. L. Cambridge University Press, Cambridge.
- IPCC 2010. Climate change 2010: The scientific Basis. Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- IPCC 2013. Summary for policymakers. In: Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T. F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P. M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1–30.
- IPCC 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151p.

- Medellín-Azuara, J.; Howitt, R. E.; MacEwan, D. J. & Lund, J. R. 2011. Economic impacts of climate-related changes to California agriculture. *Climatic Change*, 109: 387-405.
- Newman, J. A.; Abner, M. L.; Dado, R. G.; Gibson D. J.; Brookings, A. & Parsons, A. J. 2003. Effects of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on tall fescue: growth, photosynthesis, chemical composition and digestibility. *Global Change Biology*, 9: 425-437.
- Norby, R. J.; Wullschleger, S. D.; Gunderson, C. A.; Johnson, D. W. & Ceulemans, R. (1999). Tree responses to rising CO₂ in field experiments: Implications for the future forest, *Plant Cell Environ.*, 22, 682 – 714.
- Peñuelas, J. & Estiarte, M. 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trees*, 13: 20-24.
- Petrini, O 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H. & Hirano, S. S.(Ed.) *Microbial ecology of leaves*. Berlin, Heidelberg, Germany & New York, Springer, pp.179–197.
- Pinto, H. *Aquecimento global e a nova geografia da produção agrícola no Brasil*. Unicamp; Brasília: Embrapa. 2008. 83p.
- Schulz, B & Boyle, C. 2006. What are endophytes? In: Schulz, B.; Boyle, C. & Sieber, T.N. (Ed.) *Microbial root endophytes*. Berlin, Heidelberg, Germany & New York, USA: Springer, pp. 1–13.
- Silva, V. de P. R. da; Campos, J. H. da C.; Silva, M. T. 2012. Climate risk in maize crop in the northeastern of Brazil based on climate change scenarios. *Engenharia Agrícola*, Sorocaba, 32:1176-1183.
- Siqueira, O. J. 2001. Efeitos Potenciais das Mudanças Climáticas na Agricultura Brasileira e Estratégias Adaptativas para Algumas Culturas. In: *Lima, M. A. de, Cabral, O. M. R., Miguez, J. D. G.* (Eds.). *Mudanças Climáticas Globais e a Agropecuária Brasileira*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, pp. 65-96.
- Souza, P. J. O. P.; Rocha, E. J. P.; Ribero, A.; Loureiro, R. S. & Bispo, C. J. C. 2008. Impactos no albedo em consequência do avanço da fronteira agrícola na Amazônia. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 16: 87-95.
- Streck, N. A & Alberto, C. M. Estudo numérico do impacto da mudança climática sobre o rendimento de trigo, soja e milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.

41, p. 1351-1359. 2006.

USDA 2015. World Agricultural Supply and Demand Estimates. Wasde, 541:1-40.

Veteli, T. O. 2003. Global atmospheric change and herbivory: effects of elevated levels of UV-B radiation, atmospheric CO₂ and temperature on boreal woody plants and their herbivores. University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology, 19, 107.

Westcott 2012. USDA Agricultural Projections to 2021. Office of the Chief Economist, World Agricultural Outlook Board, U.S. Department of Agriculture. Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee. Long-term Projections Report OCE-2012-1, 102p.

Ziska, L. H. 1998. The influence of root zone temperature on photosynthetic climation to elevated carbon dioxide concentrations. *Annals of Botany*,81:717-721.

Zullo Júnior, J.; Pinto, H. S.; Assad, E. D. de. 2006. Impact assessment study of climate change on agricultural zoning. *Meteorological Applications*, Reading,13: 69-80.

Capítulo I

Simulações do mundo futuro: respostas das espécies às mudanças climáticas *

* Artigo aceito na revista *Ciência Hoje* (com previsão de publicação na edição 342 - nov/2016). Este artigo é uma resposta à sociedade brasileira, como contrapartida do projeto que financiou as pesquisas desta tese (CNPq 479485/2012-7).

Simulações do mundo futuro: respostas das espécies às mudanças climáticas

É consenso no meio científico que o aumento de gases de efeito estufa na atmosfera têm causado alterações climáticas em várias partes do planeta, o que está resultando em impactos diversos em espécies e ecossistemas. Pesquisadores de renomadas universidades e centros de pesquisas estão investigando como os seres vivos irão responder ao aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO₂) e à elevação da temperatura na Terra.

Recentemente, líderes políticos e cientistas de vários países reuniram-se em Paris na 21^a Conferência do Clima (COP-21) para debater sobre as condições climáticas atuais e definir um novo acordo internacional sobre o clima. O Acordo de Paris (disponível online em inglês: <http://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/109.pdf>) foi assinado por 195 países que se comprometeram a investir em tecnologias limpas e reduzir as emissões de gases de efeito estufa para manter o aquecimento global abaixo de 2°C. A concentração de gases de efeito estufa na atmosfera tem aumentando cada vez mais nas últimas décadas. Desde o início da Revolução Industrial em 1750, a concentração de CO₂ na atmosfera aumentou mais de 30%, ao passar de 280 para cerca de 400 ppm (partes por milhão) nos dias atuais. A taxa de aumento também se acelerou desde que começaram a acompanhá-las continuamente em 1958, passando de 0,7 ppm ao ano naquela época para uma média de 2,2 ppm ao ano nas últimas décadas. Segundo o Painel Intergovernamental Sobre Mudanças do Clima (IPCC, na sigla em inglês), até o fim do século XXI a concentração de CO₂ pode chegar ao dobro da atual, atingindo aproximadamente 800 ppm.

As principais causas deste aumento alarmante estão associadas às emissões decorrentes da queima de combustíveis fósseis e as mudanças no uso do solo, como a transformação de florestas em área agrícolas ou urbanas. Uma consequência do aumento da concentração destes gases na atmosfera é a elevação da temperatura em até 5°C em algumas regiões até o final deste século. O **Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas**, órgão nacional que avalia informações científicas sobre os aspectos relevantes das mudanças climáticas no Brasil, ressalta que é esperado um aumento da temperatura de até 6°C na região amazônica, além da diminuição do volume de chuvas em 45% no mesmo período. Estas alterações climáticas podem trazer diversas e

catastróficas consequências, como ondas de calor, estiagens ou chuvas concentradas em determinados períodos. Estes fatores afetarão a biodiversidade, as interações entre espécies, a estrutura dos ecossistemas e a prestação de serviços ambientais resultando em grandes e talvez irreversíveis impactos à vida na terra.

Pesquisas em desenvolvimento

Buscando entender o que ocorrerá com as espécies expostas às mudanças climáticas, diversos grupos de pesquisa no mundo têm voltado seus estudos à simulação de ambientes com as condições previstas para o planeta até o ano de 2100. Destacam-se os experimentos em Câmaras de Topo Aberto (CTA; Figura 1A), geralmente instaladas em casas de vegetação e os sistemas de Enriquecimento de CO₂ ao Ar Livre (FACE, na sigla em inglês; Figura 1B). As CTAs geralmente são usadas para experimentos mais restritos. Já os sistemas FACE, de custo bem mais elevado, têm a vantagem de poderem ser instalados em ambientes abertos ou naturais, possibilitando avaliar os efeitos no ecossistema como um todo. Em ambos os casos, as condições climáticas são controladas por sensores que regulam a concentração de CO₂ (cujo gás é fornecido por cilindros) e, em alguns casos, também regulam o aumento da temperatura (+3°C em relação a ambiente, por exemplo). Um computador interligado a estes sistemas armazena continuamente dados como concentração de CO₂, temperatura e umidade.

Estudos amplos em ambientes naturais ainda esbarram no elevado custo de instalação e manutenção do sistema FACE. O único experimento em floresta nativa encontra-se em andamento na Austrália (EucFACE). Desde 2012, diversos estudos vêm sendo realizados sobre a atuação dos microrganismos do solo até a fisiologia dos eucaliptos nativos, na tentativa de desvendar o que irá acontecer naquele ecossistema caso as previsões do IPCC se concretizem. Felizmente, outros dois grandes projetos de FACE em florestas nativas estão previstos ainda para 2016: um no Reino Unido e outro na Amazônia brasileira. O Amazon-FACE irá propiciar uma série de descobertas importantes, já que as reais consequências do aumento da concentração de CO₂ para organismos de florestas tropicais são ainda desconhecidas, e pelo fato de a Amazônia ser um dos ambientes mais ricos em espécies e de grande importância na manutenção do clima global. Todavia, cabe relatar que os efeitos das mudanças climáticas não são lineares e conhecimentos obtidos em um ambiente tropical não serão necessariamente

os mesmos em outros ambientes tropicais onde as espécies são diferentes e organizadas de maneiras diferentes. Por exemplo, embora as espécies de plantas possam apresentar resposta similares ao aumento do CO₂ e temperatura (por exemplo, altas taxas de crescimento), o resultado em um dado ecossistema pode ser o domínio da comunidade por uma espécie com capacidade invasora e assim resultar em grandes problemas no funcionamento do ecossistema e até extinção de espécies e perda da biodiversidade e serviços ecossistêmicos.

Embora estudos em diversas partes do globo tenham mostrado que os efeitos do aumento do CO₂ variam muito entre as espécies de plantas, de um modo geral, ocorre aumento da biomassa (por exemplo, o número de ramos e folhas é maior) geralmente em função do incremento na fotossíntese. Porém, a maior disponibilidade de átomos de carbono (C) faz com que a maioria das plantas acumulem mais carboidratos em suas folhas, reduzindo a proporção de proteínas, pela diluição do nitrogênio (N). A melhora na eficiência do uso de água é uma resposta comum a praticamente todas as plantas que crescem sob aumento de CO₂. A produtividade de algumas plantas também poderá aumentar com o aumento do CO₂. Mas se estas plantas sofrerem estresse por aumento de temperatura (com ou sem déficit hídrico) em determinadas fases do desenvolvimento, o resultado pode ser devastador, comprometendo totalmente as colheitas. Este é um dos aspectos mais preocupantes dentro do contexto de mudanças climáticas por afetar diretamente a disponibilidade de alimentos e a segurança alimentar da humanidade. Além deste alerta dado por cientistas e suas pesquisas, os líderes mundiais assinaram o Acordo de Paris temendo que isso possa gerar uma crise econômica mundial.

Resultados obtidos em pesquisas brasileiras

Pesquisadores de algumas universidades e centros de pesquisa brasileiros vêm realizando experimentos em CTA e estruturas de mini-FACE (o mesmo princípio de FACE, em configurações menores) a fim de conhecer os efeitos das mudanças climáticas em espécies nativas, invasoras e cultivadas de interesse econômico. Dentre os aspectos mais importantes a serem compreendidos estão as alterações no desenvolvimento e na fotossíntese das plantas, e a consequência disso para as espécies que interagem com elas.

Estudos realizados com duas espécies nativas, o jatobá da mata (*Hymenaea*

courbaril – da floresta Amazônica) e uma espécie de bambu (*Aulonemia aristulata* – da mata atlântica) mostraram que ambas apresentam taxas mais altas de fotossíntese e maior crescimento com o aumento do CO₂, enquanto o bambu aumentou a tolerância à seca. Com as mudanças climáticas, o estabelecimento destas espécies pode ser mais rápido em seu ambiente natural, podendo também servir como um mecanismo eficiente de sequestro de carbono pela floresta. Porém, o desenvolvimento rápido do bambu poderia atrapalhar o crescimento de outras árvores que ocorrem na mesma área, alterando a composição do ecossistema.

Em relação às plantas nativas do Cerrado, experimentos com duas espécies da família das margaridas (*Viguiera discolor* e *Vernonia herbacea*), mostram que elas crescem mais quando a concentração de CO₂ aumenta. Além disso, estas espécies são conhecidas por acumular frutanos, que são compostos químicos naturais de proteção contra a seca e outros estresses. O aumento do CO₂ atmosférico aumentou a produção e armazenamento de frutanos nessas espécies, indicando que elas poderão enfrentar melhor a seca numa atmosfera com mais CO₂.

Entre as plantas cultivadas, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aumentou seu crescimento com o aumento do CO₂. Além disso, apresentou aumento no teor de sacarose (composto usada para a fabricação de açúcar e álcool) e reduziu o teor de lignina (composto que confere resistência e dureza às células das plantas), sugerindo potencial das células para expansão e acumulação de mais açúcares. Tudo isso poderia aumentar a produtividade da cana em um cenário de mudanças climáticas.

Um experimento com o famoso feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) que avaliou os efeitos do aumento de CO₂ e da seca verificou que o CO₂ auxiliou melhorando a eficiência do uso da água, as plantas tiveram maior crescimento, mas não tiveram aumento na produtividade. Outro estudo sobre uma doença do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) conhecida como oídio (*Oidium* sp.) mostrou que o CO₂ teve efeito positivo, diminuindo a severidade da doença. Nas plantas mantidas em ambiente com aumento de CO₂ a severidade da doença foi de aproximadamente 33% enquanto que nas plantas sem aumento foi de 71%. Em outros países também existem muitos estudos como estes, com várias espécies e suas doenças, onde os resultados mostram que o CO₂ pode ter tanto efeitos positivos e negativos, como ser neutro no processo de infecção das

plantas.

Nossa equipe no Laboratório de Ecologia Evolutiva e Biodiversidade da UFMG também vem desenvolvendo pesquisas em CTA a fim de entender os efeitos das mudanças climáticas sobre as plantas nativas, invasoras e culturas. Experimentos com uma espécie nativa do Cerrado e Mata Atlântica conhecida popularmente como alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* – Figura 2) avaliaram os efeitos da atmosfera enriquecida com CO₂ no desenvolvimento das plantas e na diversidade de fungos endofíticos – fungos que vivem no interior das plantas e podem trazer diversos benefícios às mesmas (veja Ciência Hoje V.42 N. 252). As plantas cultivadas sob elevado CO₂ cresceram mais, apresentando maior comprimento da raiz e altura, número de folhas e biomassa total. Porém, a diversidade de fungos endofíticos diminuiu drasticamente. Como estes organismos desempenham um papel importante para a saúde das plantas, o aumento do CO₂ poderia torná-las mais suscetíveis ao ataque de inimigos naturais e até comprometer sua adaptação ao ambiente.

Outro estudo investigou os efeitos do aumento de CO₂ e temperatura previsto para 2100 no potencial de duas espécies exóticas de braquiária (*Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens*), para invadir paisagens naturais no Cerrado brasileiro, como já vem ocorrendo. O aumento do CO₂ e da temperatura resultou em maiores taxas de germinação e maiores chances de estabelecimento no campo. Além disso, uma delas se tornou mais tolerante à seca e às ondas de calor. Provavelmente estas plantas terão um potencial invasor ainda maior frente às futuras alterações climáticas.

Em um experimento com a soja (*Glycine max*), avaliamos os efeitos do aumento de CO₂ e temperatura no desenvolvimento desta cultura e nas suas interações com fungos endofíticos e uma das suas principais pragas, a lagarta *Spodoptera frugiperda*. Embora as altas temperaturas possam comprometer o desenvolvimento da cultura por afetar o processo de fotossíntese, o aumento do CO₂ aumentou o crescimento das plantas. Porém, uma análise nutricional das folhas revelou que o conteúdo de nitrogênio diminuiu, tornando-as menos nutritivas. Isso poderá interferir na alimentação dos insetos praga que delas se alimentam. Para verificar essa hipótese, oferecemos às lagartas de *Spodoptera* discos de folhas cultivadas com e sem aumento de CO₂ e verificamos que as lagartas consumiram 45% mais folhas cultivadas em CO₂ elevado

quando comparadas às cultivadas em ambiente atual. Estas observações experimentais indicam que se medidas paliativas não forem tomadas, esta praga poderá ter um efeito ainda mais devastador sobre a cultura no futuro. Já o número de espécies de fungos endofíticos diminuiu drasticamente e alteraram-se as espécies presentes em folhas de soja quando as plantas foram cultivadas sob o aumento de CO₂ e temperatura. Novamente, estes dados indicam que algumas espécies de fungos não conseguem sobreviver em plantas expostas a estas condições climáticas, o que também pode ter efeitos drásticos na performance das espécies.

Cenário futuro

Estudos como estes são de grande importância, pois só de plantas o Brasil tem em seu território mais de 55.000 espécies (cerca de 22% da diversidade mundial), além de biomas bastante distintos em termos de espécies e funcionamento. Estudos sobre os impactos do aumento de CO₂ e temperatura realizados apenas em ambientes florestais ou com grupos específicos de espécies não garantirão que o conhecimento obtido possa ser aplicado a outras regiões de importância similar como os Cerrados e campos, os quais vêm sendo destruídos em taxas até maiores do que a dos ambientes florestais.

A preocupação quanto ao futuro do planeta frente às mudanças climáticas aumentou o interesse em pesquisas científicas nesta área, mas ainda há muito a ser feito para que possamos entender como as espécies irão se adaptar (ou não) ao novo cenário climático. O estado de alerta é mundial e crescente. A COP-21 marcou um momento decisivo na história, já que, pela primeira vez, todos os países envolvidos se comprometeram a combater a mudança do clima na terra (incluindo os Estados Unidos, que não assinou os acordos anteriores), mas a simples assinatura de um acordo não garante que as metas serão atingidas. Assim, a ampliação destes estudos é fundamental e urgente para que possamos eficientemente nos adaptar e investir na mitigação dos impactos das mudanças climáticas.

Sugestões de leitura:

Okí, Y., Fernandes, G. W., Correa Junior, A. 2008. Fungos: amigos ou inimigos? *Ciência Hoje*, V.42, N 252, p-64-66.

Base científica das mudanças climáticas. Relatório do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. 2015. V.1. Cap.9. p.321-346. Disponível em: http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/documentos_publicos/GT1/GT1_volume_completo_cap_9.pdf

Impactos, vulnerabilidades e adaptação. Relatório do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. 2015. V.2. 419p. Disponível em: http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/pt/publicacoes/relatorios-pbmc/item/impactos-vulnerabilidades-e-adaptacao-volume-2-completo?category_id=15

Legendas das Figuras:

Figura 1. Estrutura de uma Câmara de Topo Aberto (CTA) para cultivo de plantas sob condições controladas de aumento de CO₂ e de temperatura com 1,53 m³ (a) e estrutura de um sistema de Enriquecimento de CO₂ ao Ar Livre (FACE) com 30 m de altura e 25 m de diâmetro em funcionamento em uma floresta nativa de eucaliptos na Austrália (b) (Fotos: Leandra Bordignon).

Figura 2. Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) na Serra do Cipó em Minas Gerais (Foto: Geraldo W. Fernandes).

Figura 1 (a)



Figura 1(b)



Figura 2



Capítulo II

Efeito do aumento do CO₂ e da temperatura nas interações biológicas de soja

***Glycine max* (L.) Merr. ***

*artigo no formato da revista *Lundiana International Journal of Biodiversity*

Efeito do aumento do CO₂ e da temperatura nas interações biológicas de soja *Glycine max* (L.) Merr.

Resumo

A elevação do CO₂ atmosférico e o aumento da temperatura poderão acarretar drásticos impactos nas relações entre herbívoros, plantas e os seus microrganismos simbióticos associados. O presente estudo avaliou se o aumento do CO₂ e da temperatura, previstos para 2100, poderia causar alterações na concentração de carbono e nitrogênio foliar da soja e conseqüentemente na riqueza e composição de fungos endofíticos e no consumo foliar da soja pela lagarta praga *Spodoptera frugiperda*. Para avaliar os efeitos do aumento do CO₂ e da temperatura, plantas de soja foram cultivadas, desde a germinação, em câmaras de topo aberto utilizando quatro tratamentos. O aumento da concentração de CO₂ atmosférica acarretou a diminuição da concentração de nitrogênio (N) e aumento da relação C:N foliar da soja, e também a redução da riqueza e abundância dos fungos endofíticos, bem como aumento no consumo foliar por *S. frugiperda*. A elevação da temperatura aumentou a concentração de nitrogênio, a riqueza e a abundância de fungos endofíticos, mas diminuiu o consumo foliar da soja em condições de CO₂ ambiente, em condições de elevada concentração de CO₂ atmosférico estes efeitos não ocorreram. As mudanças na riqueza e composição de espécies de fungos endofíticos decorrentes do aumento do CO₂ e temperatura podem estar associadas com as mudanças de nitrogênio e C:N foliar. A diluição do (N) na folha cultivada em altas concentrações de CO₂ acarretou maior consumo da lagarta *S. frugiperda*. As mudanças de CO₂ atmosférico e temperatura previstas para 2100 podem fazer com que a soja tenha menor riqueza de microrganismos endofíticos, tornando-se mais vulnerável a herbivoria.

Palavras chave: aquecimento global, fungos endofíticos, herbivoria, lepidoptera, mudanças climáticas, *Spodoptera frugiperda*

Introdução

O aumento do CO₂ atmosférico e da temperatura acarretam impactos substanciais na dinâmica de interações e na estrutura dos ecossistemas (Brosi et al. 2010; Cornelissen, 2011) decorrentes principalmente das mudanças ocorridas no metabolismo das plantas. Vários estudos indicam que o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera tem efeito direto nas taxas de fotossíntese, propiciando um aumento na disponibilidade de carbono que conseqüentemente leva a aumento do crescimento, da biomassa, da proporção de C:N e gera alterações nas concentrações de metabólitos secundários (como o terpeno e taninos) nas plantas (Ceulemans & Mousseau, 1994; Curtis & Wang, 1998; Peñuelas & Estiarte, 1998; Norby et al., 1999; DeLucia et al., 2005; Cornelissen, 2011).

