

CAMBIOS INDUCIDOS EN LA MORFOANATOMÍA FOLIAR POR EFECTO DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA BAJA, Y SUS IMPLICACIONES EN LA ECONOMÍA DEL C, EN ESPECIES DE *Brachiaria* (TRIN.) GRISEB. (POACEAE) Y *Centrosema* (DC.) BENTH. (FABACEAE)

Orlando Guenni Rodríguez y Damelis Jáuregui

Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua. orlandoguenni@gmail.com

COMPENDIO

En los pastizales y sistemas silvopastoriles destinados a la producción animal en el trópico, la sombra origina condiciones de estrés que limitan la productividad y persistencia de las plantas forrajeras. La sostenibilidad de esos ecosistemas dependerá entonces de la selección correcta de especies que persistan bajo condiciones restringidas de luminosidad. En este trabajo se estudiaron algunas respuestas morfo-anatómicas de la hoja en gramíneas (C_4) y leguminosas (C_3) de los géneros *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae) y *Centrosema* (DC.) Benth. (Fabaceae), ante condiciones de radiación fotosintéticamente activa (RFA) contrastantes. Para esto, se cultivaron en campo e invernadero, plantas de las distintas especies de ambos géneros bajo dos proporciones de RFA: 100% (control) y 30%. En comparación con 100% de RFA, el área foliar específica incrementó (50-120%) en ambos grupos. En las gramíneas se observó una disminución en el espesor de la pared celular más cutícula (30-64%) en ambas epidermis. A excepción de *B. dictyoneura*, donde no hubo variación del espesor de la hoja, en *B. brizantha* y *B. decumbens* tanto el espesor de la lámina como del mesofilo se redujeron hasta un 26% por efecto de la radiación baja, mientras que en ambas leguminosas dicha reducción alcanzó un 28%. En este caso, las hojas más delgadas resultaron de reducciones (28-36%) en el grosor tanto del parénquima en empalizada como esponjoso (*C. molle*), o solo de este último (39%, *C. macrocarpum*). La modificación del espacio aéreo mesofilar varió

entre las leguminosas. Se discuten las relaciones entre la plasticidad estructural del tejido fotosintético y el grupo metabólico bajo condiciones de sombra, así como sus implicaciones en la eficiencia de utilización del C asimilado.

PALABRAS CLAVE

Aclimatación, gramíneas y leguminosas forrajeras, hoja, metabolismo fotosintético, radiación solar.

INDUCED CHANGES IN LEAF MORPHOLOGY AND ANATOMY UNDER LOW LIGHT INTENSITY: THEIR IMPLICATIONS ON C ECONOMY IN SPECIES OF *Brachiaria* (TRIN.) GRISEB. (POACEAE) AND *Centrosema* (DC.) BENTH (FABACEAE)

ABSTRACT

In pastures and silvopastoral systems sustaining animal production in the tropics, shade is associated with stress conditions that constrain forage plant productivity and persistence. Sustainability in these ecosystems depends strongly on the appropriate selection of those species that can survive to in low solar radiation conditions. In this study, some leaf morphological and anatomical responses from C₄ grasses (*Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae) and C₃ legumes (*Centrosema* (DC.) Benth. (Fabaceae) to different photosynthetically active radiation (PAR) conditions, were assessed. Plants of the studied species were cultivated under field and glasshouse conditions and exposed to two contrasting PAR proportions: 100% and 30%. Compared to 100% RFA, the specific leaf area increased (50-120%) in the two groups. A decrease in thickness of the external cell wall plus cuticle in both epidermi (30-64%) was observed only in the grasses. With the exception of *B. dictyoneura*, where no modification of leaf thickness was observed, the species *B. brizantha* and *B. decumbens* showed thinner leaves and mesophyll tissue (\pm 26% reduction) under low PAR, whereas for both legumes such reductions reached around 28%. In this case, thinner leaves resulted from reductions (28-36%) in both, palisade and spongy parenchyma (*C. molle*), or from only the latter (39%, *C. macrocarpum*). Modification of the aerial space within the mesophyll varied between legumes. The relationships between structural plasticity of the photosynthetic tissue and the metabolic group under low radiation conditions are discussed, as well as their implications on the utilization efficiency of assimilated C.

KEY WORDS

Acclimation, forage grasses and legumes, leaf, photosynthetic metabolism, solar radiation.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas destinados a la producción animal, la sombra es considerada como un factor ambiental que limita el crecimiento y persistencia de las especies forrajeras (Baruch y Fisher 1991, Wilson y Ludlow 1991, Humphreys 1994, Cruz *et al.* 1999). En el proceso de aclimatación de las plantas a variaciones en la intensidad de radiación propia del hábitat donde crecen, existe un número de atributos que a diferentes escalas de organización espacial y temporal pueden ser modificados, con el fin de ajustar al menor costo posible, el funcionamiento de la planta a ambientes cambiantes. Dependiendo del grado de plasticidad fenotípica, la variación de ciertos caracteres fisiológicos, morfológicos y anatómicos permite entonces modificar las respuestas de las plantas de manera de optimizar el crecimiento e incrementar la capacidad competitiva y así sobrevivir a restricciones temporales o continuas en la intensidad lumínica (Givnish 1988).

Es reconocido ampliamente que cuando las plantas son expuestas a un conjunto particular de condiciones ambientales limitantes, ellas modifican su capacidad fotosintética para maximizar la ganancia de C en esos escenarios. Esta aclimatación de la fotosíntesis puede variar desde cambios en la morfología de las plantas hasta modificaciones en la bioquímica del aparato fotosintético (Boardman 1977, Givnish 1988, Walters 2005). Por ejemplo, una respuesta común a condiciones de baja luminosidad es invertir más C en la formación de hojas que raíces y desarrollar hojas más delgadas (Guenni *et al.* 2008). Como se menciona más adelante, las plantas aclimatadas a la sombra poseen más proteínas utilizadas en la captación de luz que en el transporte de electrones, implicando que su máximo fotosintético es reducido y el proceso se satura a intensidades lumínicas más bajas (Björkman 1981, Baruch y Fisher 1991, Walters 2005, Peri *et al.* 2007, Lambers *et al.* 2008, Gómez *et al.* 2013). Incluso, como respuesta a las modificaciones en la calidad de luz, las plantas pueden ajustar las proporciones relativas de los diferentes fotosistemas (Walters y Horton 1995a, b).

Cuando las plantas o una cobertura vegetal en particular como los pastos, son expuestas durante su crecimiento y desarrollo a una condición lumínica

relativamente constante, se produce un gradiente en las propiedades fotosintéticas de las hojas a lo largo del dosel herbáceo. Así, se producen diferentes clases de hojas, las cuales se pueden agrupar en dos tipos básicos: hojas de “sombra” y hojas de “sol” (Chapin III *et al.* 2002, Oguchi *et al.* 2003, Terashima *et al.* 2006, Lambers *et al.* 2008). Las mismas difieren tanto en morfología, anatomía y ultraestructura de organelos, así como en propiedades bioquímicas (Walters 2005, Lambers *et al.* 2008). De igual manera, las plantas que habitan lugares por lo general expuestos a intensidades lumínicas bajas, como los estratos inferiores de una cobertura arbórea o en el sotobosque, poseen típicamente hojas de “sombra”, mientras aquellas plantas pioneras o que habitan naturalmente sitios expuestos directamente a la radiación solar, poseen mayormente hojas de “sol”. Sin embargo, la anatomía foliar impone ciertas restricciones al potencial de aclimatación a la intensidad de radiación. Una aclimatación efectiva a un ambiente nuevo requiere necesariamente la producción de hojas nuevas con modificaciones particulares en su estructura que optimicen la relación ganancia de CO₂ / costo de construcción de la hoja (Oguchi *et al.* 2003, 2005, Walters 2005, Lambers *et al.* 2008).

