

VANESSA FUENTES SUGUIYAMA

**Alterações Fisiológicas e Bioquímicas nas
Respostas de Tolerância à Dessecação
em *Barbacenia purpurea* Hook. - Velloziaceae**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

São Paulo

2013

VANESSA FUENTES SUGUIYAMA

**Alterações Fisiológicas e Bioquímicas nas
Respostas de Tolerância à Dessecação
em *Barbacenia purpurea* Hook. - Velloziaceae**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

ORIENTADORA: MARCIA REGINA BRAGA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Suguiyama, Vanessa Fuentes

S947a Alterações fisiológicas e bioquímicas nas respostas de tolerância à dessecação em *Barbacenia purpurea* (Hook.) - Velloziaceae / Vanessa Fuentes Suguiyama -- São Paulo, 2013.

78 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013

Bibliografia.

1.Velloziaceae. 2. Deficit hídrico. 3. Plantas revivescentes. I. Título

CDU: 582.572.5

"(...) porque um dia é preciso parar de sonhar, tirar os planos da gaveta e, de algum modo, começar".

Amyr Klink

DEDICO

Aos meus pais Acacio e Josefa, meu irmão Cesar

ao meu namorado Danilo,

por todo amor, apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

De todas as etapas na redação de uma dissertação, o item Agradecimentos é, de certo, um dos mais relevantes, pois é nele que registramos como memória a importância do envolvimento direto ou indireto de cada pessoa, e é aqui que tentamos retribuir em simples palavras a contribuição especial de cada um.

Desta forma, meus sinceros agradecimentos:

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pela contribuição na minha formação e pelo auxílio. À CAPES, pelo auxílio financeiro, que foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho. Ao CNPQ e FAPESP pelo auxílio aos projetos.

À minha orientadora, Dra. Marcia Regina Braga, pela compreensão, paciência, dedicação, disposição, conselhos e pela crescente amizade. A sua história, determinação e objetividade são exemplos a serem seguidos.

Ao Dr. Emerson Silva pela colaboração, ensinamentos e auxílio no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Dr. Sérgio Tadeu Meirelles pelo empréstimo das plantas e pela colaboração.

Ao Dr. Saulo de Tarso Aidar pelas dicas e conselhos no cuidado das plantas.

Ao Dr. Marcos Aidar e ao Dr. Mauro Alexandre Marabesi pelo auxílio e pelos ensinamentos.

À Ms. Janaína Gomes pela ajuda nas análises por UPLC.

À Eglee Igarashi do Laboratório de Fisiologia Vegetal do IB/USP pelo auxílio dedicado a análise dos carboidratos de parede celular.

Ao Ms. Rodrigo Fazani Esteves Sanches pelo auxílio com equipamentos e instruções.

Às Dras. Maria Angela M. Carvalho, Luce Maria B. Torres e Maria Cláudia Marx Young, pelos conselhos, pela pronta disposição, pelo carinho e pelos momentos agradáveis.

À Mary Monteiro, pela sua dedicação aos alunos do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica e por todas as broncas e conselhos.

À Ana Alice e Maria Aparecida, pela adorável companhia e por toda a ajuda.

À Maura Casari, por estarmos juntas a tantos e bons anos, pela oportunidade, pela confiança e pela sincera amizade.

À Marina Veronesi por me ensinar a desenvolver muitos protocolos, pelas agradáveis aulas de inglês, pela amizade, pela dedicação, pelos conselhos e pelas longas e engraçadas conversas.

À Thiara Siqueira pelo surf, pela escalada, pelos passeios, por muitos momentos agradáveis, por ter me escutado tanto e por ter se tornado uma grande amiga.

À Juliana Zerlin, Emanuela Oliveira, Kássia Fardin e Daiane Mignoni, por serem as minhas fofas prediletas e ótimas companhias para uma viagem e, é claro, por todo carinho.

Ao meu querido João Naldi, companheiro de bancada, meu amigo e confidente.

Ao Rodrigo Cabral, Anderson “Parrudo” e Flavio Trevisan, pelos auxílios na execução dos ensaios, pelos agradáveis momentos em laboratório e fora (com muitas gargalhadas) e pela amizade.

Aos meus amigos e colegas do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica Fernanda Zaninetti, Evandro Vieira, Ludmila Raggi, Jéssica Jorge, Emile Casasco, Aline Hell, Juliana Iura, Kelly Simões e Vanessa Oliveira, por todos os momentos adoráveis e pela sempre disposição em ajudar.

Às minhas eternas amigas, Eleine, Luana, Carol, Aline, Gislaine, Verinha, Tatiana e Fernanda por mais de 20 anos de amizade e por tudo o que vivemos juntas.

À Célia pela confiança, pelo amor, pelo carinho e pela generosidade. Às minhas queridas Juliane, Fernanda e Fabíola, pelos longos momentos de companhia, pelos muitos assuntos inacabados devido nossa falta de seriedade, por terem me acolhido, por tratarem as diferenças como modo de aprendizado, por vários momentos agradáveis, por toda a ajuda em muitos “sentidos” e pelo carinho. Ao Sr. Pedro, pelos conselhos, pelas agradáveis conversas, pelo carinho e por todas as gargalhadas.

E por fim, e de grande importância, aos meus pais Acacio e Josefa, que me proporcionaram esta experiência, pelo amor, pela compreensão e por terem se dedicado em construir o melhor caminho aos filhos. Ao meu irmão Cesar por acreditar em mim e por ser um exemplo de caráter, de personalidade e de lealdade. A minha Perdita, porque amor nasce no coração dos preparados (e que me desculpem os céticos). A minha cunhada Natália, por ser uma pessoa tão especial e por ter me ajudado nos momentos mais difíceis. E, é claro a pessoa que mais me incentivou e um dos personagens principais da minha história, meu amado Danilo, pelo amor, por todo o apoio, pela paciência nos momentos mais difíceis, pela dedicação, pelo carinho, pela amizade, pelo companheirismo e pelos momentos inesquecíveis.

RESUMO

Tolerância à dessecação vegetativa consiste na habilidade de um organismo em sobreviver à perda de mais de 95% do seu conteúdo hídrico celular por longos períodos e recuperar completamente sua competência metabólica após a reidratação. Esta característica é comumente encontrada em um grupo de plantas, denominadas de plantas revivescentes, que possuem a capacidade de se manterem viáveis por longos períodos em estado de anabiose e retornar ao seu metabolismo celular normal após a água se tornar novamente disponível. *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae), sinóníma *Pleurostima purpurea* (Hook.) Rafinesque, é uma espécie revivescente comumente encontrada em afloramentos rochosos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Este trabalho objetivou avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas envolvidas nas respostas associadas à tolerância a dessecação em *B. purpurea* e se as alterações são influenciadas pela sazonalidade. Para tanto, plantas envasadas de *B. purpurea* foram submetidas ao déficit hídrico em duas diferentes estações do ano, inverno e verão, e foi observado que a espécie possui mecanismos induzidos de respostas à deficiência hídrica, que incluem o desligamento da fotossíntese, a degradação das clorofilas, a ativação do sistema antioxidante não enzimático e o aumento e síntese de carboidratos e aminoácidos para ajustamento osmótico. A espécie responde com alterações metabólicas que independem da sazonalidade. No entanto, possui duas respostas temporalmente distintas dependentes da tensão hídrica imposta às folhas, sendo que em baixos níveis de déficit hídrico (98-70% do teor relativo de água foliar) são ativados mecanismos de evitação da dessecação, enquanto que em níveis de déficit hídrico moderado a intenso (abaixo de 70 até 10% do teor relativo de água foliar) a espécie apresenta respostas típicas de plantas vasculares tolerantes à dessecação. Conclui-se, portanto, que a tolerância de *B. purpurea* à dessecação envolve a percepção da intensidade do déficit de água que resulta em diferentes estratégias para superar o período de estresse.

ABSTRACT

Desiccation tolerance of vegetative tissues is the ability of an organism to survive the loss of more than 95% of its water content for extensive periods and recover completely their metabolic competency after rehydration. This feature is commonly found in a group of plants referred to as resurrection plants, which have the ability to remain viable for long periods in anabiose and return to their normal cell metabolism after water becomes available again. *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae), synonym *Pleurostima purpurea* (Hook.) Rafinesque, is a resurrection species, usually found in rocky outcrops in the state of Rio de Janeiro, Brazil. This work was focused on assessing the physiological and biochemical responses associated with tolerance to desiccation in *B. purpurea* and as they are influenced by seasonality. Potted plants of *B. purpurea* were subjected to water deficit in two different seasons, winter and summer. It was observed that the species has induced mechanisms of desiccation tolerance, which include photosynthesis inhibition, degradation of chlorophylls, activation of non-enzymatic antioxidant system, and increase and synthesis of carbohydrates and amino acids for osmotic adjustment. The species responds with metabolic changes that independently on the seasonality. However, the responses are temporally separated and are under the control of water deficit imposed on leaves. At low levels of water deficit (98-70% relative water content in leaves) the mechanisms of desiccation avoidance are activated, while at levels of moderate to intense water deficit (below 70 to 10% relative water content in leaves) the species showed responses of desiccation tolerant typical of vascular plants. In conclusion, the desiccation tolerance in *B. purpurea* involves perception of water deficit intensity, which results in different strategies to overcome the stress period.

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Taxas de assimilação líquida do carbono

AMG - Amiloglucosidase

BSTFA - (Trimetilsilil) trifluoroacetamida

CG/EM - Cromatografia a gás acoplada a espectrômetria de massas

C_i - Concentração interna de CO₂

DFFF - Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2 difenil-1-picrilhidrazila

E - Transpiração

g - Gravidade

g_s - Condutância estomática

HPAEC/PAD - Cromatografia líquida de troca iônica com detector de pulso amperométrico

IRGA - Analisador de gás por infravermelho

MF - Massa fresca

MPa - Megapascal

PFf - Peso fresco foliar

PSf - Peso seco foliar

PTf - Peso turgido foliar

rpm - Rotações por minuto

RFOs - Oligossacarídeos da série da rafinose

ROS - Espécies reativas de oxigênio

TFA – Ácido trifluoroacético

TRD - Reflectometria no domínio do tempo

TRAf - Teor relativo de água foliar

UPLC - Cromatografia líquida de ultra eficiência

UR - Umidade relativa do ar

Us - Umidade do solo

PAR - Radiação fotossinteticamente ativa

UV - Ultravioleta

Ψ_w - Potencial hídrico

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Plantas revivescentes.....	3
1.2 Mecanismos de tolerância à dessecação em plantas revivescentes.....	3
1.2.1 Alterações relacionadas ao desligamento da fotossíntese.....	4
1.2.2 Sistema antioxidante.....	5
1.2.3 Alterações do conteúdo de carboidratos.....	6
1.2.4 Alterações nas propriedades da parede celular.....	7
1.2.5 Alterações morfológicas e anatômicas.....	8
1.3 Plantas revivescentes da flora brasileira.....	9
1.4 <i>Barbacenia purpurea</i>.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	13
3.2 Tratamento e amostragem.....	14
3.3 Parâmetros Ecofisiológicos.....	14
3.3.1 Monitoramento das condições ambientais.....	14
3.3.2 Teor de umidade do solo.....	15
3.3.3 Teor relativo de água foliar (TRAf).....	15
3.3.4 Potencial hídrico foliar (Ψ_w).....	15
3.3.5 Análise de trocas gasosas de CO ₂ e H ₂ O.....	15

3.3.6 Teores de pigmentos fotossintéticos.....	16
3.4 Parâmetros Bioquímicos.....	16
3.4.1 Coleta do material vegetal para as análises bioquímicas.....	16
3.4.2 Extração de carboidratos solúveis.....	17
3.4.3 Quantificação de carboidratos solúveis.....	17
3.4.4 Análise de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca iônica com detector por pulso amperométrico (HPAEC/PAD).....	17
3.4.5 Extração e quantificação de amido.....	18
3.4.6 Extração da parede celular.....	19
3.4.7 Hidrólise ácida de polissacarídeos não celulósicos da parede celular.....	19
3.4.8 Análise dos monossacarídeos neutros por HPAEC/PAD.....	20
3.4.9 Análise atividade antioxidante de folhas de <i>B. purpurea</i>	20
3.4.10 Análise do perfil metabólico.....	20
3.4.11 Análise de aminoácidos por UPLC.....	21
3.5 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Monitoramento das condições ambientais.....	23
4.2 Respostas ecofisiológicas.....	24
4.3 Respostas bioquímicas.....	32
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1 Respostas ao déficit hídrico.....	50
5.2 Reidratação.....	57
5.3 Turgor foliar e a percepção do déficit hídrico.....	58
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 35% da superfície terrestre é considerada árida ou semiárida (Wood, 2005). A partir de mudanças na precipitação normal em função do período de duração, três tipos de seca podem ser considerados: (I) seca meteorológica, caracterizada por um déficit de precipitação associado a alta incidência de radiação, temperaturas elevadas, baixa umidade relativa do ar e aumento da evaporação; (II) seca ecofisiológica, cuja falta de água disponível no solo leva a um estresse hídrico nas plantas, ocasionando uma redução da biomassa e (III) seca hidrológica, que consiste na redução dos níveis de escoamento fluvial, afluências de reservatórios, lagos, barragens e terras alagadas (IPMA, 2013).

As plantas que se desenvolvem em ambientes com limitação hídrica têm de lidar com a tendência constante de perder água de seus tecidos para o ambiente circundante (Wood, 2005; Oliver *et al.*, 2010). Para sobreviver à baixa disponibilidade de água e a seca e ainda manter o crescimento, as plantas podem escapar, evitar ou tolerar a perda de água (Bewley, 1979). As plantas que escapam da seca possuem ciclos de vida curtos e completam as fases vegetativa e reprodutiva enquanto a umidade ainda está disponível no ambiente (Bewley, 1979). Plantas que evitam ou resistem à seca possuem estratégias que limitam a percepção do déficit hídrico no protoplasma, cujo objetivo é evitar o impacto da perda imediata de água dos tecidos (Wood, 2005). As plantas que possuem a capacidade de tolerar a seca, por sua vez, possuem a habilidade de resistir a baixa disponibilidade de água, utilizando adaptações que permitem que o metabolismo ocorra em baixos potenciais hídricos (Wood, 2005).

Poucas são as espécies de plantas vasculares capazes de lidar com variações extremas de disponibilidade de água no ambiente (Porembski, 2011), sendo que a maioria não sobrevive a potenciais de água (Ψ_w) entre -5 e -10 megapascal (MPa) (Oliver *et al.*, 2010). Em condições de deficiência hídrica severa (0,1 g H₂O g⁻¹ de massa seca correspondendo a -100 MPa), apenas 0,02% das plantas vasculares são capazes de resistir à perda substancial de água de seus órgãos vegetativos (Alpert & Oliver, 2002; Wood, 2005; Oliver *et al.*, 2010; Morse *et al.*, 2011; Farrant *et al.*, 2012). Nessas plantas, a existência de adaptações estruturais e funcionais, desenvolvidas ao longo do tempo culminou em estratégias eficazes para a aquisição da tolerância à dessecação vegetativa (Wood, 2005; Lüttge *et al.*, 2011).

A tolerância à dessecação pode ser definida como a habilidade de um organismo em sobreviver à perda de mais de 95% do seu conteúdo de água celular (por períodos que variam de acordo com o grupo) e recuperar completamente sua competência metabólica após a

reidratação (Farrant *et al.*, 2007; Lüttge *et al.* 2011, Porembski, 2011; Dinakar *et al.* 2012, Farrant *et al.*, 2012). Dessecação é a condição mais extrema de desidratação de um tecido ou célula e esta definição refere-se ao processo pelo qual toda a água livre é perdida a partir do protoplasma (Wood, 2005).

No reino vegetal, a tolerância à dessecação é um fenômeno comumente encontrado em tecidos reprodutivos, como esporos, sementes e polens e em tecidos vegetativos de briófitas e líquens, sendo raro em pteridófitas e angiospermas e ausente nas gimnospermas (Porembski & Barthlott, 2000; Farrant *et al.*, 2007; Morse *et al.*, 2011; Farrant *et al.*, 2012).

Os mecanismos da tolerância à dessecação diferem entre plantas avasculares e vasculares (Morse *et al.*, 2011). As plantas avasculares não são capazes de prevenir a perda de água de seus tecidos para o ambiente, sofrendo mudanças bruscas no seu grau de hidratação (Larcher, 2000; Oliver *et al.*, 2010). Nessas plantas, também denominadas de poiquiloídricas verdadeiras, a dessecação ocorre muito rapidamente e a proteção antes da secagem é mínima ou nula, sendo que a sobrevivência a este estado é baseada na presença de mecanismos constitutivos e na indução de mecanismos de reparo de possíveis danos somente após a reidratação (Oliver *et al.*, 1998; Farrant *et al.*, 2007; Lüttge *et al.*, 2008; Farrant *et al.*, 2012). Lüttge *et al.* (2008) demonstraram para as briófitas brasileiras *Campylopus savannarum*, *Racocarpus fontinaloides* e *Ptychomitrium vaginatum* que a sobrevivência a uma rápida dessecação e reidratação está associada à proteção foto-oxidativa nestas espécies poiquiloídricas, e que a manutenção do aparato fotossintético durante a dessecação é um pré-requisito para um rápido retorno de suas atividades após o aumento da disponibilidade hídrica.