Uma série de estudos com soja em CO₂ elevado (de 450 a 1250 p.p.m) foram avaliados por Ainswort et al. (2002) em uma metanálise. Eles mostraram que, embora exista um incremento no crescimento e produtividade, quando o cultivar é plantado sem a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio ocorre uma diluição das concentrações de nitrogênio foliar. A elevação da temperatura, por sua vez, pode acelerar o

metabolismo vegetal e potencializar os efeitos gerados pelo aumento do CO₂ em plantas cultivadas (Cowling & Sage, 1998; Ziska, 1998; Hakala, 1998; Newman et al., 2001) desde que não exceda sua temperatura ótima de crescimento (Hamilton et al., 2008). Estas modificações observadas na planta hospedeira alteram a ocorrência e o desenvolvimento de microrganismos que habitam assintomaticamente o interior de seus tecidos (endofíticos) (Petrini, 1991; Schulz & Boyle, 2006), e o consumo por herbívoros (Veteli, 2003).

É importante destacar que a presença destes microrganismos endofíticos traz inúmeras vantagens para as plantas, uma vez que eles podem reduzir o aparecimento de organismos patogênicos (Clay & Holah, 1999; Arnold et al., 2003), minimizar a palatabilidade dos herbívoros (Fernandes et al., 2011), estimular o crescimento da planta de forma direta promovendo a fixação de nitrogênio e produção de fitohormônios (Azevedo, 2000) e muitas vezes até aumentar a resistência das plantas hospedeiras a estresses ambientais como a seca (Richardson et al., 1993; Schardl et al., 2004). Estes fungos têm alta diversidade nos trópicos e estão associados diretamente com as características estruturais e químicas (nutrientes e metabólitos secundárias) encontradas nas plantas (Fernandes et al. 2011; Sanchez et al. 2012).

Os fungos endofíticos são sensíveis as alterações do ambiente. Algumas espécies apresentam seu desenvolvimento e metabolismo restrito a determinadas faixas de temperatura (ver Li et al., 2012) e outras podem deixar de ocorrer devido mudanças químicas nas plantas hospedeiras. Desta forma, a elevação do CO₂ atmosférico e da temperatura, por exemplo, podem reduzir a ocorrência de fungos endofíticos. Os estudos de Rilling et al. (1999) verificaram que ocorre redução da abundância e riqueza de fungos associados as plantas em condições de alta concentração de CO₂. Algo

semelhante foi encontrado por Oki et al (unpublished data) para uma espécie de planta nativa do cerrado, (*Baccharis dracunculifolia*). Os pesquisadores notaram que em plantas cultivadas sob aumento do CO₂ (720 μmol mol⁻¹) a composição de fungos endofíticos diminuiu em 50% quando comparadas às cultivadas em CO₂ ambiente. Além disso, Oki e colaboradores observaram que no tratamento com o dobro da concentração de CO₂ não foram encontradas espécies endofíticas que possuem potencial de minimizar a ação de patógenos de plantas. Assim, além das alterações que o aumento do CO₂ promove nas plantas e na riqueza de endofíticos, outros importantes processos ecológicos são modificados ou perdidos.

Algumas espécies de fungos endofíticos também atenuam os efeitos diretos do aumento da concentração de CO₂ e das altas temperaturas. Newman et al. (2003), por exemplo, sugere que a presença de um fungo endofítico na cultura forrageira *Festuca arundinaceae* altera a composição química da planta hospedeira, aumentando a quantidade de nitrogênio, e desta maneira minimizando os efeitos negativos observados pelo aumento do CO₂ (diluição do nitrogênio e aumento da razão C:N). Outro estudo verificou que quando são introduzidos esporos de fungos endofíticos em cultivares elas apresentam maior resistência às altas temperaturas (Pennisi, 2003). Redman et al. (2002) observaram, por exemplo, que somente as gramíneas com endofíticos sobreviveram em solos mais quentes (com temperaturas até 65°C).

Estudos sobre o efeito da elevação do CO₂ na diversidade de fungos endofíticos ainda são raros, não havendo ainda estudos que considerem o efeito conjunto do aumento da concentração de CO₂ e da temperatura na ocorrência destes microrganismos. Isso mostra uma falha no conhecimento e a possibilidade de novas e

importantes descobertas especialmente para os cultivares de relevância econômica, como a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (CONAB 2010).

Outra crescente preocupação com elevação das concentrações de CO₂ atmosférico está relacionada aos impactos da herbivoria. As folhas de plantas submetidas a condições de elevada concentração do CO₂ atmosférico apresentam um aumento da razão C:N e uma diluição da concentração nitrogênio (Reekie & Bazazz, 1989; Körner & Arnone, 1992; Arnone & Körner, 1995; Poorter et al., 1997; Bezemer & Jones, 1998; Coley, 1998; Curtis & Wang, 1998; Awmack & Leather, 2002) e para a maioria dos herbívoros, o nitrogênio é um nutriente essencial ao desenvolvimento e *fitness* (Mattson, 1980; Lincoln et al., 1986; Douglas et al., 2006).

Muitos insetos que se alimentaram de folhas desenvolvidas sob elevadas concentrações de CO₂ apresentaram um aumento da taxa de consumo, presumivelmente como uma resposta à redução da qualidade alimentar (consumo compensatório) (Roth & Lindroth, 1995; Lindroth, 1996; Jones & Bezemer, 1998; Agrell et al., 2000). Em uma metanálise, Stiling e Cornelissen (2007) avaliaram 75 estudos realizados com respostas de diferentes grupos de herbívoros (em sua maioria lepidoptera, 41%) ao aumento do CO₂ e concluíram que o CO₂ elevado gera uma diminuição na taxa de crescimento (8,3%), na eficiência de conversão (19,9%) e no peso da pupa (5,03%). Eles observaram também que há aumento das taxas de consumo (16,5%) e do tempo de desenvolvimento dos herbívoros (3,87%). Além disso, o impacto gerado pelo aumento do CO₂ pode afetar diretamente o herbívoro, através de mudanças no comportamento, na preferência, fisiologia e história de vida (Agrell et al., 2006; Bale et al., 2002) ou indiretamente, decorrente das mudanças morfológicas (Morrison & Morecroft, 2006; Lake & Wade, 2009), bioquímicas (Yuan et al., 2009), e fisiológicas (Yadugiri, 2010)

de suas plantas hospedeiras. A relevância do conhecimento sobre os impactos do CO₂ elevado em insetos herbívoros tem atraído cada vez mais pesquisas nesta área (Coviella & Trumble, 1999; Hunter, 2001; Zvereva & Kozlov, 2006; Stiling & Cornelissen, 2007; Cornelissen, 2011).

Além das condições climáticas, um dos maiores fatores que afeta a produtividade das culturas é a incidência de pragas. A soja (*Glycine max*) é a oleaginosa mais amplamente cultivada (Pimentel et al., 2006; Hao et al., 2012), com produção mundial de 317,3 milhões de toneladas de grãos na safra 2014/2015 (USDA, 2015a). No Brasil, considerado o segundo maior produtor mundial desse grão, a área cultivada ocupa 32,5 milhões de hectares, sendo que na última safra expandiu em mais um milhão de hectares (USDA, 2015b). Entre os herbívoros, considerados praga da soja, está *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae), conhecida como “lagarta-do-cartucho do milho” (Busato et al., 2006), embora apresente hábito polífago infestando também outras culturas (Pogue, 2002). As lagartas de *S. frugiperda* alimentam-se de folhas podendo afetar a capacidade fotossintética da planta e provocar danos em áreas extensivas, com necessidade de replantio (Gomez, 2007; Ricieri et al., 2006) e conseqüentemente redução da produção (Cruz et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das mudanças climáticas (aumento de CO₂ atmosférico e temperatura) nas interações da soja com os fungos endofíticos e com a lagarta *S. frugiperda*. Mais especificadamente, este estudo avaliou os efeitos do enriquecimento de CO₂ e aumento da temperatura na: (I) concentração de carbono e nitrogênio foliar; (II) riqueza, abundância (número de colônias isoladas), composição e similaridade dos morfotaxa dos fungos endofíticos (III) e no consumo de folhas pela lagarta praga *S. frugiperda*. Nós hipotetizamos que as elevadas concentrações de CO₂

atmosférico e altas temperaturas reduzem a qualidade nutricional das folhas da soja reduzindo a riqueza e alterando a composição de seus fungos endofíticos. A nossa segunda hipótese é que ocorre um aumento no consumo das folhas de soja por *S. frugiperda* em condições de elevado de CO₂ como forma de suprir suas necessidades nutricionais com a redução da concentração nitrogênio foliar.

Material e Métodos

Condições de cultivo e tratamentos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Para determinar os efeitos do enriquecimento de CO₂ atmosférico e do aumento da temperatura sobre a qualidade nutricional (% de Carbono e Nitrogênio) das folhas de soja e suas interações, sementes foram germinadas e cultivadas em câmaras de topo aberto sob quatro tratamentos: Ctrl - [CO₂] (~400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente; +T [CO₂] ambiente e temperatura elevada em 3°C em relação a temperatura ambiente; +C [CO₂] elevada (~ 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente) e +C+T [CO₂] e temperatura elevados. Este último tratamento simula as condições atmosféricas previstas para 2100 (IPCC, 2010). As sementes de soja da variedade BRS – MG 760S obtidas na Embrapa Soja foram inoculadas com bactérias noduladoras (*Bradyrhizobium japonicum*, Semia 5079 e Semia 5080) na proporção prescrita (100 ml inoculante para 50 Kg de sementes) e as plantas foram cultivadas simulando os períodos de safra entre outubro e dezembro de 2012, em condições climáticas monitoradas, com irrigação diária de 300 mL e adição de 50 mL de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950) a cada três dias. Após 60 dias

de exposição aos tratamentos, quando as plantas de soja já estavam desenvolvidas e iniciando o estágio reprodutivo (R2), suas folhas foram coletadas para execução dos experimentos.

Influencia dos tratamentos nas concentrações de C, N e C:N

Para avaliar como o aumento de CO₂ e temperatura no cultivo da soja influenciam nas concentrações de carbono (C) e nitrogênio (N) foliar foram coletadas aleatoriamente 30 folhas de cada tratamento. Em seguida os sacos de papel contendo as amostras foram acondicionados em estufa com circulação de ar forçada por 10 dias na temperatura de 40°C para secagem total do material. Posteriormente procederam-se as análises laboratoriais utilizando metodologia de biodigestão.

Influência dos tratamentos sob a comunidade de fungos endofíticos

Para avaliar se o aumento de CO₂ e temperatura no cultivo da soja influencia na comunidade de fungos endofíticos foram utilizadas três folhas maduras, retiradas aleatoriamente, de 12 plantas de soja de cada um dos quatro tratamentos testados (n = 36). No laboratório, em uma capela de fluxo laminar, as folhas foram submetidas à esterilização superficial passando pelo seguinte tratamento: 1 minuto numa solução 75% etanol; 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 3-5%; 1 minuto em etanol 75%; e 30 segundos em água estéril (modificado de Fisher et al., 1994). Posteriormente, 10 fragmentos (~5x5 mm) de cada folha foram colocados em uma placa estéril contendo o meio de cultura BDA (Batata - Dextrose - Agar) contendo 150mg/L de clorafenicol para inibir o crescimento bacteriano. As placas foram fechadas, lacradas com papel filme e incubadas a 25 ± 1°C para o crescimento dos fungos endofíticos. O isolamento dos fungos endofíticos foi feito pela transferência de micélio para novas placas

contendo BDA (Fisher et al. 1994). Os fungos endofíticos encontrados eram micélios estéreis e foram separados em *morfotaxa* a partir dos aspectos macroscópicos (cor: principal e secundária, textura, relevo e aspecto da borda) (Hilarino et al. 2011). Os exemplares passaram por análise biomolecular e os resultados foram submetidos a comparações através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool no GenBank - NCBI (National Center for Biotechnology Information Website) a fim de detectar similaridades com as espécies já registradas. Para cada tratamento foram avaliadas: a riqueza, a abundância (frequência de ocorrência dos morfotaxa nos tratamentos) de fungos endofíticos e a similaridade dos morfotaxa entre os tratamentos.

Influência dos tratamentos no consumo das folhas de soja por S. frugiperda

Para avaliar se o cultivo da soja em atmosfera enriquecida de CO₂ e temperatura elevada tem influência na preferência de consumo de folhas pela lagarta *Spodoptera frugiperda*, os tratamentos foram comparados dois a dois, o que resultou em um fatorial de seis comparações (Ctrl e +T; Ctrl e +C; Ctrl e +C+T; +T e +C; +T e +C+T; +C e +C+T). Foram feitas 12 repetições para cada uma. O consumo foi avaliado utilizando dois discos foliares (área total = 1,32 cm²) de cada par de tratamento comparado. Para montagem do experimento foram utilizadas placas estéreis (90x15mm) forradas com papel filtro umedecido com água estéril. Sobre o papel, foram colocados um par de discos de cada um dos dois tratamentos comparados, de forma oposta na região de maior circunferência da placa. Ao centro foram acrescentadas 10 lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, oriundas de criação da Embrapa Milho e Sorgo. As placas foram fechadas e embrulhadas em papel alumínio (para evitar o contato com a luz), e mantidas a temperatura de 25 ± 1°C. Após 24 horas, todas as placas passaram por registro fotográfico com escala milimétrica. As imagens dos discos foliares consumidos

foram utilizadas para o cálculo da área consumida no software Sigma Scan Pro. Para avaliar se houve diferenças na área consumida dos discos foliares de soja foi utilizada a análise de GLM no Software R 3.0 (R Development Core Team, 2013) com teste de contraste a 5% de probabilidade.

Análise de dados

Para comparar as concentrações de C, N e C:N foliar nos quatro tratamentos de CO₂ e temperatura foram feitas análises de GLM e com posterior teste de contraste (5% de probabilidade) usando Software R 3.0. Para determinar se haviam diferenças entre os quatro tratamentos no número de colônias isoladas por indivíduo e na riqueza dos fungos endofíticos foram feitas análises de GLM (quasipoisson) e teste de contraste (5% de probabilidade) no pacote RT4Bio do Software R R 3.0 (R Development Core Team, 2013). A similaridade de morfotaxa entre os tratamentos foi calculado utilizando o índice de Jaccard no Software Past (ver. 2.17). Para avaliar se houve diferenças na área consumida dos discos foliares de soja foi utilizada a análise de GLM no Software R 3.0 (R Development Core Team, 2013) com teste de contraste a 5% de probabilidade.

Resultados

A concentração de nitrogênio (N) foliar diferiu entre os tratamentos, sendo que a maior concentração foi encontrada em folhas cultivadas no tratamento +T [N = 3,774 ± 0,33 (dag/Kg); p < 0,05; Tabela 1]. Neste tratamento a concentração de nitrogênio foliar foi ~25% maior em relação aos demais tratamentos. Por outro lado, a concentração de

carbono (C) não diferiu entre as folhas dos quatro tratamentos testados ($p > 0,05$; Tabela 1). Já, a razão entre C:N foi maior no tratamento com +C ($p < 0,05$; Tabela 1).

Ao todo, foram isoladas 65 colônias de fungos endofíticos, apresentando 39 morfotaxa diferentes. O número total de colônias isoladas (n_i) e morfotaxa (n_m) de fungos endofíticos foi maior no tratamento +T ($n_i = 25$; $n_m = 19$), seguido do +C ($n_i = 20$; $n_m = 12$), Ctrl ($n_i = 14$; $n_m = 11$) e +C+T ($n_i = 5$; $n_m = 5$). O número de colônias isoladas (média = 2,083; $p = 0,039$) (Figura 1a) e morfotaxa (média = 2,083; $p = 0,022$) (Figura 1b) foi maior no tratamento +T. A similaridade de morfotaxa de fungos endofíticos entre os tratamentos foi baixa (Figura 2; Tabela 1). Os tratamentos que apresentaram maior similaridade (12%) foram +C e +T. Observou-se que o morfotaxa 2 ocorreu apenas quando há elevação de temperatura e o morfotaxa 9 apenas no elevado CO₂.

O consumo dos discos foliares por *S. frugiperda* diferiu entre os tratamentos testados ($p < 0,05$). Folhas dos tratamentos com elevado CO₂ foram mais consumidas pelas lagartas quando estavam sujeitas a temperatura ambiente (área média de consumo = 38%) do que quando em elevada temperatura (28%) ($p < 0,05$; Figura 3a). Observou-se sob temperatura ambiente, as folhas que estavam em elevado CO₂ foram mais consumidas (45%) do que as que estavam em CO₂ ambiente (23%) ($p < 0,001$; Figura 3b). As demais comparações entre os tratamentos não apresentaram diferenças significativas.

Discussão

A elevação da concentração atmosférica de CO₂ e da temperatura influenciou na concentração de nitrogênio foliar e na relação C:N da soja estudada. A elevação das concentrações de CO₂ em condições de temperatura ambiente causou uma diminuição

do nitrogênio e conseqüentemente aumentou a relação C:N foliar da soja. Apesar da elevação da temperatura aumentar as concentrações de nitrogênio foliar em condições de CO₂ ambiente, em condições de elevado CO₂ este aumento da concentração de nitrogênio foliar não ocorreu. O aumento da relação C:N é comumente relatado em atmosfera enriquecida em CO₂ como resultado do aumento da taxa fotossintética e maior quantidade C disponível, porém isto pode ser limitado pela disponibilidade de suprimento de N (Stitt & Krapp, 1999; Oren et al., 2001; Hungate et al., 2003; Luo et al., 2004). Ainsworth et al. (2002) demonstraram que o aumento do CO₂ afeta a distribuição de nutrientes planta, geralmente diminuindo o teor de nitrogênio foliar quando as plantas de soja não foram inoculadas com bactérias noduladoras.

Há inúmeros fatores que podem ocasionar a redução de nitrogênio e aumento da relação C:N em elevada concentração de CO₂ atmosférico. Segundo Stitt & Krapp (1999) as altas concentrações de CO₂ causam uma maior expansão foliar e maior produção de amido que pode representar 40 - 50% do peso da folha, e, conseqüentemente uma aparente diminuição nas concentrações de outros nutrientes na folha. Outro efeito que pode propiciar o decréscimo das concentrações de N nos tecidos vegetais em plantas C3 crescidas em elevada concentração de CO₂ está associada à redução da condutância estomática, que conseqüentemente leva a diminuição da transpiração (Polley et al. 1999). Isto pode afetar a absorção de nutrientes do solo, incluindo N, e reduzir a disponibilidade de nitrogênio na planta. Outra interpretação sobre a redução da concentração do N em elevadas concentrações de CO₂ sugere que isso ocorre devido a fatores ontogenéticos, pois com o crescimento rápido nestas condições de elevado CO₂, ocorre também a aceleração da senescência. Além disso, sabe-se que os efeitos do incremento fotossintético como resposta a elevação das

concentrações de CO₂ atmosférico em plantas C3 a longo prazo diminui (Sicher & Kremer, 1995). Isso ocorre por causa da aclimação fotossintética (Huang et al., 2003; Seneweera et al., 2011) e esta é frequentemente associada ao acúmulo de carboidratos não estruturais nas folhas e uma diminuição na concentração de N nas folhas e na planta (Stitt & Krapp, 1999; Nowak et al., 2004).

As mudanças fisiológicas nos padrões nutricionais da soja com aumento do CO₂ atmosférico e da temperatura afetaram a riqueza e mais pronunciadamente a composição de fungos endofíticos. Em elevadas concentrações de CO₂, onde ocorreu a diminuição das concentrações de N foliar, também foi observada a diminuição na riqueza e número de colônias de fungos endofíticos. No tratamento +T, onde foi observada maior concentração de N foliar e menor razão C:N, encontrou-se maior riqueza de fungos endofíticos. Esses resultados reforçam a forte relação das características vegetais (como produção de substâncias secundárias e acúmulo de nutrientes) com a comunidade de fungos endofíticos como observado por Sanchez-Azofeifa et al. (2012) e Fernandes et al. (2011). Há uma certa especificidade entre a comunidade de fungos endofíticos e a planta hospedeira (Azevedo 1998), associada principalmente as características estruturais e químicas da planta que favorecem, permeiam ou impedem o desenvolvimento de espécies endofíticas (Fernandes et al. 2011). As mudanças nas características que ocorrem com o aumento do CO₂, como também por estresse ambiental, ou mesmo ao longo do desenvolvimento das folhas, acompanham a riqueza e a composição de fungos endofíticos (Sanchez-Azofeifa et al.; 2012; Espinosa-Garcia & Langenheim, 1990; Hilarino et al., 2011; Fernandes et al., 2011). Qualquer condição ambiental adversa também pode exercer um importante papel de alteração sobre as comunidades de fungos endofíticos (Tayung et al., 2012). Além

disso, a temperatura mais alta, como fator isolado, pode também favorecer a ocorrência de uma maior diversidade de fungos endofíticos (Brosi et al. 2011), embora existam espécies que apresentam uma faixa de temperatura para o desenvolvimento (Li et al. 2012).

As modificações nutricionais (N e razão C:N) observadas na soja dos diferentes tratamentos de CO₂ e temperatura tiveram um impacto direto na herbivoria. A elevada concentração de CO₂ influenciou na qualidade nutricional das folhas da soja, que apresentaram qualidade reduzida (menor disponibilidade de N e maior razão C:N). Por este motivo, as lagartas de *S. frugiperda* consumiram maior quantidade das folhas (consumo compensatório) para suprir as suas necessidades nutricionais. O mesmo consumo compensatório em condições de baixa concentração de nitrogênio, observados em tratamento com alta concentração de CO₂ também foi observado por outros pesquisadores com outra espécie de *Spodoptera* (Simpson et al., 1990). Bezemer & Jones (1998) encontraram correlação entre mudanças nos níveis de N e carboidratos de plantas cultivadas sob elevadas concentrações de CO₂ e as mudanças no consumo das lagartas. Além disso o aumento da concentração de CO₂ e temperatura pode também reduzir a concentração de substâncias fenólicas, devido ao aumento de alocação a diferentes estruturas (como espessura foliar, aumento de tricomas) (Zvereva & Kozlov 2006) e conseqüentemente aumentar a herbivoria. Casteel e colaboradores (2008) demonstraram que o elevado CO₂ também reconfigura os fitormônios em plantas de soja, resultando em diminuição dos níveis de produtos químicos de defesa e aumento da suscetibilidade ao herbívoro *Popillia japonica* (Zavala et al., 2008; Zavala et al., 2009).