Las hojas aclimatadas a la sombra tienen en general un costo menor de construcción, con una estructura dirigida a maximizar la intercepción de luz: poseen menos tejido de soporte y un número menor de células mesofilares por unidad de área, de manera que son más delgadas y con un área foliar específica mayor; pero con menos cloroplastos y enzimas carboxilantes (Rubisco) por unidad de área, así como menos potencial de transporte de electrones. Esta limitante funcional es compensada haciendo aún más eficiente la captación de radiación solar: aumentando la concentración de clorofila por cloroplasto y por unidad de masa foliar, incrementando el número de tilacoides por granum y acumulando proporcionalmente más de este pigmento en las antenas de los complejos aceptores de fotones localizados dentro de las membranas de los tilacoides en los cloroplastos, resultando así en un cociente *chl a*/*chl b* menor (Evans 1998, Terashima y Hikosaka 1995, Walters 2005, Lambers *et al.* 2008). La sobrevivencia en condiciones de sombra demanda entonces la maximización en la captura de luz y minimización en las pérdidas de C y energía en la respiración (Björkman 1973, Pearcy y Sims 1994).

Por su parte, las hojas de sol (o expuestas a intensidades lumínicas más altas), son comúnmente más gruesas, con un contenido mayor de materia seca por unidad de área, y con un contenido mayor de nitrógeno por unidad de área, el cual es utilizado fundamentalmente en la construcción de enzimas fotosintéticas. Por lo tanto, estas hojas poseen una capacidad mucho mayor de intercambio

gaseoso por unidad de superficie asimilatoria (Pearcy y Sims 1994, Pearcy 2007, Lambers *et al.* 2008). Las tasas fotosintéticas más altas observadas en hojas de sol son por lo tanto el resultado de: 1) una conductancia estomática mayor (la cual incluso varía proporcionalmente al nivel de radiación recibida a corto plazo o durante el desarrollo ontogenético de la hoja), y 2) una capacidad fotosintética intrínseca del mesofilo mucho mayor por unidad de conductancia de CO₂ de este tejido (reflejado en el contenido mayor de N y por ende de enzimas fotosintéticas) (Björkman 1981, Givnish 1988, Terashima *et al.* 2006). En consecuencia, la eficiencia mayor de uso de luz en las plantas de sol comparadas con las de sombra dependerá, entre otros factores, del efecto positivo de una mayor disponibilidad de N y por ende de enzimas fotosintéticas, dado que la carboxilación como propiedad funcional es más probable que limite la fotosíntesis a niveles altos de radiación solar (Givnish 1988). Adicionalmente, el máximo fotosintético en las hojas de plantas C₃ está también correlacionado con otros parámetros estructurales como el área superficial del mesofilo ocupada por los cloroplastos, debido a la importancia que este carácter tiene en la disolución y transporte de CO₂ hacia los sitios de carboxilación. De aquí que las hojas de sol sean en general más gruesas que las de sombra (Terashima *et al.* 2006). El grosor necesario para maximizar la fotosíntesis es alcanzado en muchas hojas de sol por un incremento en el largo de las células del parénquima en empalizada, o por el desarrollo de más de una capa de células de ese tejido (Lambers *et al.* 2008).

Por lo tanto, las diferencias entre o dentro de especies en respuesta a la intensidad de luz, serán un reflejo de las condiciones bajo las cuales se desarrollaron las hojas, con una morfo-anatomía y composición química final optimizada para las condiciones particulares de crecimiento. Sin embargo, las plantas generalmente no crecen en ambientes estáticos, y es muy común que en escala de horas a semanas la luz incidente pueda variar en varios órdenes de magnitud (Pearcy 2007). Esto estimula otro tipo de ajuste funcional, con hojas completamente desarrolladas capaces de cambiar su capacidad fotosintética a corto plazo sin modificaciones sustanciales en su anatomía; lo que se denomina un proceso de “aclimatación dinámica” y que posee un valor adaptativo muy importante para crecer en ambientes cambiantes (Oguchi *et al.* 2008, Athanasiou *et al.* 2010). El tiempo requerido para completar este proceso puede variar entre 4 y 14 días para herbáceas anuales, hasta más de 30 días en perennes. Esta aclimatación funcional implica cambios coordinados en todo el aparato fotosintético, donde cada uno de sus componentes como la actividad de la Rubisco, la capacidad de transporte de electrones, la cantidad, tipo y distribución espacial de los

pigmentos clorofilianos, así como la orientación de los cloroplastos dentro del tejido parenquimático, exhiben cambios en la misma escala de tiempo; esto debido a una fuerte transcripción de genes (Percy y Sims 1994, Terashima y Hikosaka 1995, Athanasiou *et al.* 2010).

En este estudio, se cuantifica y analiza la estructura (morfología y anatomía) de la hoja en especies de monocotiledóneas (gramíneas C_4 del género *Brachiaria* (Trin.) Griseb.), y dicotiledóneas (leguminosas C_3 del género *Centrosema* (DC.) Benth.), las cuales se cultivaron previamente en condiciones contrastantes de intensidad lumínica. El análisis de la información se enfocó en estimar el grado de plasticidad fenotípica del órgano asimilatorio ante reducciones en la intensidad de radiación recibida durante el crecimiento. De igual manera, se intentó comparar la variación en el potencial de aclimatación a la sombra entre grupos funcionales C_3 y C_4 , a través de los cambios inducidos por la restricción de luz en la morfo-anatomía foliar.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

En este estudio comparativo, se utilizaron tres especies C_4 (subtipo PEP-CK) de gramíneas tropicales de origen africano, pertenecientes al género *Brachiaria* (Renvoize *et al.* 1998): *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf CIAT 6780, *B. decumbens* Stapf CIAT 606 y *B. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (sin. *B. humidicola*) CIAT 6133. Esta última especie es considerada un “tipo morfológico” similar a *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Renvoize *et al.* 1998). En el caso de las plantas con metabolismo C_3 , se utilizaron dos especies de leguminosas forrajeras del Neotrópico pertenecientes al género *Centrosema*: *C. molle* Mart. ex Benth. CIAT 15160 ‘Barinas’ y *C. macrocarpum* Benth. CIAT 5713 (Cook *et al.* 2005).

CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y ESTUDIOS MORFO-ANATÓMICOS REALIZADOS

En el caso de las gramíneas C_4 , las condiciones de crecimiento de las plantas han sido detalladas previamente (Guenni *et al.* 2008) y el procedimiento utilizado para los cortes anatómicos fue reportado originalmente por Guenni *et al.* (2007). Brevemente, las gramíneas se cultivaron en condiciones de invernadero durante el crecimiento vegetativo bajo dos regímenes de luminosidad: 100% de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) que llegaba a las plantas, y 30% de la RFA (mediante la colocación de mallas negras de sombreo). Para el estudio anatómico, las hojas se cosecharon unos 40 días después de cultivarse

las plantas bajo las condiciones de luz descritas anteriormente (Guenni *et al.* 2008). En cada combinación especie x tratamiento de luz, se determinó el área foliar específica (AFE) de la lámina foliar utilizando un medidor de área foliar y estableciendo la relación área: peso seco de la lámina. Los datos de AFE utilizados acá, fueron por lo tanto los reportados por Guenni *et al.* (2008).

Con fines de comparar la anatomía foliar de las gramíneas con la de las leguminosas, se utilizó la región de la semi-lámina de aquellas hojas más jóvenes y recién expandidas. Las mismas se preservaron en una solución de FAA (formalina-ácido acético-etanol al 70%), para posteriormente obtener cortes transversales hechos a mano alzada. El material fue luego teñido en una solución acuosa (0,05%) de azul de toluidina y montadas en agua-glicerina (v:v) para su observación bajo el microscopio óptico y la toma de fotografías con una cámara digital acoplada al instrumento. En total, se utilizaron tres a cuatro láminas foliares por especie y tratamiento, correspondiendo cada lámina a una planta distinta.

