

ANÁLISIS FENOTÍPICO DE GENOTIPOS DE SORGO CONTRASTANTES EN CARACTERES FOTOSINTÉTICOS

Rosas, M.B.; Maguire, V.; Ortiz, D.

EEA Inta Manfredi, Ruta 9 km 636, Córdoba, Argentina. correo electrónico: rosas.belen@inta.gob.ar

PHENOTYPE ANALYSIS OF SORGHUM GENOTYPES CONTRASTING IN PHOTOSYNTHETIC TRAITS

Abstract

Climate change represents one of the greatest environmental challenges of the 21st century, deeply affecting natural ecosystems and agriculture globally. C4 crops are becoming vital for food and bioenergy supply, predominating in warm and dry environments, showing not only higher intrinsic water use efficiency (WUEi) but also higher transpiration efficiency than C3 plants. The physiological advantages that C4 plants possess make them relevant in climate change contexts. Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is one of the most important crops in the arid and semi-arid regions of the world, offering great opportunities to study anatomical and morphological adaptations to these types of climates and improve WUEi in C4 crops. The associations between parameters and the principal component analysis allowed us to distinguish the interrelationships between variables associated with the differences between contrasting groups. Among them, the strong association between stomata density and photosynthetic parameters stands out, which highlights the usefulness of stomatic variables as an indirect method of selection. Another strong association was found between leaf width (LW) and photosynthetic parameters, which defines it as an important trait to use as a selection method for breeding programs. Further studies are needed to understand how leaf anatomy influences the WUEi of C4 crops, and how LW modifies it. This would enable LW to be a substitute for WUEi in C4 crop breeding programs, since both LW and stomatal traits are highly heritable in sorghum crops.

Palabras Clave – Keywords: sorgo-análisis fenotípico-genotipos contrastantes-EUAI/sorghum-phenotype analysis-contrasting genotypes-WUEi

Introducción

El cambio climático global plantea desafíos a la producción agrícola, con eventos de altas temperaturas y sequía cada vez más comunes (IPCC, 2022). En este contexto, los cultivos C4 como el sorgo presentan una mayor productividad y eficiencia intrínseca del uso del agua (EUAI), que se refiere a la relación entre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A) y la conductancia estomática (gs), que en los cultivos C3 (Leakey et al., 2019). A su vez, la tasa de asimilación neta de carbono es la base fundamental de la productividad de los cultivos, aunque es un rasgo complejo para ser caracterizado en grandes cantidades de líneas, al igual que la EUAI. Los estomas ejercen influencia sobre la productividad de los cultivos a través de la fotosíntesis y el uso del agua, que son reguladas por la conductancia estomática (Franks & Beerling, 2009). La baja conductancia estomática puede restringir la absorción de CO₂ al limitar su

entrada y, por lo tanto, la tasa de asimilación de CO₂, mientras que una gs alta facilita altas tasas de A. Este equilibrio se caracteriza por la EUAi. Existe evidencia de que los estomas más grandes generalmente son menos eficientes en el intercambio de gases en comparación con los más pequeños, debido a la mayor profundidad de los poros (Faralli et al., 2019). Además, los estomas más grandes tardan más tiempo en cerrarse, lo que lleva a una pérdida adicional de agua, que aumenta la cantidad de agua gastada por unidad de biomasa producida (Faralli et al., 2019). Una combinación de estomas más pequeños con alta densidad se traduce en mayores gs y productividad en condiciones no restringidas (Franks & Beerling, 2009), mientras que un número y área optimizados sería beneficioso en condiciones limitadas por agua (Lawson & Blatt, 2014; Leakey et al., 2019).

El sorgo es el quinto cultivo alimenticio más importante del mundo y uno de los cereales más tolerantes a la sequía y eficientes en el uso del agua (Kidambi et al., 1990; Peng & Krieg, 1992). Este cultivo ofrece grandes oportunidades para estudiar las adaptaciones anatómicas y morfológicas en climas secos y mejorar la EUAi en cultivos C4.

En este estudio el objetivo es entender la influencia de la morfología de la hoja sobre la EUAi en sorgo.