Considerações finais

Em conjunto, nossos resultados demonstram que as mudanças dos níveis de CO₂ e temperatura alteram a qualidade nutricional foliar da soja, que tais alterações podem causar impactos na riqueza e composição da micota endofítica bem como no ataque da praga *S. frugiperda* respondem as modificações nutricionais encontradas na folha através do consumo foliar.

Nós verificamos que as elevadas concentrações de CO₂ previstas para 2100 reduziram a qualidade nutricional das folhas da soja, com drástica redução da riqueza e alteração da composição da micota endofítica associada e uma maior vulnerabilidade a herbivoria pela praga *S. frugiperda*. As altas temperatura previstas poderão aumentar ainda mais a herbivoria pela *S. frugiperda*.

Estas respostas indicam que manejos futuros precisam ser planejados para minimizar os efeitos das mudanças climáticas. É provável que algumas espécies de fungos endofíticos da soja possam reduzir os efeitos da diluição do nitrogênio, a palatabilidade dos herbívoros em altas concentrações de CO₂.

Agradecimentos

Nós agradecemos a parceria com a EMBRAPA Soja (V. Fronza) e EMBRAPA Milho e Sorgo (S. M. Mendes e K. B. Boregas) pela parceria e fornecimento das sementes de soja e lagarta. Ao CNPq (479485/2012-7) pelo apoio financeiro e a M. V. Beirão pelo auxílio com as análises no Software R. Agradecemos ainda a A. R. Cordeiro, E. G. D. Mota, L. B. Tameirão, M. M. de Castro, M. Batista, A. C. V. Pires e F. A. Ladeira pelo auxílio e dedicação durante os experimentos.

Referências

- Agrell, J.; McDonald, E. P.; Lindroth, R. L. 2000. Effects of CO₂ and light on tree-insect interactions. **Oikos**, 88:259–272.
- Agrell, J.; Anderson, P.; Oleszek, W.; Stochmal, A. & Agrell, C. 2006. Elevated CO₂ levels and herbivore damage alter host plant preferences. **Oikos**, 112:63-72.
- Ainsworth, E. A.; Davey, P. A.; Bernacchi, C. J.; Dermody, O. C.; Heaton, E. A.; Moore, D. J. & Long, S. P. 2002. A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (glycine max) physiology, growth and yield. **Global Change Biology**, 8:695-709.
- Arnone, J. A. & Körner, C. 1995. Soil and biomass carbon pools in model communities of tropical plants under elevated CO₂. **Oecologia**, 104:64–71.
- Arnold, A. E.; Mejía, L. C.; Kyllö, D.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Robbins, N. & Herre, E. A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100: 15649-15654.
- Azevedo, J. L.; Maccheroni Jr., W.; Pereira, J. O.; Araújo, W. L. de. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3: 40-65.
- Azevedo, J.L. 1998. Microorganismos endofíticos. In: Melo, I. S. de; Azevedo, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna, Embrapa, pp. 117-137.
- Awmack, C. S. & Leather, S. R. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review Entomology**, 47:817–844.

Bale, J. S.; Masters, G. J.; Hodgkinson, I. D.; Awmack, C.; Bezemer, T. M.; Brown, V. K.; Butterfield, J.; Buse, A.; Coulson, J. C.; Farrar, J.; Good, J. E. G.; Harrington, R.; Hartley, S.; Jones, T. H.; Lindroth, R. L.; Press, M. C.; Symrnioudis, I.; Watt, A. D. & Whittaker, J. B. 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. **Global Change Biology**, 8:1-16.

Bezemer, R. M. & Jones, T. H. 1998. Plant-insect interactions in elevated atmospheric CO₂: quantitative analyses and guild effects. **Oikos**, 82:212–222.

Brosi, G. B.; McCulley, R. L.; Bush, L. P.; Nelson, J. A.; Classen, A. T. & Norby, R. J. 2011. Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. **New Phytologist**, 189:797–805.

Busato, G. R.; Grutzmacher, A. D.; Garcia, M. S.; Giolo, F. P. & Martins, A. F. 2002. Consumo e utilização de alimentos por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, 31: 525-529.

Carroll, G.C. & Petrini, O. 1983. Patterns of substrate utilization by some endophytes from coniferous foliage. **Mycologia**, 75, 53-63.

Casteel, C. L.; O'Neill, B. F.; Zavala, J. A.; Bilgin, D. D.; Berenbaum, M. R. & DeLucia, E. H. 2008. Transcriptional profiling reveals elevated CO₂ and elevated O₃ alter resistance of soybean (*Glycine max*) to Japanese beetles (*Popillia japonica*). **Plant Cell Environ**, 31:419–434.

Ceulemans, R. & Mousseau, M. 1994. Tansley review No. 71 effects of elevated atmospheric CO₂ on woody plants. **New Phytologist**, 127:425–446.

Clay, K. & Holah, J. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. **Science**, 285:1742-1744.

Coley, P. D. 1998. Possible effects of climate change on plant/herbivore interactions in moist tropical forests. **Climatic Change**, 39:455–472

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos. Safra 2009/2010. Quarto Levantamento. Janeiro/2010. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_09.12.pdf (Acesso em 20 de abril de 2015).

Cornelissen, T. 2011. Climate change and its effects on terrestrial insects and herbivory patterns. **Neotropical Entomology**, 40:155-163.

Coviella, C. E. & Trumble, J. T. 1999. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. **Conservation biology**, 13:700-712.

Cowling, S.A. & Sage, R.F. 1998. Interactive effects of low atmospheric CO₂ and elevated temperature on growth, photosynthesis and respiration in *Phaseolus vulgaris*. **Plant, Cell and Environment**, 21: 427-435.

Cruz, I.; Figueiredo, M. L. C.; Oliveira, A. C.; Vasconcelos, C. A. 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. **International Journal of Pest Management**, 45: 293-296.

Curtis, P. S. & Wang, X. 1998. A meta-analysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form and physiology. **Oecologia**, 113:299–313.

- De Lucia, E. H.; Moore, D. J. & Norby, R. J. 2005. Contrasting responses of forest ecosystems to rising atmospheric CO₂: Implications for the global C cycle. **Global Biogeochemical Cycles**, 19:1-9.
- Douglas, A. E.; François, C. L. M. J. & Minto, L. B. 2006. Facultative ‘secondary’ bacterial symbionts and the nutrition of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Physiologic Entomology**, 31:262–269.
- Espinosa-Garcia, F. J. & Langenheim, J. H. 1990. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population diversity and spatial patterns. **New Phytologist**, 116:89-97.
- Fernandes, G. W.; Oki, Y.; Sanchez-Azofeifa, A.; Faccion, G. & Amaro-Arruda, H. C. 2011. Hail impact on leaves and endophytes of the endemic threatened *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae). **Plant Ecology**, 212: 1687-1697.
- Fisher, P. J.; Petrini, O.; Petrini, L. E. & Sutton, B. C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. From England, Majorca and Switzerland. **New Phytologist**, 127:133-137.
- Gomez, S. A. 2009. É tempo de preocupação com as pragas da soja. **Revista Campos e Negócio**, 5:2.
- Hakala, K. 1998. Growth and yield potential of spring wheat in a simulated changed climate with increased CO₂ and higher temperature. **European Journal of Agronomy**, 9: 41-52.
- Hamilton EW III, Heckathorn SA, Joshi P, Wang D, Barua D (2008) Interactive effects of elevated CO₂ and growth temperature on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃ and C₄ species. **J Integr Plant Biol** 50:1375–1387.

- Hao, X. Y.; Han, X.; Lam, S. K.; Wheeler, T.; Ju, H.; Wang, H.R.; Li, Y.C. & Lin, E.D. 2012. Effects of fully open-air [CO₂] elevation on leaf ultrastructure, photosynthesis, and yield of two soybean cultivars. **Photosynthetica**, 50:362-370.
- Hilarino, M. P. A.; Oki, Y.; Rodrigues, L.; Santos, J. C.; Corrêa Junior, A.; Fernandes, G. W. & Rosa, C. A. 2011. Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). **Acta Botanica Brasilica**, 25: 815-821.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. 1950. The water culture method for growing plants without soils. **Circular California Agricultural Experiment Station**, 347:1-32.
- Huang, Y.; Li, H.; Hutchison, C. E.; Laskey, J. Kieber, J. J. 2003. Biochemical functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, 33:221-233.
- Hungate, B. A.; Dukes, J. S.; Shaw, M. R., Luo, Y. & Field, C. B. 2003. Nitrogen and climate change. **Science**, 302:1512-1513.
- Hunter, M. D. 2001. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. **Agricultural and Forest Entomology**, 3:153-159.
- IPCC. **Climate Change 2007: the physical science basis**. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Eds. Solomon, S.; Qin, D.; Manning, M.; Chen, Z.; Marquis, M.; Avery, K. B.; Miller, M. T. & H. L. Cambridge University Press, Cambridge.
- Körner, C. & Arnone, J. A. 1992. Responses to elevated carbon dioxide in artificial tropical ecosystems. **Science**, 257:1672-1675.

- Körner, C. 2003. Ecological impacts of atmospheric CO₂ enrichment on terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, 361:2023–2041.
- Lake, J. A. & Wade, N. 2009. Plant-pathogen interactions and elevated CO₂: morphological changes in favor of pathogens. **Journal of Experimental Botany**, 60: 3123-3131.
- Li, H. Y.; Shen, M.; Zhou, Z. P.; Li, T.; Wei, Y. L. & Lin, L. B. 2012. Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China. **Fungal Diversity**, 54:79-86.
- Lincoln, D. E., Couvet, D., & Sionit, N. 1986. Response of an insect herbivore to host plants grown in carbon dioxide enriched atmospheres. **Oecologia**, 69,556-560.
- Lindroth, R. L. 1996. Consequences of elevated atmospheric CO₂ for forest insects. In: Körner, C. & Bazzaz, F. A. (Ed.) **Carbon dioxide, populations and communities**. Physiological Ecology Series. Academic Press, 347-361.
- Luo, Y.; Su, B.; Currie, W. S.; Dukes, J. S.; Finzi, A.; Hartwig, U.; Hungate, B.; Mcmurtrie, R. E.; Oren, R.; Parton, W. J.; PATAKI, D. E.; Shaw, M. R.; Zak, D. R. & Field, C. B. .2004. Progressive Nitrogen Limitation of Ecosystem Responses to Rising Atmospheric Carbon Dioxide. **BioScience**, 54:731-739.
- Mattson, W. J. Jr. 1980. Herbivory in Relation to Plant Nitrogen Content. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 11:119-161.
- Morrison, J. I. L. & Morecroft, D. M. 2006. **Plant Growth and Climate Change**. Wiley-Blackwell. 232pp.
- Newman, J.A., Abner, M.L., Dado, R.G., Gibson D.J., Brookings A. & Parsons A.J. 2003. Effects of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on tall fescue:

growth, photosynthesis, chemical composition and digestibility. **Global Change Biology**, 9:425-437.

Norby, R. J.; Hanson, P. J.; O'Neill, E. G.; Tschaplinski, T. J.; Weltzin, J. F.; Hansen, R. A.; Cheng, W.; Wullschlegel, S. D. Gunderson, C.A. Edwards, N. T. & Johnson D. W. 2002. Net primary productivity of a CO₂-enriched deciduous forest and the implications for carbon storage. **Ecological Applications**, 12:1261–1266.

Omacini, M.; Chaneton, E.; Ghersa, C. M. & Muller, C. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, 409:78–81.

Oren, R.; Ellsworth, D.S.; Johnsen, K.H.; Phillips, N. & Ewers, B.E. Maier, C.; Schafer, K. V. R.; McCarthy, H.; Hendrey, G.; McNulty, S. G. & Katul, G. G. 2001. Soil fertility limits carbon sequestration by forest ecosystems in a CO₂-enriched atmosphere. **Nature**, 411:469-472.

Pennisi, E. 2003. Modernizing the Tree of Life. **Science**, 300:1692-1697.

Peñuelas, J. & Estiarte, M. 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? **Trees**, 13: 20-24.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H. & Hirano, S. S.

(Ed.) **Microbial ecology of leaves**. Berlin, Heidelberg, Germany & New York, NY,

USA: Springer, pp.179–197.

Pimentel, I. C.; Glienke-Blanco, C.; Gabardo, J.; Stuart R. M.; Azevedo, J. L. 2006. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49:705-711.

- Pogue, G. M. 2002. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society** 43: 1-202
- Polley, H. W.; Johnson, H. B.; Tischler, C. R. & Torbert, H. A. 1999. Links between transpiration and plant nitrogen: Variation with atmospheric CO₂ concentration and nitrogen availability. **International Journal of Plant Sciences**, 160:535-542.
- Poorter, H.; Van Berkel, Y.; Baxter, R.; Den Hertog, J.; Dijkstra, P.; Gifford, R. M.; Griffen, K. L.; Roumet, C.; Roy, J.; Wong, S. C. 1997. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. **Plant Cell Environ**, 20:472–482.
- Redman, R. S.; Sheehan, K. B.; Stout, R.G.; Rodriguez, R. J. & Henson, J. M. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science** 298: 1581.
- Reekie, E. G. & Bazzaz, F. A. 1989. Competition and patterns of resource use among seedlings of five tropical trees grown at ambient and elevated CO₂. **Oecologia**, 7:9212–9222
- Ricieri, J. A.; Passos, M. M.; Sebem, M.; Turra, S; Gouvea, A.; Feltrin, G.; Gudoski, M.; Mazaro, S. M.; Donazollo, J. 2006. O manejo de pragas da soja no sudoeste do Paraná: 2005-2006. **Synergismus Scientifica**, 1:150-155.
- Richardson, M. D.; Hoveland, C. S.; Bacon, C. W. 1993. Photosynthesis and stomatal conductance of symbiotic and nonsymbiotic tall fescue. **Crop Science**, 33:145–149.
- Rillig, M. C.; Field, C. B.; Allen, M. F. 1999. Fungal root colonization responses in natural grasslands after long-term exposure to elevated atmospheric CO₂. **Global Change Biology**, 5:577–585.

Roth, S.K. & R.L. Lindroth. 1995. Elevated atmospheric CO₂: effects on phytochemistry, insect performance and insect-parasitoid interactions. **Global Change Biology**, 1:173-182.

Rudgers, J. A.; Koslow, J. M. & Clay, K. 2004. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, 7: 42-51.

Sanchez-Azofeifa, A., Oki, Y., Fernandes, G. W., Ball, R. A., & Gamon, J. 2012. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, 26: 291-299.

Schardl, C. L.; Leuchtman, A. & Spiering, M. J. 2004. Symbioses of grasses with seed borne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, 55:315–340.

Schulz, B. & Boyle, C. 2006. What are endophytes? In: Schulz, B.; Boyle, C. & Sieber, T.N. (Ed.) **Microbial root endophytes**. Berlin, Heidelberg, Germany & New York, NY, USA: Springer, 1–13.

Seneweera, S.; Makino, A.; Hirotsu, N.; Norton, R. & Suzuki, Y. 2011. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. **Environmental and Experimental Botany**, 71:128–136.

Sicher, R. C. & Kremer, D. F. 1995. Photosynthetic acclimation and photosynthate partitioning in soybean leaves in response to carbon dioxide enrichment. **Photosynthesis Research**, 46: 409–417.

Simpson, S. J.; Simmonds, M. S. J.; Blaney, W. M. & Jones, J. P. 1990. Compensatory dietary selection occurs in larval *Locusta migratoria* but not *Spodoptera littoralis* after a

single deficient meal during ad libitum feeding. **Physiological Entomology**, 15: 235–242.

Stiling, P. & Cornelissen, T. 2007. How does elevated carbon dioxide (CO₂) affect plant–herbivore interactions? A field experiment and meta-analysis of CO₂ mediated changes on plant chemistry and herbivore performance. **Global Change Biology**, 13: 1823-1842.

Stitt, M. & Krapp, A. 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell & Environment**, 22:583–621.

USDA(a). 2015. World Agricultural Supply and Demand Estimates. **Wasde**, 541:1-40.

USDA(b). 2015. World Agricultural Production. **Foreign Agricultural Service**, Wap:5-15.

Veteli, T. O. 2003. **Global atmospheric change and herbivory: effects of elevated levels of UV-B radiation, atmospheric CO₂ and temperature on boreal woody plants and their herbivores**. University of Joensuu, University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology, No: 19. 107 pp.

Yadugiri, V. T. 2010. Climate change: the role of plant physiology. **Current Science**, 99:423-425.

Yuan, J. S.; Himanen, S. J.; Holopainen, J. K.; Chen, F. & Stewart, C. N. 2009. Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. **Trends in Ecology & Evolution**, 24:323–331.

Zavala, J. A.; Casteel, C. L.; DeLucia, E. H. & Berenbaum, M. R. 2008. Anthropogenic increase in carbon dioxide compromises plant defense against invasive insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105:5129–5133

Zavala, J. A.; Casteel, C. L.; Nabity, P. D.; Berenbaum, M. R.; DeLucia, E. H. 2009. Role of cysteine proteinase inhibitors in preference of Japanese beetles (*Popillia japonica*) for soybean (*Glycine max*) leaves of different ages and grown under elevated CO₂. **Oecologia**, 161:35–41

Ziska, L.H. 1998. The influence of root zone temperature on photosynthetic acclimation to elevated carbon dioxide concentrations. **Annals of Botany**,81:717-721.

Zvereva, E. L. & Kozlov, M. V. 2006. Consequences of simultaneous elevation of carbon dioxide and temperature for plant–herbivore interactions: a metaanalysis. **Global Change Biology**, 12, 27–41.

Legendas das figuras

Figura 1. (a) Número (média \pm EPM) de colônias de fungos endofíticos isolados em indivíduos de soja cultivadas em quatro tratamentos de temperatura e CO₂ (teste G.L.M, P=0,039) (b) número (média \pm EPM) de morfotaxa de fungos endofíticos por indivíduos de soja cultivadas em quatro tratamentos de temperatura e CO₂ (teste G.L.M, p = 0,022). Tratamentos: Ctrl - [CO₂] (~400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambientes; +T [CO₂] ambiente e temperatura elevada em 3°C em relação a temperatura ambiente; +C [CO₂] elevada (~ 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente) e +C+T [CO₂] e temperatura elevados. (*) Indica que houve significância p < 0,05.

Figura 2. Cluster agrupando por similaridade entre os tratamentos Ctrl - [CO₂] ambiente (~400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambientes; +T [CO₂] ambiente e temperatura elevada em 3°C em relação a temperatura ambiente; +C [CO₂] elevada (~ 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente) e +C+T [CO₂] e temperatura elevados, utilizando o Índice de Jaccard (Coeficiente de correlação = 0,818).

Figura 3. Área foliar da soja (*Glycine max*) consumida (média \pm EPM) por *Spodoptera frugiperda* quando combinados os tratamentos: (a) elevado CO₂ e temperatura ambiente (+C) e CO₂ ambiente e temperatura ambiente (Ctrl) (teste G.L.M, p < 0,001); (b) Área consumida (média \pm EPM) por *Spodoptera frugiperda* quando combinados os

tratamentos elevado CO₂ e elevada temperatura (+C+T) e elevado CO₂ e temperatura ambiente (+C) (teste G.L.M, $p < 0,05$).