En relación a las leguminosas C₃, las dos especies de *Centrosema* se cultivaron en el campo experimental de la Sección de Forrajes del Instituto de Producción Animal (IPA), FAGRO - UCV (10°16'N, 67°36'W; 459 msnm), en parcelas de más de un año de establecidas y bajo dos proporciones de RFA equivalentes a las que fueron expuestas las especies de *Brachiaria*. Para esto, se utilizaron mallas negras de sombra colocadas a una altura de ± 1 m por encima del suelo. Después de 90 días de rebrote bajo sol y sombra, se tomaron muestras de la 2da-3ra hoja por debajo de la más joven en un tallo o estolón. El AFE se determinó en hojas de la misma edad utilizando el mismo procedimiento reportado para las gramíneas. Para los cortes anatómicos, en todos los casos se procesaron porciones ($\pm 0,5$ cm²) del folíolo central de la hoja trifoliada seleccionada, las cuales se fijaron en FAA (con etanol 70%), para luego preparar láminas con secciones transversales usando el método de inclusión en parafina (Johansen 1940). Las secciones fueron teñidas con safranina/fast-green y se montaron en bálsamo de Canadá (Johansen 1940). Posteriormente, se observaron bajo microscopía óptica, tomando fotografías de los cortes con una cámara digital. En este caso, se utilizó un total de 8-12 folíolos por especie y tratamiento (dos a tres folíolos tomados al azar de cada parcela o repetición en campo).

En las gramíneas, las mediciones anatómicas incluyeron: a) espesor máximo de la lámina (EL, a nivel del haz vascular de primer orden), b) espesor máximo del mesofilo (EM, en las regiones donde están ausentes las células buliformes), y c) espesor de la pared celular externa más cutícula en la epidermis abaxial (EAB) y adaxial (EAD). En el caso de las leguminosas se midieron: a) espesor

máximo de la hoja (EH), b) espesor del parénquima en empalizada (EPEM), c) espesor del parénquima esponjoso (EPES), d) fracción total de espacio aéreo en el mesofilo (fTAM), e) porcentaje de espacio aéreo en el parénquima en empalizada en relación al total (fAPEM), f) porcentaje de espacio aéreo en el parénquima esponjoso en relación al total (fAPES), y g) espesor de la pared celular externa más cutícula en la epidermis abaxial (EAB) y adaxial (EAD). En todos los casos, las mediciones de la pared celular externa más cutícula fueron tomadas en imágenes digitales aumentadas 150-200%. Para la cuantificación de los caracteres anteriores, todas las imágenes de las fotografías digitales fueron analizadas con el paquete ImageJ-versión 1.48 (Abramoff *et al.* 2004).

DISEÑO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El diseño estadístico utilizado varió de acuerdo al experimento. En el caso de las gramíneas, fue un diseño completamente aleatorizado (Guenni *et al.* 2007, 2008) y las variables morfoanatómicas se analizaron bajo un diseño completamente aleatorizado, con un factorial de 3 especies x 2 tratamientos x 8 mediciones (tomadas en 3-4 hojas distintas). En el caso de las leguminosas, el diseño de campo fue el de bloques al azar, con un factorial de 2 especies x 2 tratamientos x 4 repeticiones (bloques). Los valores en cada repetición representaron a su vez el promedio de 5-10 mediciones de al menos cuatro hojas diferentes. Se utilizó un ANOVA en concordancia con cada diseño experimental, para luego comparar fundamentalmente diferencias entre medias dentro de cada especie (aplicando la prueba de Tukey al 5%, SAS Institute 2004). Las comparaciones entre tipos fotosintéticos se hicieron con base en el porcentaje promedio de aumento o reducción del carácter medido a 30% RFA en comparación con 100% RFA. El procedimiento UNIVARIATE (SAS Institute 2004) se usó para probar la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk, SAS Institute 2004) en los datos numéricos. En condiciones de falta de normalidad, los valores se transformaron usando la función $\log_{10}(x+1)$ o el arcoseno para datos de fracciones (Zar 1984). Si los datos transformados no seguían cumpliendo los requisitos de normalidad, se analizaron por vía no paramétrica (prueba de Friedman; SAS Institute, 2004).

RESULTADOS

MODIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA FOLIAR A INTENSIDADES LUMÍNICAS BAJAS

En general, se observó una disminución marcada en el costo de construcción de la hoja cuando se desarrolló a intensidades lumínicas bajas (30% RFA). Sin embargo, en la mayoría de los caracteres medidos, el efecto de la intensidad

de radiación dependió fuertemente de la especie ($0,0001 < P < 0,02$). Tanto en las gramíneas como en las leguminosas, el AFE incrementó significativamente ($P = 0,05$) bajo 30% RFA en comparación con 100% RFA (Tablas I y II). En las gramíneas C_4 , el incremento porcentual estuvo dentro del intervalo 63 (*B. dictyoneura*) - 120% (*B. decumbens*) (Tabla I), mientras que en las leguminosas C_3 , dicho intervalo de incremento fue relativamente más estrecho: 50 (*C. molle*) - 77% (*C. macrocarpum*) (Tabla II). Bajo la condición de sombra, las láminas foliares de las gramíneas se mostraron frecuentemente más largas (Guenni *et al.* 2008), mientras que en el caso de las leguminosas, las hojas trifoliadas eran más grandes, en especial en *C. macrocarpum*.

Tabla I. Variación en algunos caracteres morfo-anatómicos de la lámina foliar en tres especies de *Brachiaria* (C_4) cultivadas bajo dos proporciones de RFA: 100% (sol) y 30% (sombra). Las hojas se colectaron al cabo de 45 días de crecimiento. AFE: área foliar específica (cm^2g^{-1}), EL: espesor máximo de la lámina foliar (μm), EM: espesor máximo del mesofilo (μm), EAB: espesor de la epidermis abaxial (pared celular + cutícula, μm), EAD: espesor de la epidermis adaxial (pared celular + cutícula, μm).

Especie/ Grupo	RFA (%)	AFE* (cm^2g^{-1})	EL (μm)	EM (μm)	EAB (μm)	EAD (μm)
<i>B. brizantha</i>	100	210 ^b	244,6 ^a	191,8 ^a	5,00 ^a	4,65 ^a
	30	350 ^a	186,3 ^b	150,4 ^b	3,46 ^b	2,73 ^b
	% Variación	+67	-23,8	-21,6	-30,0	-42,6
<i>B. decumbens</i>	100	205 ^b	218,1 ^a	190,5 ^a	5,01 ^a	4,28 ^a
	30	450 ^a	170,4 ^b	141,0 ^b	1,75 ^b	2,27 ^b
	% Variación	+120	-21,9	-26,0	-64,0	-46,5
<i>B. dictyoneura</i>	100	200 ^b	208,0 ^a	156,1 ^a	5,05 ^a	4,85 ^a
	30	325 ^a	216,3 ^a	170,1 ^a	2,44 ^b	3,11 ^b
	% Variación	+63	+4,0	+9,0	-52,9	-36,7
C_4 (Rango +/-)		63-120	0-24	0-26	30-64	37-47

Datos tomados de Guenni *et al.* (2008). Diferencias significativas ($P = 0,05$) entre intensidades de luz en cada especie, se denotan con letras distintas en la misma columna. Se incluye el porcentaje promedio de incremento o disminución del carácter medido a 30% RFA con respecto a 100% RFA, así como el rango de incremento o disminución del carácter medido para todas las especies como grupo fotosintético.

Tabla II. Variación en algunos caracteres morfo-anatómicos del foliolo central en dos especies de *Centrosema* (C_3) bajo dos proporciones de RFA: 100% (sol) y 30% (sombra). Las hojas se colectaron al cabo de 90 días de crecimiento. AFE: área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$), EH: espesor máximo de la hoja (μm), EPEM: espesor del parénquima en empalizada (μm), EPES: espesor del parénquima esponjoso (μm), PTAM: porcentaje total de espacio aéreo en el mesofilo (%), fAPEM: fracción en el parénquima en empalizada del total de espacio aéreo mesofilar (%), fAPES: fracción en el parénquima esponjoso del total de espacio aéreo mesofilar (%), EAB: espesor de la epidermis abaxial (pared celular + cutícula, μm), EAD: espesor de la epidermis adaxial (pared celular + cutícula, μm).