Em geral, as plantas vasculares possuem a habilidade de controlar a perda de água para o ambiente e são denominadas homeohídricas, sendo caracterizadas por não estarem sujeitas a mudanças bruscas no seu grau de hidratação (Larcher, 2000). As plantas tolerantes à dessecação, por sua vez, tem a desidratação dos tecidos atrasada em relação ao ambiente e, para isto, devem ser ativados tanto mecanismos de evitação da desidratação quanto mecanismos de proteção durante a secagem e de reparo na reidratação (Wood, 2005).

De acordo com Wood & Jenks (2007) e Farrant *et al.* (2012), aproximadamente 400 espécies de plantas vasculares apresentam tolerância à dessecação vegetativa, estando incluídas em 9 famílias de pteridófitas (Adiantaceae, Aspleniaceae, Davalliaceae, Grammitidaceae, Hymenophyllaceae, Isoëtaceae, Polypodiaceae, Schizaeaceae e

Selaginellaceae) e 10 famílias de angiospermas (Acanthaceae, Cactaceae, Cyperaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Myrothamnaceae, Poaceae, Scrophulariaceae e Velloziaceae). Independente do grupo a que pertençam, para que as plantas sobrevivam a uma perda severa de água protoplasmática, três características são essenciais: (I) os danos devem ser limitados a um nível reparável; (II) a integridade fisiológica deve ser mantida no estado desidratado e (III) os mecanismos de reparo devem existir após a reidratação.

1.1 Plantas revivescentes

Plantas revivescentes, do inglês “*resurrection plants*”, são plantas vasculares, especialmente monocotiledôneas (Porembski & Barthlott, 2000), caracterizadas por possuírem a capacidade de tolerar dessecação vegetativa, mantendo-se viáveis por longos períodos em estado de anabiose (suspensão das atividades vitais), e retornar ao seu metabolismo celular normal após a água se tornar novamente disponível (Farrant *et al.*, 2007; Farrant *et al.*, 2009; Aidar *et al.*, 2010; Morse *et al.*, 2011; Dinakar *et al.*, 2012). Estas plantas habitam nichos ecológicos caracterizados por condições ambientais extremas, possuindo limites sazonais de disponibilidade hídrica com períodos extensos sem precipitação, altos graus de radiação e solos com capacidade mínima de retenção de água. São encontradas a partir do nível do mar até 2800 metros, mas ocorrem principalmente em afloramentos rochosos ou *inselbergs* nos trópicos e, em menor escala, em zonas temperadas. A diversidade de espécies é maior no sul da África (especialmente África do Sul, Namíbia e Zimbábue), Madagascar, Austrália e Brasil (Porembski & Barthlott, 2000; Dinakar *et al.*, 2012).

Os mecanismos relacionados à capacidade de tolerar a dessecação vegetativa nas plantas revivescentes implicam na existência de uma complexa maquinaria associada à desidratação e reidratação, envolvendo atributos anatômicos, fisiológicos e moleculares específicos. O processo de anabiose é metabolicamente custoso e implica em investimentos maciços em sistemas de proteção e reparo (Meirelles, 2009; Lüttge *et al.*, 2011; Dinakar *et al.*, 2012).

1.2 Mecanismos de tolerância à dessecação em plantas revivescentes

Dentre os mecanismos que plantas revivescentes dispõem para tolerar a dessecação encontram-se (I) alterações relacionadas ao desligamento da fotossíntese; (II) modulação do sistema antioxidante; (III) acúmulo de carboidratos; (IV) mudanças nas propriedades

químicas da parede celular e (V) alterações morfológicas e anatômicas, entre outros (Farrant *et al.*, 2009; Dinakar *et al.*, 2012).

1.2.1 Alterações relacionadas ao desligamento da fotossíntese

Os cloroplastos são particularmente sensíveis a danos oxidativos e quando se trata de tolerância à dessecação, além da produção de antioxidantes, duas outras estratégias são encontradas nos vegetais em relação ao conteúdo de clorofila mantido após a dessecação, para evitar a formação de espécies reativas de oxigênio (Aidar, 2005; Dinakar *et al.*, 2012). A primeira estratégia, encontrada em pteridófitas e eudicotiledôneas, refere-se às plantas denominadas homeoclorófilas, nas quais o conteúdo de clorofilas é parcialmente preservado juntamente com a estrutura básica plastidial. Em estudo realizado por Farrant (2000), foi observado que em plantas de *Craterostigma wilmsii* os cloroplastos apresentavam um formato ovalado, enquanto que em *Myrothamnus flabellifolius* os cloroplastos assumiam um formato arredondado. Em ambas as espécies, a manutenção dos cloroplastos não foi possível devido ao enrolamento foliar que levou a um sombreamento destas células e protegeu os cloroplastos da incidência de luz.

A segunda estratégia é restrita a monocotiledôneas e está presente em plantas denominadas peciloclorófilas, nas quais ocorre perda total do conteúdo de clorofila do tecido, associada a um desmantelamento das membranas dos tilacóides devido à desidratação, resultando na inativação da cadeia transportadora de elétrons, consecutivamente inibindo a fotossíntese. Farrant (2000) observou que, em *Xerophyta humilis*, as membranas externas dos cloroplastos mantêm-se contínuas enquanto que as membranas internas perdem sua conformação original, assumindo aspecto vesiculado após a dessecação e, dessa maneira, o aparato fotossintético deve ser inteiramente reconstruído após a reidratação. Esta estratégia é eficaz na minimização da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e parece ser uma das principais razões das espécies peciloclorófilas permanecerem viáveis no estado desidratado por muito mais tempo do que as plantas homeoclorófilas (Farrant *et al.*, 2007).

Farrant *et al.* (2003), a partir dos resultados obtidos em um estudo com plantas homeoclorófilas e peciloclorófilas submetidas à secagem na presença e ausência de luz, sugeriram que em plantas revivescentes a redução da atividade fotossintética pode estar associada, em grande parte, à transdução de sinal a partir da degradação ou mascaramento da clorofila. Estudos de proteômica realizados com proteínas associadas à fotossíntese em folhas

da espécie peciloclorófila *Xerophyta viscosa* durante a desidratação mostraram a degradação de proteínas ao mesmo tempo em que ocorria o dismantelamento das membranas dos tilacóides. Já na espécie homeoclorófila *Craterostigma plantagineum*, as mesmas proteínas foram, em parte, mantidas durante a desidratação, uma vez que cloroplastos são apenas parcialmente degradados na dessecação (Ingle *et al.*, 2007).

Em *X. humilis* foi observada redução da fotossíntese em condições de desidratação e, acompanhando este decréscimo, o aumento das concentrações intercelulares de CO₂, sugerindo que a principal limitação fotossintética era fotoquímica, afetando principalmente a regeneração da ribulose 1,5-bis-fosfato (RuBP) dependente de energia. Essa limitação coincidiu com o início da degradação das clorofilas (Beckett *et al.*, 2012). Além disso, foi observado a partir de imagens de fluorescência que a eficiência dos centros de reação (PSII) foi prejudicada com a dessecação. A recuperação da eficiência fotossintética foi obtida após a reidratação, sem nenhum dano permanente, demonstrando que as limitações fotossintéticas são reversíveis em espécies revivescentes.

1.2.2 Sistema antioxidante

O déficit hídrico causa perturbações metabólicas e danos mecânicos à membrana e macromoléculas das plantas revivescentes devido também à geração de ROS (Dinakar *et al.*, 2012). Para combater os danos causados pelas ROS, plantas revivescentes contam com a atuação de um complexo sistema antioxidante enzimático ou não, cujo padrão de respostas varia amplamente entre as espécies (Farrant, 2000).

A atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) como mecanismos para evitar os danos oxidativos em espécies revivescentes é amplamente estudada (Farrant, 2000; Farrant *et al.*, 2003; Illing *et al.*, 2005; Farrant *et al.*, 2009). Farrant (2000) observou que a regulação do sistema antioxidante enzimático em condições de secagem varia muito entre as espécies revivescentes. *C. wilmsii*, em condições desseccantes, apresenta aumento da atividade de APX e GR, enquanto que em *M. Flabellifolius* e *X. humilis* as enzimas APX, GR e SOD têm sua atividade aumentada (Farrant, 2000; Farrant *et al.*, 2003). Illing *et al.* (2005) compararam a atividade de enzimas antioxidantes em duas espécies sensíveis a dessecação (*Eragrostis curvula* e *E. tef*) com a tolerante a dessecação *Eragrostis nindensis* e observaram que, sob desidratação leve, em todas as espécies havia aumento da atividade antioxidante. No entanto,

em baixos teores de água, esta atividade era mantida apenas em *E. nindensis*. Desta forma, os autores propuseram que, embora as enzimas façam parte dos sistemas de proteção à dessecação, elas não são suficientes para garantir a tolerância dessas espécies à dessecação.

Além da ação dos sistemas antioxidantes mencionados, as plantas revivescentes contam com atuação de substâncias antioxidantes provenientes do metabolismo secundário, tais como compostos fenólicos e terpênicos, para minimizar os danos causados pelas ROS (Taiz & Zeiger, 2004). Farrant (2000) observou que o acúmulo de antocianinas evita a interação luz-clorofila por refletir a radiação, consequentemente inibindo a fotorrespiração em plantas no estado dessecado. Esta resposta também foi encontrada na planta *M. flabellifolius*, submetida à dessecação, onde o acúmulo de antocianinas ocorre apenas em plantas dessecadas na presença de luz, sugerindo que este aumento seja mediado pela radiação. Entretanto, em *C. wilmsii* o acúmulo de antocianinas ocorreu em folhas dessecadas tanto na presença quanto na ausência de luz, sugerindo que, para esta espécie, este acúmulo ocorre em resposta à secagem, atuando na prevenção de formação de ROS independentemente da presença de luz (Farrant *et al.*, 2003). Estudos relatam a atuação de outros compostos fenólicos contra danos induzidos por ROS. Moore *et al.* (2005) observaram a presença do ácido 3, 4, 5-tri-*O*-galoilquinico, um polifenol, em *M. flabellifolius* e os autores demonstraram que este polifenol protege as membranas contra danos induzidos pela dessecação.

Os carotenóides também atuam na proteção contra danos causados pela formação de ROS (Dinakar *et al.*, 2012). A manutenção do conteúdo de carotenóides não é uma resposta recorrente nas plantas revivescentes. Em condições de déficit hídrico ocorre degradação parcial do conteúdo de carotenóides em *M. flabellifolius* e *X. viscosa*, enquanto que em *C. wilmsii*, os teores de carotenóides se mantêm constantes durante a dessecação (Sherwin & Farrant, 1996). Em *X. humilis*, Beckett *et al.* (2012) observaram diminuição dos níveis de violaxantina e aumento de zeaxantina e estas alterações são devidas à conversão de violaxantina em zeaxantina (ciclo das xantofilas), que se liga às proteínas do sistema antena, levando a alterações na conformação (Taiz & Zeiger, 2004) e dissipação de energia na forma de calor e consequente ação antioxidante e de foto-proteção (Beckett *et al.*, 2012).

1.2.3 Alterações do conteúdo de carboidratos

O acúmulo de carboidratos tem sido relatado em todas as plantas revivescentes estudadas até o momento e é considerado um fator de grande importância na aquisição da

tolerância à dessecação (Oliver *et al.*, 1998; Farrant *et al.*, 2009). Dentre as funções atribuídas ao acúmulo destes carboidratos, destaca-se o ajustamento osmótico para manutenção da turgescência, a estabilização das estruturas das membranas contra efeitos nocivos causados por ROS, a formação do estado vítreo celular e o fornecimento de esqueletos carbônicos proporcionando fonte de energia para recuperação da planta durante a reidratação (Oliver *et al.*, 1998; Farrant *et al.*, 2007; Farrant *et al.*, 2009)

Mudanças nos conteúdos de carboidratos solúveis foram verificadas em *X. viscosa* (Peters *et al.*, 2007) em condições dessecadas. Foi observado aumento de sacarose e de oligossacarídeos da série da rafinose (RFOs), especialmente rafinose, cujo acúmulo ocorreu em maiores concentrações em teor relativo de água foliar de 5%. Esse acúmulo foi reversível, decrescendo à medida que a turgescência evoluía, evidenciando que RFOs desempenham papel protetor nos tecidos foliares desta revivescente, além de atuarem no armazenamento de carbono a ser disponibilizado da reidratação. Farrant *et al.*(2009) relatam que, além do acúmulo de sacarose e rafinose em *Mohria caffrorum*, também ocorre aumento dos níveis de glicerol, arabinose e melezitose e ainda redução na abundância dos níveis de glicose e frutose, acompanhando a progressão do déficit hídrico, e esta redução indica que estes açúcares podem estar sendo convertidos em sacarose.

1.2.4 Alterações nas propriedades da parede celular

Estudos indicam o dobramento reversível da parede celular como o mecanismo responsável pelo enrolamento foliar, sendo este essencial para a manutenção da estrutura celular no estado desidratado (Farrant, 2000; Farrant *et al.*, 2007; Dinakar *et al.*, 2012). O padrão de dobramento da parede celular é dependente de sua estrutura e composição química, de modo que diversas modificações devem ocorrer durante a desidratação para estabilizar sua arquitetura. Dentre elas, alterações significativas no teor dos monossacarídeos e polissacarídeos podem estar envolvidas com o aumento na flexibilidade da parede celular durante o enrolamento foliar (Moore, *et al.*, 2006; 2008; Dinakar *et al.*, 2012).

Em *C. wilmsii*, a dessecação dos tecidos foliares induziu aumento do conteúdo de xiloglucanos e pectinas não esterificadas na parede celular e da proporção de galactose em relação à glicose na estrutura dos xiloglucanos nas folhas desidratadas, em relação aos tecidos hidratados (Vicré *et al.*, 1999; Vicré *et al.*, 2004). Na revivescente *C. plantagineum*, foi observado o aumento na atividade da proteína expansina, o qual permitiu uma maior

extensibilidade da parede celular a partir do rompimento de ligações não covalentes (ligações de hidrogênio) entre os polissacarídeos de parede, indicando ser este o fator responsável pelo enrolamento foliar em condições dessecadas nesta espécie (Jones & McQuenn-Mason, 2004).

Moore *et al.* (2006) observaram que o dobramento da parede celular na espécie revivescente *M. flabellifolius* está relacionado a um aumento do teor do monossacarídeo arabinose, possivelmente na forma de arabinano, que confere maior flexibilidade à parede celular, por diminuir a forte interação entre as cadeias de ramnogalacturonanos. Os autores sugerem que a função mais importante deste mecanismo é prevenir os danos mecânicos aos tecidos, especialmente a perda da associação entre a plasmalema e a parede celular. Os autores propõem que o arabinano é constitutivamente sintetizado nas paredes celulares de *M. flabellifolius* permitindo um preparo constante da planta para enfrentar os ciclos de dessecação e reidratação.

1.2.5 Alterações morfológicas e anatômicas

Durante a dessecação há uma considerável redução do volume celular que pode gerar tensão na bicamada lipídica, resultando em deslocamento das proteínas de membrana, contribuindo para a perda da sua integridade, rompimento da compartimentalização celular e perda da atividade das enzimas apoplásticas (Mahajan & Tuteja, 2005). Para evitar o estresse mecânico, ocorrem alterações morfológicas e anatômicas nos tecidos das plantas revivescentes e estas alterações têm por finalidade evitar a ruptura da membrana plasmática, além de reduzir a superfície de transpiração e limitar os danos causados pela incidência de radiação ultravioleta (UV) (Dinakar *et al.*, 2012).

O enrolamento ou dobramento foliar é uma alteração morfológica recorrente em plantas revivescentes. Sherwin & Farrant (1998) relataram diferentes padrões de dobramento foliar e suas possíveis funções. Em *X. viscosa*, o enrolamento de suas folhas ocorreu a partir das margens das lâminas foliares que se dobraram ao meio, ao longo da nervura central, mantendo apenas a superfície abaxial exposta à luz. Em *C. wilmsii*, o padrão de dobramento ocorreu do ápice da folha em direção à base, incluindo toda superfície adaxial e deixando também a superfície abaxial exposta à radiação. Em outro estudo realizado por Farrant *et al.*, (2009), foi demonstrado que na pteridófita *M. caffrorum*, além do enrolamento foliar em direção à superfície adaxial, apareciam escamas de coloração laranja na superfície abaxial das folhas, possivelmente como estratégia para proteger esta superfície da exposição excessiva à

radiação. De modo interessante, essas adaptações foram observadas apenas na estação seca, uma vez que na época chuvosa estas escamas estavam ausentes e, quando submetidas à dessecação nestas condições, as folhas de *M. caffrorum* não apresentavam enrolamento foliar e sim aspecto de murcha, que foi mantido mesmo após a reidratação. Com isso, os autores sugeriram que a tolerância à dessecação nesta pteridófito é influenciada pela sazonalidade, ou seja, na estação de seca ela se comporta como uma espécie tolerante à dessecação, enquanto na estação chuvosa ela se comporta como uma espécie sensível à perda de água.