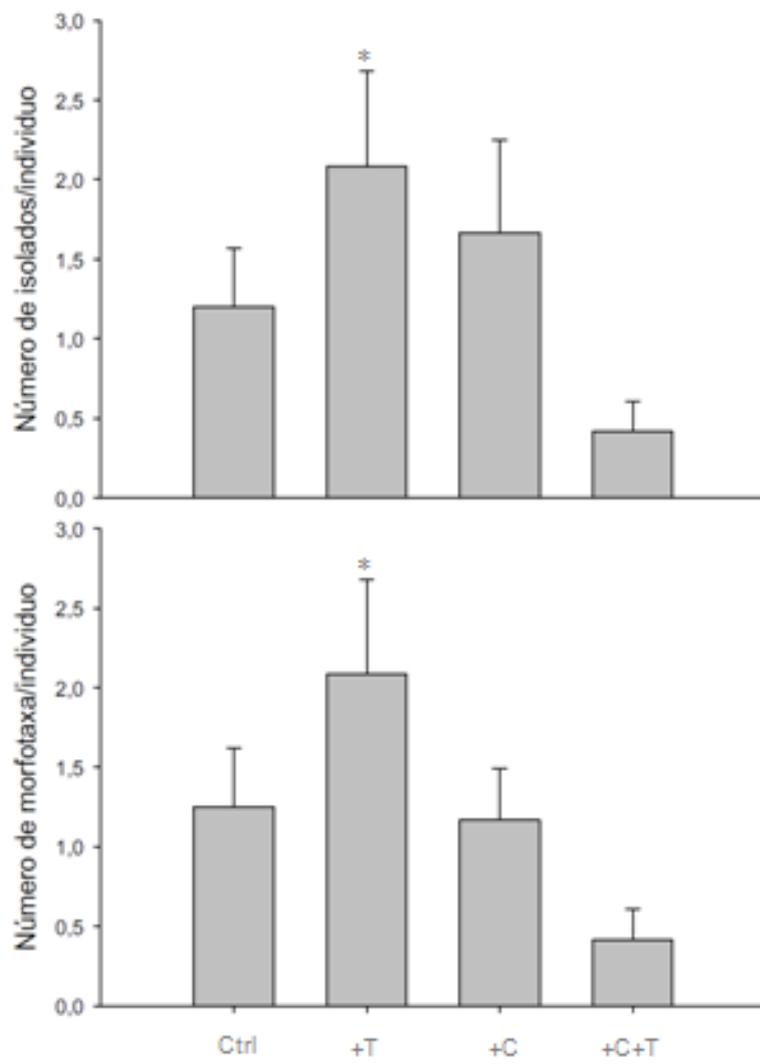


Figura 1

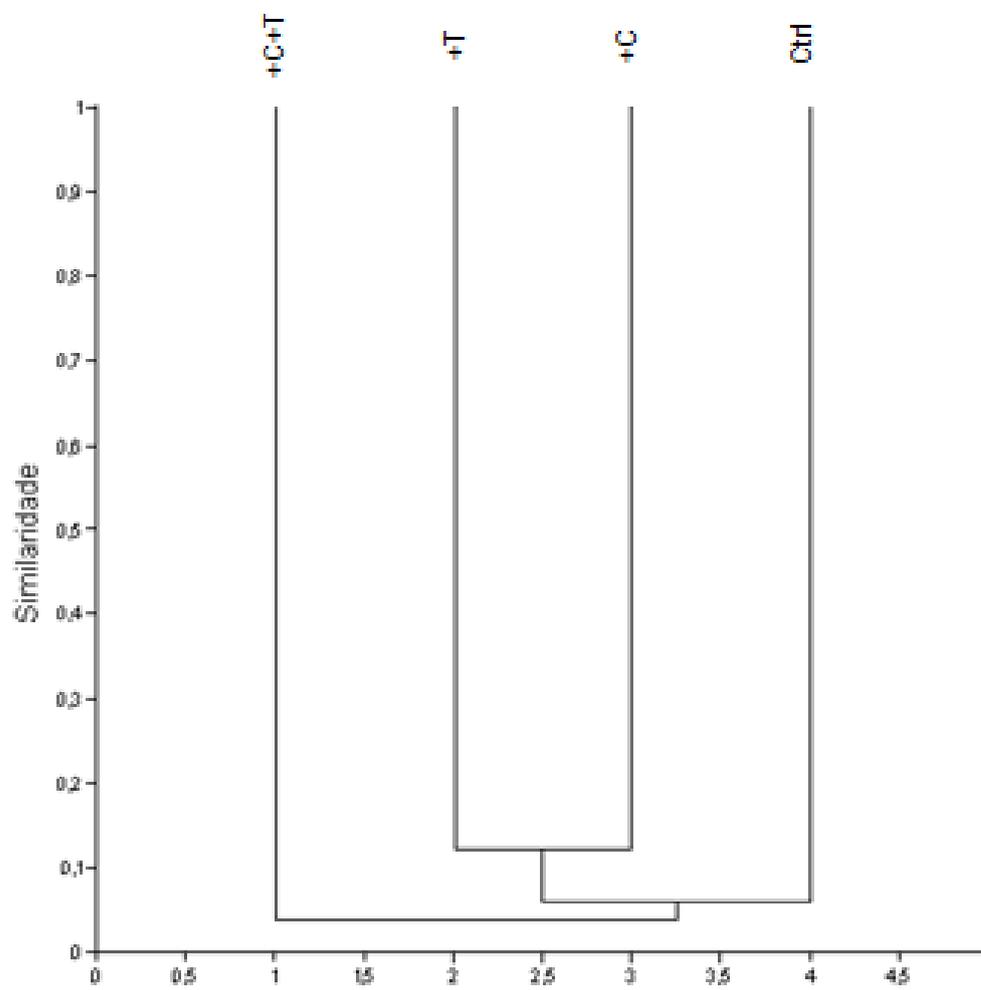


Figura 2

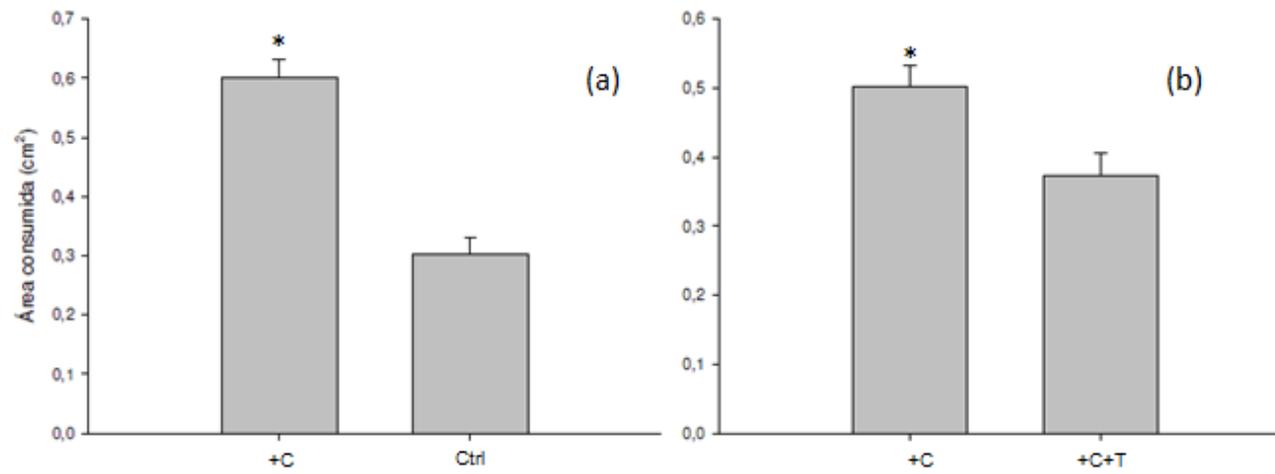


Figura 3

Tabela 1. Média (\pm erro padrão) da concentração de carbono (C), nitrogênio (N) e razão entre C e N em folhas de soja (*Glycine max*) nos quatro tratamentos avaliados. Tratamentos: Tratamentos: Ctrl - [CO₂] ambiente ($\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambientes; +T [CO₂] ambiente e temperatura elevada em 3°C; +C [CO₂] elevada ($\sim 800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente) e +C+T [CO₂] e temperatura elevados. (*) Indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Tratamentos	Carbono (C)	Nitrogênio (N)	C:N
Ctrl	51,735 \pm 0,117	3,206 \pm 0,241	17,244 \pm 1,702
+T	51,894 \pm 0,33	3,774 \pm 0,104*	13,845 \pm 0,403
+C	51,999 \pm 0,17	2,864 \pm 0,179	19,153 \pm 1,836*
+C+T	52,227 \pm 0,97	3,031 \pm 0,096	17,406 \pm 0,619
p	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05

Tabela 2. Similaridade de morfotaxa de fungos endofíticos entre os tratamentos de cultivo da soja (*Glycine max*) utilizando Índice de Jaccard (Coeficiente de Correlação = 0,818). Tratamentos: Ctrl - [CO₂] (~400 μmol mol⁻¹) e temperatura ambientes; +T [CO₂] ambiente e temperatura elevada em 3°C em relação a temperatura ambiente; +C [CO₂] elevada (~ 800 μmol mol⁻¹) e temperatura ambiente) e +C+T [CO₂] e temperatura elevados.

Tratamentos	Ctrl	+T	+C	+C+T
Ctrl	1	0,07	0,05	0
+T	0,07	1	0,12	0,04
+C	0,05	0,12	1	0,07
+C+T	0	0,04	0,07	1

Capítulo III

Efeitos sinérgicos do aumento de CO₂ e das ondas de calor na termotolerância fotossintética da soja em um cenário de mudanças climáticas *

*artigo formatado para a revista *Photosynthetica: International Journal for Photosynthesis
Research*

Efeitos sinérgicos do aumento de CO₂ e das ondas de calor na termotolerância fotossintética da soja em um cenário de mudanças climáticas*

Resumo

Até o final deste século, as lavouras de soja (*Glycine max* (L.) Merr) vão experimentar uma atmosfera com o dobro da quantidade de CO₂ e alguns graus a mais de temperatura em relação às condições atuais. Embora a performance e o desenvolvimento sob elevado CO₂ tenham sido bastante estudados, ainda são poucos estudos que consideram as respostas celulares da tolerância fotossintética desta cultura. Neste estudo nós avaliamos a tolerância fotossintética ao choque térmico agudo *in vitro* em soja cultivada sob aumento de CO₂ e temperatura. Os resultados mostraram que as mudanças climáticas diminuíram a termotolerância do fotossistema II da soja, refletido na redução da temperatura de queda de 50% no rendimento quântico potencial bem como no conteúdo de todos os pigmentos fotossintéticos analisados. Estas respostas podem indicar que as ondas de calor podem representar uma ameaça para a cultura da soja em um cenário de mudanças climáticas futuras.

Palavras chaves: aquecimento global, aumento de CO₂, fotossistema II, pigmentos, termotolerância, *Glycine max*

Introdução

Até o final deste século, a soja (*Glycine max*) irá crescer sob uma atmosfera com o dobro da quantidade de CO₂ atual (IPCC, 2014). Por se tratar da mais importante oleaginosa cultivada no mundo (Sudaric *et al.* 2010; Schmutz *et al.* 2010), com previsão de área plantada de 33,4 milhões de hectares e produção de 1.764 milhões de sacas na safra 2015/2016 (USDA, 2015), sua performance de desenvolvimento sob elevado CO₂ tem sido bastante avaliada. Na metanálise realizada por Ainsworth *et al.* (2002) ficou evidente que a soja cultivada sob CO₂ elevado apresenta aumento na assimilação de carbono e diminuição na condutância estomática com consequente aumento no teor de carboidratos foliar, incremento no crescimento e no rendimento. Também foram descritas melhorias na eficiência do uso da água e aumento no índice de área foliar (IAF), bem como na biomassa aérea (Dermody *et al.* 2006). Além disto, os estudos indicam que a maior eficiência fotossintética gerou incremento significativo na produção de grãos (Ort *et al.* 2006).

Embora os efeitos do CO₂ sejam bem descritos para esta cultura, ainda carecem estudos avaliando os efeitos do aumento da temperatura ou da interação destes dois fatores nesta leguminosa de interesse mundial ainda são escassos. Segundo o IPCC (2014), associada a elevação do CO₂, a previsão é de que a temperatura global aumente entre 1.1 e 4.8 °C até o fim do século XXI. Estas mudanças podem intensificar a severidade e a duração de períodos com temperaturas excepcionalmente altas, conhecidos como ‘ondas de calor’ (IPCC 2014). Apesar do amplo conhecimento acerca da soja cultivada sob atmosfera enriquecida com CO₂, pouco se sabe sobre como esta espécie responderá às ondas de calor previstas para os próximos anos (Siebers *et al.* 2015).

Na soja, dois dos processos mais sensíveis à temperatura e centrais para a produtividade são a fotossíntese líquida (A) e a produção de vagens (Zinn *et al.* 2010). Em geral, os efeitos negativos do estresse térmico nas plantas são influenciados pelos efeitos negativos na fotossíntese, que está entre os processos fisiológicos mais termosensíveis (Wise *et al.* 2004; Kim e Portis 2005). Entre estes efeitos negativos na fotossíntese sob alta temperatura está o dano ao transporte de elétrons (Taub *et al.* 2000). A diminuição na absorção de CO_2 devido ao fechamento estomático pode gerar um excesso de elétrons que não podem ser consumidos nas reações de carboxilação. Estes elétrons podem reagir com o oxigênio, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS). Desta forma, se a planta não for capaz de dissipá-las, as ROS podem gerar um dano foto-oxidativo ao aparelho fotossintético, em especial o fotossistema (FS) II (Smirnoff 1993; Asada 1999). Alguns autores destacam que em temperaturas acima de 40°C ocorrem efeitos adversos no metabolismo reduzindo o crescimento da planta de soja, e este quadro é agravado ainda mais em condições de déficit hídrico (Fontana *et al.* 2001; Farias *et al.* 2007).

Características fotossintéticas sob estresse térmico podem servir como bons indicadores de termotolerância da planta (Dhanda e Munjal 2012). Uma das formas de avaliar a termotolerância é através da eficiência quântica do FSII (razão F_v/F_m), medida através da fluorescência da clorofila a . Este método tem sido amplamente utilizado para detectar perturbações induzidas pelo stress no aparelho fotossintético (Baker e Rosenqvist 2004) por ser inversamente proporcional aos danos nos centros de reação do FSII (Farquhar *et al.* 1989). Assim, esta medida pode servir como um bom indicador da termotolerância da planta (Godoy *et al.* 2011).

Embora o aumento CO₂ possa ter um efeito protetor no FSII devido a redução da produção de ROS (Erice *et al.* 2007), seus efeitos são ainda contraditórios. Os efeitos do aumento do CO₂ na tolerância fotossintética ao estresse térmico agudo apresentam resultados que variam entre efeito positivo (Hamilton *et al.* 2008; Mishra *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008), negativo (Hamilton *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008), ou mesmo nenhum efeito (Coleman *et al.*, 1991).

Apesar de tanto o aumento da temperatura como o do CO₂ terem efeitos na fotossíntese, poucos estudos têm focado nos efeitos das interações entre esses dois fatores nas respostas fisiológicas de plantas ao estresse térmico agudo (Hamilton *et al.* 2008; Faria *et al.* 2015). Entender os mecanismos destes processos e como a soja irá reagir as alterações futuras de CO₂ e temperatura é fundamental para o manejo desta cultura. O incremento da produção mundial na última década deve-se em grande parte ao aumento da área plantada e avanço da fronteira agrícola sobre ambientes naturais (D'Ávila, 2006). Isso promove mudanças no uso do solo, fator esse que está diretamente ligado às alterações climáticas (IPCC, 2014). Neste estudo avaliamos o efeito do aumento do CO₂ e da temperatura previstas para 2100 na tolerância do fotossistema II ao choque térmico agudo induzido *in vitro* em plantas de soja. Nós hipotetizamos que com o aumento do CO₂ a soja poderá apresentar uma melhoria na tolerância do FSII ao choque térmico agudo devido a maior eficiência fotossintética proporcionada por concentrações maiores deste gás. Porém, o mesmo não é esperado para o aumento da temperatura, que poderá comprometer o funcionamento do FSII.

Materiais e Métodos

Condições de cultivo e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos em câmaras de topo aberto instaladas em uma casa de vegetação localizada na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brasil (19°52'08.67"S 43°57'59.63"O). As câmaras apresentam a estrutura de alumínio, cobertas por plástico PVC conforme descrito por Aidar *et al.* (2002) (Fig. 1) com adaptações para controle de temperatura e espaço interno de 1,53 m³. Para simular as condições previstas pelo IPCC para 2100 (IPCC 2013; 2014), as câmaras foram calibradas e monitoradas por sensores para simularem quatro: Ctrl ([CO₂] e temperatura ambientes); +T ([CO₂] ambiente e temperatura elevada em 3°C); +C ([CO₂] elevada ~ 800 µmol mol⁻¹ e temperatura ambiente) e +C+T ([CO₂] e temperatura elevados). Foram utilizadas oito câmaras de topo aberto, duas câmaras para cada tratamento testado. Todas as câmaras apresentavam sensores de temperatura e a cada 15 minutos uma comparação entre as câmaras com temperatura ambiente era feita e automaticamente acionava uma resistência que elevava a temperatura em ~3°C a mais nas câmaras com temperatura elevada. As fontes de CO₂ foram cilindros pressurizados com 99,8% de CO₂, 58,3 KgF.cm⁻². A concentração atmosférica de CO₂ (800 µmol mol⁻¹) nas câmaras foi monitorada constantemente através de um medidor automático de CO₂ SBA-4 OEM[®] (PPSystems). Os experimentos foram conduzidos com umidade relativa do ar e fotoperíodo naturais. A cada 15 minutos, medidas de CO₂, temperatura e umidade relativa do ar de todas as câmaras foram armazenadas em um computador através do software Remote Integrated Control System (RICS 3.7, Evco) durante todo o experimento.

Para avaliar o efeito do aumento do CO₂ e da temperatura na tolerância do FSII ao choque térmico agudo induzido em soja, foram utilizadas sementes de certificadas da

variedade BRS MG 760S RR fornecidas pela EMBRAPA Soja. Esta variedade foi indicada pela EMBRAPA Soja por ser adaptada às condições climáticas do estado de Minas Gerais (Brasil) e apresentar resistência a diversas doenças da soja (ex.: cancro da haste, oídio, nematoide de galha, pústula bacteriana e mancha “olho-de-rã”). O plantio ocorreu no mês de outubro de 2013 simulando o período de safra da soja. As sementes foram inoculadas com bactérias noduladoras (Semia 5079: *Bradyrhizobium japonicum* e Semia 5019: *Bradyrhizobium elkanii*) para fornecer às plantas a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (N). Foram utilizados vasos de PVC preto com 32,5 cm de altura e volume de 7 litros preenchidos por solo esterilizado (substrato comercial – Terral[®] – proveniente do mesmo lote). Em todos os vasos foi adicionada a mesma quantidade de terra a qual foi umedecida de forma uniforme por três dias antes do plantio. Os 30 vasos de cada tratamento (15 por câmara, sendo 2 câmaras por tratamento) foram numerados e identificados conforme os tratamentos e em cada vaso foram plantadas cinco sementes desta cultivar. Em seguida, os vasos foram regados novamente com 300 mL de água e acomodados em três fileiras no interior das câmaras de topo aberto. Dez dias após o plantio foram removidas as plântulas extras e manteve-se apenas um indivíduo em cada vaso, que foi a unidade amostral neste experimento. Durante todo o experimento as plantas receberam as mesmas condições de regas (300 mL diários) e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) (50 ml a cada três dias). Para reduzir os possíveis efeitos das diferenças ambientais entre as câmaras, os vasos foram trocados semanalmente entre as duas câmaras com o mesmo tratamento. A fim de minimizar os efeitos da heterogeneidade e possível microclima no interior das câmaras, foi realizada uma rotação dos potes dentro das câmaras a cada três dias.

Após 60 dias de exposição aos tratamentos, foram selecionadas aleatoriamente cinco plantas de cada tratamento para a coleta de folhas para os experimentos de tolerância do FSII ao choque térmico agudo induzido *in vitro*..

Avaliação da eficiência quântica do FSII após choque térmico agudo

Como a maioria dos processos fisiológicos, a fotossíntese é altamente sensível à temperatura e sua tolerância fotossintética pode ser definida a partir de uma alteração na capacidade de excitação do fotossistema II (FSII). Dentro de uma gama de temperaturas, a fotossíntese responde rapidamente e reversivelmente, com a integridade funcional do aparelho fotossintético intacta (Berry e Bjorkman 1980). No entanto, em temperaturas extremas (altas e baixas), ocorre um dano irreversível no aparato fotossintético, o que pode afetar significativamente este processo. O FSII tem sido reconhecido como sendo um dos componentes mais termicamente lábeis da fotossíntese (Havaux 1993) e por isso a capacidade de excitação de FSII foi utilizada como métrica de termotolerância fotossintética através da obtenção do valor da temperatura que promove uma redução em 15% (T_{15}) e 50% (T_{50} - temperatura crítica, segundo Godoy *et al.* 2011) dos valores iniciais de rendimento quântico potencial do FSII.

Para a determinação da tolerância do FSII ao choque térmico agudo discos foliares ($\varnothing = 1.5$ cm) originários de folhas de mesma idade e totalmente expandidas de cinco plantas por tratamento foram coletados, dispostos em papel filtro umedecido com água destilada e mantidos em um saco de polietileno *zip-lock* no escuro por 30 minutos antes do início das medidas de fluorescência da clorofila *a*. Em seguida, os discos foram retirados do saco de polietileno *zip-lock* e dispostos em uma folha de papel filtro umedecido com água destilada e esta foi fixada entre duas placas de metálicas com pequenas aberturas circulares. Imediatamente foi feita medida do rendimento quântico

potencial (F_v/F_m) inicial com o uso de um medidor de fluorescência modulada (MINI PAM Walz Mess und Regeltechnik) a temperatura ambiente (22 °C). A placa com o papel filtro, as amostras e um termômetro digital, modelo TD-880 (Icel Manaus), foram colocadas em um saco de polietileno *zip-lock*, e este foi mergulhado em banho-maria ultratermostático com circulador (modelo Quimis® 214D2), conforme Neuner & Pramsöhler (2006). O choque térmico agudo foi induzido através do aumento gradativo da temperatura de 1 °C a cada 3 minutos. Após atingir a temperatura desejada, as amostras eram mantidas no banho por mais 30 segundos e em seguida retiradas da bolsa para imediata medida de F_v/F_m . Após as medidas, as amostras foram novamente colocadas no banho. A cada aumento de 2 °C na temperatura do termômetro digital, novas medidas de F_v/F_m foram obtidas, repetindo-se o procedimento descrito anteriormente, até que a temperatura em que não fosse observado nenhum sinal de fluorescência. Os valores de F_v/F_m obtidos para cada temperatura foram utilizados para obter a temperatura que promove uma redução em 15% (T_{15}) e 50% (T_{50}) dos valores iniciais.

Quantificação de pigmentos cloroplásticos

Quatro discos foliares ($\varnothing = 1$ cm) provenientes da mesma folha utilizada para a termotolerância, foram cortados e armazenados por 48 h em frascos ambar contendo 5 ml de acetona a 80%. Posteriormente foram macerados em N_2 líquido usando um almofariz e pistilo, acrescentando-se mais 5 mL de acetona a 80%, para um volume total de 10 mL. Este extrato foi centrifugado e analisado por espectrofotometria para quantificação de clorofila *a*, *b* e carotenóides de acordo com Lichtenthaler e Wellburn (1983).