Especie/ Grupo	RFA (%)	AFE* ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	EH (μm)	EPEM (μm)	EPES (μm)	PTAM (%)	FAPEM (%)	FAPES (%)	EAB (μm)	EAD (μm)
<i>C. macrocarpum</i>	100	170 ^b	218,4 ^a	85,2 ^a	96,6 ^a	6,2 ^b	24,0 ^a	76,0 ^a	1,44 ^a	2,30 ^a
	30	301 ^a	160,2 ^b	65,5 ^a	59,2 ^b	12,0 ^a	21,1 ^a	79,0 ^a	1,21 ^a	1,72 ^a
	% Variación	+77	-27	-23	-39	+94	-12	+4	-16	-25
<i>C. molle</i>	100	201 ^b	189,6 ^a	91,0 ^a	70,7 ^a	5,1 ^a	39,6 ^a	60,4 ^b	1,23 ^a	1,49 ^a
	30	300 ^a	136,8 ^b	58,3 ^b	51,0 ^b	10,0 ^a	19,1 ^b	80,9 ^a	1,07 ^a	1,38 ^a
	% Variación	+50	-28	-36	-28	+96	-52	+34	-13	-7
C_3 (Rango +/-)		50-77	27-28	0-36	28-39	0-94	0-52	0-34	0	0

*Diferencias significativas ($P = 0,05$) entre intensidades de luz en cada especie, se denotan con letras distintas en la misma columna. Se incluye el porcentaje promedio de incremento o disminución del carácter medido a 30% RFA con respecto a 100% RFA, así como el rango de incremento o disminución del carácter medido para todas las especies como grupo fotosintético.

MODIFICACIÓN DE LA ANATOMÍA FOLIAR A INTENSIDADES LUMÍNICAS BAJAS

En las tres especies de *Brachiaria* se pudo observar una serie de caracteres anatómicos típicos del síndrome C_4 (subtipo PCK), los cuales incluyen en general un conjunto de células mesofilares sin espacio aéreo aparente y en contacto estrecho con las células de la vaina parenquimática, éstas últimas mostrando una capa única bordeando en forma de roseta la vaina vascular y con una alineación marcada de cloroplastos en la periferia del protoplasma, próximos a la pared celular en contacto con el mesofilo; interna a ésta, es evidente la vaina mestomática en los haces mayores, la cual está constituida por células más pequeñas que la externa, con paredes gruesas. Adicionalmente, los haces vasculares de distinto orden se extienden a ambas epidermis y, en esta región de contacto con las mismas, están ligados a tejido esclerenquimático sub-epidérmico de proporción variada (Fig. 1). Este arreglo interno de los distintos tejidos en la lámina foliar se mantuvo estable dentro del intervalo de intensidades lumínicas estudiadas.

En *B. brizantha* y *B. decumbens*, tanto el espesor total de la lámina como del mesofilo se redujeron significativamente ($P = 0,05$) a 30% RFA, alcanzando entre un 21 y 26% la disminución del espesor en ambos caracteres (Tabla I). En contraste, tanto el grosor de la lámina como del mesofilo en *B. dictyoneura* no mostraron ningún cambio importante por efecto de la disminución de la RFA (Tabla I). En el caso del grosor de pared celular más la cutícula, en ambas epidermis se hizo evidente ($P = 0,05$) una reducción de esta región a 30% RFA. En las tres especies de *Brachiaria*, los intervalos de reducción porcentual oscilaron entre 30 y 64% y de 37 a 47% en la epidermis abaxial y adaxial, respectivamente.

La estructura anatómica de la hoja en las especies de *Centrosema* sigue la conformación típica de una planta C_3 (Fig. 2). Ambas epidermis se caracterizan por poseer una capa de células bien diferenciada, con paredes celulares externas relativamente gruesas. La epidermis adaxial es seguida por parénquima en empalizada con una a dos capas de células alargadas verticalmente, y pocos espacios intercelulares. A continuación se presenta parénquima esponjoso en contacto directo con la epidermis abaxial y donde se localizan los haces vasculares. El parénquima esponjoso presenta células redondeadas y abundantes espacios intercelulares.

Los cambios en el grosor de la hoja en las especies C_3 estudiadas, siguieron la misma tendencia que para las especies C_4 . En ambas especies, el espesor

máximo del folíolo central se redujo significativamente ($P = 0,05$) alrededor de un 28% (Tabla II). Esta disminución en el espesor de la hoja por efecto de la sombra estuvo asociada a una reducción casi proporcional en ambos tejidos parenquimáticos, aunque con diferencias entre especies. Las hojas más delgadas de *C. molle* resultaron de una reducción ($P = 0,05$) tanto del parénquima en empalizada (36%) como del parénquima esponjoso (28%), mientras que en el caso de *C. macrocarpum*, la reducción ($P = 0,05$) en un 39% del espesor del parénquima esponjoso fue solo la responsable de producir hojas más delgadas a 30% RFA (Tabla II).

En *C. macrocarpum*, solo el espacio aéreo total en el mesofilo fue alterado ($P = 0,05$) por la sombra (94% de incremento). Esto ocurrió quizás debido a un pequeño aumento ($\pm 4\%$, aunque no significativo) del espacio aéreo dentro del parénquima esponjoso (Tabla II). En *C. molle*, la no significancia en el incremento de casi el doble del espacio aéreo total a 30% RFA en relación a 100% RFA, pudiera estar asociada a un efecto compensatorio entre el incremento ($P = 0,05$) observado en la fracción de aire correspondiente al parénquima esponjoso ($\pm 34\%$) y la reducción ($P = 0,05$) marcada de esa fracción en el parénquima en empalizada ($\pm 52\%$) (Tabla II). En las dos especies de *Centrosema*, el grosor de la pared celular más la cutícula en ambas epidermis no fue modificado por la sombra (Tabla II).

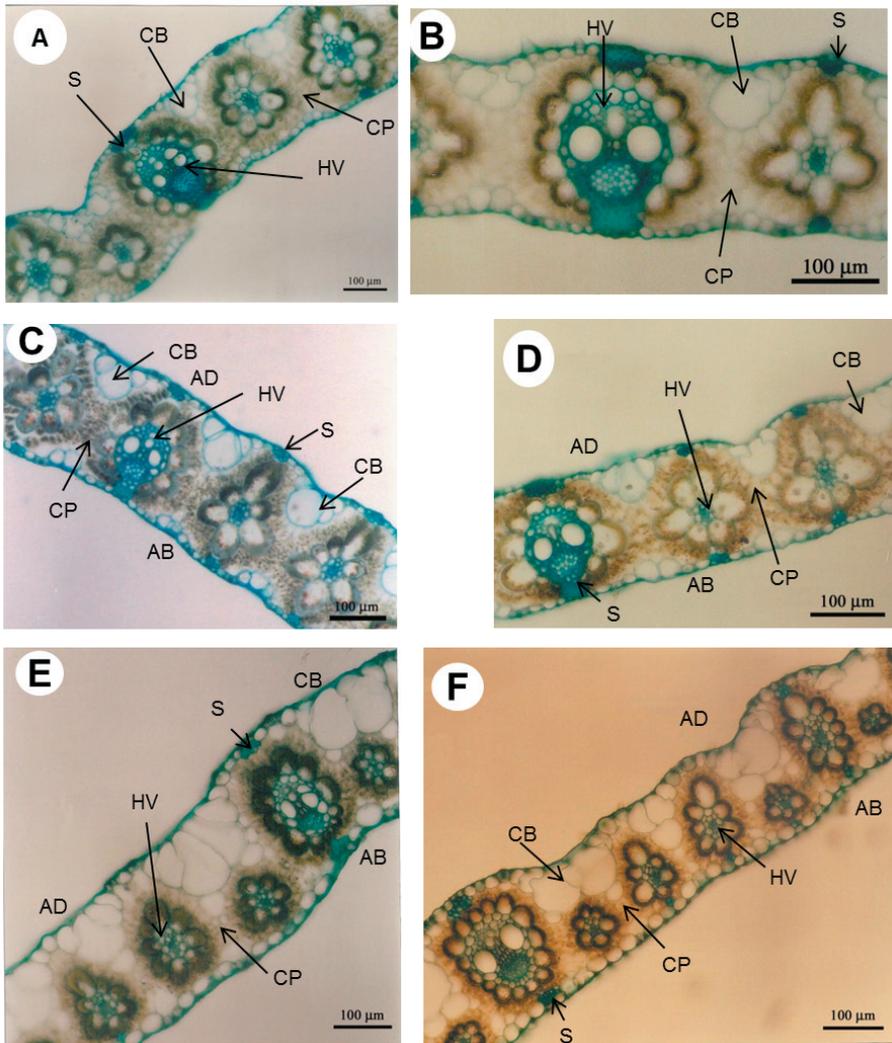


Fig. 1. Secciones transversales de la media lámina en *B. brizantha* (a, b), *B. decumbens* (c, d) y *B. dictyoneura* (e, f), al desarrollarse bajo condiciones de 100% RFA (a, c, e) y 30% RFA (b, d, f). AB: epidermis abaxial, AD: epidermis adaxial, HV: Haz vascular primario, S: esclerénquima asociado con el haz vascular, CP: células parenquimáticas, CB: células buliformes.