Materiales y Métodos

Para el ensayo se utilizaron diez genotipos de sorgo contrastantes en caracteres fotosintéticos, seleccionados a partir de tres ensayos anteriores. Para esto se utilizó un índice de selección, teniendo en cuenta las variables de fluorescencia de la clorofila y contenido de clorofila en hoja. Se determinaron de esta manera dos grupos de cinco genotipos cada uno, denominados "ALTO" y "BAJO". El ensayo se llevó a cabo en la EEA de INTA Manfredi (31° 49' S, 63° 46' O), durante la campaña 2021/2022. Los genotipos se sembraron a campo el 18/11/2021 con sembradora de tipo directa. El ensayo se mantuvo libre de malezas, plagas y enfermedades. Se efectuaron riegos periódicos (20 mm en total), a través de un riego por goteo, para asegurar óptimas condiciones hídricas. El diseño fue en bloques completamente aleatorizados (DBCA), con tres repeticiones. Cada parcela contó con 4 surcos de 5 m. de largo y a una distancia de 0.70 m. Se evaluaron plantas en etapas vegetativas desde emergencia hasta panoja embuchada. Se tomaron sobre el surco central dos plantas por parcela seleccionadas para las siguientes mediciones: Altura de planta (ALT, cm), contenido de clorofila en hoja (SPAD), número final de hojas (NH), tasa de aparición de hojas (TAH, hoja.TT⁻¹). Se tomaron mediciones de morfología de hoja: área total de hoja (ATH, cm²); largo de hoja (LH, cm), ancho de hoja (AH, cm). Utilizando la misma hoja se calcularon caracteres estomáticos como ancho de estoma (AE, μm), largo de estoma (LE, μm), tamaño de estoma (TE, μm²). Por último, se calcularon las densidades estomáticas como el número de estomas por el área de la superficie adaxial (DE_Ab, mm²) y adaxial (DE_Ad, mm²) de la hoja. La densidad estomática total de la hoja (DET, mm²) fue la suma de las densidades estomáticas adaxiales y abaxiales. Esta misma hoja se la llevo a estufa a 60 °C durante 48 horas y

se calculó el área foliar específica (AFE, cm². g), como la relación entre el área de hoja y su peso seco (PSH, g). Además de estas variables, se registraron con un analizador de gas LI-COR 6400 XT parámetros de intercambio de gases y fluorescencia de clorofila: tasa de asimilación de carbono de hoja (A, μmol CO₂ m⁻²s⁻¹), conductancia estomática (gs, mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiración (T, mmol H₂O m⁻²s⁻¹), se registró también la relación de A y T como relación de transpiración (A/T, μmol mmol⁻¹). Se determinó la eficiencia intrínseca de uso de agua (EUA_i), como la relación de A y gs. Los parámetros de fluorescencia incluyeron: rendimiento cuántico efectivo del PSII (ΦPSII), eficiencia de la energía capturada por los centros de reacción abiertos de PSII (Fv'/Fm'), y la fracción de los centros de reacción del PSII que están abiertos (qP).

Se realizaron dos cortes de biomasa de 0.50 m² sobre los surcos centrales. Se tomó peso fresco total, a las hojas se les calculó área foliar, y luego, todo fue a estufa a 60°C por 48 hs. para calcular el peso seco. Con estas mediciones se calculó la tasa de asimilación neta (TAN, g.m⁻². día⁻¹), una medida de la actividad fotosintética del cultivo integrada durante el período en cuestión, mediante la siguiente relación:

$$TAN = \left(\frac{PS_2 - PS_1}{AF_2 - AF_1} \right) \left(\frac{\log AF_2 - \log AF_1}{t_2 - t_1} \right)$$

Donde PS_2 y PS_1 son peso seco, AF_2 y AF_1 son el área foliar, log es el logaritmo natural del área foliar y t_2 y t_1 son tiempo (2 y 1, valor final-semana 7 de muestreo- e inicial-semana 4 de muestreo- en todos los casos). Se realizaron muestreos de agua al inicio y al final del ensayo a través de gravimetría para determinar el consumo de agua. Se realizó el cálculo de consumo de agua (CA) como la diferencia de disponibilidad de agua al inicio y final del ensayo, sumando las precipitaciones y riegos.

$$CA = (\blacktriangle LAD) + LI + R$$

Donde $\blacktriangle LAD$ es la diferencia de lámina de agua disponible al final e inicio, LI es el agua de lluvia y R es el agua de riego. Por último, se estimó la eficiencia de uso del agua (EUA) como la biomasa final dividida por el consumo de agua.