Para manter a estabilização mecânica do protoplasma, alterações anatômicas podem ocorrer nas células das plantas revivescentes. Em resposta a deficiência hídrica, *C. wilmsii*, *M. flabelifolius* e *X. humilis* apresentaram, em suas células, substituição de um único vacúolo central por pequenos vacúolos e a água presente nas células foi substituída por outros compostos, os quais ocuparam mais espaço no citoplasma, minimizando a redução da plasmalema devido à pressão da parede celular (Farrant, 2000). Farrant *et al.* (2009) observaram, a partir de imagens de microscopia eletrônica de transmissão, que nas células do mesófilo de plantas dessecadas de *M. caffrorum* não ocorria ruptura da plasmalema e que, mesmo em condições de dessecação, o citoplasma mantinha sua conformação original. Os autores observaram ainda a presença de polifenóis formando uma linha na periferia de um vacúolo central.

1.3 Plantas revivescentes da flora brasileira

A maioria dos estudos com plantas revivescentes e sobre os mecanismos associados à tolerância a dessecação foi realizada com plantas revivescentes da flora africana (Gaff, 1977; Sherwin & Farrant, 1998; Farrant, 2000; Farrant *et al.*, 2003; Vicré, *et al.*, 2004; Illing, *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006; Ingle *et al.*, 2007; Peters, *et al.*, 2007; Farrant *et al.*, 2009; Beckett *et al.*, 2012). No entanto, algumas espécies brasileiras foram incluídas em uma lista de plantas tolerantes à dessecação da América do Sul, publicada por Gaff (1987) e citada por Aidar (2005).

Um dos primeiros estudos realizados com revivescentes da flora brasileira foi efetuado por Meguro *et al.* (1977) com *Xerophyta plicata*. Mais tarde, Garcia (1997) estudou o comportamento ecofisiológico de três espécies de Velloziaceae (*Barbacenia gentianoides*, *Vellozia nivea* e *Nanuzia plicata*) durante os processos de dessecação e reidratação, mostrando

que *B. gentianoides* comporta-se como uma espécie sensível à dessecação, *N. plicata* é uma espécie tolerante e que *V. nivea* depende de sinalização para ativar a tolerância à dessecação.

Uma extensa lista de espécies tolerantes foi apresentada por Meirelles *et al.* (1997), incluindo 30 espécies de vários locais no Brasil, principalmente em substratos rochosos. Dentre elas está incluída *Barbacenia purpurea*.

1.4 *Barbacenia purpurea*

Barbacenia purpurea Hook., sinónimia *Pleurostima purpurea* (Hook.) Rafinesque, pertence à família Velloziaceae e é uma planta revivescente comumente encontrada em afloramentos rochosos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Em 2010, Aidar *et al.* analisaram as respostas ecofisiológicas de tolerância à dessecação nesta espécie, avaliando o conteúdo de água foliar, as trocas gasosas e o teor de pigmentos fotossintéticos durante a dessecação e reidratação em indivíduos cultivados a partir de sementes coletadas no Morro da Urca (RJ). A partir da imposição das plantas a condições de dessecação, os autores observaram que as respostas referentes às taxas fotossintéticas ocorrem em quatro fases, conforme sintetizado na tabela 1.

Tabela 1. Análise dos parâmetros fotossintéticos em resposta a deficiência hídrica em *Barbacenia purpurea* realizada por Aidar *et al.* (2010), onde TRAf = teor relativo de água foliar, g_s = condutância estomática e A = taxa de assimilação líquida do carbono.

Fase	Dias	TRAf	Parâmetros fotossintéticos
1	0 a 4	acima de 90%	máximo da disponibilidade hídrica g_s semelhante ao controle
2	4 a 9	acima de 90%	declínio da g_s
3	9 a 14	decrece de 90 a 75%	fechamento estomático ($g_s = 0$)
4	14 a 20	decrece de 75 a 14%	degradação das clorofilas g_s próximo a zero A apresenta valores negativos e, em seguida, zera

Com a diminuição do conteúdo de água nas folhas, Aidar *et al.* (2010) verificaram declínio da condutância estomática e da fotossíntese líquida e degradação das clorofilas totais. O conteúdo de carotenóides não sofreu alterações ao longo da secagem, caracterizando a estratégia de peciloclorofilia. Além disso, os autores observaram que, em resposta a

desidratação, a planta apresentou enrolamento das folhas sem ocorrência da abscisão. Desta forma, os autores constataram que *B. purpurea* apresenta mecanismos de evitação da dessecação associados a mecanismos de tolerância e que a planta utiliza os mecanismos de evitação da dessecação em condições de seca moderada, os quais devem permitir que a dessecação tenha início somente após todos os processos preparatórios para reidratação estarem ativados.

Considerando a escassez de estudos com espécies revivescentes da flora brasileira, especialmente sobre o seu comportamento fisiológico e bioquímico, *B. purpurea* foi selecionada como espécie modelo para novas investigações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações fisiológicas e bioquímicas como respostas de tolerância à dessecação da espécie revivescente *Barbacenia purpurea*, sob influência do déficit hídrico, em diferentes épocas do ano e subsequente reidratação.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as respostas ecofisiológicas em *Barbacenia purpurea*, em condições de deficiência hídrica severa, quanto ao teor de umidade do solo e planta, o potencial hídrico foliar, composição de pigmentos fotossintéticos e medidas de troca gasosa de CO₂ e H₂O;
- ✓ Analisar os teores de carboidratos solúveis, amido e aminoácidos e a composição da parede celular;
- ✓ Verificar alterações no perfil metabólico de folhas de *B. purpurea* dessecadas e após reidratadas;
- ✓ Avaliar a influência da sazonalidade nas respostas metabólicas relacionadas à tolerância à dessecação em *B. purpurea*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizados seis vasos contendo plantas de *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae), com aproximadamente 17 anos de idade (Figura 1), originárias de sementes coletadas no Morro da Urca/RJ e gentilmente emprestados pelo Dr. Sérgio Tadeu Meirelles do IB/USP. Devido ao crescimento lento da espécie, esses vasos eram os únicos que dispunham de material vegetal suficiente para as coletas pretendidas, motivo pelo qual não foi possível ampliar o tamanho amostral. Desde outubro de 2010, as plantas, que possuem até 18 ramos por vaso, foram mantidas em vasos de 3 litros contendo substrato Plantmax (DDL Agro Indústria Ltda.®) em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, São Paulo (IBt/SP), com monitoramento de temperatura (°C), umidade relativa do ar (UR, %) e densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF, $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cujas médias foram calculadas utilizando-se os dias de coleta como datas de referência.

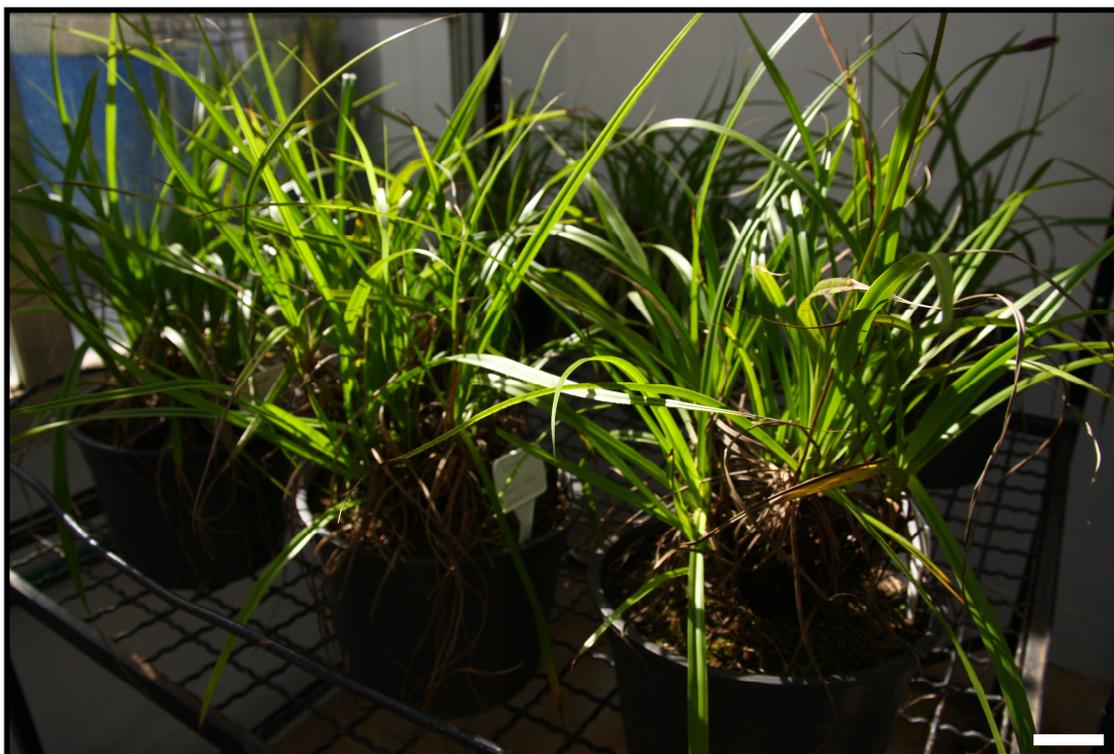


Figura 1. Vasos de *Barbacenia purpurea* mantidos na casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do IBt/SP e utilizados nos experimentos. Barra = 10 cm.

Os vasos receberam solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) a cada 20 dias ao longo do ano. Dez dias antes do início dos experimentos, as plantas foram tratadas com inseticida natural comercial (Neem, Sempre Verde[®]) para combate a cochonilha, com o objetivo de evitar contaminação ou perda do material durante as coletas.

3.2 Tratamento e amostragem

Para a imposição do déficit hídrico, as plantas foram divididas em dois grupos de 3 vasos, sendo um denominado controle (C) e o outro tratado (T). O grupo de plantas controle foi irrigado diariamente com 400 mL de água de torneira durante todo o experimento e o grupo tratado foi submetido à dessecação por suspensão completa da rega. A reidratação do grupo tratado foi efetuada depositando os vasos em recipiente contendo água de torneira por 3 horas, até que atingissem a capacidade de campo e de forma a evitar que as folhas fossem umedecidas.

O tratamento foi realizado em duas épocas do ano, no período de 05 de julho a 04 de agosto de 2011, correspondente à estação de inverno e de 13 de fevereiro a 09 de março de 2012, correspondendo ao verão.

As medidas e as coletas do material vegetal foram efetuadas para o experimento de inverno aos 0, 8, 16, 20 e 24 dias após a imposição ao déficit hídrico e as 12, 36, 84 e 132 horas após a restauração do regime de rega, e para o experimento de verão aos 0, 8, 16 e 20 dias de déficit hídrico e com 12, 36, 84 e 132 horas após a reidratação. A diferença no tempo de reidratação, com retorno das regas diárias do grupo tratado entre os dois experimentos, foi devido ao estabelecimento mais rápido do processo de dessecação durante o período de verão.

3.3 Parâmetros Ecofisiológicos

3.3.1 Monitoramento das condições ambientais

A temperatura (°C), umidade relativa do ar (UR, %) e densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF, $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram continuamente monitoradas no interior da casa de vegetação onde as plantas permaneceram, utilizando sensor de temperatura e umidade do ar (Li-1400-140, LI-COR – Nebraska, USA) e um sensor quantum (Li-190SA, LI-COR - Nebraska, USA) respectivamente, sendo estes conectados a um datalogger (Li-1400, LI-COR - Nebraska, USA). A partir dos dados coletados foram obtidos os valores máximos e mínimos e calculadas as médias diárias dos parâmetros monitorados.

3.3.2 Teor de umidade do solo

A análise de umidade do solo ($U_s\%$) foi realizada diariamente durante os experimentos pelo método de Reflectometria no Domínio do Tempo (TDR), utilizando uma sonda de umidade do solo, modelo ML2x ThetaProbe Soil Moisture acoplada à um datalogger modelo HH2 Moisture Meter (Delta T Devices, Cambridge, UK).

3.3.3 Teor relativo de água foliar (TRAf)

Para determinação do TRAf durante os tratamentos de disponibilidade hídrica, uma folha por vaso, totalizando três repetições por tratamento por coleta, foi destacada das plantas e imediatamente pesada (mg) em balança digital analítica para a obtenção do peso fresco da folha (PFf), sendo, em seguida, submersa em água destilada dentro de um becker por 24 horas e então pesada para obtenção do peso túrgido da folha (PTf). Posteriormente, as folhas foram levadas para estufa a 60°C por 72 horas para a obtenção do peso seco foliar (PSf). O teor relativo de água (TRA) foi calculado conforme descrito por Weatherley (1950), através da seguinte equação: $TRAf (\%) = (PFf-PSf/PTf-PSf) \times 100$.

3.3.4 Potencial hídrico foliar (Ψ_w)

Para determinar a intensidade do déficit hídrico imposto às plantas nos diferentes tratamentos, foram realizadas medidas do potencial da água nas folhas, utilizando-se uma bomba de pressão tipo Scholander Modelo 1000 (PMS Instrument Co., Utah, EUA). As medidas foram realizadas no período da antemanhã, entre 05:00 e 06:00 horas. Foram realizadas três medidas, sendo uma folha por vaso, por tratamento em cada tempo de coleta.

3.3.5 Análise de trocas gasosas de CO₂ e H₂O

As medidas instantâneas das taxas de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ (C_i $\mu\text{L l}^{-1}$) foram realizadas na quarta ou quinta folha de um ramo por vaso de *B. purpurea*, utilizando-se um analisador de gás no infravermelho (IRGA) modelo Li-6400 (LI-COR – Nebraska, USA), entre as 08:00 e 10:00 horas. As medidas foram realizadas com densidade do fluxo de fótons fotossintéticos e concentração de CO₂ na câmara do IRGA com taxas ajustadas para 800 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 380 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. As

taxas de fluxo tiveram seus valores determinados a partir de um experimento prévio descrito por Aidar *et al.* (2010).

3.3.6 Teores de pigmentos fotossintéticos

Para determinar o conteúdo de pigmentos foram utilizadas três repetições, representadas por três plantas diferentes. Em cada repetição foram avaliadas duas folhas de dois diferentes ramos em um total de seis repetições por tratamento por coleta. Para cada folha destacada, correspondente à terceira ou quarta folha completamente expandida de cada ramo, foram retirados 5 cm da parte mediana da folha para análise da composição de pigmentos fotossintéticos. A extração e quantificação desses pigmentos foram realizadas sob luz verde de segurança, de acordo com a metodologia proposta por Hendry & Price (1993). As amostras foliares foram maceradas em acetona 80% e o homogeneizado foi centrifugado a 3000 g por 5 minutos. O sobrenadante recuperado foi utilizado para a leitura das absorbâncias (Ab) nos comprimentos de onda de 480, 645 e 663 nm. A partir dos valores de absorbância encontrados, as concentrações de clorofilas *a* e *b* e de carotenóides totais foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg g}^{-1}\text{): } (((12,7 \times \text{Ab}663) - (2,69 \times \text{Ab}645)) \times V) / \text{Ms}) \times 1,12$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg g}^{-1}\text{): } (((22,9 \times \text{Ab}645) - (4,68 \times \text{Ab}663)) \times V) / \text{Ms}) \times 1,1$$

$$\text{Clorofila total (mg g}^{-1}\text{): Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

$$\text{Razão clorofila } a/b \text{ (mg g}^{-1}\text{): Clorofila } a / \text{Clorofila } b$$

$$\text{Carotenóides totais (mg g}^{-1}\text{): } ((\text{Ab}480 + (0,114 \times \text{Ab}663) - (0,638 \times \text{Ab}645)) \times V) / (112,5 \times \text{Ms})$$

Onde: V = volume da solução de extração

Ms = massa seca em mg

3.4 Parâmetros Bioquímicos

3.4.1 Coleta do material vegetal para as análises bioquímicas

Foram utilizadas três repetições, representadas por três plantas diferentes. Em cada repetição foram avaliadas duas folhas de dois diferentes ramos. Cada folha destacada, correspondente à terceira ou quarta folha completamente expandida de cada ramo, após a retirada dos 5 cm da parte mediana da folha para análise da composição de pigmentos fotossintéticos, foi imediatamente pesada em balança analítica, congelada em nitrogênio

líquido e então, macerada para obtenção do pó da folha. As amostras destinadas às análises de carboidratos e de perfil metabólico foram liofilizadas utilizando Modulo D freezer Dyer 5 L - Thermo Electron, USA.