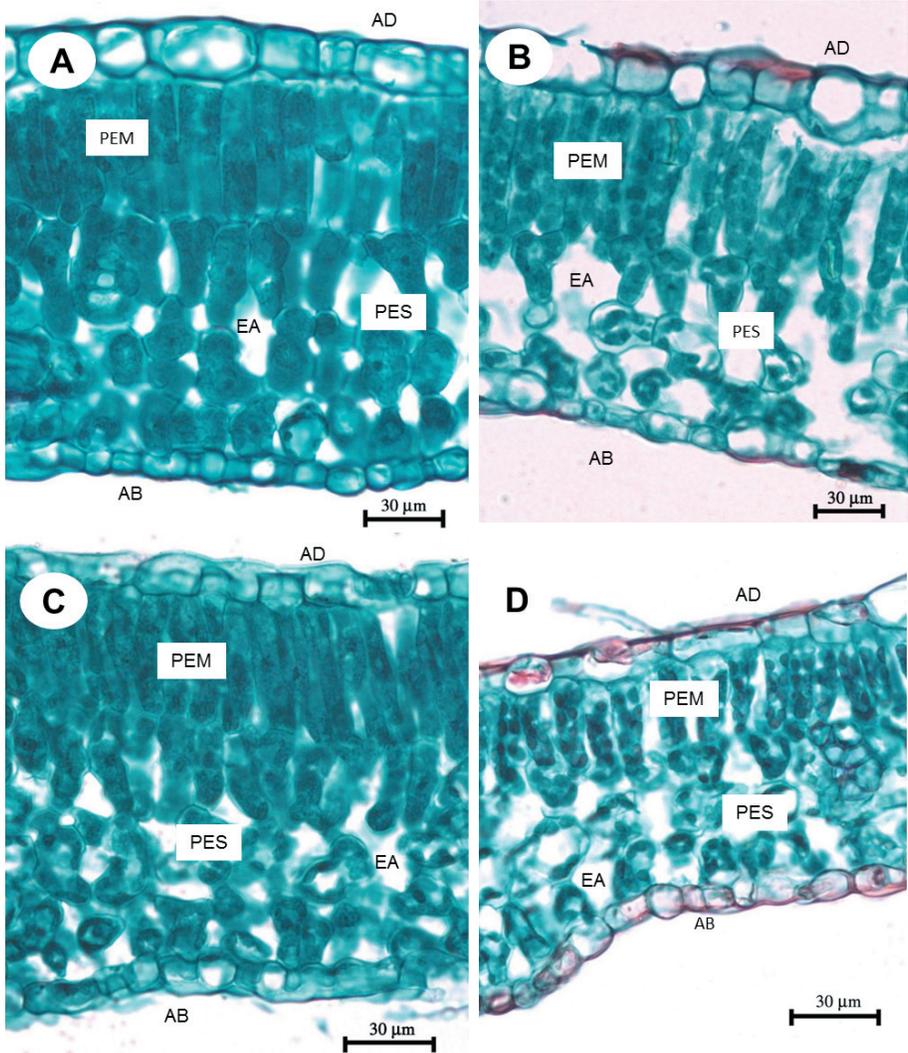


Fig. 2. Secciones transversales del folíolo central en *C. macrocarpum* (a, b) y *C. molle* (c, d), al desarrollarse bajo condiciones de 100% RFA (a, c) y 30% RFA (b, d). AB: epidermis abaxial, AD: epidermis adaxial, EA: espacio aéreo mesofilar, PEM: parénquima en empalizada, PES: parénquima esponjoso.

DISCUSIÓN

CAMBIOS MORFO-ANATÓMICOS ASOCIADOS CON LA OPTIMIZACIÓN EN LA GANANCIA DE C BAJO CONDICIONES DE SOMBRA

La breve descripción hecha de la estructura y disposición anatómica de los distintos tejidos que conforman la lámina foliar en las especies de gramínea C_4 estudiadas, confirma aquellas reportadas en estudios previos (Dengler *et al.* 1994, Albes de Brito y Rodella 2002, Pereira-Nicolau *et al.* 2010).

La aclimatación de las plantas a condiciones restringidas de luminosidad a mediano y largo plazo, requiere un incremento sustancial en la expansión del área foliar para la captura de luz, pero con el menor costo posible de construcción. Las láminas foliares de las gramíneas C_4 estudiadas y aclimatadas a sombra artificial (Guenni *et al.* 2008), mostraron una serie de caracteres que difirieron marcadamente de aquellos que se desarrollaron a intensidades de radiación más altas. En relación a la distribución de biomasa en la planta, los cambios en la relación hoja/tallo fueron mucho menos importantes que aquellos asociados al incremento relativo en la relación vástago/raíz, relación área foliar/peso total de la planta y el área foliar específica (Guenni *et al.* 2008). Esto ya ha sido reportado exhaustivamente para éstas y otras gramíneas forrajeras (Allard *et al.* 1991, Kephart *et al.* 1992, Baruch y Guenni 2007, Paciullo *et al.* 2007, Hernández y Guenni 2008, Gómez *et al.* 2013).

La relación inversa entre la intensidad de radiación y el área foliar específica es muy común (Humphreys 1994, Cruz *et al.* 1999, Walters 2005). En condiciones de sombra, el incremento del AFE es asociado en gramíneas con láminas y pseudo-tallos más largos (etiolados), o con láminas más anchas o más largas pero delgadas (Allard *et al.* 1991, Norton *et al.* 1991, de Castro *et al.* 1999, Peri *et al.* 2007, Guenni *et al.* 2008). Estas modificaciones estructurales de la hoja y dirigidas a maximizar la intercepción de luz (Sultan 2003), favorecen inclusive la captación de luz difusa bajo el dosel arbóreo (Cruz *et al.* 1999, Hernández y Guenni *et al.* 2008). La movilización preferencial de carbohidratos solubles y no solubles a la elongación de las hojas puede darse tan pronto como las plantas son expuestas a condiciones de sombra. Por lo tanto, el AFE representa un parámetro altamente dependiente del estatus nutricional del suelo durante la fase de expansión foliar y, por ende, puede ser usado como indicativo del grado de aclimatación a las condiciones de crecimiento imperantes (Tardieu *et al.* 1999, Wilson *et al.* 1999, Lafarge *et al.* 2010).

Las hojas más delgadas desarrolladas a intensidades lumínicas reducidas, vienen acompañadas por cambios anatómicos, tales como el desarrollo de tejido parenquimático más delgado a consecuencia de un volumen mesofilar reducido (por disminución en el número de células y/o del tamaño individual de las mismas), así como un incremento del espacio intercelular del mesofilo derivado de una disminución en el cociente “área superficial (o volumen) del mesofilo/área superficial de la lámina foliar” (Ludlow y Wilson 1971, Charles-Edwards *et al.* 1974, Ward y Woolhouse 1986, Allard *et al.* 1991, Walters 2005, Peri *et al.* 2007). Esto hace que el AFE sea influenciada directamente por el grosor de la hoja y/o la concentración de materia seca foliar. Sin embargo, dado que ambos parámetros pueden afectar la tasa fotosintética aún a valores constantes del AFE, se considera que la hoja debe optimizar la relación entre estos tres caracteres en función del ambiente donde se desarrolle (Shipley *et al.* 2005).