Los datos se analizaron a través del software R. Para el análisis univariado, se estimaron las estadísticas descriptivas para cada variable a partir de ANOVA y se determinaron los coeficientes de correlación de Spearman entre ellas. Además, se utilizó un modelo lineal para analizar las diferencias entre genotipos y entre grupos "ALTO" y "BAJO" para las distintas variables, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + Gr_i + G_{(i)j} + B_k + \varepsilon_l$$

Donde Y es la variable respuesta, μ es la media general, Gr es el grupo, G es el genotipo anidado a grupo, B es el bloque (repetición) y ε es el error.

Resultados

En este estudio, los genotipos presentaron una variación significativa ($p < 0.05$) para ALT, SPAD, A, Fv'/Fm', AE, TE, AFE, AH, gs, φPSII, DE_Ad y DET (Tabla 1). A su vez, los grupos contrastantes tuvieron diferencias significativas en ALT, SPAD, AH, PSH, ATH, A, gs, T y Fv'/Fm'. El grupo ALTO presentó valores mayores a los del BAJO para las tres variables de intercambio gaseoso (A, gs, T). Estas diferencias se observaron también

en uno de los parámetros de fluorescencia de clorofila (Fv'/Fm'). La mayoría de las variables de morfología de hoja presentaron valores superiores en el grupo ALTO, mientras que AFE fue menor en este grupo. SPAD fue un 7% superior en el grupo ALTO. Finalmente, las variables de caracteres estomáticos mostraron que el grupo ALTO presentó una mayor densidad y tamaño de estomas comparado con el BAJO.

La DE fue significativamente mayor, entre un 19 y 39% en la superficie abaxial que, en la adaxial, en todos los genotipos, siendo en promedio un 23% mayor esta diferencia en el grupo ALTO.

La mayoría de las variables en este estudio se correlacionaron significativamente con al menos otra variable (Figura 1). Las variables de morfología de hoja se correlacionaron entre sí al igual que los caracteres estomáticos.

Se detectaron asociaciones positivas entre A y gs ($R^2=0.88$), observando que genotipos con mayor gs alcanzaron mayores tasas de A. La EUAi se relacionó de manera negativa con gs ($R^2=0.82$), al igual que con A ($R^2=0.54$), pero esta última fue más débil, lo que sugiere que la EUAi se asoció principalmente con cambios en gs en lugar de A.

Existió una correlación importante entre A y Fv'/Fm' ($r=0.84$), lo que podría permitir el uso de esta última variable para determinar de manera indirecta la tasa fotosintética.

Tanto los parámetros de intercambio gaseoso como los de fluorescencia se correlacionaron con la gran mayoría de los caracteres estomáticos. Por otro lado, la ALT se correlacionó de manera negativa con SPAD ($r=-0.47$). En tanto que SPAD solo se correlacionó con una de las variables estomáticas (DE_Ab), y con todas las variables de morfología de hoja de manera positiva. La variable CA se correlacionó con SPAD ($r=0.61$), LE ($r=0.77$) y TE ($r=0.67$), y además con todas las variables de morfología de hoja. Tanto la variable TAN como la EUA se correlacionaron entre sí ($r=0.87$), y a su vez con LE y TE, y con todas las variables de morfología de hoja.