Análises estatísticas

Os valores de F_v/F_m obtidos para cada temperatura foram analisadas por um ajuste de modelo sigmoidal para obter o valor da temperatura que promove uma redução em 15% (T_{15}) e 50% (T_{50}) dos valores iniciais, (veja Godoy *et al.* 2011) utilizando o software R 3.0.0 (R Development Core Team 2013). Os gráficos de ajuste das curvas sigmoides para cada tratamento foram feitos utilizando os valores médios de F_v/F_m em cada temperatura e os valores de T_{15} e T_{50} para cada tratamento, no software Sigmaplot 10.0. Os dados de F_v/F_m (T_{15} e T_{50}) e pigmentos dos quatro tratamentos testados foram analisados através de modelos lineares generalizados (GLM) com a aplicação de teste de F de Fisher e, para as variáveis cujo teste F foi significativo as médias de tratamentos foram comparadas por teste de contraste a 5% de probabilidade, utilizando o software R 3.0.0 (R Development Core Team 2013) e os recursos do pacote Rcmdr e RT4Bio. O gráfico do conteúdo de pigmentos foi produzido pelo software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

Resultados

As plantas cultivadas em todos os tratamentos testados não foram afetadas na temperatura de queda 15% do F_v/F_m (T_{15}), porém a temperatura de queda de 50% (T_{50}) foi afetada pelos tratamentos com aumento de CO_2 e temperatura (Figura 2, Tabela 1). As plantas que cresceram nos tratamentos com aumento de CO_2 e/ou temperatura (+T, +C e +C+T) tiveram uma redução de ~ 1 °C na temperatura de queda de 50% do F_v/F_m , quando comparados com as plantas crescidas em condições atuais de CO_2 e temperatura (Ctrl) ($P < 0,05$) (Tabela 2).

O conteúdo de todos os pigmentos fotossintéticos foi afetado pelos tratamentos testados (Tabela 3). O conteúdo de clorofila total (chl *a+b*) foi reduzido nas plantas crescidas sob CO₂ elevado (+C ~22% e +C+T ~24%) quando comparadas as plantas crescidas sob CO₂ ambiente (Ctrl) ($P < 0,01$, Fig.3). Contudo, a razão clorofila (chl) *a/b* foi maior em plantas cultivadas no tratamento com temperatura elevada (+T ~26%) se comparadas ao controle (Ctrl - $P < 0,01$, Fig.3). Para o conteúdo de carotenóides, todos os tratamentos testados (+T, +C, +C+T) promoveram redução em relação ao controle (Ctrl - $P < 0,01$, Fig. 3). Dentre todos os tratamentos, as plantas que cresceram sob elevado CO₂ foram as que apresentaram redução mais drástica no conteúdo de carotenoides (+C+T ~77%; +C ~65% e +T ~48%) (Fig. 3). Tanto o aumento do CO₂ quanto o aumento da temperatura, promoveram aumento na razão clorofila/carotenoides (+C ~70% e +T ~103%) em relação ao tratamento controle ($P < 0,01$, Fig. 3). E esta razão foi ainda maior quando os dois fatores combinados (+C+T ~146%) ($P < 0,01$, Fig. 3, Tabela 3).

Discussão

Era esperado que o aumento do CO₂ pudesse melhorar a termotolerância através da maior eficiência fotossintética que este promove nas plantas de soja (Ainsworth *et al.* 2002). Porém, as alterações climáticas previstas para o fim deste século, avaliadas neste estudo através da elevação do CO₂ e da temperatura, afetaram a soja tornando-a menos resistente a danos no FSII. Embora a redução no rendimento quântico potencial do FSII para temperatura de queda de 50% (T₅₀) tenha sido de apenas ~1 °C, este efeito pôde ser observado em todos os tratamentos testados (+T,+C,+C+T) quando comparados ao tratamento controle (Ctrl).

Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos celulares responsáveis pelo aumento da tolerância térmica do FSII de plantas cultivadas sob elevado CO₂ e temperatura. Estudos de Hamilton *et al.* (2008) e Faria *et al.* (2015) com espécies de metabolismo C₄ (*Zea mays*, *Amaranthus retroflexus* e *Urochloa decumbens*, respectivamente), demonstraram que o CO₂ pode ter efeito positivo sobre a tolerância fotossintética. Porém, quando combinado com o aumento de temperatura, os mesmos autores verificaram que este efeito pode ser anulado. Este fato não foi observado neste estudo, uma vez que tanto as plantas sob CO₂ elevado quanto aumento de temperatura e ambos combinados sofreram aumento. Siebers *et al.* (2015) avaliaram plantas de soja (C₃), crescendo no campo (SoyFACE), sob a concentração de 600 μmol mol⁻¹ de CO₂ e submetidas ao efeito de ondas de calor (+ 6°C) *in vivo* por três dias e concluíram que as ondas de calor afetam o rendimento do FSII. Neste caso, entretanto, a redução foi transitória, não persistindo no dia seguinte à imposição do estresse. Porém, os mesmos autores ressaltam que quando as ondas de calor coincidem com o desenvolvimento inicial da vagem, ocasiona a redução de 10% no rendimento da soja.

Coleman *et al.* (1991) demonstraram que vários processos metabólicos podem afetar a termotolerância das plantas cultivadas sob elevado CO₂. Por exemplo, plantas de soja cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ aumentaram a eficiência no uso da água (Ainsworth *et al.* 2002), o que ocorre devido a redução da condutância estomática e transpiração (Vu e Allen 2009). Assim, um aumento na termotolerância ao choque agudo poderia ocorrer devido à melhora nas condições hídricas de plantas de soja (Ainsworth *et al.* 2002). Embora neste experimento as plantas tenham recebido irrigação, é importante salientar que em um campo de soja eventualmente passa por períodos de estiagem onde o stress hídrico pode ocorrer, e assim plantas sob elevado

CO₂ poderiam ser beneficiadas.

De um modo geral, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos da soja foi reduzido nos tratamentos testados em relação ao tratamento controle. Contudo, apenas os tratamentos com CO₂ elevado (+C e +C+T) reduziram a clorofila total enquanto ambos os tratamentos testados (+C, +T e +C+T) causaram redução no conteúdo de carotenóides. Por outro lado, a elevada temperatura (+T) gerou um aumento na razão clorofila *a/b*. Estudos recentes sugerem que o aumento da concentração de CO₂ até 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ tem efeitos significativos no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Contrariando os resultados aqui apresentados, Wang *et al.* (2015) observaram que, sob concentrações entre 500 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, houve um efeito positivo sobre os pigmentos fotossintéticos (carotenoides e clorofila *a*, *b* e total) das folhas da soja. Porém, quando a soja foi cultivada em uma super concentração de CO₂ (5000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) o conteúdo destes pigmentos foi drasticamente reduzido enquanto a razão da clorofila *a/b* não foi alterada (Wang *et al.* 2015).

O efeito negativo do CO₂ sobre o teor de clorofila observado aqui pode ser devido a maior acúmulo de amido nas células, o que perturba cloroplastos e aumenta a degradação ou diminui a síntese de clorofila (Delucia *et al.* 1985). Outros estudos ressaltam que a deficiência ou a diminuição na absorção de N em função da limitação da transpiração gerada pelo aumento do CO₂ também poderia contribuir para perda de clorofila e redução da clorofila total (Conroy e Hocking 1993; Shangguan *et al.* 2000). O aumento da temperatura também pode levar a alterações no conteúdo de pigmentos, e pode ter sido um fator de aumento da razão (chl) *a/b* nas folhas de soja aqui avaliadas. O aumento da razão clorofila *a/b* também pode ser justificado pelo fato de que durante o processo de degradação da clorofila, Chl *b* é convertido em Chl *a* (Fang *et al.* 1998).

A redução do conteúdo de carotenoides observada no presente estudo em todos os tratamentos testados (+C, +T, +C+T), pode ser um indicativo de aumento no estresse oxidativo, já que a proteção contra ROS, bem como pela eliminação de radicais livres, é uma das principais funções biológicas de carotenóides (Domonkos *et al.* 2013). No estudo de Siebers *et al.* (2015) com soja, as ondas de calor também induziram forte estresse oxidativo e o aumento do CO₂ não foi capaz de minimizar seus efeitos deletérios no período de aquecimento. No entanto houve a recuperação de todos os parâmetros fisiológicos afetados em 24 h após o fim da onda de calor. Esta rápida recuperação do FSII após o tratamento por ondas de calor foi surpreendente, pois com maior quantidade de estresse oxidativo, é esperado um retardo na reparação da máquina fotossintética (Nishiyama *et al.* 2001; Souza *et al.* 2004).

Siebers *et al.* (2015) alegam que possivelmente as mudanças no rendimento quântico potencial do FSII durante as ondas de calor foram apenas um componente acessório dos impactos do estresse térmico sobre a soja. Estes autores verificaram que, embora o FSII se recupere rapidamente dos efeitos das ondas de calor, efeitos colaterais foram observados na produtividade quando o estresse ocorreu durante os estágios reprodutivos que coincidiram com o desenvolvimento inicial das vagens. Assim, embora o presente estudo tenha observado que nem as possíveis melhorias trazidas pelo aumento do CO₂ conseguiram atenuar reduções na T₅₀ e do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos (em testes *in vitro*), em campo com a ocorrência de ondas de calor, as respostas de Siebers *et al.* (2015) podem ser um indício de que talvez ocorra recuperação, mesmo a nível de protoplasto. Vale ressaltar que Siebers *et al.* (2015) alertam que dependendo da fase de desenvolvimento em que as plantas se encontram, as ondas de calor podem afetar o rendimento final da produção.

Com a crescente divulgação de previsões geradas pelos modelos de clima indicando que aumentará a frequência e a intensidade das ondas de calor (Meehl e E-Baldi 2004), é imprescindível conhecer os processos que precisam ser adaptados em plantas para tolerar extremos climáticos, considerando ainda outras situações de campo, como por exemplo a escassez de água. É necessário também investigar melhor se as ondas de calor terão algum efeito no crescimento e na qualidade da produção desta cultura, bem como todos os processos associados a tais alterações. Só assim poderemos prever como a cultura da soja poderá responder ao cenário climático futuro.

Agradecimentos

Agradeço a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Soja) pelo fornecimento das sementes e suporte técnico. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e apoio financeiro ao projeto. Obrigada a J.P. Lemos-Filho e A. Gianni pelo empréstimo dos equipamentos, a M. S. Silva pelo auxílio com as análises de pigmentos e a M. Beirão pela assistência com as análises estatísticas. Ao Prof A. Franco pelas correções. Obrigada especialmente a todos os estudantes de graduação pela ajuda no cultivo das plantas e cuidados com os experimentos.

Referências

- Aidar M.P.M., Martinez C.A., Costa A.C. *et al.*: Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá (*Hymenaea courbaril* L. Leguminosae-Caesalpinioideae). - *Biota Neotrop.* **2**:1-10, 2002.
- Ainsworth E.A., Davey P.A., Bernacchi C.J. *et al.*: A meta-analysis of elevated CO₂ effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. – *Glob. Change Biol.* **8**:695–709, 2002.
- Asada K.: The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. – *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**:601–639, 1999.
- Baker N., Rosenqvist E.: Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. – *J. Exp. Bot.* **55**:1607–1621, 2004.
- Berry J.A., Bjorkman O.: Photosynthetic response and adaptation to high temperature in plants. - *Annual Review of Plant Physiology.* **31**:491–543, 1980.
- Coleman J.S., Rochefort L., Bazzaz F.A. *et al.*: Atmospheric CO₂, plant nitrogen status and the susceptibility of plants to an acute increase in temperature. - *Plant, Cell Environ.* **14**:667–674, 1991.
- Conroy J., Hocking P.: Nitrogen nutrition of C₃ plants at elevated atmospheric CO₂ concentrations. – *Physiol. Plant.* **89**:570-576, 1993.
- Dermody O., Long S.P., Delucia E.H.: **How** does elevated CO₂ or ozone affect the leaf-area index of soybean when applied independently? - *New Phytol.* **169**:145–155, 2006.
- Delucia E.H., Sasek T.W., Strain B.R.: Photosynthetic inhibition after long-term exposure to elevated levels of atmospheric carbon dioxide. - *Photosynth Res.* **7**:175–184, 1985.
- D'avila, N. (2006) Desmatamento na Amazônia: O novo nome da soja. <http://www.comciencia.br/reportagens/agronegocio/14.shtml>. 02 Out. 2015
- Dhanda S.S., Munjal R.: Heat tolerance in relation to acquired thermotolerance for membrane lipids in bread wheat. - *Field Crops Res.* **135**:30–37, 2012.
- Domonkos I., Kis M., Gombos Z. *et al.*: Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. - *Prog. Lipid. Res.* **52**:539–561, 2013.

- Erice G., Aranjuelo I., Irigoyen J.J. *et al.*: Effect of elevated CO₂, temperature and limited water supply on antioxidant status during regrowth of nodulated alfalfa. - *Physiol. Plant.* **130**:33–45, 2007.
- Fang Z., Bouwkamp J.C., Solomos T.: Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in nonyellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. B.* **49**:503–510, 1998.
- Faria A.P., Fernandes G.W., França M.G.C.: Physiological approaches to determine the impact of climate changes on invasive African grasses in the savanna ecoregion of Brazil. - *Environ Earth Sci.* **74**:3077–3088, 2015.
- Farias J.R.B., Nepomuceno A.L., Neumaier N.: *Ecofisiologia da Soja*. – In: Circular Técnica nº 48 Pp. 1-9. Embrapa CNPSO, Londrina 2007.
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T.: Carbon isotope discrimination and photosynthesis. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**:503-537, 1989.
- Fontana D.C., Ducati J.R., Weber E. *et al.*: Monitoramento e previsão da safra de soja 1999/2000 Pp 1-116. CEPSSRM/UFRGS, Porto Alegre 2001.
- Godoy O., Lemos-Filho J.P., Valladares F.: Invasive species can handle higher leaf temperature under water stress than Mediterranean natives. - *Environ Exp. Bot.* **71**:207–214, 2011.
- Hamilton E.W.III, Heckathorn S.A., Joshi P. *et al.*: Interactive effects of elevated CO₂ and growth temperature on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃ and C₄ species. – *J. Integr. Plant Biol.* **50**:1375–1387, 2008.
- Havaux M.: Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. - *Plant, Cell & Env.* **46**:461–467, 1993.
- Hoagland D.R., Arnon D.I.: The water culture method for growing plants without soils. - *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.* **347**:1–32, 1950.
- IPCC: Summary for policymakers. In: *Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Pp. 1–30 Cambridge, United Kingdom and New York, USA, 2013.
- IPCC: *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Pp. 151. Geneva, Switzerland, 2014.

- Kim K., Portis Jr. A.R.: Temperature dependence of photosynthesis in Arabidopsis plants with modifications in Rubiscoactivase and membrane fluidity. - *Plant Cell Physiol.* **46**:522–530, 2005.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.: Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. - *Biochemical Society Transactions.* **11**:591 – 592, 1983.
- Meehl G.A., Tebaldi C.: More intense, more frequent and longer lasting heat waves in the 21st century. – *Science.* **305**:994–997, 2004.
- Mishra S., Heckathorn S.A., Barua D. *et al.*: Interactive effects of elevated CO₂ and ozone on leaf thermotolerance in field-grown Glycine max. – *J. Integr. Plant Biol.* **50**:1396–1405, 2008.
- Neuner G., Pramsohler M.: Freezing and high temperature thresholds of photosystem 2 compared to ice nucleation, frost and heat damage in evergreen subalpine plants. - *Physiologia Plantarum.* **126**:196–204, 2006.
- Nishiyama Y., Yamamoto H., Allakhverdiev S.I. *et al.*: Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. – *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **20**:5587–5594, 2001.
- Ort D.R., Ainsworth E.A., Aldea M. *et al.*: SoyFACE: the effects and interactions of elevated [CO₂] and [O₃] on soybean. – In: *Managed Ecosystems and CO₂: Case Studies, Processes and Perspectives.* Pp. 71–85. Springer, Berlin 2006.
- R-Development-Core-Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing 3.0.0 Ed. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2013 Available from: <http://www.r-project.org/>
- Siebers M.H., Yendrek C.G., Drag D. *et al.*: Heat waves imposed during early pod development in soybean (*Glycine max*) cause significant yield loss despite a rapid recovery from oxidative stress. - *Glob Change Biol.* **21**:3114–3125, 2015.
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J. *et al.*: Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. - *Nature* **463**:178–183, 2010.
- Shangguan Z., Shao M., Dyckmans J.: Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. – *J. Plant Physiol.* **156**:46–51, 2000.
- Smirnoff N.: The role of active oxygen in the response of plants to water deicit and desiccation. - *New Phytol.* **125**: 27-58, 1993.

- Souza R.P., Machado E.C., Silva J.A.B. *et al.*: Photosynthetic gas exchange in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. - *Environ Exp. Bot.* **51**: 45–56, 2004.
- Sudaric A., Vrataric M., Mladenovic Drinic S. *et al.*: Biotechnology in soybean breeding. – *Genetika.* **42**:91-102, 2010.
- Taub D.R., Seemann J.R., Coleman J.S.: Growth in elevated CO₂ protects photosynthesis against high temperature damage. - *Plant, Cell and Environment.* **23**:649-656, 2000.
- USDA. 2015. World Agricultural Supply and Demand Estimates. WASDE 546. Out. 2015. Online: <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Acesso em 11 Out. 2015
- Vu J.C.V., Allen Jr. L.H.: Stem juice production of the C₄ sugarcane (*Saccharum officinarum*) is enhanced by growth at double-ambient CO₂ and high temperature. - *Journal of Plant Physiology.* **166**:1141-1151, 2009.
- Wang D., Heckathorn S.A., Barua D. *et al.*: Effects of elevated CO₂ on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃, C₄, and CAM species. – *Am. J. Bot.* **95**:165–176, 2008.
- Wang M., Xie B., Fu Y. *et al.*: Effects of different elevated CO₂ concentrations on chlorophyll contents, gas exchange, water use efficiency, and PSII activity on C₃ and C₄ cereal crops in a closed artificial ecosystem. - *Photosynth Res* **126**:351–362, 2015.
- Wise R.R., Olson A.J., Schrader S.M. *et al.*: Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. - *Plant Cell Environ* **27**:717–724, 2004.
- Zinn K.E., Tunc-Ozdemir M., Harper J.F.: Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. - *J Exp. Bot.* **61**:1959–1968, 2010.

Legenda das Figuras:

Fig. 1. Câmaras de topo aberto com 1,53 m³ cada, utilizadas para cultivo e imposição dos tratamentos testados (Ctrl: controle - concentração de CO₂ (~400 µmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +T: concentração de CO₂ ambiente (~400 µmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente); +C: elevada concentração de CO₂ (~800 µmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +C+T: elevada concentração de CO₂ (~800 µmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente).

Fig. 2. Curvas de ajuste sigmoidal para a queda em 15 (T₁₅) e 50% (T₅₀) do rendimento quântico potencial do do FSII (F_m/F_v) em folhas submetidas ao aumento gradual da temperatura. Os dados representam a média ± EPM (n = 5) para cada tratamento ambiental (Ctrl: controle - concentração de CO₂ (~400 µmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +T: concentração de CO₂ ambiente (~400 µmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente); +C: elevada concentração de CO₂ (~800 µmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +C+T: elevada concentração de CO₂ (~800 µmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente).

Fig. 3. Conteúdo de pigmentos das folhas das plantas de soja crescidas nos tratamentos com diferentes concentrações de CO₂ e temperatura após o choque térmico agudo induzido *in vitro*. Valores representam médias ± EPM (n = 5). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas (p < 0.01) entre os tratamentos (Ctrl: controle - concentração de CO₂ (~400 µmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +T: concentração de CO₂ ambiente (~400 µmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente); +C: elevada concentração de CO₂ (~800 µmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +C+T:

elevada concentração de CO₂ (~800 μmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente).



Fig. 1

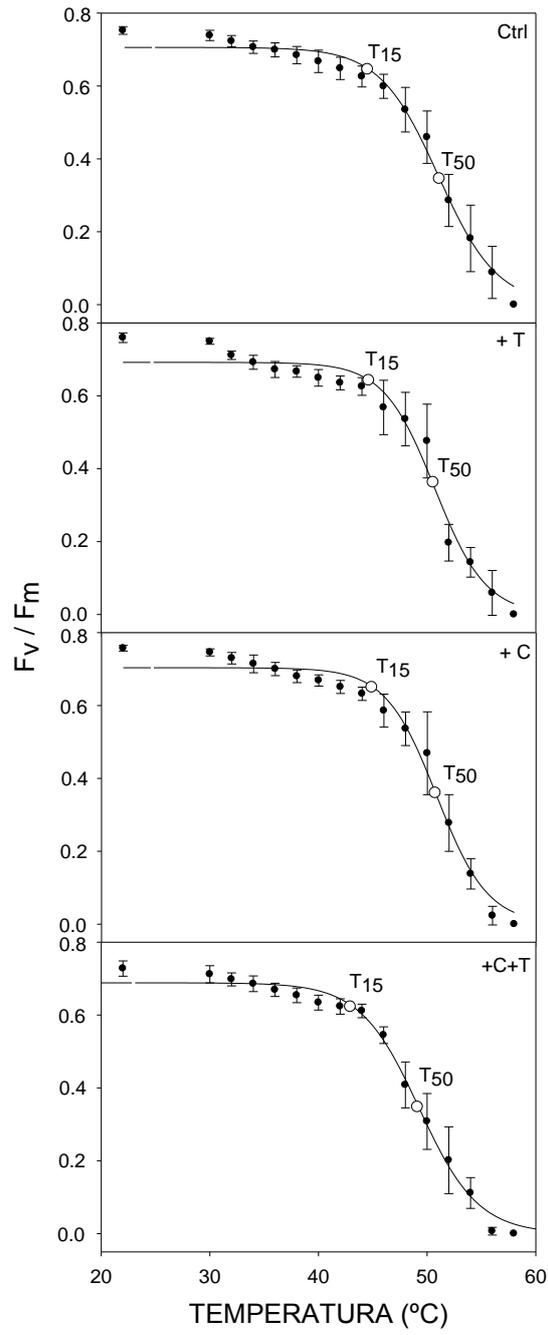


Fig. 2

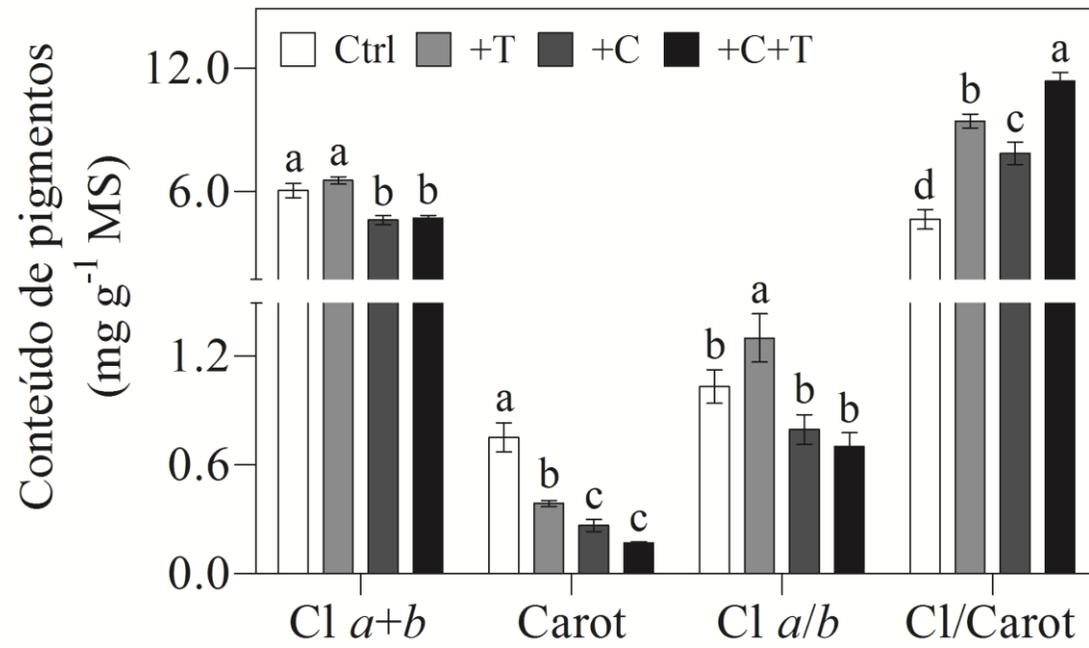


Fig. 3

Tabela 1. Resultados da análise de modelos lineares generalizados (GLM) para para T_{15} e T_{50} : temperaturas críticas capazes de reduzir em 15% e 50% o rendimento quântico potencial (F_v/F_m) inicial do FSII em tecido foliar de plantas de soja crescidas nos quatro tratamentos testados: Ctrl: controle - concentração de CO_2 ($\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente; +T: concentração de CO_2 ambiente ($\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente); +C: elevada concentração de CO_2 ($\sim 800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente; +C+T: elevada concentração de CO_2 ($\sim 800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente).