La reducción del tejido mesofilar por efecto de la sombra fue confirmada aquí a partir del análisis cuantitativo de la anatomía foliar realizado con la información presentada por Guenni *et al.* (2007). En *B. brizantha* y *B. decumbens*, Guenni *et al.* (2007) reportaron una disminución aparente en la proporción de tejido mesofilar por efecto de la sombra (30% RFA), la cual mostró ser más obvia (22-24%) en la porción de la media lámina en comparación con la región de la costilla central. En un estudio de campo con *B. decumbens* (Guenni *et al.*, datos sin publicar), a nivel de la nervadura central, solo fue significativa la reducción en el grosor de la pared celular más la cutícula en ambas epidermis por efecto de la sombra (30% RFA). El incremento del AFE a niveles bajos de RFA ha estado también asociado a disminuciones en el grosor de la pared celular de dicho tejido (Deinum *et al.* 1996, Guenni *et al.* 2007), y en este estudio se confirmaron reducciones importantes de hasta un 60%. Una pared celular más delgada implicaría un costo menor de construcción del área foliar en condiciones de sombra. Aunque esto pudiese a su vez limitar el control de la pérdida de agua de la hoja, la disminución en la densidad estomática con la sombra (Allard *et al.* 1991, Walters 2005) pudiera tener un efecto compensatorio.

Un comportamiento atípico dentro de las especies C_4 estudiadas fue el de *B. dictyoneura*. En términos de la distribución de biomasa en la planta y la anatomía foliar, la plasticidad fenotípica de esta especie ante la sombra parece ser menor (Guenni *et al.* 2007, Guenni *et al.* 2008); con un detrimento significativo en la producción de raíces en relación al vástago (Guenni *et al.* 2008), y un incremento de 63% en el AFE que solo pudiera explicarse por una reducción (37-53%) en el grosor de la pared celular externa más la cutícula en ambas epidermis.

La estructura del mesofilo en las hojas de ambas especies de *Centrosema*, sigue el patrón dorsiventral característico de hojas de otras leguminosas que se orientan horizontalmente (García y Madriz 1999) y, al igual que en *C. angustifolium* y *C. virginianum*, con ausencia de mesofilo paravenal (Lackey 1978).

En las dicotiledóneas, las variaciones en el grosor de la hoja como respuesta adaptativa a la intensidad de radiación solar, están asociadas comúnmente con diferencias en el número de células por unidad de espesor de la hoja (Kephart *et al.* 1992). En concordancia con lo observado en las gramíneas C₄, las hojas de ambas especies de *Centrosema* (C₃) desarrolladas bajo sombra fueron más grandes y delgadas. Esto resultó en un incremento evidente de la superficie asimilatoria por unidad de masa foliar (50-70% incremento del AFE), de manera que su costo de construcción por unidad de área se redujo, compensando por consiguiente la disminución del 70% en la intensidad de radiación a lo largo de los 90 días de rebrote bajo estas condiciones. Al igual que las gramíneas, las dos leguminosas fueron muy eficientes invirtiendo el C fijado en aumento de la superficie foliar por unidad de peso seco, una respuesta bastante común a la sombra y observada en leguminosas tropicales y otras especies (Cooper y Qualls 1967, Boardman 1977, Ludlow y Wilson 1971, Wong *et al.* 1985, Terashima *et al.* 2001, Walters 2005).

Las hojas de sombra en ambas especies de *Centrosema* fueron casi 30% más delgadas que las hojas de sol debido a reducciones proporcionales en: a) el grosor del parénquima esponjoso (*C. macrocarpum*) o, b) reducciones en el grosor tanto de parénquima en empalizada como del parénquima esponjoso (*C. molle*). En *C. macrocarpum*, tal reducción en el parénquima esponjoso al parecer estuvo mayormente asociada a una disminución en la longitud celular, mientras que en *C. molle* fue más común observar una reducción en el número de capas de células parenquimáticas. En ambos casos, las hojas de sombra mostraron una estructura en forma de embudo, contribuyendo así a aumentar la proporción de espacio intercelular. En otras especies esto es considerado como parte del llamado síndrome de evasión a la sombra, el cual se manifiesta en hojas en desarrollo (jóvenes) en la medida que las hojas maduras anteriores se hayan desarrollado previamente en la sombra (Kim *et al.* 2005, Terashima *et al.* 2011). A intensidades lumínicas <35%, las hojas de *Macroptilium atropurpureum* (Siratro), tenían mucho menos células elongadas en el parénquima en empalizada, mientras que el parénquima esponjoso mostró una cantidad menor de células, las cuales a su vez eran más pequeñas y se disponían en un arreglo más laxo, en comparación con 100%

de luz (Ludlow y Wilson 1971). La presencia de parénquima en empalizada en contacto solo con la epidermis adaxial, es indicativo de hojas horizontales recibiendo irradiación solar desde la cara superior de la hoja (Lambers *et al.* 2008). El incremento común observado en el espacio intercelular dentro del mesofilo de hojas de sombra, especialmente en el tejido esponjoso (Ludlow y Wilson 1971, Dengler 1980, Terashima *et al.* 2006), pudiera implicar más luz difusa alcanzando las células orientadas irregularmente localizadas a mayor profundidad dentro de la hoja, y por consiguiente más absorbancia de luz por parte del PS-II (fotosistema-II) localizado en los grana más grandes de los cloroplastos (Terashima y Hikosaka 1995, Evans 1998, Lambers *et al.* 2008, Terashima *et al.* 2011). Esto igualmente se traduciría en un potencial mayor de aclimatación fotosintética en las mismas hojas si se expusieran a cambios de intensidades bajas a altas de luz (Oguchi *et al.* 2005), representando lo último un fenómeno común bajo el dosel arbóreo en sistemas silvopastoriles (Cruz *et al.* 1999; Peri *et al.* 2007).

IMPLICACIONES DEL TIPO DE METABOLISMO FOTOSINTÉTICO EN LA PLASTICIDAD DE LA ANATOMÍA FOLIAR ANTE REDUCCIONES EN LA INTENSIDAD LUMÍNICA

Mientras que desde el punto de vista fisiológico el papel de una estructura se traduce como lo que la misma es capaz de hacer en el metabolismo de un individuo, desde el punto de vista evolutivo su significancia funcional se relaciona con su contribución potencial a la adaptación de una especie en un ambiente determinado (Press 1999). En este sentido, el engranaje entre la estructura y función de la hoja puede estudiarse a varios niveles o escalas de organización como lo son el morfológico, el anatómico y el ultraestructural; éstos dos últimos influenciando directamente la funcionabilidad del proceso fotosintético.

Los diferentes metabolismos fotosintéticos como C_3 y C_4 son por lo tanto, sistemas apropiados para el estudio de la relación estructura-función. Aunque en este trabajo el número de especies utilizadas pudiera ser insuficiente para establecer generalizaciones (tres especies de monocotiledóneas C_4 y dos dicotiledóneas C_3), el hecho de que ambos grupos funcionales produjeran la misma respuesta morfológica ante disminuciones en la intensidad lumínica (es decir, un incremento sustancial en el AFE), implicaría que se ha utilizado una solución común a la misma restricción ambiental. Kephart *et al.* (1992) observaron que este mismo tipo de aclimatación morfológica estuvo presente y con relativa similitud en la intensidad de respuesta ante la sombra, en todas las especies perennes de gramíneas C_3 y C_4 estudiadas, por lo que postulan que

los mecanismos de aclimatación que afectan tanto la intercepción de luz como la forma de la hoja son similares en ambos grupos funcionales.