3.4.2 Extração de carboidratos solúveis

Amostras de folhas liofilizadas obtidas conforme descrito no item 3.4.1. foram submetidas à extração de carboidratos solúveis segundo método de Carvalho *et al.* (1998). A extração foi feita a partir de 200 mg de folhas liofilizadas, que foram submersas em 10 mL de etanol 80%, homogeneizadas e levadas a banho-maria a 80°C por 15 minutos, sendo então centrifugadas (Sorvall Super T21, Kendro Laboratory Products, USA) a 1000 g por 15 minutos. Os resíduos foram re-extraídos por mais quatro vezes e os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo (r-215, Buchi, Switzerland) a 36°C até eliminação completa do etanol. Foram então retomados em 3 mL água destilada e mantidos a -20°C até a quantificação de carboidratos (item 3.4.3.) e análise de sua composição por cromatografia líquida de alta resolução (item 3.4.4). Os resíduos foram liofilizados, pesados e considerados como os resíduos insolúveis em álcool e utilizados para extração e dosagem de amido (item 3.4.5) e da parede celular (item 3.4.6).

3.4.3 Quantificação de carboidratos solúveis

Os carboidratos solúveis presentes nos extratos de folhas foram quantificados a partir do método colorimétrico do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) utilizando 100 µg mL⁻¹ de glicose (Sigma Aldrich®) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 490 nm, em espectrofotômetro (SP-22, Biospectro, Curitiba, PR).

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945). A leitura da absorbância foi efetuada em espectrofotômetro a 520 nm e o padrão utilizado foi glicose (Sigma Aldrich®) a 100 µg mL⁻¹.

3.4.4 Análise de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca iônica com detector por pulso amperométrico (HPAEC/PAD)

Alíquotas de 1 mL dos extratos obtidos no item 3.4.2 foram purificadas em coluna de troca iônica, utilizando 5 mL de resinas Dowex de troca catiônica 50x8 (100-200 mesh) e aniônica 1x8 (52-100 mesh). A eluição foi realizada com 36 mL de água deionizada e o

volume final teve o pH ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio 0,4 M. Após a purificação, as amostras foram liofilizadas e retomadas em 1 mL de água deionizada, e então novamente submetidas à quantificação de carboidratos totais de acordo com o método de Dubois *et al.* (1956) para ajuste da concentração em 400 µg mL⁻¹.

As amostras foram filtradas utilizando membrana de politetrafluoretileno (código JHWP01300, Millex™, Merck Millipore®, USA) e a análise da composição em carboidratos solúveis foi realizada através de cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em cromatógrafo líquido DIONEX modelo ICS3000 (Dionex, Thermo Scientific, USA) em coluna CarboPac PA-1. Os monossacarídeos e oligossacarídeos foram eluídos isocraticamente com 100 mM de NaOH, com fluxo de 0,25 mL min⁻¹. A identificação dos açúcares foi efetuada por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais, sendo eles: *mio*-inostol, glicose, frutose, sacarose, rafinose, estaquiose, verbascose e trealose (Sigma Aldrich®). O tempo de corrida foi de 35 minutos.

3.4.5 Extração e quantificação de amido

Alíquotas dos resíduos da extração de carboidratos solúveis (item 3.4.2) foram submetidas a extração de amido pelo método enzimático proposto por Amaral *et al.* (2007). A 10 mg de amostra foram adicionados 0,5 mL [120 U mL⁻¹] de alfa-amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (código E-ANAAM, Megazyme®) em tampão MOPS [ácido 3-(*n*-morfolino) propanosulfônico] 10 mM pH 6,5 seguido por incubação a 75°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido novamente e, na sequência, as amostras foram resfriadas a 50°C. A elas foi adicionado 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL⁻¹ de amiloglicosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (código E-AMGPV, Megazyme®) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5, e a incubação realizada a 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Para interromper a reação enzimática e precipitar as proteínas foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico 0,8 M às incubações. Após rápida centrifugação (2 minutos a 10.000 g), foi efetuada dosagem de amido pela quantificação da glicose liberada no processo de hidrólise. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 20 µL de extrato enzimático, às quais foram adicionados 300 µL de reagente Glicose PAP Liquiform (Centerlab®), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase (GOD-POD), além de 4-aminoantipirina e fenol a pH 7,5. Após incubação por 15 minutos a 37°C, o teor de glicose foi determinado em leitor de

microplacas de ELISA a 490 nm. A curva padrão foi efetuada utilizando-se concentrações crescentes de glicose (Sigma Aldrich®).

3.4.6 Extração da parede celular

Os resíduos resultantes da extração de carboidratos solúveis em álcool (item 3.4.2) foram submetidos a extração com dimetilssulfóxido (DMSO) com a finalidade de remover o amido das amostras. A 100 mg de resíduo foram adicionados 5 mL de DMSO 90% e os materiais foram mantidos sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 800 x g por 10 minutos e os sobrenadantes desprezados. Os resíduos foram lavados exaustivamente em água destilada e, em seguida, foram liofilizados e pesados para determinar o rendimento.

Após a extração com DMSO, os resíduos foram lavados sequencialmente com diferentes sistemas de solventes, sendo que a cada lavagem, o material foi agitado, centrifugado (800 x g por 10 minutos) e os sobrenadantes descartados. Primeiramente foram adicionados 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, seguidos por 10 mL de água destilada e de clorofórmio:metanol [1:1] (v/v), por duas vezes. Na sequência, adicionou-se 10 mL de acetona. A última lavagem foi realizada com 10 mL de éter etílico. O material foi seco em estufa a 60°C por três dias e então pesado para obtenção do rendimento de parede celular (Gorshkova *et al.*, 1996, modificado).

3.4.7 Hidrólise ácida de polissacarídeos não celulósicos da parede celular

Dois miligramas de parede celular bruta de folhas foram pesados e colocados em ampolas de vidro, aos quais foram adicionados 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 N. As ampolas foram seladas com auxílio de bico de Bunsen e as amostras hidrolisadas em autoclave a 121°C, 1,5 atm por 1 hora. Os sobrenadantes foram recolhidos por centrifugação a 800 x g por 15 minutos e dosados quanto ao teor de carboidratos totais pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e ácidos urônicos (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991), utilizando-se 100 µg mL⁻¹ de glicose e ácido galacturônico (Sigma Aldrich®) como padrões, respectivamente.

Após as medidas colorimétricas, os hidrolisados resultantes foram evaporados em um evaporador a vácuo com rotação (Hetovac VR-1 Centrifuge w/Rotor, HetoLab Equipment, USA), lavados com 500 µL de etanol por três vezes e 500 µL de água deionizada uma vez, e

evaporados a cada etapa de lavagem. Os materiais foram retomados em 1 mL de água deionizada e analisados por HPAEC/PAD (item 3.4.8).

3.4.8 Análise dos monossacarídeos neutros por HPAEC/PAD

Os monossacarídeos neutros provenientes da hidrólise ácida de polissacarídeos não celulósicos da parede celular foram analisados por HPAEC/PAD, utilizando coluna Carbo-PAC PA1 em sistema DIONEX modelo ICS3000 (Dionex, Thermo Scientific, USA). Os monossacarídeos foram eluídos isocraticamente em NaOH 12 mM, com fluxo de 0,25 mL min⁻¹ e identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de fucose, ramnose, arabinose, galactose, glicose, xilose e manose (Sigma Aldrich®). O tempo de corrida foi de 35 minutos.

3.4.9 Análise da atividade antioxidante de folhas de *B. purpurea*

Para a determinação da atividade antioxidante das folhas foram utilizadas alíquotas do extrato etanólico obtido na extração de carboidratos solúveis totais (item 3.4.2). A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos foi efetuada por sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH (0,2%, Sigma Aldrich®). Em microplaca de 96 cavidades foram adicionados 71,4 µL de solução metanólica de DPPH 0,3 mM e 178,5 µL da amostra de extrato a 200 µg/mL. Como controle negativo utilizou-se 71,4 µL de solução metanólica de DPPH 0,3 mM e 178,5 µL de metanol e como controle positivo foi utilizada quercitina (Sigma Aldrich®) 5 µg mL⁻¹. A microplaca foi mantida em temperatura ambiente na ausência de luz e a absorbância foi medida aos 5 minutos a 518 nm, em espectrofotômetro BIOTEK KC4 (Koleva *et al.*, 2002, modificado).

3.4.10 Análise do perfil metabólico

O perfil metabólico das folhas de *B. purpurea* coletadas diante a imposição do déficit hídrico foi analisado por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM), de acordo com o método de Roessner *et al.* (2001), modificado. Vinte miligramas de material liofilizado de folhas foram extraídos com 500 µL de uma solução de clorofórmio:metanol:água, na proporção 12:5:1, ao qual foram adicionados 50 µL de adonitol 0,2 mg mL⁻¹ como padrão interno para auxiliar as normalizações durante a quantificação. O material foi incubado a 60°C por 30 minutos sob agitação e centrifugado a 800 x g por 5

minutos. Após a extração, 350 μL do sobrenadante foi coletado, a eles foram adicionados 350 μL de água destilada, com nova agitação. Após centrifugados (800 x g por 5 minutos), 300 μL da fase polar foram coletados e evaporados a vácuo sob rotação. O material residual foi submetido a derivatização acrescentando-se 150 μL de piridina, 50 μL de *N,O*-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 μL de hidrocloreto de metoxialmina e, em seguida incubado sob agitação durante 1 hora a 75°C.

As amostras foram injetadas em um sistema GC-EM composto por um cromatógrafo a gás Agilent GC 6890 series acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo Agilent MSD 5973N (Agilent Technologies, USA). A separação cromatográfica foi realizada em coluna de 30 metros HP5 com espessura de 0,25 mm e filme de 0,25 μm (Supelco, Bellfonte, USA). A temperatura de injeção foi de 230°C, a interface a 250°C, e a fonte de íons ajustada para 200°C. Hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL min⁻¹. Os picos detectados foram comparados com padrões autênticos e com a NIST 08 Mass Spectral Library e confirmados através do cálculo do índice de Kovats.

3.4.11 Análise de aminoácidos por UPLC

Foram utilizados 40 μL da fase polar das amostras previamente extraídas para a análise do perfil metabólico (item 3.4.10), apenas do experimento de verão, para determinar o perfil de aminoácidos e amônio presentes nas folhas durante os tratamentos de déficit hídrico e reidratação. Para tanto foi utilizada Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector de ultra-violeta – UPLC (Waters Acquity UPLC system – Waters, Milford, USA). As amostras de folhas foram centrifugadas por 5 minutos a 800 x g. Em seguida, foi realizada derivatização seguindo protocolo do kit AccQ-Tag da Waters, com adaptações. Em um frasco foram adicionados 70 μL de tampão borato, 40 μL de amostra 20 μL de 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) e a mistura agitada em vórtex e levada a banho-maria a 55°C por 10 minutos.

A separação ocorreu através de uma coluna AccQ.Tag Ultra Column C18 (2,1X100 mm 1,7 μm), a 60 °C com os seguintes eluentes: A - AccQ.Tag Ultra Eluent A 10% em água (Walters®), B - AccQ.Tag Ultra Eluent B a 100% (Walters®), em fluxo de 0,7 mL min⁻¹. Os aminoácidos foram detectados por luz ultravioleta (UV) em comprimento de onda de excitação de 260 nm.

A determinação dos aminoácidos presentes nas amostras foi feita por comparação com padrões comerciais: Ala - Alanina, Arg- Arginina, Asn - Asparagina, Asp - Aspartato, Cit - Citrulina, Cys - Cisteína, Gaba - ácido gama-aminobutírico, Gly - Glicina, Glu - Glutamato, Gln - Glutamina, H-Pro - Hidroxiprolina, His - Histidina, Ile - Ileucina, Leu - Leucina, Lys - Lisina, Met - Metionina, Orn - Ornitina, Phe - Fenilalanina, Pro - Prolina, Ser - Serina, Tyr - Tirosina, Thr - Treonina, Trp - Triptofano, Val – Valina (Sigma Aldrich[®]), além de amônia (NH₃), nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 150 pmol.

3.5 Análise estatística

Os dados referentes aos parâmetros ecofisiológicos e bioquímicos, excetuando o perfil metabólico e de aminoácidos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo todo e qualquer contraste entre médias avaliados pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico BioEstat 3.0 (Ayres *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Monitoramento das condições ambientais

As variações na densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF), temperatura do ar e umidade relativa do ar (UR) referentes aos experimentos realizados na estação de inverno e verão são apresentados nas figuras 2 e 3.

Ao longo do experimento realizado no período do inverno de 2011 (figura 2A), o DFFF médio no interior da casa de vegetação foi de $168,23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tendo como pico máximo $540,63 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no 30º dia. No experimento efetuado no verão de 2012 (figura 2B), o DFFF médio foi de $281,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tendo como o pico máximo de fluxo $848,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aos 24 dias de coleta.

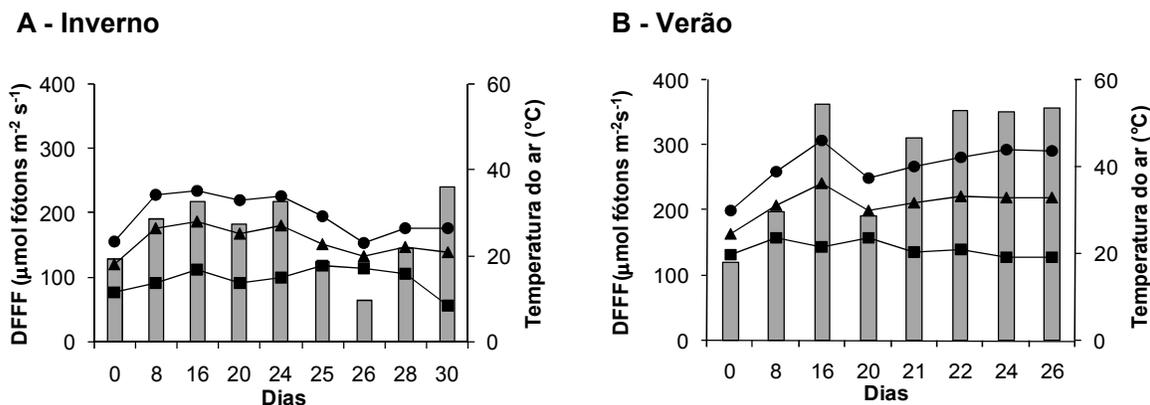


Figura 2. Médias de temperatura máxima (\bullet), média (\blacktriangle) e mínima (\blacksquare) e DFFF (barras) no interior da casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do IBt/SP durante o período de inverno (A) e verão (B).

A temperatura média do ar no experimento de inverno (figura 2A) manteve-se em torno de 24°C , com média máxima de 35°C no 16º dia e média mínima de 8°C no 30º dia, gerando uma amplitude térmica de 27°C . A maior variação de temperatura diária foi de $20,3^{\circ}\text{C}$ observada no 8º dia e a menor em $5,8^{\circ}\text{C}$ no 26º dia.

No verão (figura 2B), a temperatura média do ar ficou em torno de 31°C , com máxima de 46°C no 16º dia e mínima de $19,2^{\circ}\text{C}$ no 26º dia resultando em uma amplitude térmica no período de $26,8^{\circ}\text{C}$. A maior variação de temperatura diária foi $12,7^{\circ}\text{C}$, aos 24 e 26 dias e a menor variação de $6,2^{\circ}\text{C}$ no 20º dia.

Em ambos experimentos observa-se que a temperatura média foi determinada em grande parte pelas variações na temperatura máxima, tendo em vista que a temperatura mínima apresentou pequenas variações ao longo dos períodos experimentais.

A umidade relativa do ar (UR) no inverno (figura 3A) manteve-se em torno de 52,1% e no experimento do verão (figura 3B) a média foi de 78,9%. Os maiores valores de temperatura do ar coincidiram com altos valores de DFFF e com baixos valores de UR.

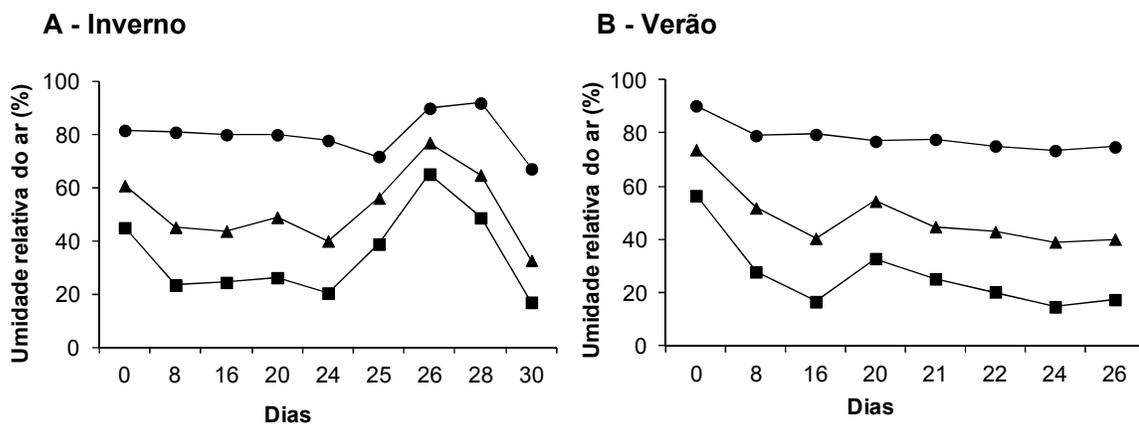


Figura 3. Médias da umidade relativa do ar máxima (●), média (▲) e mínima (■) no interior da casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do IBt/SP durante o período inverno (A) e verão (B).