Tabla 1: Medidas resumen de todas las variables para todos los genotipos

VARIABLE	GENOTIPOS										GRUPO		p-value		CV (%)
	13_29	26_25	27_30	25_27	3_28	7_24	6_33	12_21	28_25	20_30	ALTO	BAJO	Genotipo	Grupo	
ALT (cm)	35.83 ^c	33.83 ^c	49 ^{abc}	32.66 ^c	37.66 ^{bc}	34.33 ^c	44.66 ^{abc}	66.5 ^a	61.16 ^{ab}	40 ^{bc}	37.8	49.3	***	***	14.2
SPAD	46.65 ^a	45.91 ^a	44.7 ^a	46.55 ^a	46.1 ^a	44.14 ^{ab}	46.80 ^a	38.92 ^b	42.39 ^{ab}	41.95 ^{ab}	46.0	42.8	**	***	3.3
AFE (cm ²)	205.57 ^b	216.39 ^{ab}	212.80 ^{ab}	210.33 ^b	214.49 ^{ab}	196.28 ^b	219.78 ^{ab}	260.87 ^a	217.94 ^{ab}	220.99 ^{ab}	211.9	223.2	*	ns	5.9
LH (cm)	58.22	55.81	58.07	57.42	54.66	54.36	53.38	55.54	55.29	52.00	56.8	54.1	ns	ns	9.7
AH (cm)	7.61 ^a	8.03 ^a	7.78 ^a	6.97 ^{ab}	7.48 ^a	7.65 ^a	6.41 ^{ab}	6.43 ^{ab}	6.55 ^{ab}	5.34 ^b	7.6	6.5	*	***	7.1
PSH (g)	1.57	1.57	1.69	1.39	1.39	1.58	1.18	1.00	1.33	1.01	1.5	1.2	ns	*	17.8
NH	14.67	14.67	14.33	12.67	14.33	14.67	13.33	14.00	13.33	13.67	14.1	13.8	ns	ns	5.5
ATH (cm2)	322.52	333.75	357.13	292.45	297.37	310.69	259.21	259.59	281.78	223.75	320.6	267.0	ns	*	13.9
TAH (hoja.día-1)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.020	0.019	ns	ns	9.6
A (µmol CO2 m-2s-1)	57.66 ^{ab}	70.57 ^a	59.78 ^{ab}	53.28 ^b	59.24 ^{ab}	53.44 ^b	56.51 ^{ab}	54.82 ^b	51.63 ^b	45.95 ^b	60.1	52.5	**	***	6.5
gs (mol H2O m-2 s-1)	0.34 ^b	0.52 ^a	0.38 ^{ab}	0.33 ^b	0.38 ^{ab}	0.30 ^b	0.34 ^b	0.35 ^{ab}	0.32 ^b	0.28 ^b	0.39	0.32	*	**	12.9
T (mmol H2O m-2s-1)	9.72	12.22	10.59	9.50	10.82	9.37	9.89	9.90	9.38	8.73	10.6	9.5	ns	**	8.5
A/T (µmol mmol-1)	5.93	5.80	5.65	5.61	5.48	5.74	5.73	5.65	5.54	5.33	5.7	5.6	ns	ns	3.9
Fv'/Fm'	0.42 ^a	0.45 ^a	0.44 ^a	0.42 ^a	0.42 ^a	0.43 ^a	0.40 ^{ab}	0.42 ^a	0.42 ^a	0.36 ^b	0.43	0.40	**	**	3.5
φPSII	0.25 ^{ab}	0.29 ^a	0.25 ^{ab}	0.23 ^b	0.25 ^{ab}	0.23 ^{ab}	0.23 ^{ab}	0.26 ^{ab}	0.24 ^{ab}	0.22 ^b	0.25	0.24	*	ns	6.6
qP	0.59	0.64	0.57	0.54	0.61	0.55	0.58	0.62	0.60	0.61	0.59	0.59	ns	ns	5.2
EUAi (µmol mol-1)	169.94	136.00	160.14	164.26	154.99	177.75	165.56	160.62	164.38	164.39	157.1	166.5	ns	ns	6.8
CA (mm)	201.20	179.89	191.15	198.22	194.03	154.47	209.50	202.83	186.83	184.56	192.9	187.6	ns	ns	8.3
DE_Ad (mm)	72.48 ^{ab}	82.67 ^{ab}	109.52 ^a	82.82 ^{ab}	64.89 ^b	75.33 ^{ab}	102.43 ^{ab}	87.51 ^{ab}	78.13 ^{ab}	82.56 ^{ab}	82.5	85.2	*	ns	12.2
DE_Ab (mm)	107.39	113.50	143.92	113.53	107.14	104.99	127.67	122.16	99.76	102.23	117.1	111.4	ns	ns	12.9
DET (mm)	179.87	196.17	253.44	196.36	172.02	180.32	230.11	209.67	177.88	184.79	199.6	196.6	*	ns	11.2
LE (µm)	439.21	380.80	387.73	372.68	366.25	425.24	401.58	338.75	392.18	387.50	389.33	389.05	ns	ns	7.4
AE_Ad (µm)	221.02 ^a	188.05 ^{ab}	193.83 ^{ab}	194.01 ^{ab}	210.41 ^{ab}	234.88 ^a	190.79 ^{ab}	167.52 ^b	198.42 ^{ab}	201.23 ^{ab}	201.5	198.6	**	ns	6.0
NE_Ad	12.33 ^{ab}	14 ^{ab}	18.67 ^a	14 ^{ab}	11 ^b	13 ^{ab}	17.67 ^{ab}	15 ^{ab}	13.33 ^{ab}	14 ^{ab}	14.0	14.6	**	ns	12.1
NE_Ab	18.33	19.33	24.67	19.33	18.33	18.00	21.67	20.67	17.00	17.33	20	19	ns	ns	12.8
TE (µm2)	97825.3 ^a	71538.2 ^{ab}	75488.8 ^{ab}	72331.3 ^{ab}	77318.1 ^{ab}	99880.9 ^a	76604.6 ^{ab}	56559.7 ^b	77662.6 ^{ab}	77737.7 ^{ab}	78900.3	77689.1	**	ns	10.8
TAN (g.m-2. día-1)			3.732	3.54661	3.30281		3.42521	3.33158	3.54283	3.8885	3.52138	3.547028	ns	ns	21.1
EUA (g.m2/mm)			3.94	3.13	4.02		3.34	3.46	4.33	3.14	3.69	3.57	ns	ns	19