En contraste, las respuestas ante la sombra relacionadas con la actividad fotosintética, como la tasa diaria de intercambio gaseoso y las tasas de crecimiento y acumulación de biomasa, contrastan mucho más entre plantas C_3 y C_4 , a razón de las diferencias intrínsecas en la eficiencia de concentración y difusión de CO_2 dentro del mesofilo (conductancia mesofilar) y las asociadas con la anatomía foliar (Lambers *et al.* 2008). La ventaja de la vía C_4 como una bomba efectiva de inyección de CO_2 hacia el interior de la hoja, radica en la separación física de las dos etapas de carboxilación entre las células del mesofilo y las de la vaina vascular (Dengler *et al.* 1994, Press 1999). La localización precisa del sitio de descarboxilación, su distancia de la interfase con el mesofilo, y la distribución de los cloroplastos y las mitocondrias en las células de la vaina vascular son tan importantes en la eficiencia del proceso como el grosor de la pared en estas células, para así impedir la dilución apoplástica de CO_2 hacia el mesofilo (von Caemmerer y Furbank 2003). Adicionalmente, tanto el tejido mesofilar como el de la vaina vascular en las especies C_4 tienen menos área superficial expuesta a espacios aéreos intercelulares y un cociente superficie/volumen menor que en las especies C_3 (Dengler *et al.* 1994). Igualmente, el volumen de tejido mesofilar por haz vascular en las C_4 es menor que el equivalente en las C_3 ; y la relación tejido mesofilar/tejido de la vaina vascular es consistentemente menor en las plantas C_4 . Estos y otros caracteres anatómicos implican una proximidad mayor entre el tejido mesofilar y el de la vaina vascular, facilitando así el intercambio de metabolitos entre los dos tejidos (Dengler *et al.* 1994). La pérdida de funcionalidad entre el tejido mesofilar y el de la vaina vascular pudiese interferir entonces en la coordinación entre los ciclos C_4 y C_3 que se dan respectivamente en dichos tejidos; así como también incrementar la pérdida de CO_2 desde la vaina vascular y disminuir así la actividad enzimática (Sage y McKown 2006). Aun así, las gramíneas C_4 poseen un potencial de aclimatación a la sombra y otros estreses ambientales bien significativo. Tal es el caso de especies como *Panicum maximum* (Baruch y Fisher 1991, Humphreys 1994), la cual puede comportarse como una planta de sombra. Igualmente, la especie *B. decumbens* puede mantener su rendimiento cuántico cuando crece en condiciones de radiación solar baja (Gómez *et al.* 2013). Sin embargo, la mayor restricción en la distribución ecológica de las plantas C_4 en relación con las C_3 , pudiera en parte ser explicado por una plasticidad fenotípica más limitada en las primeras (Sage y McKown 2006).

Dado que la eficiencia del metabolismo C_4 depende grandemente de la integridad estructural de los tejidos involucrados, los resultados de este estudio parecen confirmar el hecho de que en plantas con esta ruta metabólica; existe un nivel de plasticidad anatómica y/o funcional en la fotosíntesis mucho menor como respuesta ante factores estresantes asociados a una reducción en la radiación disponible (Sage y McKown 2006).

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista de la morfo-anatomía foliar, las especies de *Brachiaria* y *Centrosema* estudiadas se comportan típicamente como “plantas de sol”. Sin embargo, el potencial de aclimatación de la fotosíntesis a la sombra, medido por la variación en la estructura de la superficie asimilatoria, varió más entre especies que entre grupos metabólicos (C_3 y C_4). Esto es aparentemente consecuencia de una variación interespecífica marcada aún dentro de cada grupo metabólico (particularmente en las C_4). Para confirmar esto, es necesario incluir un número mayor de especies que provengan de hábitats (regímenes lumínicos) más diversos.

Entre los caracteres medidos para estimar el grado de aclimatación a la sombra, el área foliar específica sigue siendo altamente “plástico”, es decir, responde significativamente a cambios en la intensidad lumínica, por lo que se recomienda como criterio importante en la selección de especies para ambientes sombreados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff, M.D., P.J. Magalhaes and S.J. Ram. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophoto. Int.* 11(7): 36-42.
- Albes de Brito, C.J. and R.A. Rodella. 2002. Caracterização morfo-anatomica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). *Rev. Bras. Bot.* 25: 221-228.
- Albrizio, R. and P. Studeto. 2005. Resource use efficiency of field-grown sunflower, sorghum, wheat and chickpea. I. Radiation use efficiency. *Agric. For. Meteorol.* 130: 254-268.
- Allard, G., C.J. Nelson and C.G. Pallardy. 1991. Shade effects on growth of tall fescue: I. Leaf anatomy and dry matter partitioning. *Crop Sci.* 31: 163-167.
- Athanasίου, K., B.C. Dyson, R.E. Webster and G.N. Johnson. 2010. Dynamics acclimation of photosynthesis increases plant fitness in changing

- environments. *Plant Physiol.* 152: 366-373.
- Baruch, Z. y M.J. Fisher 1991. Factores climáticos y de competencia que afectan el desarrollo de la planta en el establecimiento de una pastura. *In: C. Lascano and J. Spain (Eds.). Establecimiento y Renovación de Pasturas.* 103-142. CIAT, Cali, Colombia. 426 p.
- Baruch, Z. and O. Guenni. 2007. Irradiance and defoliation effects in three species of the forage grass *Brachiaria*. *Trop. Grasslands* 41: 269-276.
- Björkman, O. 1973. Comparative studies of photosynthesis in higher plants. *Photophysiol.* 8: 1-63.
- Björkman, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. *In: Lange, O.L., P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler (Eds.). Physiological plant ecology. I. Physical environment.* 57-107. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 630 p.
- Boardman, N.K. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 355-377.
- Chapin III, F.S., P.A. Matson and H.A. Mooney. 2002. Carbon input to terrestrial ecosystems. *In: Chaplin III, F.S., P.A. Matson and H.A. Mooney (Eds.). Principles of terrestrial ecosystem ecology.* 97-122. Springer-Verlag, New York, USA. 392 p.
- Charles-Edwards, D.A., J. Charles-Edwards and F.L. Sant. 1974. Leaf photosynthesis activities in six grass varieties grown under contrasting light and temperature environments. *J. Exp. Bot.* 25, 715-724.
- Cook, B.G., B.C. Pengelly, S.D. Brown, J.L. Donnelly, D.A. Eagles, M.A. Franco, J. Hanson, B.F. Mullen, I.J. Partridge, M. Peters and R. Schultze-Kraft. 2005. Tropical forages: an interactive selection tool. CSIRO, DPI&F (Qld), CIAT, ILRI. Brisbane, Australia (<http://www.tropicalforages.info>)
- Cooper, C.S., and M. Qualls. 1967. Morphology and chlorophyll content of shade and sun leaves of two legumes. *Crop Sci.* 7: 672-673.
- Cruz, P., J. Sierra, J.R. Wilson, M.A. Dulorme and R. Tournebize. 1999. Effects of shade on the growth and mineral nutrition of tropical grasses in silvopastoral systems. *Ann. Arid Zone.* 38: 335-361.
- De Castro, C.R., R. García, M.M. Carvalho and L. Couto. 1999. Produção forrageira de gramíneas cultivadas sob luminosidade reduzida. *Rev.*

- Bras. Zootecn. 28: 919-927.
- Deinum, B., R.D. Sulastri, M.H. Zeinab and A. Maassen. 1996. Effects of light intensity on growth, anatomy and forage quality of two tropical grasses (*Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum* var. *trichoglume*). Neth. J. Agric. Sci. 44: 111- 124.
- Dengler N.G., R.E. Dengler, P.M. Donnelly and P.W. Hattersley. 1994. Quantitative leaf anatomy of C₃ and C₄ grasses (Poaceae): Bundle sheath and mesophyll surface area relationships. Ann. Bot. 73: 241-255.
- Dengler, N.G. 1980. Comparative histological basis of sun and shade leaf dimorphism in *Helianthus annuus*. Can. J. Bot. 58: 717-730.
- Evans, J.R. 1998. Photosynthetic characteristics of fast and slow-growing species. In: Lambers, H., H. Poorter and M.M. Van Vuren (Eds.). Inherent variation in plant growth. 101-119. Backhuys Publishers, Leiden. 600 p.
- García, M. y P. Madriz. 1999. Anatomía foliar comparada de cinco genotipos de frijol mungo, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 16: 610-620.
- Givnish, T.J. 1988. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. Aust. J. Plant Physiol. 15: 63-92.
- Gómez, S., O. Guenni and L. Bravo de Guenni. 2013. Field growth, nutrient uptake, photosynthesis and light use efficiency under differing irradiance and soil N supplies in the forage grass *Brachiaria decumbens* Stapf. Grass Forage Sci. 68: 395-407.
- Guenni, O., S. Seiter and R. Figueroa. 2008. Growth responses of three *Brachiaria* species to light intensity and nitrogen supply. Trop. Grasslands 42: 75-87.
- Guenni, O., F. Camacho y S. Seiter. 2007. Efectos de la intensidad lumínica sobre la anatomía foliar de tres especies del género *Brachiaria* y su relación con la calidad del forraje. An. Bot. Agr. 14: 6-15.
- Hernández, M. y O. Guenni. 2008. Producción de biomasa y calidad nutricional del estrato graminoide en un sistema silvopastoril dominado por samán (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) Zootecnia Trop. 26: 439-453.
- Hikosaka, K. and I. Terashima. 1995. A model of the acclimation of photosynthesis in leaves of C₃ plants to sun and shade with respect to nitrogen use. Pl. Cell Environ. 18: 605-618.