4.2 Respostas ecofisiológicas

A figura 4 apresenta as variações na umidade do solo (U_s) dos vasos de *B. purpurea*. Em ambas estações do ano investigadas, é possível observar que ocorre um decréscimo de água no solo a partir do 4º dia de suspensão do regime de rega, chegando a valores mínimos de 3% no 24º dia no período de inverno (figura 4A) e 1,4% no 20º dia do verão (figura 4B). O decréscimo é mais acentuado no início do experimento do verão devido às maiores temperaturas, que resultaram em uma maior demanda atmosférica por água e, por conseguinte, em maior taxa de evaporação da água do solo. Após 12 horas da reidratação, os vasos desseccados ($U_s = 3\%$ e $1,4\%$) retornaram ao estado de saturação do solo, com $U_s = 37\%$ no inverno e $U_s = 42\%$ no verão que foram mantidas até o final do experimento.

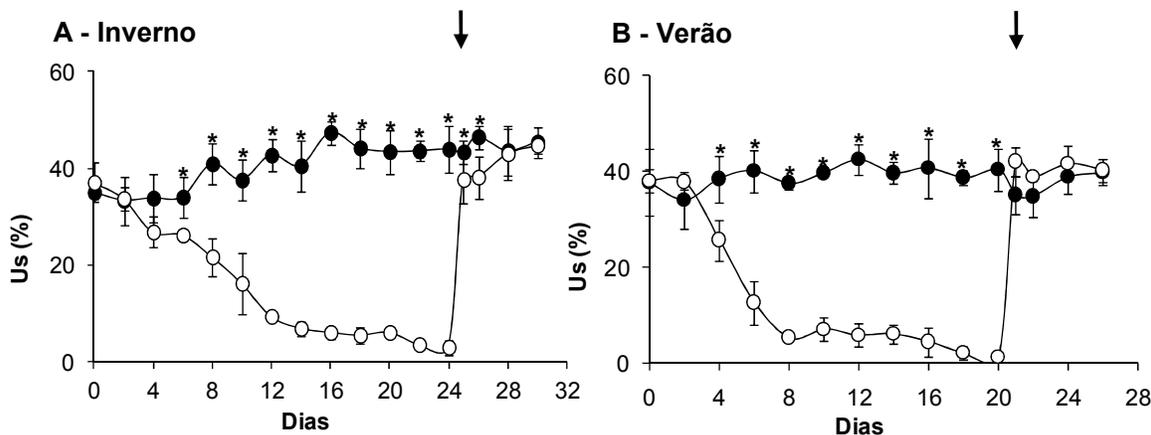


Figura 4. Umidade do solo em vasos de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○), durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão da média (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

O estabelecimento do déficit hídrico e os efeitos visuais do estresse hídrico imposto pela suspensão total das regas foram mais lentos no período do inverno, sendo que as plantas submetidas à dessecação mantiveram aparência normal até o 12º dia, seguida por lenta desidratação com enrolamento foliar até o 20º dia e então perda intensa da coloração verde até o 24º dia (Figura 5). Após 16 horas de reidratação, as folhas estavam completamente turgidas e, após 41 horas, parte das folhas já apresentava coloração esverdeada. As folhas adquiriram coloração verde, semelhante ao controle, após 90 horas.

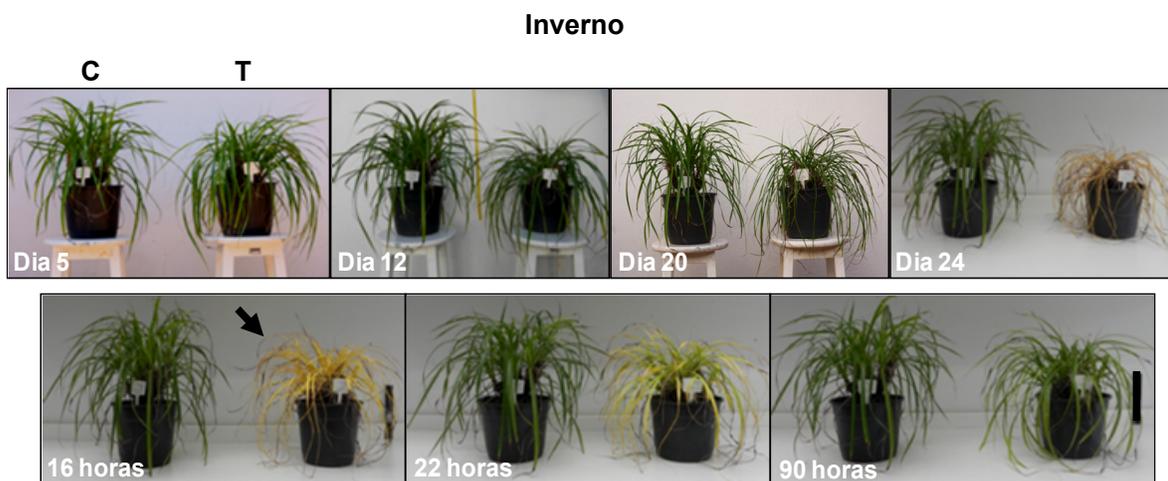


Figura 5. Aspecto geral das plantas *Barbacenia purpurea* durante a imposição do déficit hídrico e posterior reidratação, em período de inverno, com regime de regas diárias (C – grupo controle - vaso da esquerda) e suspensão total de rega (T – grupo tratado - vaso da direita). Barra = 15 cm. A seta indica o dia da reidratação.

A figura 6 apresenta o aspecto geral das plantas durante a desidratação no experimento do verão. Com a suspensão da rega no grupo tratado (vaso da direita), as plantas mantiveram aparência normal até o 6º dia, seguido por rápida desidratação e enrolamento foliar nos 7º e 8º dia, sendo a partir do 9º dia observada a degradação da clorofila e o amarelecimento das folhas. Com 16 dias de déficit hídrico, a clorofila havia sido completamente degradada e as folhas encontravam-se com o TRAf próximo aos 10% (figura 7), indicando estado de anabiose, o qual foi mantido até o 20º dia de dessecação. Com 36 horas após a retomada do regime de rega, as folhas apresentavam-se túrgidas e parte delas já apresentava coloração esverdeada (figura 6). Com a reidratação do substrato, foi possível observar que tanto a hidratação foliar quanto a síntese da clorofila iniciam-se da base da folha em direção ao ápice.

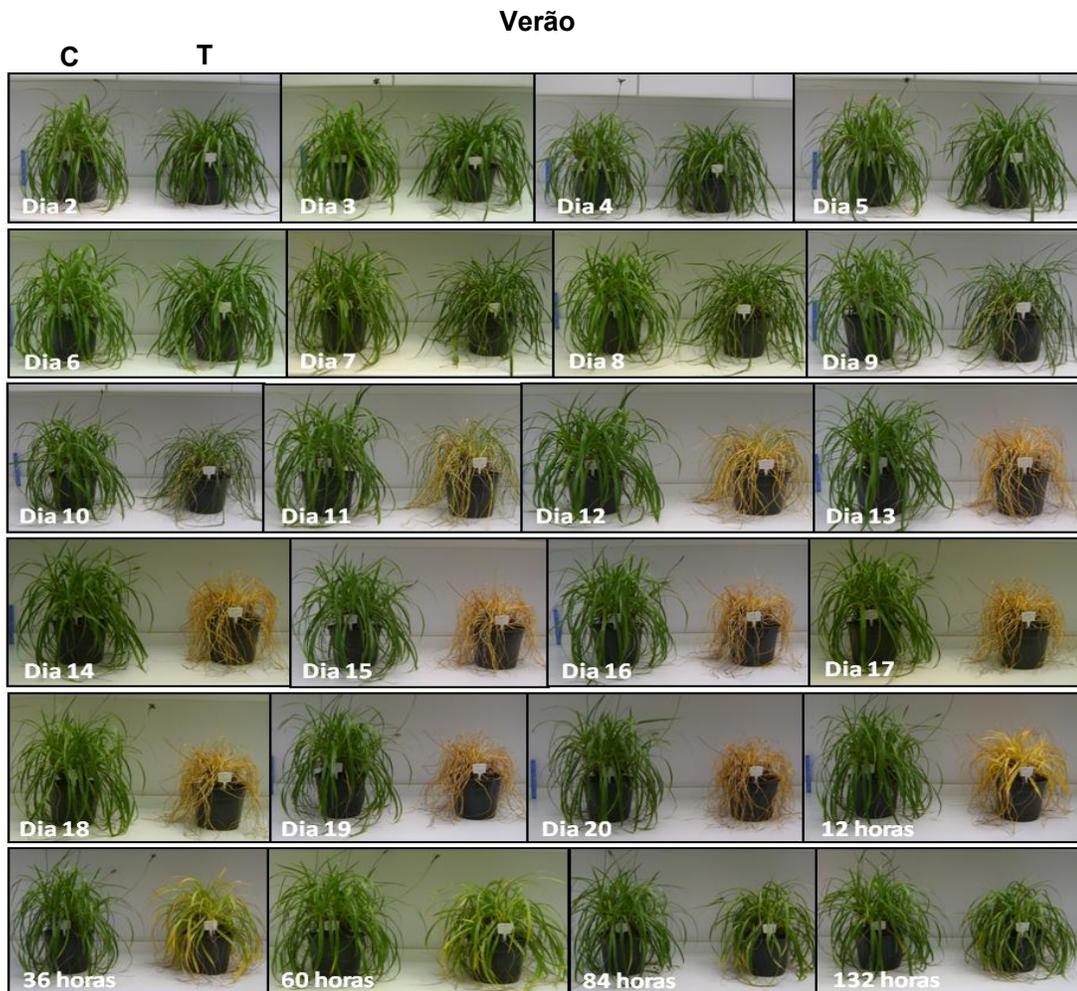


Figura 6. Aspecto geral das plantas *Barbacenia purpurea* durante a imposição do déficit hídrico e posterior reidratação, em período de verão, com regime de regas diárias (C – grupo controle - vaso da esquerda) e suspensão total de rega (T – grupo tratado - vaso da direita). Barra = 15 cm. A seta indica o dia da reidratação.

Diferenças significativas no TRAf (figura 7A) e ψ_w (figura 8A) das plantas submetidas à dessecação em relação às do controle, no inverno, foram observadas somente a partir do 20º e 16º dias, respectivamente. Já no experimento de verão, diferenças significativas entre os tratamentos (figuras 7B e 8B) foram observadas já a partir do 8º dia.

No experimento do inverno, o TRAf, no grupo tratado (figura 7A) manteve-se no mesmo nível do controle até o 8º dia, sendo reduzido para 74% no 16º dia e chegando a 29% no 24º dia. Doze horas após a reidratação, as plantas apresentavam 38% do TRAf e 85% após 36 horas do retorno da rega. Ao contrário do inverno, o TRAf do experimento realizado no verão (figura 7B) decresceu rapidamente com a imposição do déficit hídrico atingindo 9% no 16º dia. Após a reidratação, o TRAf aumentou gradativamente chegando a valores próximos aos do grupo controle com 132 horas (82% T, 91% C) após a retomada da rega.

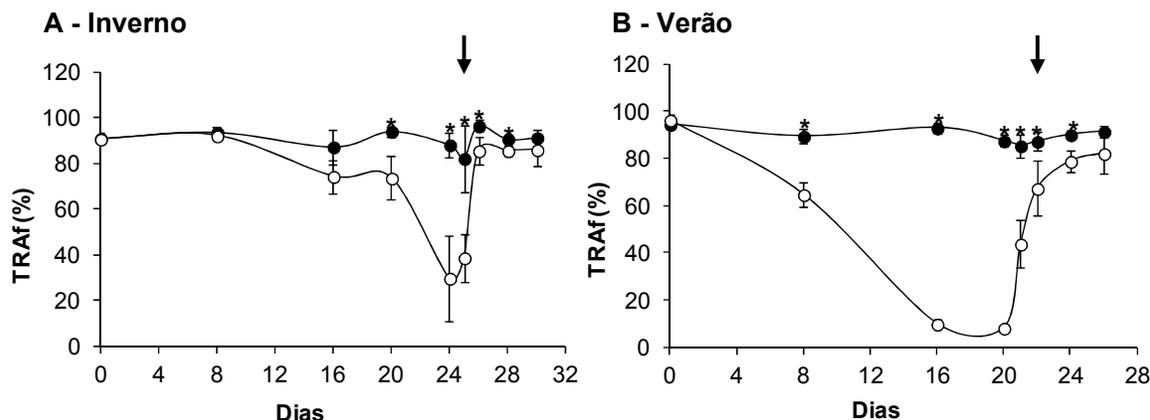


Figura 7. Teor relativo de água em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Em relação à disponibilidade de água nas folhas de *B. purpurea*, foi observado que no inverno o Ψ_w manteve-se estável até o 8º dia (-0,3 MPa), seguido de redução considerável à -1,4 MPa no 16º dia e chegando a condições indetectáveis pelo método utilizado no 20º dia (figura 8A). Com a reidratação, houve um aumento da disponibilidade hídrica nas folhas após 12 horas (-0,5 MPa), alcançando valores iguais ao grupo controle. O Ψ_w , no verão, decresceu rapidamente até o 8º dia (-2,4 MPa), atingindo valores indetectáveis no 16º dia e, assim como no experimento de inverno, com 12 horas após a reidratação, a disponibilidade hídrica foi de -0,4 MPa, valor semelhante ao detectado no controle (figura 8B).

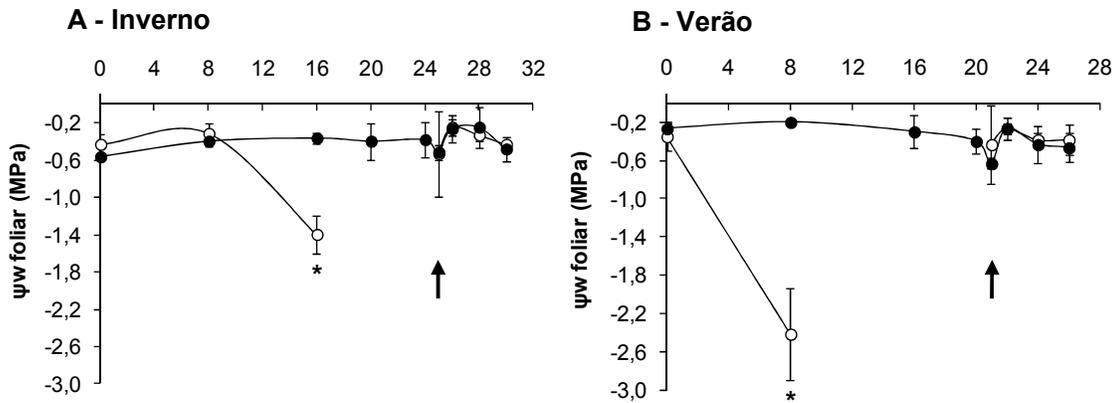


Figura 8. Potencial hídrico das folhas (Ψ_w) de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Os dados de fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (g_s) e concentração interna de CO_2 (C_i) dos experimentos realizados no inverno e no verão, estão representados na figura 9. Problemas com o analisador de gases no infravermelho (IRGA) durante o experimento de verão impossibilitaram as realizações de medidas nos pontos referentes ao 1º, 8º e 16º dias.

Em plantas submetidas à dessecação foi observado, no experimento de inverno (figura 9A), que a partir do 8º dia ocorre redução da taxa fotossintética, que se intensificou no 16º dia ($1,4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), enquanto o controle atingiu $9,8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no mesmo dia de avaliação. A taxa fotossintética das plantas tratadas decresceu a valores próximos a $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no 22º dia de experimento. No experimento realizado no verão (figura 9B), as taxas fotossintéticas chegaram a valores muito inferiores aos detectados no grupo controle ($T = 1,36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $C = 12,61 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) aos 20 dias de imposição da seca. Com a reidratação, em ambos experimentos, o grupo tratado apresentou taxas fotossintéticas próximas ao grupo controle com 84 horas da retomada da rega.