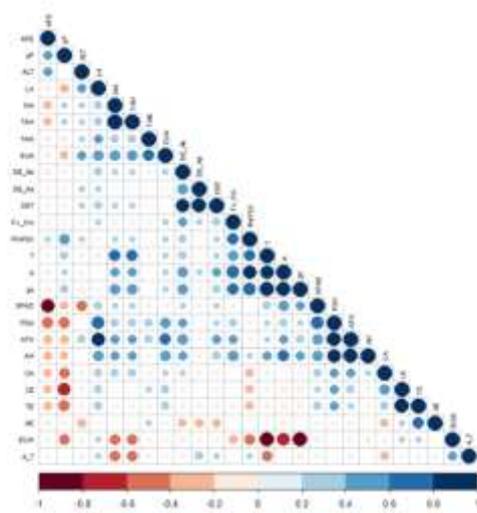


Figura 1: Coeficientes de correlación de Spearman (nivel de significancia $p < 0.05$) para las variables ALT: altura; SPAD: contenido de clorofila en hoja; LE: largo de estoma; AE: ancho de estoma; TE: tamaño de estoma; DE_Ad: densidad estomática adaxial; DE_Ab: densidad estomática abaxial; DET: densidad estomática total; ATH: área total de hoja; LH: largo de hoja; AH: ancho de hoja; PSH: peso seco de hoja; AFE: área foliar específica; TAH: tasa de aparición de hoja; NH: número de hoja; A: tasa de asimilación de carbono de hoja; gs: conductancia estomática; T: transpiración; A/T: tasa de transpiración; ϕ PSII: rendimiento cuántico efectivo del PSII; F_v'/F_m' : eficiencia de la energía capturada por los centros de reacción abiertos de PSII; qP: fracción de los centros de reacción del PSII que están abiertos; EUAi: eficiencia de uso de agua intrínseca; TAN: tasa de asimilación neta; CA: consumo de agua; EUA: eficiencia de uso de agua.

Discusión

En este estudio, donde se utilizaron genotipos contrastantes, hubo una variación fenotípica significativa para gran parte de los caracteres medidos (ALT, SPAD, AFE, AH, A, gs, F_v'/F_m' , ϕ PSII, DE_Ad, DET, AE y TE).

Los grupos estudiados también presentaron diferencias en caracteres de morfología de hojas y estomas. Los genotipos del grupo ALTO tuvieron los mayores valores de caracteres estomáticos como DE_Ab, DET, AE y TE, en coincidencia con lo reportado en otros autores (Ferguson et al., 2021). Por otro lado, el grupo ALTO presentó mayores valores de AH, en coincidencia con lo reportado por Pan et al (2022), quienes identificaron que genotipos con valores altos de gs poseen hojas más anchas.

Los valores observados para F_v'/F_m' , qP y ϕ PSII en este trabajo fueron similares a los valores previamente reportados de F_v'/F_m' (~ 0.45), qP (~ 0.60) y ϕ PSII (~ 0.30) para algunas líneas de sorgo (Cousins et al., 2002; Salas Fernandez et al., 2015). La alta correlación entre A y la fluorescencia de clorofila (F_v'/F_m' , qP y ϕ PSII) es esperable, ya que los parámetros de fluorescencia investigados proporcionan información específica sobre el rendimiento y la eficiencia del PSII (Baker, 2008). Estas mismas correlaciones también fueron reportadas por otros autores (Ortiz et al., 2017; Salas Fernandez et al., 2015).