- Humphreys, L.R. 1994. Tropical pastures: their role in sustainable agriculture. Longman Scientific and Technical/John Wiley and Sons, Inc., New York, USA. 414 p.
- Johansen, D. 1940. Plant microtechnique. Mc Graw Hill Book Company. New York, USA. 523 p.
- Kephart, K.D., D.R. Buxton and S.E. Taylor. 1992. Growth of C₃ and C₄ perennial grasses under reduced irradiance. *Crop Sci.* 32: 1033-1038.
- Kim, G.T., S. Yano, T. Kosuka and H. Tsukaya. 2005. Photomorphogenesis of leaves: shade-avoidance and differentiation of sun and shade leaves. *Photochem. Photobio. S.4*: 770-774.
- Lackey, J.A. 1978. Leaflet anatomy of Phaseoleae (Leguminosae: Papilionoideae) and its relation to taxonomy. *Bot. Gaz.* 139: 436-446.
- Lafarge, T., C. Seassau, M. Martin, C. Bueno, A.C. Vidal, E. Schreck and D. Luquet. 2010. Regulation and recovery of sink strength in rice plants grown under changes in light intensity. *Funct. Plant Biol.* 37: 413-428.
- Lambers, H., F.S. Chapin III and T.L. Pons, T.L. 2008. Plant physiological ecology. 2nd ed., Springer, New York, USA. 605 p.
- Ludlow, M.M. and G.L. Wilson. 1971. Photosynthesis of tropical pasture plants. II. Temperature and illuminance history. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 1065-1075.
- Norton, B.W., J.R. Wilson, H.M. Shelton and K.D. Hill. 1991. The effect of shade on forage quality. *In*: Shelton, H.M. and W.W. Stür (Eds.). Forages for plantations crops. 83-88. ACIAR Proceedings N° 32, Canberra, Australia. 168 p.
- Oguchi R., K. Hikosaka and T. Hirose. 2003. Does the photosynthetic light-acclimation needs change in leaf anatomy?. *Pl. Cell Environ.* 26: 505-512.
- Oguchi, R., K. Hikosaka and T. Hirose. 2005. Leaf anatomy as a constraint for photosynthesis acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. *Pl. Cell Environ.* 28: 916-927.
- Oguchi, R., K. Hikosaka and T. Hirose. 2008. Costs and benefits of photosynthetic light acclimation by tree seedlings in response to gap formation. *Oecologia* 155: 665-675.

- Paciullo, D.S., C.A. de Carvalho, L.J. Aroeira, M.J. Morenz, F.C. Lopez e R.O. Rossiello. 2007. Morfofisiologia e valor nutritive do campim-braquiária sob sombreamiento natural e a sol pleno. *Pesqui. Agropec. Bras. (Brasília)* 42: 573-579.
- Pearcy, R.W. 2007. Responses of plants to heterogeneous light environments. *In: F.I. Pugnaire and F. Valladares (Eds.). Functional Plant Ecology.* 213-257. CRC Press, Boca Raton, USA. 744 p.
- Pearcy, R.W. and D.A. Sims. 1994. Photosynthetic acclimation to changing light environments: scaling from the leaf to the whole plant. *In: Caldwell, M.M. and R.W. Pearcy (Eds.). Exploitation of environmental heterogeneity by plants: ecophysiological process above and belowground.* 145-174. Academic Press, New York, USA. 448 p.
- Pereira Nicolau, B.A., T.M. Alvarenga, F. Fonseca e Silva e F.J. Soares Júnior. 2010. Morfoanatomia foliar de *Brachiaria decumbens* Stapft, coletada na zona rural de Lavras, estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Cient. UDO Agrícola* 10: 1-6.
- Peri, P.L., D.J. Moot, P. Jarvis, D.L. McNeil and R.J. Lucas. 2007. Morphological, anatomical and physiological changes of orchardgrass leaves grown under fluctuating light regimes. *Agron. J.* 99: 1502-1513.
- Press, M.C. 1999. The functional significance of leaf structure: a search for generalizations. *New Phytol.* 143: 213-219.
- Renvoize, S.A., W.D. Clayton and C.H.S. Cabuye. 1998. Morfología, taxonomía y distribución natural de *Brachiaria* (Trin.) Griseb. *In: Miles J.W., B.L. Maass y C.B. Do Valle (Eds.). Brachiaria: biología, agronomía y mejoramiento.* 1-17. CIAT/EMBRAPA/CNPQC, Cali, Colombia. 312 p.
- Sage, R.F. and A.D. McKown. 2006. Is C₄ photosynthesis less phenotypically plastic than C₃ photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 57: 303-317.
- SAS Institute. 2004. SAS/STATTM 9.1. User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 5136 p.
- Shipley, B., D. Vile, E. Garnier, I.J. Wright and H. Poorter. 2005. Functional linkages between leaf traits and net photosynthetic rate: reconciling empirical and mechanistic models. *Funct. Ecol.* 19: 602-615.

- Sultan, S.E. 2003. Phenotypic plasticity in plants: a case of study in ecological development. *Evol. Dev.* 5: 25-33.
- Tardieu, F., C. Granier and B. Muller. 1999. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *New Phytol.* 143: 33-43.
- Terashima, I., Y.T. Hanba, Y. Tazoe, P. Vyas and S. Yano. 2006. Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* 57: 343-354.
- Terashima, I., Y.T. Hanba, D. Tholen and U. Niinemets. 2011. Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. *Plant Physiol.* 155: 108-116.
- Terashima, I. and K. Hikosaka. 1995. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Pl. Cell Environ.* 18: 1111-1128.
- Terashima, I., S.I. Miyazawa and Y.T. Hanba. 2001. Why are sun leaves thicker than shade leaves? Considerations based on analyses of CO₂ diffusion in the leaf. *J. Plant Res.* 114: 93-105.
- Von Caemmerer, S. and R.T. Furbank. 2003. The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. *Photosynth. Res.* 77: 191-207.
- Walters, R.G. 2005. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J. Exp. Bot.* 56: 435-447.
- Walter, R.G. and P. Horton. 1995a. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environments-changes in photosynthetic function. *Planta* 197: 306-312.
- Walter, R.G. and P. Horton. 1995b. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environments-regulation of chloroplast composition. *Planta* 197: 475-481.
- Ward, D.A. and A.F. Woolhouse. 1986. Comparative effects of light during growth on the photosynthetic properties of NADP-ME type C₄ grasses from open and shaded habitats. I. Gas exchange, leaf anatomy and ultrastructure. *Pl. Cell Environ.* 9: 261-270.
- Wilson, J.R. and M.M. Ludlow. 1991. The environment and potential growth of herbage under

plantations. *In*: Shelton, H.M. and W.W. Stür (Eds.), Forages for Plantation Crops. 10-24. ACIAR Proceedings 32, Canberra, Australia. 168 p.

Wilson, P.J., K. Thompson and J.G. Hodgson. 1999. Specific leaf area and dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytol.* 143, 155-162.

Wong, C.C., M.A. Sharudim and H. Rahim. 1985. Shade tolerance potential of some tropical forages for integration with plantations. 2. Legumes. *MARDI Res. Bull.* 13: 249-269.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall International. New Jersey, USA. 718 p.