Temperatura	Df	F	Pr(>F)
T_{15}	3	0.5903	0.6302
T_{50}	3	3.4720	0.0410 *

Código de significância: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$

Tabela 2. Tolerância do fotossistema (FS) II após choque térmico agudo *in vitro* avaliado quanto às temperaturas críticas capazes de reduzir em 15% (T_{15}) e 50% (T_{50}) o rendimento quântico potencial do FSII (F_v/F_m) em tecido foliar de plantas de soja crescidas nos quatro tratamentos testados: (Ctrl: controle - concentração de CO_2 (~400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente; +T: concentração de CO_2 ambiente (~400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente); +C: elevada concentração de CO_2 (~800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e temperatura ambiente; +C+T: elevada concentração de CO_2 (~800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente).

Tratamentos	T_{15} (°C)			T_{50} (°C)		
Ctrl	44.41	± 1.11	a	51.03	± 0.38	a
+T	44.55	± 1.64	a	50.31	± 0.37	b
+C	44.86	± 0.79	a	50.62	± 0.50	b
+C+T	42.98	± 0.45	a	49.17	± 0.44	b

Valores representam a média ± EPM (n = 5 plantas). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$ - teste de contraste).

Tabela 3. Resultados da análise de modelos lineares generalizados (GLM) para o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos de tecido foliar de plantas de soja crescidas nos quatro tratamentos testados: (Ctrl: controle - concentração de CO₂ (~400 μmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +T: concentração de CO₂ ambiente (~400 μmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente); +C: elevada concentração de CO₂ (~800 μmol mol⁻¹) e temperatura ambiente; +C+T: elevada concentração de CO₂ (~800 μmol mol⁻¹) e elevada temperatura (+ 3°C em relação a temperatura ambiente).

Pigmento Cloroplastídico	Df	F	Pr(>F)	
Chl a+b	3	17.1920	2.930E-05	***
carot	3	32.3860	4.987E-07	***
Chl a/b	3	7.4815	0.0024	**
Chl/carot	3	38.7050	1.459E-07	***

Chl: clorofila; carot: carotenoides.

Códigos de significância: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$

Capítulo IV

Impacts of elevated CO₂ and temperature on tolerance to water deficit and acute heat shock in two C4 species of agricultural interest *

**formatado para a revista Climatic Change*

Impacts of elevated CO₂ and temperature on tolerance to water deficit and acute heat shock in two C4 species of agricultural interest

Abstract Before the end of this century, climate change will intensify the effects of droughts, floods and heat waves. This extreme weather will affect ecosystems managed for crop production with the side effect of need for expansion of agricultural frontiers, adversely affecting native vegetation in many parts of the globe. In the last two decades, several studies have evaluated the growth of agricultural species under forecasted climate change, but still little is known about how species will behave growing in a warmer and drier environment, especially regarding those with C4 metabolism. This study aimed to evaluate the physiological responses at the cellular level to water deficit and acute heat shock induced *in vitro* in maize and pearl millet, both C4 species, grown under elevated CO₂ concentration and temperature, simulating the atmosphere foreseen for 2100. The results showed that induced climate change improves cell tolerance to water deficit and acute heat shock for both species, maize could benefit more from increased atmospheric CO₂ concentration than pearl millet since this climatic change improve cell tolerance to water deficit and acute heat shock for maize and only acute heat shock for pearl millet. Contrastingly, pearl millet could benefit from increased temperature in cell tolerance to water deficit. These responses can be of great importance for the maintenance of these crops' cultivation, without the need for expansion of agricultural frontiers which could adversely affect native vegetation in many parts of the globe.

Keywords: Drought, electrolyte leakage, maize, membrane stability, pearl millet, thermotolerance

1 Introduction

Currently, it is widely accepted that carbon dioxide (CO₂) concentrations in the atmosphere have increased steadily over the past two centuries, mainly because of the increase in emissions associated with burning fossil fuels and changes in land use and these concentrations are expected to reach 936 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ by the end of the 21st century (IPCC 2013). Increases in CO₂ and other greenhouse gases may increase the radiant energy entering the Earth, also causing a rise in global mean temperatures. It is predicted that global mean temperatures will continue to rise, reaching increases between 1.1 and 4.8 °C by 2100 (IPCC 2013). These increases in atmospheric CO₂ concentration and global mean temperatures are leading towards profound changes in rainfall patterns and could increase the severity and duration of periods with exceptionally high temperatures, commonly known as ‘heat waves’ (IPCC 2013).

Both heat shock and water deficit are environmental stresses that can cause damage at the cellular level in plants, as these stress factors can increase reactive oxygen species (ROS) production, leading to cellular oxidative stress, where the main targets are biological membranes (Sharma et al. 2012), including photosystem (PS) II damage (Percival and Sheriffs 2002). As cell membranes are the first targets of many abiotic stresses, their physical–chemical stability under dehydration stress is one of the best indicators of stress tolerance, and can be evaluated through protoplasmic tolerance/sensitivity (Bajji et al. 2001; Kocheva et al. 2005; 2014; Faria et al. 2013; 2015).

One of the main negative effects of heat stress in plants is the damage to electron transport rate (Taub et al. 2000). Decreased photosynthesis due to stomatal closure may produce an excess of electrons that can not be consumed. These electrons can react with

oxygen, producing ROS, which can cause photo-oxidative damage to photosynthetic apparatus if they are not dispelled (Sharma et al. 2012). Contrastingly, higher CO₂ concentrations may have the opposite effect, reducing ROS production (Erice et al. 2007), therefore mitigating the effects of elevated temperature. Besides inhibiting photosynthetic functions, high temperature affects physical and chemical properties, and the structural organization of thylakoid membranes (Karim et al. 1999). Thus, photosynthetic responses under thermal stress can serve as good indicators of thermotolerance in plants (Dhanda and Munjal 2012). Photosystem II maximum quantum yield (F_v/F_m) is the most common measure of chlorophyll fluorescence, providing an estimation of PSII photochemical efficiency, and has been widely used to detect disorders induced by stress to the photosynthetic apparatus since its values are inversely proportional to damage in PSII reaction centers (Baker and Rosenqvist 2004).

As increases in temperature and CO₂ concentration can have interactive effects on various physiological processes, and responses expressed at the cellular level can be good indicators of stress tolerance (Clavel et al. 2005), several studies have focused on physiological responses in photosynthetic thermotolerance (Hamilton et al. 2008; Wang et al. 2008) and tolerance to water deficit (Erice et al. 2007; Vu and Allen Jr. 2009) in plants. Most studies agree that elevated CO₂ enhances responses to water deficit by improving water use efficiency and/or by reducing osmotic potential (Vu and Allen Jr. 2009). But in terms of responses to heat stress under elevated CO₂, results are variable, either by individual responsiveness of each species or by different methods used, and therefore, are not fully understood. While some studies report positive effects of elevated CO₂ on plant photosynthetic tolerance to acute heat shock (Hamilton et al. 2008; Wang et al. 2008), other studies observed negative (Hamilton et al. 2008; Wang et al. 2008) or even no effect on plant thermotolerance (Coleman et al. 1991). And very

little is known about the responses of plants with photosynthetic C₄ metabolism. As C₄ plants have a morphophysiological mechanism that concentrates CO₂, it is to be theoretically expected that the increase in CO₂ concentration will have minimal effect on their photosynthesis (Barnaby and Ziska 2012). Contrastingly, as C₄ species originated in warmer climates (Sage and Monson 1999), these species are more tolerant to increasing temperature than plants with C₃ metabolism. Therefore, C₄ species may be less affected by heat stress in a future world of elevated CO₂ (Hamilton et al. 2008; Wang et al. 2008).

Understanding how plant cells respond to climate change is helpful to produce better crops or tolerant cultivars to various stress factors intensified by climate change. Among the world's important crops are maize (*Zea mays* L.) and pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), which are both C₄ species and both used for human and animal nutrition (Awika 2011). Both cultures have been expanding and have become the main option as a second crop after soybeans or cotton harvest (Landau and Pereira Filho 2012) in the Brazilian Savannah region, where high temperature and seasonal rainfall patterns very often disturb plant establishment (Oliveira-Filho et al. 1989). The aim of this study was to evaluate cell physiological responses to induced water deficit and acute heat shock *in vitro* in maize and pearl millet plants grown under elevated CO₂ concentration and temperature forecasted by IPCC (2013) for the end of the century.

2 Materials and Methods

2.1 Plant material, growth conditions and environmental treatments

Maize (cv. BRS 1030) and pearl millet (cv. BRS 1501) plants were obtained from certified seeds supplied by the EMBRAPA research center at Sete Lagoas, MG, Brazil. These seeds were sown in March/2013 (maize) and July/2013 (pearl millet), in 7 L pots (five seeds per pot) containing a commercial substrate (Terral[®]). Plants were irrigated with Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution every three days, and watered as required. After ten days of growth, the extra plants were removed leaving only one plant per pot. These plants were grown for 75 days in eight open-top chambers (OTC) (1.53 m³ each) placed inside a greenhouse located at Federal University of Minas Gerais, Brazil (19°52'08.67''S 43°57'59.63''W 822 m elevation). Plants were subjected to four environmental treatments based on IPCC (2013) predictions for 2100, to the following specifications: (1) Control (Ctrl) – current CO₂ concentration (~400 μmol mol⁻¹) and ambient temperature (~24 °C); (2) Elevated temperature (+T) – current CO₂ concentration and 3 °C above ambient temperature (~27 °C); (3) Elevated CO₂ (+C) – double CO₂ concentration (~800 μmol mol⁻¹) and ambient temperature; and (4) Elevated CO₂ + temperature (+T+C) – double CO₂ concentration and 3 °C above ambient temperature. Two OTC were used per treatment, which were interchanged twice a week to avoid chamber effect. The experiments were conducted under natural photoperiod and relative air humidity (RH). The environmental conditions (CO₂ concentration, temperature and RH) were monitored every fifteen minutes throughout the entire experimental growth period and details are presented in Online Resource 1. After 75 growth days, leaf tissue disks were collected from one leaf per plant, four or five plants per treatment for *in vitro* assays of water deficit and acute heat shock, respectively.

2.2 Cellular tolerance to water deficit assay

To evaluate cellular tolerance to water deficit *in vitro*, ten leaf disks ($\varnothing = 1$ cm) were cut from mature leaves of four plants of each species per environmental treatment and subjected to water deficit imposed by polyethylene glycol (PEG-6000) solutions providing four different water potentials (Ψ_w): 0.0 (no stress imposition – deionized water); -1.2; -1.8 and -2.4 MPa. Cellular tolerance was assessed by cell membrane stability evaluation, according to Bajji et al. (2001) modified by Faria et al. (2013). This procedure consists of a three-step methodology. Briefly: step 1: determination of the best washing time required to remove most of the electrolytes derived from mechanical damage caused by cutting of leaf disks; step 2: measurement of kinetics of electrolyte leakage (EL) triggered by leaf tissues at different water potentials, after spending 15 h in the dark in PEG solutions; and step 3: estimation of cell membrane stability by determining membrane injury index (MII). EL was then assessed by using the equation: $EL = (EC_f - EC_i)/(EC_t - EC_i) \times 100$, where EC is electrical conductivity of samples placed, to rehydrate, in 6 mL of deionized water after stress imposition in different periods of rehydration: immediately after stress imposition (EC_i), at different rehydration times ranging from 0.5 to 22.5 h (EC_f), and after autoclaving (1 atm, 121 °C in 20 min) and cooling samples at room temperature (EC_t). MII was assessed using the equation: $[(R_s - R_c)/(1 - R_c)] \times 100$, where RC and RS represent $(EC_f - EC_0) - (EC_t - EC_0)$ for control or PEG-treated tissues, respectively. For this calculation, EC_0 is EC measurement at the beginning of rehydration, EC_f is EC measurement after the rehydration time interval, whereupon kinetic curves determined in step 2 became constant and EC_t is EC measurement after autoclaving and cooling samples. For measurements in step 1, samples were washed slowly (100 rpm) using an orbital shaker (Orbit Shaker, Lab-Line) at room temperature and all EC measurements were performed using a digital conductometer (Digimed DM-3, Digicron).

2.3 Cellular tolerance to acute heat shock assay

Cellular tolerance to acute heat shock *in vitro* was assessed by measurements of chlorophyll fluorescence determining the maximum quantum yield (F_v/F_m) of photosystem (PS) II. F_v/F_m values are inversely proportional to damage in PSII reaction centers (Baker and Rosenqvist 2004), thus providing an estimate of PSII photochemical efficiency and serving as a good indicator of plant thermotolerance (Godoy et al. 2011). For this procedure, five leaf disks ($\varnothing = 1.5$ cm) from five plants of each species and each environmental treatment were collected from mature leaves and dark acclimated. The initial fluorescence measurement was taken around 22 °C using a modulated fluorometer (MINI PAM – Walz Mess und Regeltechnik). Acute heat shock was imposed by placing the samples in a thermostatic bath (Q-214 D2, Quimis) and increasing temperature in 2 °C increments, followed by new fluorescence measurements after each 2 °C increase until the temperature at which no fluorescence signal was observed. The F_v/F_m values obtained for each temperature level were analyzed by a sigmoidal fit model and, for each fitted curve (Online Resource 2), the temperature where initial F_v/F_m values dropped by 15 % (T_{15}) and 50 % (T_{50}) were calculated according to Godoy et al. (2011).

Also to evaluate cellular tolerance to acute heat shock, photosynthetic pigment content of the same leaf disks used in photosynthetic assay of thermotolerance were collected and stored in 5 mL of 80 % acetone for 48 h, along with other identical disks obtained from the same leaf. These leaf disks were then macerated in liquid N₂ using a mortar and pestle and a further 5 mL of 80 % acetone was added to the extract, completing the volume to 10 mL. The extract was collected, centrifuged and analyzed

by spectrophotometer for quantification of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids according to Lichtenthaler and Wellburn (1983).

2.4 Experimental design and statistical analysis

Experimental design was a 2×2 factorial, consisting of two factors (CO₂ and temperature), on two levels (ambient and elevated). For *in vitro* assay of water deficit tolerance, one more factor was added to the model: water stress in 4 levels as described previously. Data were analyzed by general linear models (GLM) and, for the evaluation of water deficit tolerance, contrast test at 5 % probability was performed. Statistical analysis was conducted using R 3.0.0 (free software) and graphs were created using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., USA). The graphs Online resource 2 were created using Sigma Plot.

3 Results

3.1 Cellular tolerance to water deficit

For both species, the best washing time determined in the washing time test was 15 min, since this was the interval wherein the higher electrolyte leakage was observed (Fig. 1). Also, for both species grown in all environmental treatments and subjected to all Ψ_w induced by PEG solutions, a strong pattern of EL kinetics was observed. In the first 8 h, there was a rapid phase of leakage followed by a stabilization plateau until the end of the rehydration period (Fig. 2; Online Resource 3).

For maize plants, environmental treatments promoted changes in water deficit tolerance responses determined by EL kinetic curves. Plants subjected to elevated CO₂ treatments improved tolerance to water deficit in all Ψ_w imposed by PEG solutions when compared with those subjected to current CO₂ concentrations (Fig. 2a–d; Online Resource 4). Pearl millet plants did not show any difference in water deficit tolerance responses between environmental treatments (Fig. 2e–h; Online Resource 4).

Regarding membrane stability, as expected, MII increased as the water deficit increased for both species (Fig. 3). Differences in MII between Ψ_w were more pronounced in maize than in pearl millet plants, as maize plants presented differences in MII between all Ψ_w while for pearl millet only severe stress ($\Psi_w = -2.4$ MPa) resulting in greater MII under Ctrl treatment (Fig. 3). For both species, treatments changed MII responses to some extent, but each species was differently affected by induced climate change factors. For maize, plants grown under elevated CO₂ treatments showed lower MII for all Ψ_w tested than those grown under current CO₂ concentrations (Fig. 3a). For pearl millet, plants grown under elevated temperature treatments showed lower MII than those grown under ambient temperature treatments, but only under mild ($\Psi_w = -1.2$ MPa) and severe stress (Fig. 3b). Contrastingly, because MII response under mild stress was improved and was not changed under moderate stress ($\Psi_w = -1.8$ MPa), pearl millet plants grown under elevated temperature treatments began to show significant differences between the stress levels under moderate stress, while under Ctrl and +C treatment these differences were shown only under severe stress (Fig. 3b).

3.2 Cellular tolerance to acute heat shock

Cellular tolerance to induced acute heat shock was differently affected by tested treatment in both species (Table 1). For maize plants, elevated CO₂ treatments increased T₁₅ in ~1.21 °C compared to the current CO₂ concentration treatments, while for pearl millet plants, elevated temperature treatments promoted a reduction of ~1.94 °C in T₁₅ (Table 1). For the T₅₀ responses, only pearl millet plants showed differences between tested treatments. Plants grown under +C showed increases of ~1.81 °C in T₅₀ values, while +T reduced the parameter values to ~1.31 °C related to Ctrl or +T+C treatments (Table 1).

Regarding chloroplast pigments content, no differences were observed between environmental treatments for total chlorophyll content (chl *a+b*) and carotenoids, nor for chlorophyll *a/b* (chl *a/b*) ratio in maize plants (Fig. 4a). The only parameter assessed that presented differences between treatments was chlorophyll/carotenoids (chl/carot) ratio of maize plants, which showed higher values for treatments where only CO₂ concentration or temperature were elevated compared to Ctrl or +C+T treatments (Fig. 4a). Also, none of pigments analyzed in pearl millet plants showed differences between tested treatments (Fig. 4b).

4 Discussion

4.1 Cellular tolerance to water deficit

Several studies have shown that the washing time of samples can interfere with electrolyte leakage. The ideal washing time should remove ions from mechanical damage without causing electrolyte leakage due to other disruptions (Ehwald et al. 1984). Thus, a short time interval may not be sufficient to remove all electrolytes leaked

due to cutting leaf disks (Bajji et al. 2001) and very long intervals may result in excessive electrolyte leakage (Ehwald et al. 1984). In this study, for both species, most of the electrolyte was removed from samples during the first 15 min. Similar results were observed for wheat (Bajji et al. 2001), barley (Kocheva et al. 2005), palisade grasses and Tanzania grass (Faria et al. 2015).

During rehydration after stress, in all Ψ_w , both species had the greatest EL during the first 8 h, followed by a stable period up to 24 h evaluated. Thus, an interval of 8 h was sufficient to assess stress in these species, as suggested by Bajji et al. (2001) for wheat cultivars. This kinetic pattern suggests the contribution of distinct cell regions to the complete electrolyte linkage. During the first hours of rehydration, EL originated from the apoplast, and after the stabilization period, leakage arose from cytoplasm due to cell membrane structure destabilization (Vasquez-Tello et al. 1990).

Only maize plants showed differences between environmental treatments on EL, with elevated CO₂ treatments resulting in a lower amount of electrolytes leaked. At the cellular level, a general water stress response is the accumulation of ions and an increasing amount of metabolites to reduce osmotic potential (Kocheva et al. 2014), and elevated CO₂ has been shown to cause more negative osmotic potential in leaves of a number of plants, including wheat (Wall 2001), a C₃ species, and sugarcane (Vu and Allen Jr. 2009), a C₄ species. The lower EL observed in maize plants grown under elevated CO₂ probably was due to a decrease in osmotic potential of the cells that maintained turgor, even when the Ψ_w was reduced.