Se detectó una variación de DE mayor en la superficie abaxial que la adaxial, y esto coincide con trabajos realizados en varios cultivos (Bertolino et al., 2019; Liang et al., 1975). Varios estudios han reportado una relación positiva entre DE y gs (Muchow & Sinclair, 1989; Pearce et al., 2006) al igual que en nuestro ensayo.

Se detectó una asociación positiva entre A y gs. Esto es consistente con estudios previos en sorgo (Ferguson et al., 2021; Ortiz et al., 2017; Pan et al., 2022; Salas Fernandez et al., 2015), donde se estableció que

genotipos con mayor g_s alcanzan mayores tasas de A. Particularmente la variación observada en EUAi fue más debida a la variación en g_s que a la variación en A.

A diferencia de otros estudios realizados en sorgo (Ferguson et al., 2021; Pan et al., 2022), en este estudio se observaron correlaciones significativas entre los caracteres estomáticos como DE y TE con los caracteres de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofila.

Se ha determinado que la forma de la hoja refleja una serie de compensaciones entre múltiples variables, incluida la captura de luz, el intercambio de gases y la amortiguación de temperatura (Nunes-Nesi et al., 2016). Pan et al. (2022) reportaron correlaciones significativas entre el AH y parámetros como A, g_s , y EUAi, al igual que en este estudio.

La TAN es una medida de la eficiencia fotosintética promedio de las hojas. Esta tasa es alta cuando las plantas son pequeñas y sus hojas están expuestas a la luz solar directa. En varios cultivos se ha utilizado este tipo de medición (Kelly et al., 2021; Morales Morales et al., 2015). En nuestros estudios se reportaron una mayor correlación con las variables de morfología de hoja.

Conclusión

En este estudio se realizó un análisis de líneas de sorgo contrastantes en fotosíntesis seleccionadas previamente a través de un índice de selección por fluorescencia de clorofila y contenido de clorofila en hoja. Los resultados en las variables medidas, los análisis de modelos mixtos y las correlaciones entre caracteres, permitieron confirmar las diferencias entre grupos.

Los genotipos del grupo ALTO presentaron mayores valores en parámetros fotosintéticos, contenido de clorofila, morfología de hojas, número y densidad de estomas comparados con los del grupo BAJO. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre grupos en eficiencia de uso de agua.

Las asociaciones entre parámetros permitieron distinguir las interrelaciones entre variables asociadas a las diferencias entre grupos contrastantes. Entre ellas, se destaca la fuerte asociación entre la densidad de estomas y parámetros fotosintéticos (A y g_s), lo que resalta la utilidad de las variables estomáticas como método indirecto de selección. Otra fuerte asociación se dio entre el AH y las variables de parámetros fotosintéticos lo que también permite ser un carácter importante para ser utilizado como método de selección para los programas de mejoramiento.

Bibliografía

- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Bertolino, L. T., Caine, R. S., & Gray, J. E. (2019). Impact of Stomatal Density and Morphology on Water-Use Efficiency in a Changing World. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00225>
- Bheemanahalli, R., Wang, C., Bashir, E., Chiluwal, A., Pokharel, M., Perumal, R., Moghimi, N., Ostmeier, T., Caragea, D., & Jagadish, S. V. K. (2021). Classical phenotyping and deep learning concur on genetic control of stomatal density and area in sorghum. *Plant Physiology*, 186(3), 1562–1579. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab174>