As taxas de transpiração (E , figuras 9 C e D) e condutância estomática (g_s , figuras 9 E e F), variaram de forma similar ao observado para a fotossíntese nas plantas submetidas ao déficit hídrico, que com 20 dias após a imposição da seca chegaram a valores indetectáveis em ambos experimentos. De uma forma geral, a concentração interna de CO_2 (C_i , figura 9 G e H) não apresentou alterações significativas nos experimentos realizados.

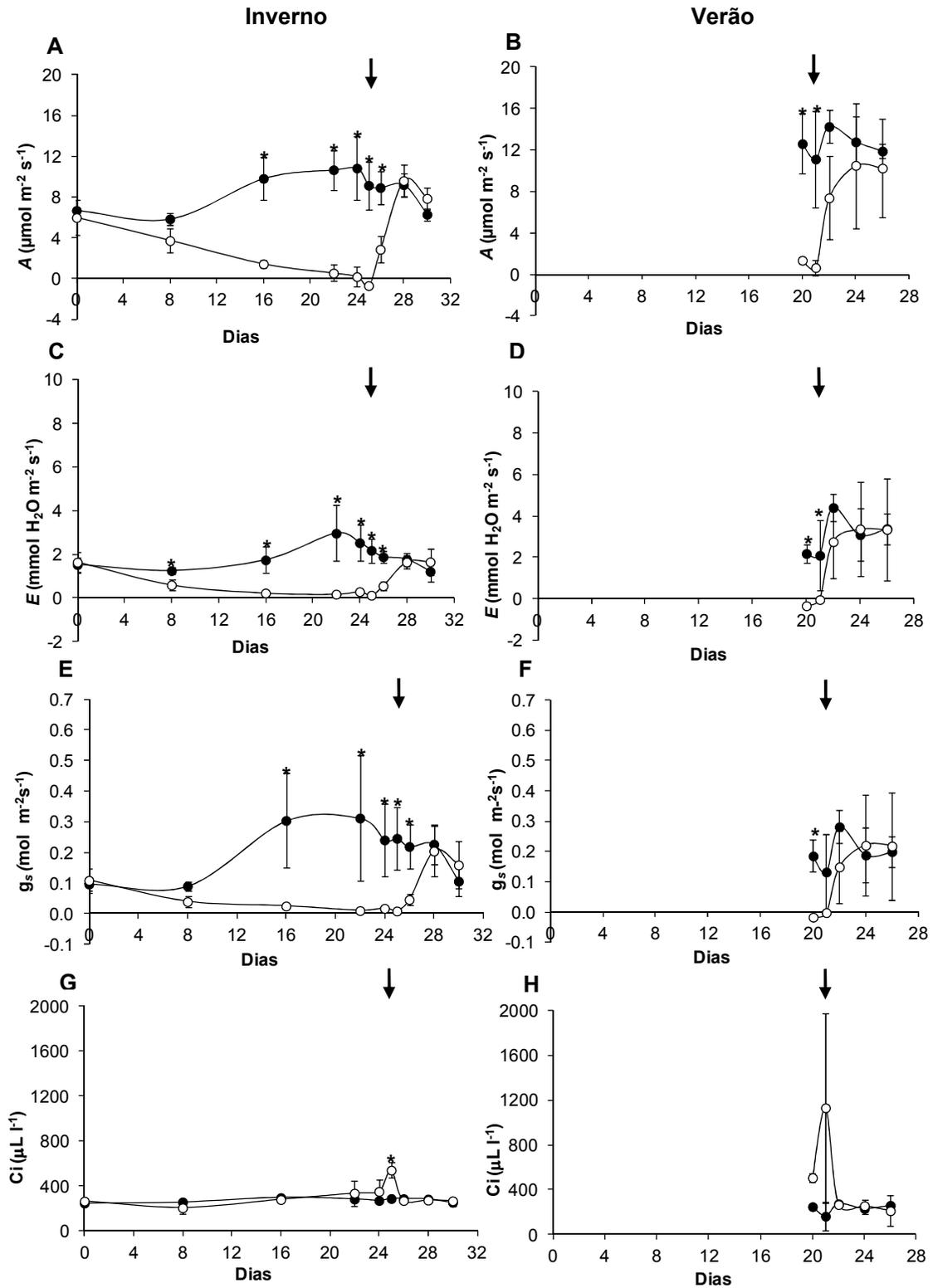


Figura 9. Fotossíntese líquida (A e B), transpiração (C e D), condutância estomática (E e F) e concentração interna de CO_2 (G e H) em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A figura 10 apresenta a quantificação dos pigmentos fotossintéticos em função do déficit hídrico. O conteúdo de clorofila *a* não variou significativamente entre os grupos controle e tratado até o 20º dia após a imposição do déficit hídrico no experimento de inverno (figura 10C). A partir do 24º dia e nas primeiras 36 horas após a retomada da irrigação, os valores chegaram próximos a 0 mg g⁻¹ da massa seca (MS), subindo lentamente para 1,7 mg g⁻¹ MS até 132 horas após a reidratação. No verão (figura 10D), houve queda acentuada de clorofila *a* do 8º ao 16º dia, de 5,7 mg g⁻¹ MS a valores indetectáveis. Com a reidratação, a clorofila *a* do grupo tratado somente foi detectada após 84 horas (1,7 mg g⁻¹ MS), com valores inferiores aos encontrados no controle.

Quanto ao conteúdo de clorofila *b*, no inverno (figura 10E) houve decréscimo significativo a partir do 20º dia chegando a valores indetectáveis no 24º dia de experimento. No verão (figura 10F) a clorofila *b* manteve-se constante até o 8º dia, com valores similares aos do grupo controle (2,2 mg g⁻¹ MF), havendo redução drástica a níveis indetectáveis no 16º dia. Em ambos experimentos, houve a ocorrência da biossíntese *de novo* de clorofila *b* a partir de 84 horas da retomada do regime de regas.

O conteúdo de clorofilas totais foi reduzido, a partir do 20º dia no experimento de inverno (figura 10A) e do 8º dia no experimento do verão (figura 10B). Em ambos experimentos, os valores de clorofilas totais do grupo tratado não alcançou os conteúdos do grupo controle após a reidratação.

A razão clorofila *a/b* diminuiu em resposta ao déficit hídrico nos experimentos de inverno e verão (figura 10G e H), retornando ao seu valor inicial após a reidratação.

O conteúdo de carotenoides totais apresentou aumento significativo em relação ao controle somente a partir da reidratação no inverno (figura 10I), enquanto que no verão apresentou decréscimo no 16º e 20º dias de imposição ao déficit hídrico, e aumento significativo com 12 horas após a rega (figura 10J).

A razão clorofila total /carotenoides decresceu a partir do 20º de imposição ao déficit hídrico no inverno e do 8º dia no verão (dados não mostrados), indicando degradação mais acentuada das clorofilas em relação aos carotenoides.

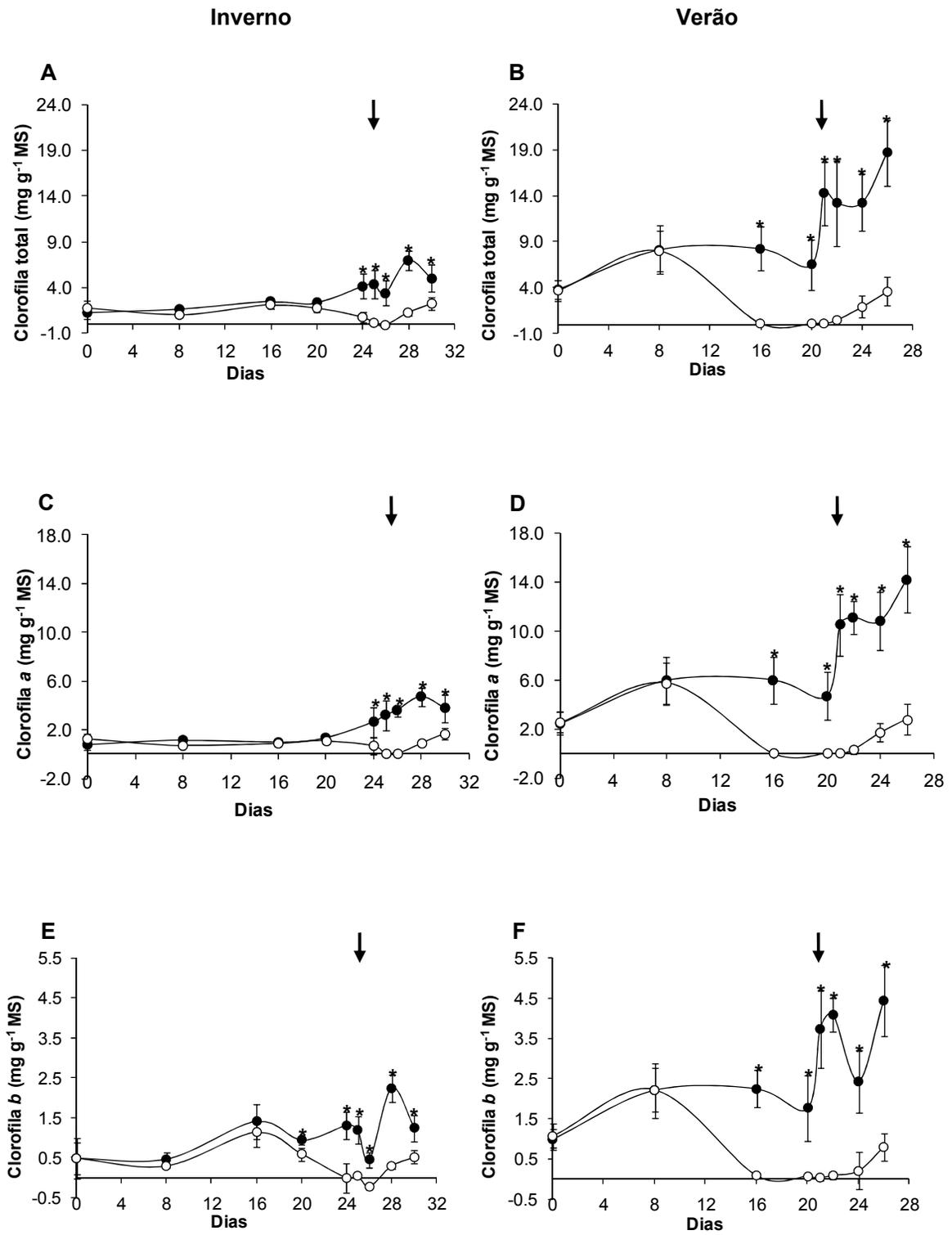


Figura 10. Continua ...

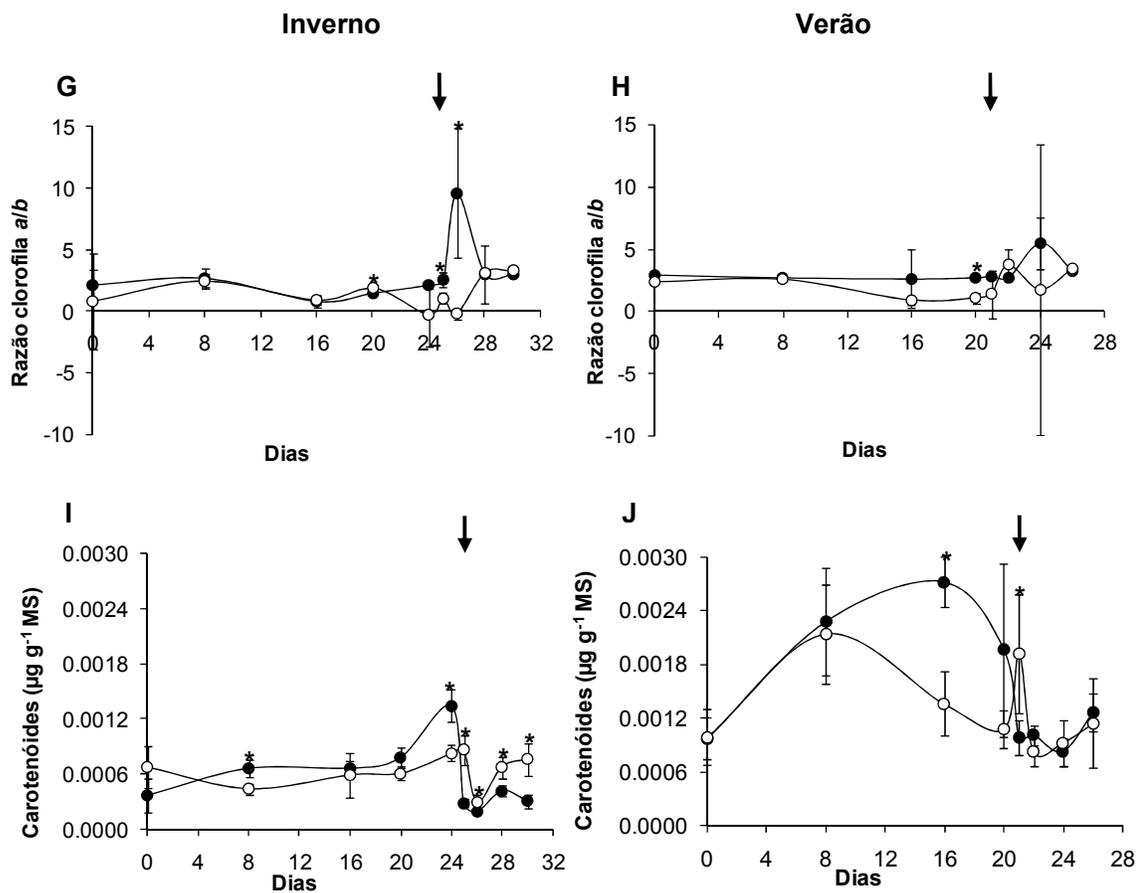


Figura 10. Conteúdo total (A e B), clorofila *a* (C e D), clorofila *b* (E e F), razão clorofila *a/b* (G e H) e carotenoides (I e J) em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

4.3 Respostas bioquímicas

A análise do conteúdo total de carboidratos solúveis (figura 11) revelou aumento do teor em função do déficit hídrico. No inverno, o conteúdo de carboidratos totais aumentou 1,8 vezes até o último dia de imposição à seca chegando a 90 mg g⁻¹ MS no 24º dia, enquanto que no verão, esse aumento ocorreu mais rapidamente, atingindo 83 mg g⁻¹ MS no 16º dia, correspondendo a um aumento de 1,9 vezes. Nas duas estações, os teores de carboidratos retornam a valores semelhantes ao do controle com 36 horas após a reidratação.

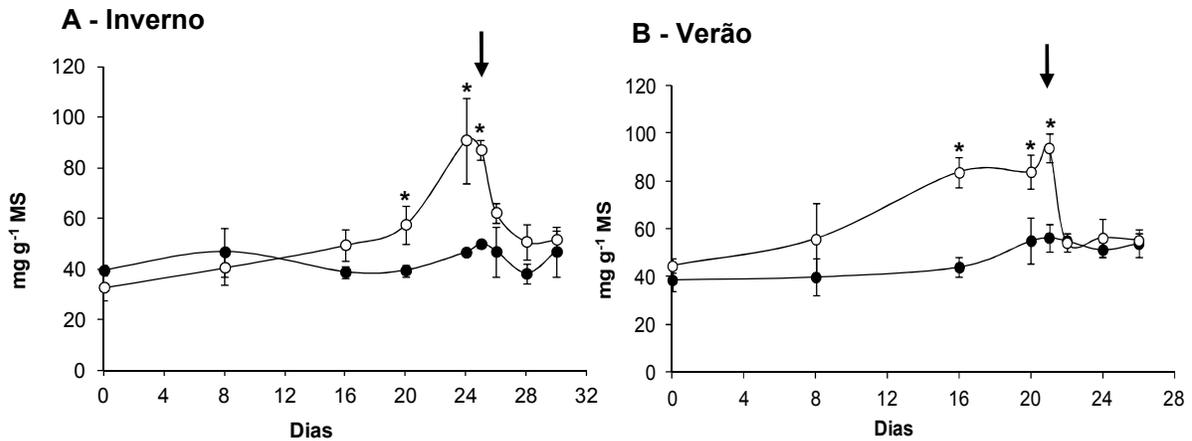


Figura 11. Determinação de carboidratos solúveis totais em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

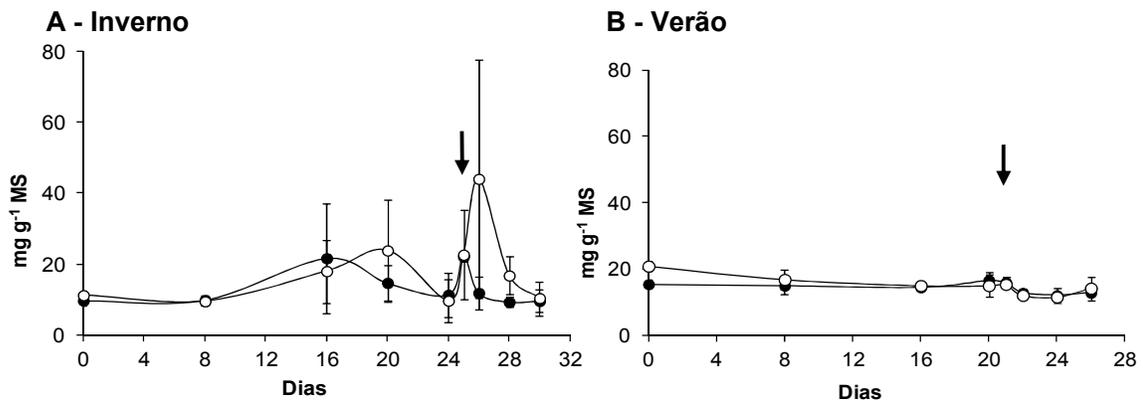


Figura 12. Determinação de carboidratos redutores em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Os carboidratos detectados nas amostras por HPAEC/PAD foram glicose, frutose, sacarose e os oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose, além de polióis (figura 13). Coerente com as quantificações de açúcares redutores (figura 12), não foram observadas variações significativas nos teores de glicose e frutose (figura 13C, D, E e F). Dentre os açúcares analisados, as quantidades de sacarose, rafinose, estaquiase e verbascose variaram expressivamente entre os grupos com a imposição do déficit hídrico, nos experimentos de inverno e verão (figura 13). O teor de estaquiase aumentou 7 vezes no inverno e 5,9 vezes no verão, enquanto que verbascose, ausente no início dos experimentos, não apresentou aumento significativo no inverno, porém aumentou 3,8 vezes no verão.