This improvement observed in EL response of maize plants grown under elevated CO₂ was also observed for MII in all Ψ_w . Cell membrane stability is one of the best indicators of water deficit tolerance (Geravandi et al. 2011). One of the harmful effects of desiccation is related to the generation of ROS, whose main targets are cell

membranes (Sharma et al. 2012). ROS can cause lipid peroxidation and protein oxidation that is often associated with changes in permeability, composition and structure of membranes (Campos et al. 2003). Elevated CO₂ reduced the impact of drought on protein oxidation in rye-grass and alfalfa (Farfan-Vignolo and Asard 2012). These observations support a protective effect as a benefit of CO₂ in terms of oxidative damage of membranes and proteins, but the mechanism of this reduction of oxidative damage under elevated CO₂ is still unclear. One possibility may be an increase of antioxidant enzymes activity under high CO₂ concentrations, as observed for alfalfa (Erice et al. 2007; Farfan-Vignolo and Asard 2012) and grapevine (Salazar-Parra et al. 2012) plants, resulting in a protective effect at membrane level (Salazar-Parra et al. 2012).

Pearl millet plants also showed reduced MII, but under elevated temperature treatments, which may be an improvement related to growth temperature. As long as optimum growth temperature is not surpassed, plants grown at higher temperatures can be more resistant to stresses due to the changes recorded in membrane stability induced by changes in membrane lipids composition (Gombos et al. 1994; Downs et al. 1999). Pearl millet has its origin in regions of Africa and the Indian subcontinent, therefore, is supremely adapted to heat and aridity and can be grown in areas where other cereal crops, such as maize or wheat, would not survive (Manning et al. 2010). Probably growth temperatures under control and elevated CO₂ treatments (mean ~23.5 °C) were below the optimum growth temperature for this species (32.8–35 °C) (Newman et al. 2010) and thus temperature rises could have improved water deficit tolerance responses.

4.2 Cellular tolerance to acute heat shock

Although both species present C4 metabolism, they showed different responses of cellular tolerance to acute heat shock. Maize plants showed differences between environmental treatments only for T₁₅, while pearl millet plants showed differences for both T₁₅ and T₅₀. For maize plants, growth under elevated CO₂ treatments resulted in enhanced thermal tolerance, since T₁₅ was about 1.21 °C higher. But this improvement was not observed for T₅₀. Elevated CO₂ may play a beneficial role on plant photosynthesis (Ainsworth et al. 2002), and plants with C4 metabolism like maize and redroot pigweed show improvements in photosynthetic heat shock tolerance grown under elevated CO₂ (Hamilton et al. 2008), confirming the results presented by maize in this study. It is widely known that increases in atmospheric CO₂ concentration can affect a variety of physiological responses in plants (Ainsworth et al. 2002), but heat shock tolerance responses are still unclear. Perhaps, elevated CO₂ could enhance acute heat shock tolerance by increasing water use efficiency of plants and thus, increasing their water condition (Ainsworth et al. 2002). The improved tolerance of water deficit shown by maize grown under elevated CO₂ could be indicative of improved water use efficiency for this species and could explain the effect of elevated CO₂ on thermotolerance. It is believed that increasing thermotolerance involves a number of metabolic processes, and these processes can be linked with an increased expression of heat shock proteins (Coleman et al. 1991). However, few studies evaluating these factors were performed with C4 plants and have no clear results whether elevated CO₂ may affect the expression of these proteins. Increased CO₂ repressed the expression of genes associated with heat shock proteins in rice (Fukayama et al. 2009) and increased the expression of these genes in *Arabidopsis thaliana* (Li et al. 2008).

Photosynthetic pigment content has also been associated with heat stress tolerance (Haque et al. 2014) and changes in CO₂ concentration (Logan et al. 2009;

Wang et al. 2015), and increases in growth temperature can modify the content of photosynthetic pigments (Logan et al. 2009). When photosynthetic pigments like chlorophylls decrease, a significant fraction of absorbed light can induce ROS formation (Erice et al. 2007). However, none of pigments quantified in this study were reduced in any of the two species studied. Also, chlorophyll/carotenoids ratio was enhanced under elevated temperature and elevated CO₂ treatments for maize plants. These are also indications that elevated CO₂ improved maize plants thermotolerance.

Pearl millet plants also showed improvement in thermotolerance responses under elevated CO₂ treatment, but only for T₅₀. Contrastingly, temperature had a negative effect on thermotolerance responses of this species, reducing T₁₅ in both elevated temperature treatments and reducing T₅₀ in elevated temperature treatment. Similar results were found for *Urochloa decumbens*, but other results indicate that the increase of 3 °C in growth temperature did not configure heat stress for this species (Faria et al. 2015). For pearl millet plants, water deficit results and the absence of differences between pigment content presented under elevated temperature also shows that elevation of ~3 °C in growth temperature did not configure thermal stress for this species. There are a number of processes involved in PSII thermotolerance and they are associated with inter- and intra-specific variations (Coleman et al. 1991). Pearl millet is more tolerant to heat stress than maize (Ashraf and Hafeez 2004; Manning et al. 2010), as can be seen by T₁₅ values presented by both species under control treatment. Even growing below its optimum growth temperature, pearl millet could have benefitted by elevated CO₂ effects on thermotolerance, since +C+T treatment showed higher T₅₀ values than solely +T. Elevated CO₂ may have improved the antioxidant systems of this species or have significantly decreased ROS formation, as reported for alfalfa (Aranjuelo et al. 2008) and thus, mitigated negative effects of elevated temperature.

5. Conclusions

Maize plants could benefit more from elevated CO₂ concentrations, since this species had its responses to water deficit and acute heat shock enhanced under elevated CO₂ treatments. Pearl millet plants, however, only benefitted from elevated CO₂ effects on heat shock tolerance, but this species could benefit from increases in temperature, since it had its water deficit responses enhanced under elevated temperature treatments. Any improvement or even no change in responses of these two crops could be of great importance for the maintenance of these crops' cultivation without the need for expansion of agricultural frontiers, which could adversely affect native vegetation in many parts of the globe. Plant performance under the presence of other important drivers, such as herbivores and pathogens and highly variable weather conditions are yet to be further investigated.

Acknowledgements The authors thank Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo) for kindly supplying the seeds, to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the project funding. Thanks to M. Beirão for assistance with statistical analysis, to all the graduate students for their assistance in plant cultivation and to Norman Lee and Alistair Hayward for revision and correction of the final English text.

References

- Ainsworth EA, Davey PA, Bernacchi CJ, Dermody OC, et al. (2002) A meta-analysis of elevated CO₂ effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Glob Change Biol* 8: 695–709
- Aranjuelo I, Erice G, Nogués S, Morales F, et al. (2008) The mechanism(s) involved in the photoprotection of PSII at elevated CO₂ in nodulated alfalfa plants. *Environ Exp Bot* 64: 295–306
- Ashraf M, Hafeez M (2004) Thermotolerance of pearl millet and maize at early growth stages: growth and nutrient relations. *Biol. Plant.* 48, 81–86
- Awika JM (2011) Major cereal grains production and use around the world. In: Awika JM, Piironen V, Bean S (eds) *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*, ACS Symposium Series, Washington, pp 1–13
- Bajji M, Kinet JM, Lutts S (2001) The use of electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul* 36: 61–70
- Baker N, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55: 1607–1621.
- Barnaby JY, Ziska LH (2012) *Plant Responses to Elevated CO₂*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1-10
- Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J Plant Physiol* 160: 283–292

- Clavel D, Drame NK, Roy-Macauley H, Braconnier S, et al (2005) Analysis of early responses to drought associated with field drought adaptation in four Sahelian groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. *Environ Exp Bot* 54: 219–230
- Coleman JS, Rochefort L, Bazzaz FA, Woodward FI (1991) Atmospheric CO₂, plant nitrogen status and the susceptibility of plants to an acute increase in temperature. *Plant Cell Environ* 14: 667–674
- Dhanda SS, Munjal R (2012) Heat tolerance in relation to acquired thermotolerance for membrane lipids in bread wheat. *Field Crop Res* 135: 30–37
- Downs C, Coleman J, Heckathorn S (1999) The chloroplast 22-kDa heat-shock protein: a luminal protein that associates with the oxygen evolving complex and protects photosystem II during heat stress. *J Plant Physiol* 155: 477–487
- Ehwald R, Richter E, Schlangstedt M (1984) Solute leakage from isolated parenchyma of *Allium cepa* and *Kalanchoe daigremontiana*. *J Exp Bot* 35: 1095–1103
- Erice G, Aranjuelo I, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M (2007) Effect of elevated CO₂, temperature and limited water supply on antioxidant status during regrowth of nodulated alfalfa. *Physiol Plant* 130: 33–45
- Farfan-Vignolo ER, Asard H (2012) Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiol Biochem* 59: 55–62
- Faria AP, Lemos-Filho JP, Modolo LV, França MGC (2013) Electrolyte leakage and chlorophyll a fluorescence among castor bean cultivars under induced water deficit. *Acta Physiol Plant* 35: 119–128
- Faria AP, Fernandes GW, França MGC (2015) Physiological approaches to determine the impact of climate changes on invasive African grasses in the savanna ecoregion of Brazil. *Environ Earth Sci* 74: 3077–3088

- Fukayama H, Fukuda T, Masumoto C, Taniguchi Y, et al. (2009) Rice plant response to long term CO₂ enrichment: gene expression profiling. *Plant Sci* 177: 203–210
- Geravandi M, Farshadfar E, Kahrizi D (2011) Evaluation of some physiological traits as indicators of drought tolerance in bread wheat genotypes. *Russ J Plant Physiol* 58: 69–75
- Godoy O, Lemos-Filho JP, Valladares F (2011) Invasive species can handle higher leaf temperature under water stress than Mediterranean natives. *Environ Exp Bot* 71: 207–214
- Gombos Z, Wada H, Hideg E, Murata N (1994) The unsaturation of membrane lipids stabilizes photosynthesis against heat stress. *Plant Physiol* 104: 563–567
- Hamilton EWIII, Heckathorn SA, Joshi P, Wang D, et al. (2008) Interactive effects of elevated CO₂ and growth temperature on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃ and C₄ species. *J Integr Plant Biol* 50: 1375–1387
- Haque MS, Kjaer KH, Rosenqvist E, Sharma DK, et al. (2014) Heat stress and recovery of photosystem II efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars acclimated to different growth temperatures. *Environ Exp Bot* 99: 1–8
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture method for growing plants without soils. *Cali Agric Exp Sta Circ* 347: 1–32
- IPCC (2013) Summary for policymakers. In: Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, et al. (eds) *Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, pp. 1–30

- Karim MA, Fracheboud Y, Stamp P (1999) Photosynthetic activity of developing leaves of *Zea mays* is less affected by heat stress than that of developed leaves. *Physiol Plant* 105: 685–693
- Kocheva KV, Georgiev GI, Kochev VK (2005) A diffusion approach to the electrolyte leakage from plant tissues. *Physiol Plant* 125: 1–9
- Kocheva KV, Georgiev GI, Kochev VK (2014) An improvement of the diffusion model for assessment of drought stress in plant tissues. *Physiol Plant* 150: 88–94
- Landau EC, Pereira Filho IA (2012) Cultivo do milho: Clima. In: Sistema de Produção 3. Embrapa Milho e Sorgo. Versão eletrônica. 4 ed. (*In Portuguese*) http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milheiro_4_ed/clima.htm. Accessed 1st October 2015
- Li P, Ainsworth EA, Leakey ADB, Ulanov A, et al. (2008) *Arabidopsis* transcript and metabolite profiles: ecotype-specific responses to open-air elevated [CO₂]. *Plant Cell Environ* 31: 1673–1687
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 603: 591–593
- Logan BA, Combs A, Myers K, Kent R, et al. (2009) Seasonal response of photosynthetic electron transport and energy dissipation in the eighth year of exposure to elevated atmospheric CO₂ (FACE) in *Pinus taeda* (loblolly pine). *Tree Physiol* 29: 789–797
- Manning K, Pelling R, Higham T, Schwenniger JL, et al. (2010) 4500-year old domesticated pearl millet (*Pennisetum glaucum*) from the Tilemsi Valley, Mali: new insights into an alternative cereal domestication pathway. *J Archaeol Sci* 38: 312-322

- Newman Y, Jennings E, Vendramini J, Blount A (2010) Pearl millet (*Pennisetum glaucum*): overview and management. Univ. of FL. IFAS Extension. Publication #SS-AGR-337. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu/ag347>. Accessed 1st October 2015
- Oliveira-Filho AT, Shepherd GJ, Martins FR, Stubblebine WH (1989) Environmental factors affecting physiognomic and floristic variation in an area of cerrado in central Brazil. *J Trop Ecol* 5: 413–431
- Percival GC, Sheriffs CN (2002) Identification of drought tolerant woody perennial using chlorophyll fluorescence. *J Arboric* 28: 215–223
- Sage RF, Monson RK (1999) The biology of C4 photosynthesis. Academic Press, New York
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, et al. (2012) Climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) triggers the antioxidant enzymes' response of grapevine cv. Tempranillo, avoiding oxidative damage. *Physiol Plant* 144: 99–110
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* 2012:1–26
- Taub DR, Seemann JR, Coleman JS (2000) Growth in elevated CO₂ protects photosynthesis against high-temperature damage. *Plant Cell Environ* 23: 649–656
- Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Phan Thi AT, Vieira da Silva JB (1990) Electrolyte and Pi leakage and soluble sugar content as physiological test for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J Exp Bot* 41: 827–832

- Vu JCV, Allen LH Jr (2009) Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C₄ sugarcane. *J Plant Physiol* 166: 107–116
- Wall GW (2001) Elevated atmospheric CO₂ alleviates drought stress in wheat. *Agr Ecosyst Environ* 87: 261–271
- Wang D, Heckathorn SA, Barua D, Joshi P, et al. (2008) Effects of elevated CO₂ on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃, C₄, and CAM species. *Am J Bot* 95: 165–176
- Wang M, Xie B, Fu Y, Dong C, et al. (2015) Effects of different elevated CO₂ concentrations on chlorophyll contents, gas exchange, water use efficiency, and PSII activity on C₃ and C₄ cereal crops in a closed artificial ecosystem. *Photosynth Res* 126: 351–362

Figure captions

Fig. 1. Determination of the best washing time to completely remove the electrolytes from leaf tissue disks of maize and pearl millet. Values represent mean \pm SEM (n = 8). Different letters indicate statistical differences ($P < 0.001$) in electrical conductivity between washing times

Fig. 2. Kinetics of electrolyte leakage from leaf tissue of maize (a to d) and pearl millet (e to h) plants grown under different CO₂ concentrations and different temperatures subjected to water deficit induced by PEG solutions, providing the following water potentials (Ψ_w): $\circ = 0$; $\square = -1.2$; $\triangle = -1.8$ and $\nabla = -2.4$ MPa. Values represent mean \pm SEM (n = 4). Asterisks (*) indicate the time when kinetics stabilized ($P < 0.001$; see Online Resource 3) and different letters indicate statistical differences ($\Psi_w = -1.2$ MPa: $P < 0.001$; $\Psi_w = -1.8$ and -2.4 MPa: $P < 0.01$; see Online Resource 4) between environmental treatments (Ctrl: control; +T: elevated temperature; +C: elevated CO₂ and +C+T: elevated CO₂ + temperature)

Fig. 3. Membrane injury index of leaf tissue of maize (a) and pearl millet (b) plants grown under different CO₂ concentrations and different temperatures subjected to water deficit induced by PEG solutions. Values represent mean \pm SEM (n = 4). Different lowercase letters indicate statistical differences (maize: $P < 0.001$; pearl millet: $P < 0.05$) between environmental treatments (Ctrl: control; +T: elevated

temperature; +C: elevated CO₂ and +C+T: elevated CO₂ + temperature) in the same water potential (Ψ_w) and different capital letters indicate statistical differences ($P < 0.001$) between Ψ_w in the same environmental treatment

Fig. 4. Pigment content of leaf tissue of maize (a) and pearl millet (b) plants grown under different CO₂ concentrations and different temperatures after being subjected to acute heat shock induced *in vitro*. Values represent mean \pm SEM (n = 5). Different letters indicate statistical differences ($P < 0.01$) between environmental treatments (Ctrl: control; +T: elevated temperature; +C: elevated CO₂ and +C+T: elevated CO₂ + temperature)

Fig. 1

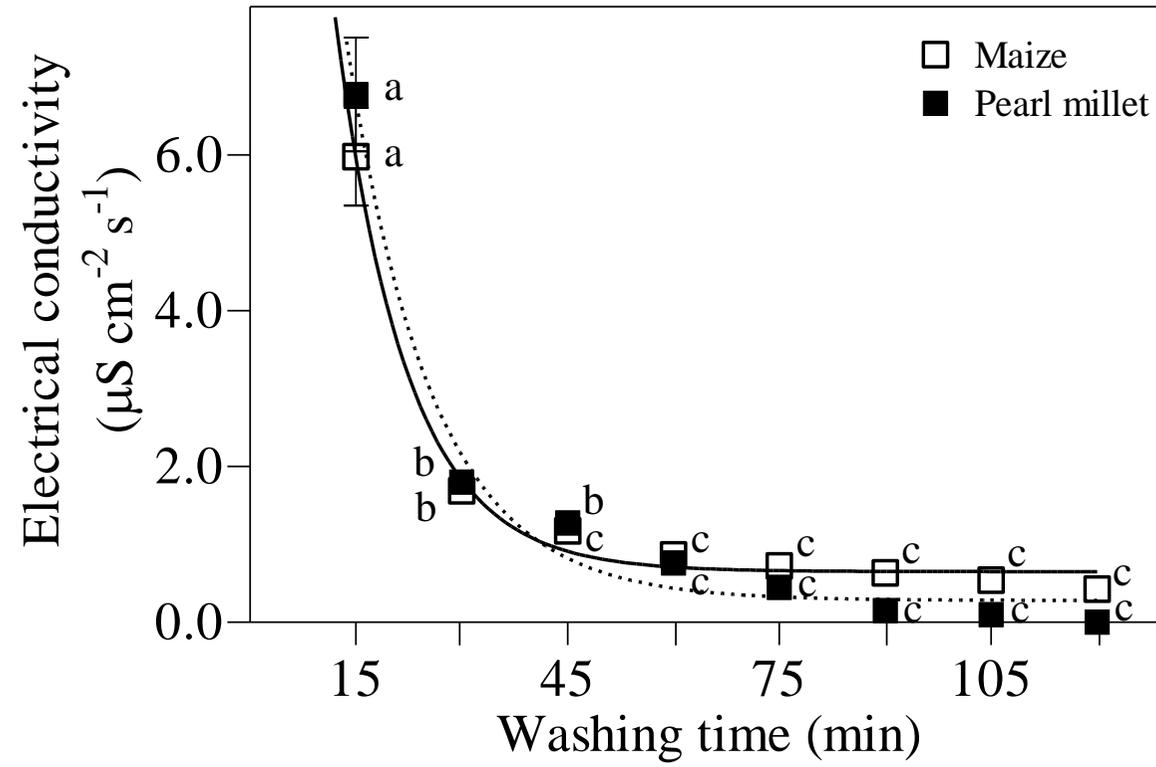


Fig. 2

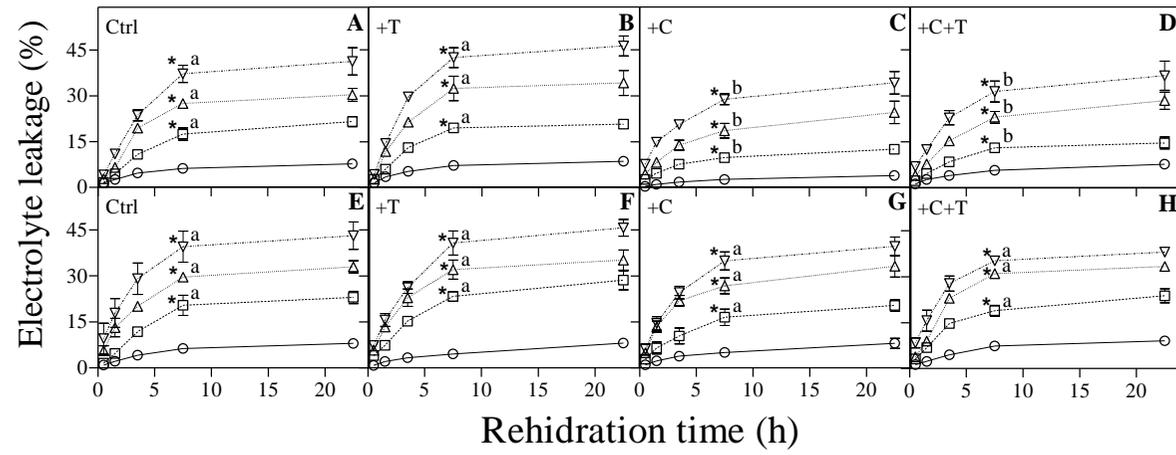


Fig. 3

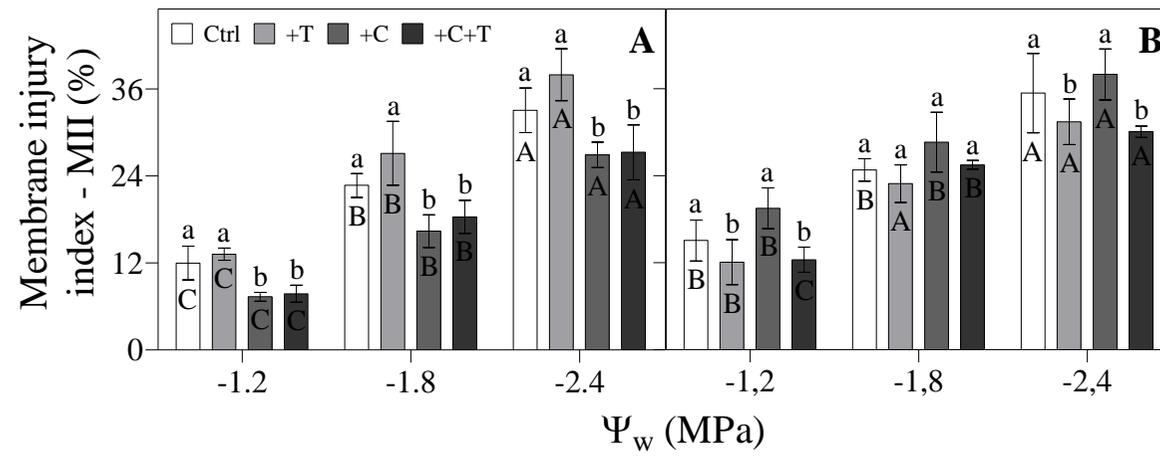


Fig. 4

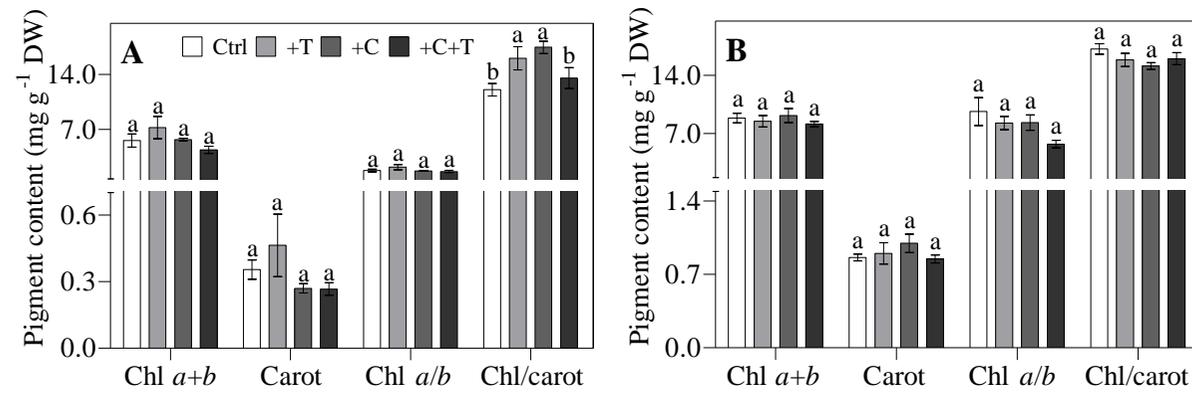


Table 1 Photosystem (PS) II tolerance after acute heat shock *in vitro* assessed as the temperature (°C) drop of 15 (T₁₅) and 50% (T₅₀) of PSII maximum quantum yield (F_v/F_m) of leaf tissue of maize and pearl millet plants grown under different CO₂ concentrations and different temperatures