- Cousins, A. B., Adam, N. R., Wall, G. W., Kimball, B. A., Pinter Jr, P. J., Ottman, M. J., Leavitt, S. W., & Webber, A. N. (2002). Photosystem II energy use, non-photochemical quenching and the xanthophyll cycle in Sorghum bicolor grown under drought and free-air CO₂ enrichment (FACE) conditions. *Plant, Cell & Environment*, 25(11), 1551–1559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00935.x>
- Faralli, M., Matthews, J., & Lawson, T. (2019). Exploiting natural variation and genetic manipulation of stomatal conductance for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 49, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.01.003>
- Ferguson, J. N., Fernandes, S. B., Monier, B., Miller, N. D., Allen, D., Dmitrieva, A., Schmuker, P., Lozano, R., Valluru, R., Buckler, E. S., Gore, M. A., Brown, P. J., Spalding, E. P., & Leakey, A. D. B. (2021). Machine learning-enabled phenotyping for GWAS and TWAS of WUE traits in 869 field-grown sorghum accessions. *Plant Physiology*, 187(3), 1481–1500. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab346>
- Franks, P. J., & Beerling, D. J. (2009). Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10343–10347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904209106>
- IPCC. (2022). *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. <https://doi.org/doi:10.1017/9781009325844>
- Kelly, S. J., Cano, M. G., Fanello, D. D., Tambussi, E. A., & Guiamet, J. J. (2021). Extended photoperiods after flowering increase the rate of dry matter production and nitrogen assimilation in mid maturing soybean cultivars. *Field Crops Research*, 265, 108104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108104>
- Kidambi, S. P., Krieg, D. R., & Nguen, H. T. (1990). Parental influences on gas exchange rates in grain sorghum. *Euphytica*, 50(2), 139–146. <https://doi.org/10.1007/BF00023637>
- Lawson, T., & Blatt, M. R. (2014). Stomatal Size, Speed, and Responsiveness Impact on Photosynthesis and Water Use Efficiency. *Plant Physiology*, 164(4), 1556–1570. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237107>
- Leakey, A. D. B., Ferguson, J. N., Pignou, C. P., Wu, A., Jin, Z., Hammer, G. L., & Lobell, D. B. (2019). Water Use Efficiency as a Constraint and Target for Improving the Resilience and Productivity of C₃ and C₄ Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 781–808. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040305>
- Liang, G. H., Dayton, A. D., Chu, C. C., & Casady, A. J. (1975). Heritability of Stomatal Density and Distribution on Leaves of Grain Sorghum. *Crop Science*, 15(4), [0011183X001500040034x](https://doi.org/10.1093/cropsci/15.4.0011183X001500040034x).
- Morales Morales, E. J., Morales-Rosales, E. J., Díaz-López, E., Cruz-Luna, A. J., Medina-Arias, N., & Guerrero-De La Cruz, M. (2015). Tasa de asimilación neta y rendimiento de girasol en función de urea y urea de liberación lenta. *Agrociencia*, 49(2), 163–176.
- Muchow, R. C., & Sinclair, T. R. (1989). Epidermal conductance, stomatal density and stomatal size among genotypes of Sorghum bicolor (L.) Moench. *Plant, Cell & Environment*, 12(4), 425–431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1989.tb01958.x>
- Nunes-Nesi, A., Nascimento, V. de L., de Oliveira Silva, F. M., Zsögön, A., Araújo, W. L., & Sulpice, R. (2016). Natural genetic variation for morphological and molecular determinants of plant growth and yield. *Journal of Experimental Botany*, 67(10), 2989–3001. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw124>
- Ortiz, D., Hu, J., & Salas Fernandez, M. G. (2017). Genetic architecture of photosynthesis in Sorghum bicolor under non-stress and cold stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 68(16), 4545–4557. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx276>
- Pan, L., George-Jaeggli, B., Borrell, A., Jordan, D., Koller, F., Al-Salman, Y., Ghannoum, O., & Cano, F. J. (2022). Coordination of stomata and vein patterns with leaf width underpins water-use efficiency in a C₄ crop. *Plant, Cell & Environment*, 45(6), 1612–1630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pce.14225>
- Pearce, D. W., Millard, S., Bray, D. F., & Rood, S. B. (2006). Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. *Tree Physiology*, 26(2), 211–218. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.2.211>
- Peng, S., & Krieg, D. R. (1992). Gas Exchange Traits and Their Relationship to Water Use Efficiency of Grain Sorghum. *Crop Science*, 32(2), [0011183X003200020022x](https://doi.org/10.1093/cropsci/32.2.0011183X003200020022x).
- Salas Fernandez, M. G., Strand, K., Hamblin, M. T., Westgate, M., Heaton, E., & Kresovich, S. (2015). Genetic analysis and phenotypic characterization of leaf photosynthetic capacity in

a sorghum (*Sorghum* spp.) diversity panel. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(6), 939–950. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0202-6>