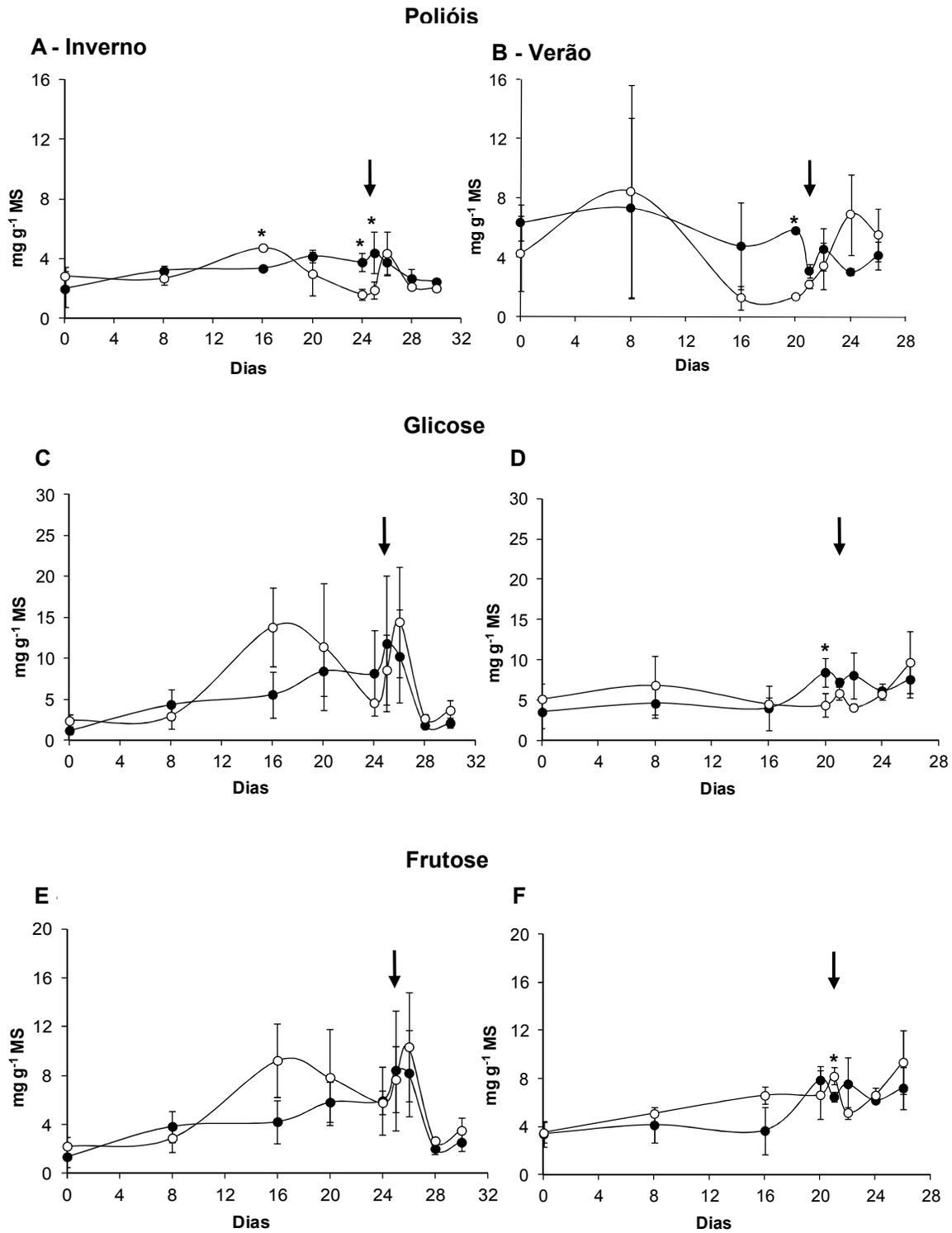


Figura 13. Continua ...

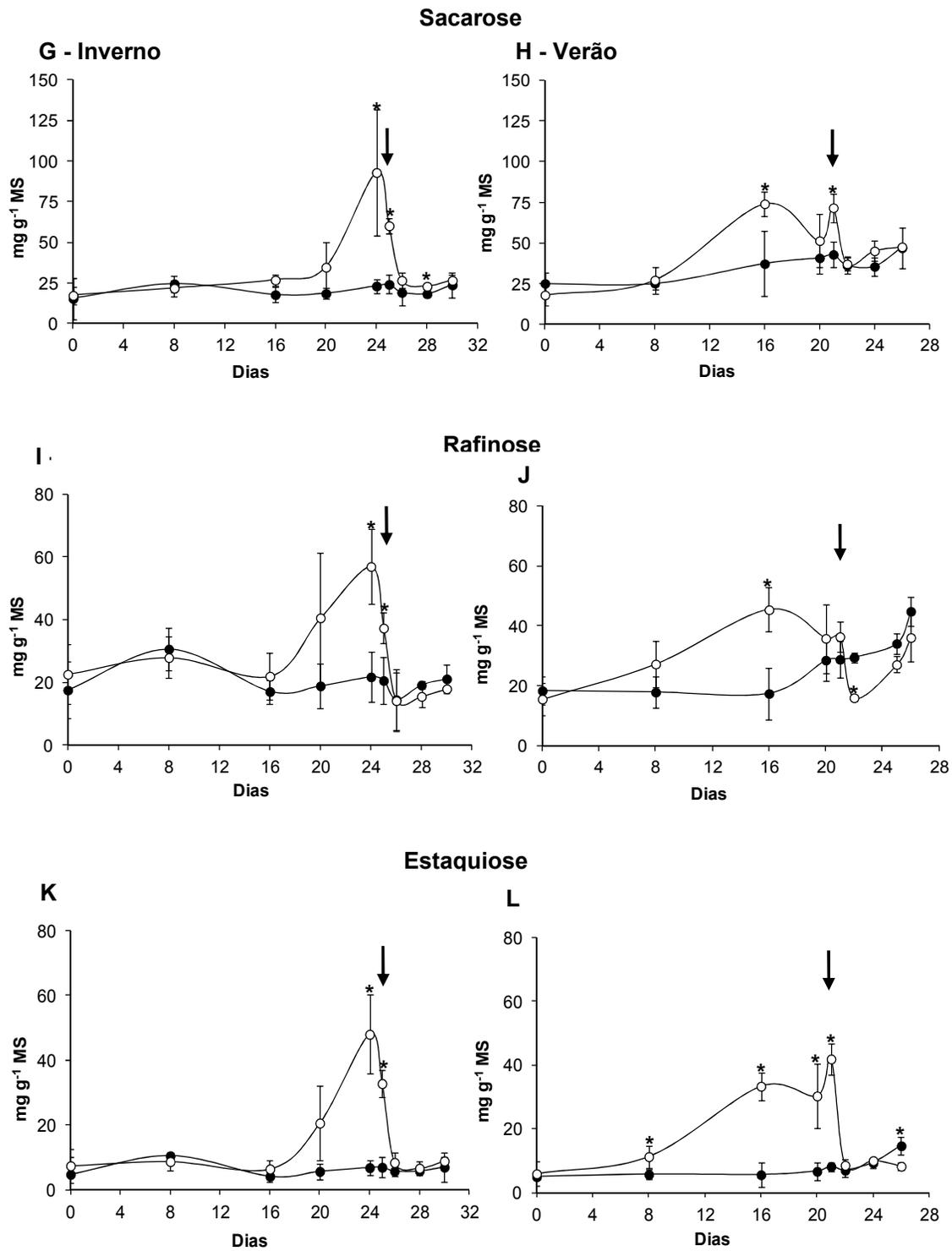


Figura 13. Continua ...

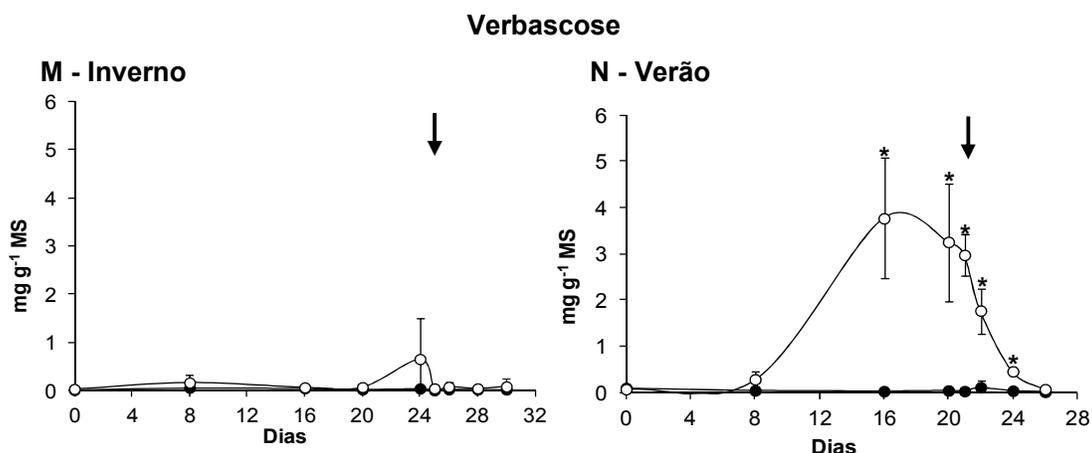


Figura 13. Teor de carboidratos solúveis determinados por HPAEC/PAD, (A e B) polióis, (C e D) glicose, (E e F) frutose, (G e H) sacarose, (I e J) rafinose, (K e L) estaquiose, (M e N) verbascose em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A figura 14 apresenta a porcentagem relativa de carboidratos solúveis e polióis identificados por análise em HPAEC/PAD, no qual se observa predomínio de sacarose e rafinose em condições normais nas folhas de *B. purpurea*, sendo que juntos correspondem a um valor médio de 72% do total quantificado no dia 0, em ambos os experimentos (figura 14A e B).

Com a imposição do déficit hídrico no inverno (figura 14A), houve redução de polióis (de 5% no dia 0 para 1% no 24º dia) e aumento de glicose e frutose no 20º dia, seguido de decréscimo no 24º dia. Sacarose aumentou de 32% no dia 0 para 44% no 24º dia. Além disso, foi observado aumento dos níveis de estaquiose de 14% (dia 0) para 23% com 24 dias e este aumento coincidiu com redução de 14% nos níveis de rafinose, indicando uma possível conversão de rafinose a estaquiose. Com a retomada da rega, observou-se que as alterações nos níveis de carboidratos foram mantidas até 12 horas após a reidratação.

No verão (figura 14B), houve decréscimo de 7%, 8% e 3% nos teores de polióis, glicose e frutose, respectivamente, os quais foram mantidos até 20º dia de imposição do déficit hídrico. Foi observado ainda aumento de sacarose (de 34% no dia 0 para 44%) e estaquiose (de 11% para 20%), síntese do oligossacarídeo verbascose (2%) e redução de rafinose (de 30% para 27%) no 16º dia de imposição ao déficit hídrico. No 20º dia foi observada redução de sacarose de 44% para 39% no 20º dia, concomitantemente ao aumento

de 3% de estaquiase. Com a reidratação, foi observado aumento de 3% nos teores de sacarose, 2% nos teores de estaquiase e decréscimo de 6% nos níveis de rafinose.

A - Inverno

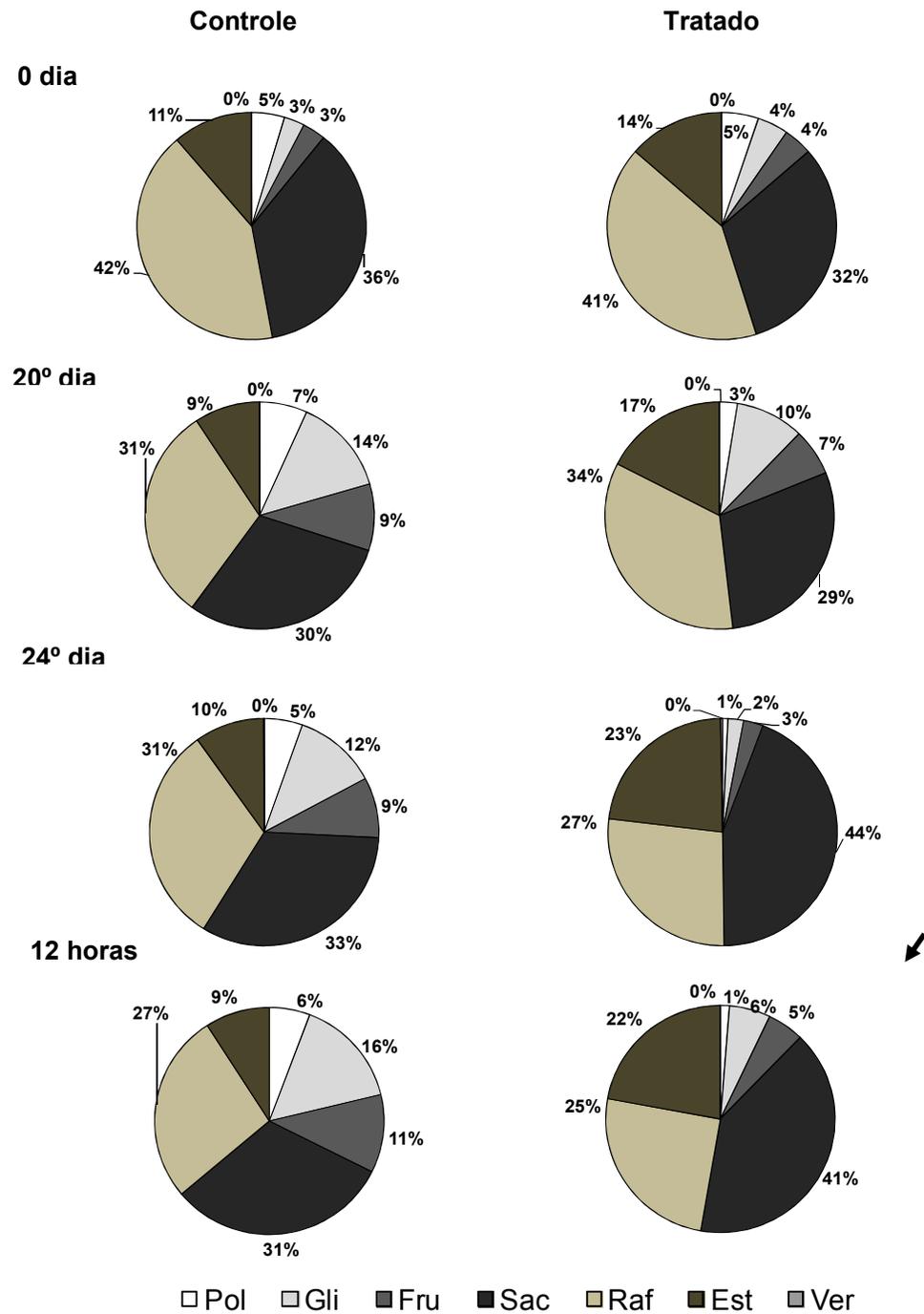


Figura 14. Continua ...