Photosystem (PS) II tolerance after acute heat shock				
T₁₅ - Temperature (°C) drop of 15% in F_v/F_m				
	Maize		Pearl millet	
Ctrl	32.62 ± 0.51	b	34.57 ± 1.12	a
+T	31.81 ± 0.64	b	33.07 ± 0.64	b
+C	33.08 ± 0.30	a	35.43 ± 1.09	a
+C+T	33.83 ± 0.52	a	33.05 ± 0.35	b
T₅₀ - Temperature (°C) drop of 50% in F_v/F_m				
	Maize		Pearl millet	
Ctrl	41.65 ± 0.39	a	41.87 ± 0.76	b
+T	41.03 ± 0.33	a	40.63 ± 0.68	c
+C	41.25 ± 0.29	a	43.75 ± 0.82	a
+C+T	41.67 ± 0.55	a	42.01 ± 0.52	b

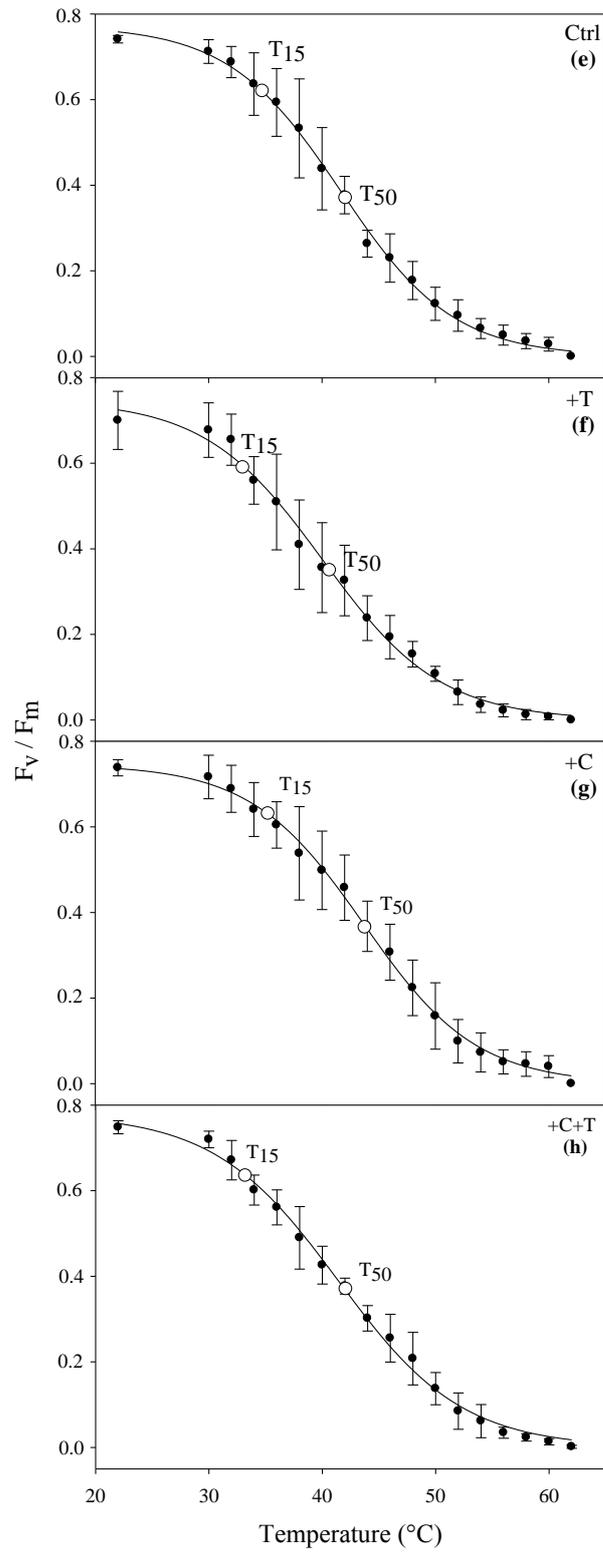
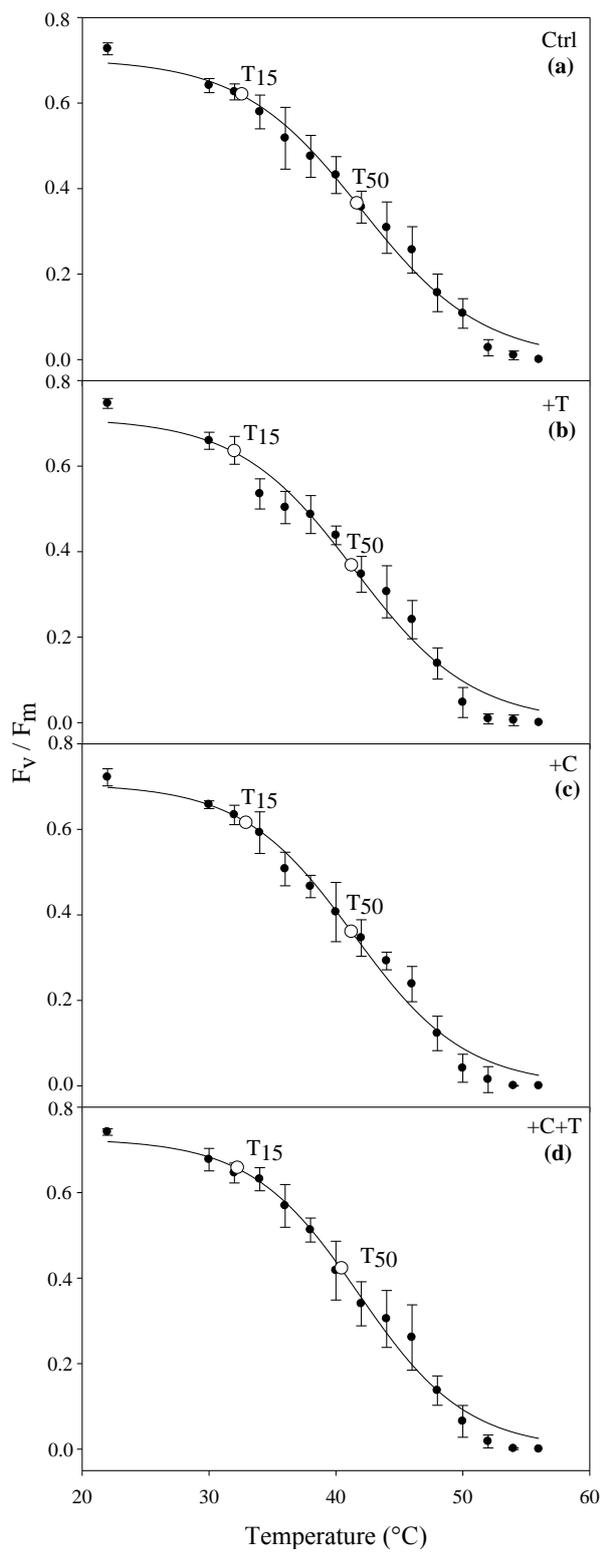
Values represent mean ± SEM (n = 5). Different letters indicate statistical differences ($P < 0.05$). Ctrl: control; +T: elevated temperature; +C: elevated CO₂; +C+T: elevated CO₂ + temperature

Online Resource 1 Average values of environmental conditions measurements: CO₂ concentration ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), temperature ($^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (%) in the four environmental treatments applied in the eight open-top chambers used for the cultivation of maize and pearl millet

	Maize (cultivation period: March/2013)			Pearl millet (cultivation period: July/2013)		
	[CO ₂] ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Relative humidity (%)	[CO ₂] ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Relative humidity (%)
Ctrl 1 ^a	405.3	23.9	72.5	419.0	23.7	60.1
Ctrl 2 ^b	397.9	24.2	74.9	395.0	22.2	60.1
Mean Ctrl	401.6	24.1	73.7	407.0	23.0	60.1
+T 1	407.3	27.1	71.4	398.0	26.7	59.1
+T 2	396.4	27.2	61.3	375.0	26.6	50.3
Mean +T	401.9	27.2	66.4	386.5	26.7	54.7
+C 1	784.4	24.3	71.9	787.0	24.0	63.4
+C 2	781.2	24.8	70.6	779.0	24.0	54.8
Mean +C	782.8	24.6	71.3	783.0	24.0	59.1
+C+T 1	804.2	27.5	59.1	799.0	23.4	48.0
+C+T 2	779.0	27.3	61.2	744.0	26.5	51.3
Mean +C+T	791.6	27.4	60.2	771.5	25.0	49.7

[CO₂]: CO₂ concentration; Ctrl: control; +T: elevated temperature; +C: elevated CO₂; +C+T: elevated CO₂ + temperature; ^a 1 and ^b 2: numbers of open-top chambers used in each environmental treatment

Online Resource 2 Sigmoidal curves fitting for the drop in 15 (T_{15}) and 50% (T_{50}) of PSII maximum quantum yield (F_v/F_m) for maize (a to d) and pearl millet (e to h) plants subjected to gradual temperature increase. Data represent mean \pm SEM (n=5) for each environmental treatment [Ctrl: control – ambient CO₂ concentration ($\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and room temperature; +T: ambient CO₂ concentration ($\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated temperature (room temperature + 3°C); +C: elevated CO₂ concentration ($\sim 800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and room temperature; +C+T: elevated CO₂ concentration ($\sim 800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated temperature (room temperature + 3°C)].



Online Resource 3 Analysis of deviance for stabilization time of electrolyte leakage from leaf tissue of maize and pearl millet plants grown under different CO₂ concentrations and different temperatures subjected to water deficit induced by polyethylene glycol (PEG) 6000 solutions. Environmental treatment [Ctrl: control – ambient CO₂ concentration (~ 400 μmol mol⁻¹) and room temperature; +T: ambient CO₂ concentration (~ 400 μmol mol⁻¹) and elevated temperature (room temperature + 3°C); +C: elevated CO₂ concentration (~ 800 μmol mol⁻¹) and room temperature; +C+T: elevated CO₂ concentration (~ 800 μmol mol⁻¹) and elevated temperature (room temperature + 3°C)].

		Maize					
		Df	Deviance	Res. Df	Res. Dev.	F	Pr(>F) ^a
Ctrl	NULL			59	9762.5		
	Ψ _w	2	1506.9	57	8255.6	60.260	1.876E-13 ***
	Reh. time	4	7194.4	53	1061.2	143.851	< 2.2E-16 ***
	Ψ _w × Reh. time	8	498.6	45	562.6	4.985	1.850E-04 ***
+T	NULL			59	12044.1		
	Ψ _w	2	2261.2	57	9782.9	68.391	2.277E-14 ***
	Reh. time	4	8225.4	53	1557.6	124.392	< 2.2E-16 ***
	Ψ _w × Reh. time	8	813.6	45	743.9	6.152	2.362E-05 ***
+C	NULL			59	5518.8		
	Ψ _w	2	1907.22	57	3611.6	82.504	8.851E-16 ***
	Reh. time	4	2720.61	53	891.0	58.845	< 2.2E-16 ***
	Ψ _w × Reh. time	8	370.8	45	520.1	4.010	0.001 **
+C+T	NULL			59	7155.7		
	Ψ _w	2	1811.9	57	5343.8	54.723	8.908E-13 ***
	Reh. time	4	4160.0	53	1183.9	62.821	< 2.2E-16 ***
	Ψ _w × Reh. time	8	438.9	45	745.0	3.314	0.005 **
		Pearl millet					
		Df	Deviance	Res. Df	Res. Dev.	F	Pr(>F) ^a
Ctrl	NULL			59	10937.2		

	Ψ_w	2	2420.1	57	8517.1	29.645	6.122E-09	***
	Reh. time	4	6472.7	53	2044.5	39.644	3.302E-14	***
	$\Psi_w \times$ Reh. time	8	207.7	45	1836.8	0.636	0.743	
	NULL			59	10633.7			
+T	Ψ_w	2	1302.7	57	9331.1	31.204	3.155E-09	***
	Reh. time	4	8073.6	53	1257.5	96.698	< 2.2E-16	***
	$\Psi_w \times$ Reh. time	8	318.2	45	939.3	1.906	0.083	
	NULL			139	8494.8			
+C	Ψ_w	2	1667.6	133	6827.2	39.787	1.123E-10	***
	Reh. time	4	5476.5	125	1350.7	65.330	< 2.2E-16	***
	$\Psi_w \times$ Reh. time	8	407.7	105	943.1	2.432	0.028	*
	NULL			59	8280.5			
+C+T	Ψ_w	2	1343.8	57	6936.8	68.242	2.363E-14	***
	Reh. time	4	6254.6	53	682.1	158.818	< 2.2E-16	***
	$\Psi_w \times$ Reh. time	8	239.1	45	443.1	3.035	0.008	**

Df, degrees of freedom; Ctrl: control; +T: elevated temperature; +C: elevated CO₂; +C+T: elevated CO₂ + temperature; ^a Significance codes: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. Electrolyte leakage kinetics data are presented in Fig. 2.

Online Resource 4 Analysis of deviance of electrolyte leakage from leaf tissue of maize and pearl millet plants grown under different CO₂ concentrations and different temperatures subjected to water deficit induced by polyethylene glycol (PEG) 6000 at the time of kinetics stabilization (8 h). Environmental treatment [Ctrl: control – ambient CO₂ concentration (~ 400 μmol mol⁻¹) and room temperature; +T: ambient CO₂ concentration (~ 400 μmol mol⁻¹) and elevated temperature (room temperature + 3°C); +C: elevated CO₂ concentration (~ 800 μmol mol⁻¹) and room temperature; +C+T: elevated CO₂ concentration (~ 800 μmol mol⁻¹) and elevated temperature (room temperature + 3°C)].

Maize							
		Df	Deviance	Res. Df	Res. Dev.	F	Pr(>F)^a
-1.2 MPa	NULL			15	304.308		
	Temp.	1	27.379	14	276.929	4.412	0.058
	[CO ₂]	1	201.143	13	75.786	32.412	0.000 ***
	Temp. × [CO ₂]	1	1.317	12	74.469	0.212	0.653
-1.8 MPa	NULL			15	757.420		
	Temp.	1	87.190	14	670.230	3.122	0.103
	[CO ₂]	1	334.800	13	335.440	11.987	0.005 **
	Temp. × [CO ₂]	1	0.270	12	335.170	0.010	0.923
-2.4 MPa	NULL			15	847.560		
	Temp.	1	61.270	14	786.290	1.834	0.201
	[CO ₂]	1	378.010	13	408.280	11.314	0.006 **
	Temp. × [CO ₂]	1	7.360	12	400.920	0.220	0.647
Pearl millet							
		Df	Deviance	Res. Df	Res. Dev.	F	Pr(>F)^a
-1.2 MPa	NULL			15	375.400		
	Temp.	1	28.011	14	347.390	1.207	0.294
	[CO ₂]	1	68.517	13	278.880	2.951	0.112
	Temp. × [CO ₂]	1	0.284	12	278.590	0.012	0.914
-1.8 MPa	NULL			15	287.260		
	Temp.	1	44.890	14	242.370	2.402	0.147
	[CO ₂]	1	14.861	13	227.510	0.795	0.390

	Temp. × [CO ₂]	1	3.240	12	224.270	0.173	0.685
	NULL			15	719.350		
-2.4 MPa	Temp.	1	2.426	14	716.920	0.047	0.831
	[CO ₂]	1	102.566	13	614.350	2.006	0.182
	Temp. × [CO ₂]	1	0.779	12	613.580	0.015	0.904

Df, degrees of freedom; Temp.: temperature; [CO₂]: CO₂ concentration; Temp. × [CO₂]: interaction between temperature and CO₂ concentration; ^a Significance codes: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$. Electrolyte leakage kinetics data are presented in Fig. 2

Considerações finais

É consenso entre os pesquisadores que o aumento da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera, sobretudo de dióxido de carbono, vem causando inúmeras alterações no clima em diversas partes do globo. Muitos estudos têm descrito o efeito destas alterações sobre plantas e como isso pode impactar outros níveis tróficos. Porém, tendo em vista a gama de espécies existentes nos diversos ecossistemas da Terra, não seria correto extrapolar tal conhecimento para outros ambientes sem certificar-se de que as respostas são semelhantes. Da mesma forma, para sistemas manejados, que possuem geralmente um zoneamento climático bem delimitado, é preciso avaliar como as espécies respondem localmente, para que o conhecimento gerado seja útil como estratégia de manejo futuro.

As mudanças climáticas previstas pelo IPCC para o fim do século XXI poderão afetar de diferentes maneiras as espécies estudadas nesta pesquisa. As espécies agrícolas apresentaram respostas diferentes de acordo com o tipo de metabolismo fotossintético que utilizam. Para as C4 (milho e milheto), a elevação da concentração de CO₂ atmosférico e da temperatura melhoraram a tolerância celular ao déficit hídrico e ao choque térmico agudo. Porém, o milho se beneficiou mais da elevada concentração de CO₂, enquanto o milheto, da elevada temperatura. Entretanto, para a soja, de metabolismo C3, as mudanças climáticas estudadas diminuíram a termotolerância do fotossistema II, o que pode ser evidenciado na redução da temperatura de queda de 50% do rendimento quântico potencial. Além disso, o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos analisados também diminuiu. Esses resultados indicam que se medidas não forem tomadas, as ondas de calor previstas nas próximas décadas podem afetar a cultura da soja. Contudo, o stress que a planta sofrerá na performance fisiológica sob

condições de mudanças climáticas globais é apenas uma pequena parte do problema. A diminuição da qualidade nutricional das folhas de soja cultivadas sob elevada concentração de CO₂ terá forte impacto tanto sobre interações ecológicas benéficas quanto negativas. A diversidade de seus fungos endofíticos tende a diminuir drasticamente no cenário climático previsto para 2100. As folhas da soja, menos nutritivas, sofrerão também com o consumo compensatório pela lagarta *Spodoptera frugiperda*. Esta espécie, que já é considerada praga, terá um potencial de dano ainda maior sobre a cultura, podendo comprometer desde o desenvolvimento das plântulas até o rendimento das colheitas.

Em geral, quase todos os estudos sobre mudanças climáticas vêm somar aos relatórios do IPCC como um alerta a humanidade. Os cientistas prevêem que a produção de alimentos em todo mundo pode sofrer um impacto dramático nas próximas décadas devido às mudanças no clima. O aumento da temperatura ameaça o cultivo e a produção de várias espécies agrícolas e pode agravar ainda mais o problema da fome nas partes mais vulneráveis do planeta. Ao mesmo tempo, a fronteira agrícola brasileira avança sobre ambientes naturais modificando o uso dos solos, sem a noção de que pode estar comprometendo ainda mais as condições de cultivo das áreas agrícolas já existentes. Enquanto potências econômicas mundiais temem a crise que isso pode gerar, países pobres como os da África, e até mesmo grandes produtores como o Brasil, já sentem os efeitos que devem se intensificar num futuro próximo. Somada às alterações climáticas, a perda de biodiversidade, que vem ocorrendo numa velocidade assustadora, poderá afetar ainda mais os sistemas de produção devido à perda de serviços ecossistêmicos prestados. Espera-se assim, que este trabalho seja relevante para estratégias de manejo e conservação, tanto dos sistemas agrícolas quanto dos

ecossistemas naturais, e que possa contribuir para discussões futuras sobre as mudanças climáticas globais.