B - Verão

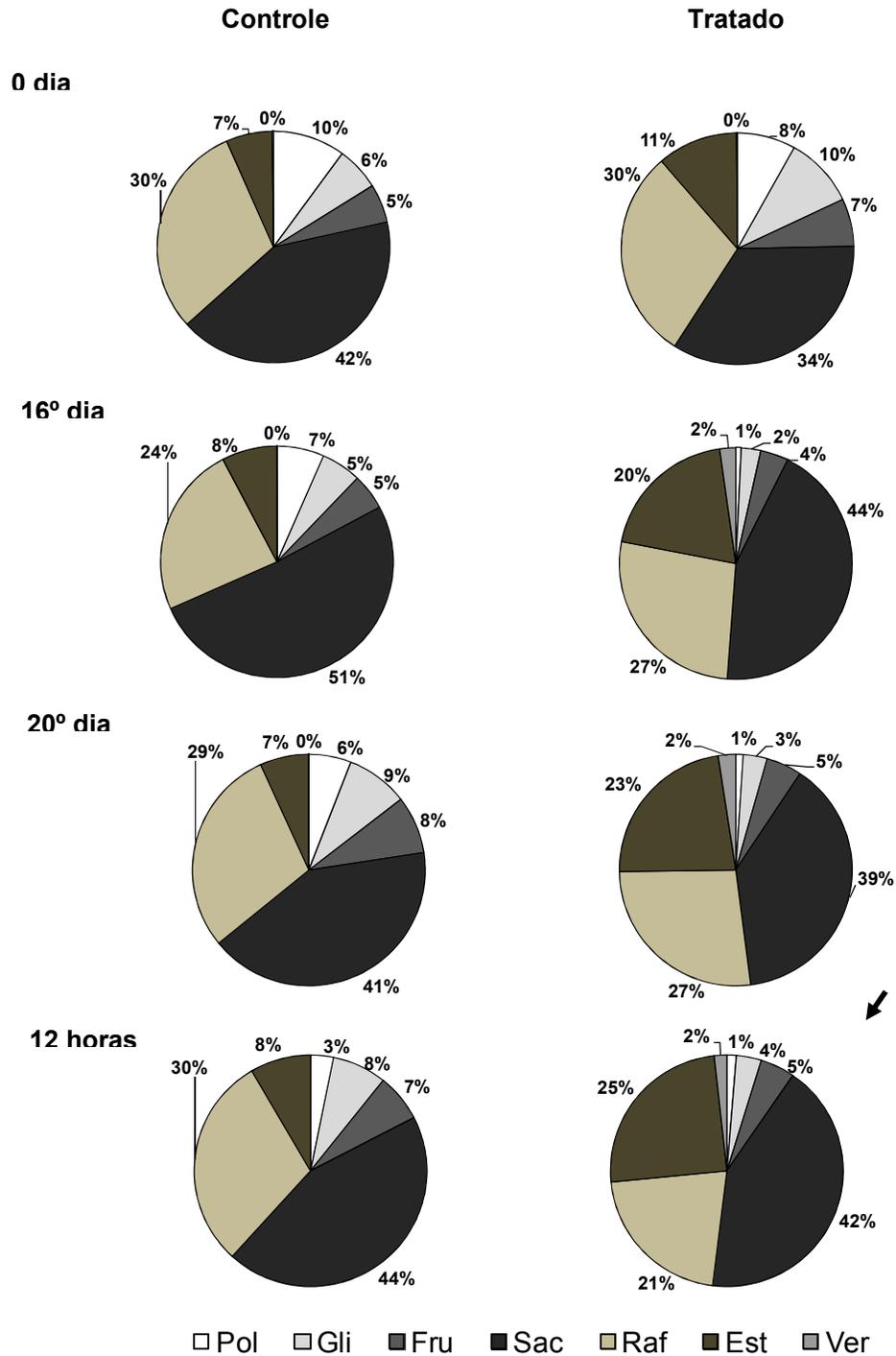


Figura 14. Porcentagem relativa de carboidratos solúveis e polióis obtidos por análise em HPAEC/PAD em folhas de *Barbacenia purpurea* durante o período de inverno (A) e verão (B). A seta indica o início do período de reidratação. Pol = polióis; Gli = glicose; Fru = frutose; Sac = sacarose; Raf = rafinose; Est = estaquiose; Ver = verbascose.

A quantificação de amido nas folhas (figura 15A e B) revelou a mobilização ou alocação deste polissacarídeo de reserva, cujos níveis foram indetectáveis com a imposição de seca às plantas. Esta mobilização coincidiu com o aumento do teor de carboidratos solúveis, conforme observado nas figuras 11, 13 e 14. Com a retomada do regime de rega, observou-se que a síntese de amido foi iniciada com aproximadamente 36 horas.

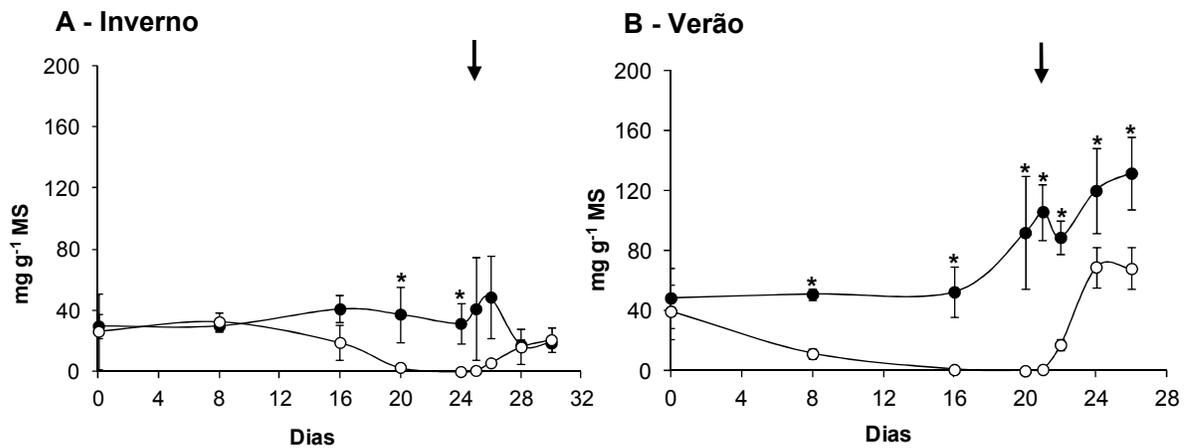


Figura 15. Quantificação de amido em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica o dia da reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

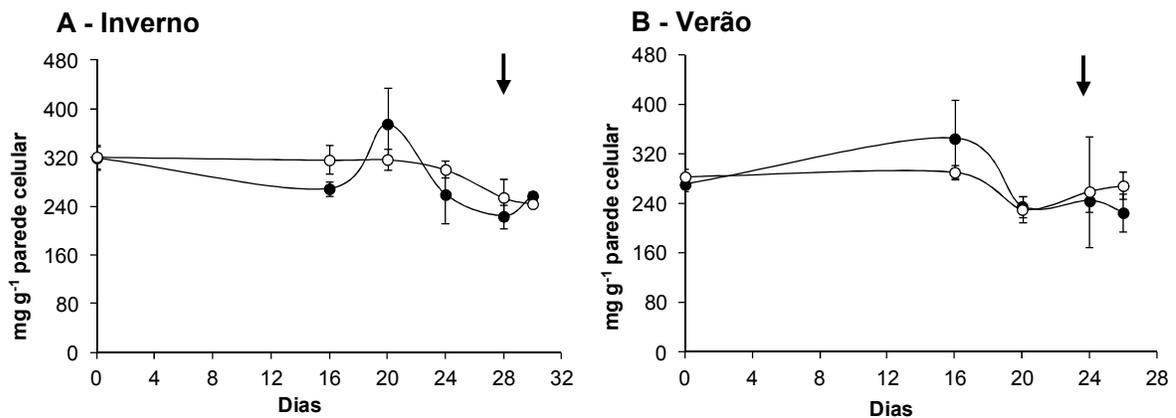


Figura 16. Teor de carboidratos totais da parede celular bruta de folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica coletas após a reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Valores expressos em relação à massa seca de parede celular.

Não foi observada diferença significativa no teor de carboidratos totais após hidrólise ácida de polissacarídeos não celulósicos da parede celular de folhas de *B. purpurea* nos dois experimentos realizados, conforme mostrado na figura 16. Entretanto, foi observado, no final do período de dessecação e na reidratação, aumento significativo no teor de ácidos urônicos no experimento de inverno (figura 17A). Quanto ao experimento realizado no verão (figura 17B) não houve aumento significativo ao longo do experimento, exceto no último dia de coleta para as plantas sob déficit hídrico submetidas à reidratação

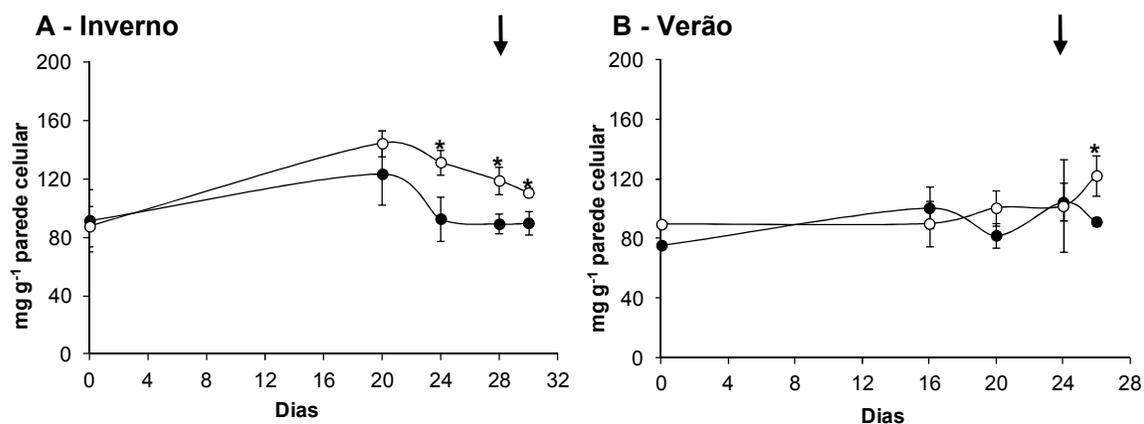


Figura 17. Teor de ácidos urônicos da parede celular de folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica coletas após a reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Valores expressos em relação à massa seca de parede celular.

A análise por HPAEC/PAD da composição dos monossacarídeos neutros da parede celular bruta de folhas de *B. purpurea* revelou a presença de xilose como monossacarídeo majoritário, correspondendo a cerca de 48%, seguido por glicose (22%), galactose (13%) e arabinose (11%). Ramnose e fucose representaram apenas 6% dos monossacarídeos (figura 18). Não foram observadas diferenças significativas na composição de monossacarídeos da parede celular entre os grupos tratado e controle e entre os períodos de inverno e verão.

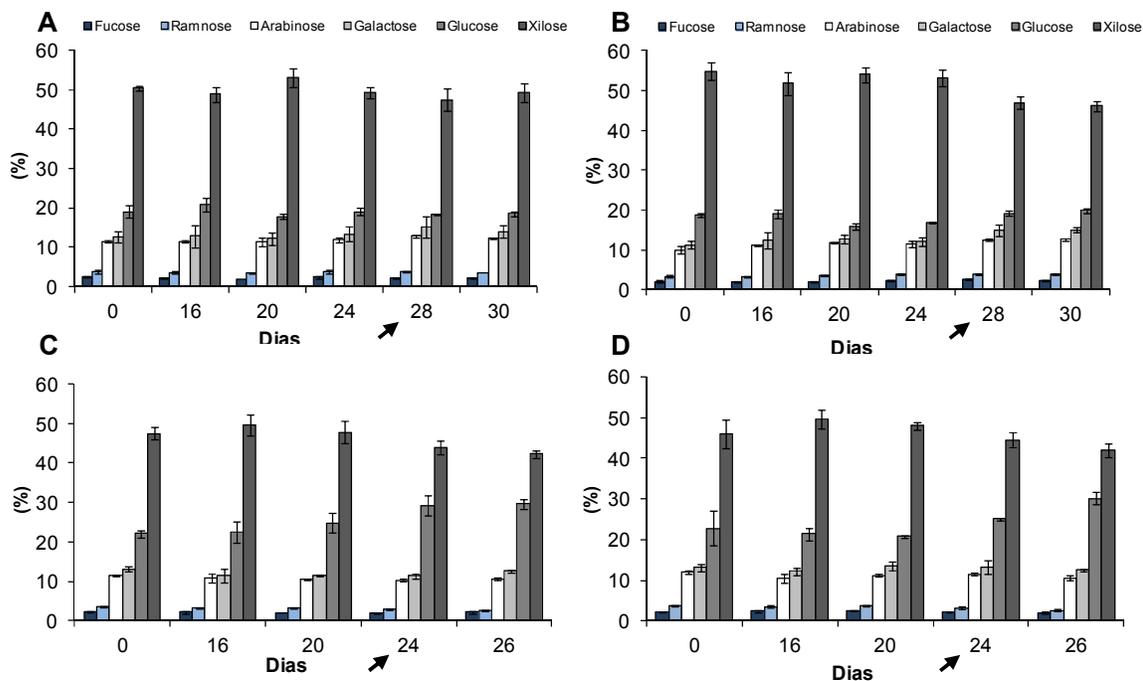


Figura 18. Composição relativa de monossacarídeos neutros da parede celular de folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - A e C) e suspensão total de rega (grupo tratado - B e D) durante o inverno (A e B) e verão (C e D). A seta indica coletas após a reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A análise quantitativa da atividade antioxidante pelo método de DPPH (figura 19) revelou tanto no experimento de inverno, quanto no de verão, que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, embora tenha sido observada tendência de aumento nas plantas tratadas no período de inverno (figura 19B)

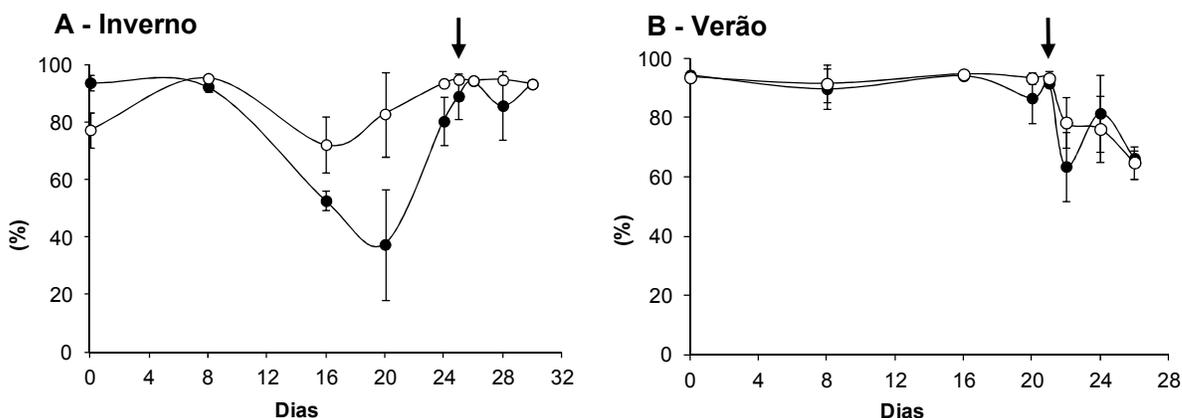


Figura 19. Atividade antioxidante em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno (A) e verão (B). A seta indica coletas após a reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. A porcentagem foi calculada tendo como referência o flavonol quercetina.

A análise do perfil metabólico nos grupos controle e tratado, nos experimentos de inverno e verão, permitiu a identificação de 43 compostos, sendo 24 ácidos orgânicos, 9 carboidratos, 7 polióis, além de 3 outros metabólitos, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Compostos identificados por CG/EM em folhas de *Barbacenia purpurea* nos grupos controle e tratado, nos experimentos de inverno e verão.

Ácidos orgânicos	Carboidratos
Ácido transcafeoilquínico	Glicose
Ácido 1-trans-cafeoilquínico	Frutose/sorbose
Ácido 3-trans-cafeoilquínico	Galactose
Ácido 4-trans-cafeoilquínico	Manose
Ácido 5-trans-cafeoilquínico	Rafinose
Ácido ascórbico	Sacarose
Ácido cafeico	Trealose
Ácido chiquímico	Xilose
Ácido cítrico	Polióis
Ácido fosfórico	Arabinitol
Ácido fumárico	Galactinol
Ácido galactônico	Galactosilglicerol
Ácido glicérico	Glicerol
Ácido hexadecanóico	Manitol/sorbitol
Ácido isocítrico	Mio-inositol
Ácido láctico	Treitol
Ácido málico	Xilitol/arabitol
Ácido octadecanóico	Outros metabólitos
Ácido oxálico	Quercetina
Ácido quínico	Tributilbenzenotiol
Ácido ribônico	3-fluoro-5 (trifluorometil) benzaldeído
Ácido succinico	
Ácido tetradecanóico	
Ácido treônico 1,4-lactona	

Na figura 20 estão representadas as proporções relativas dos ácidos orgânicos detectados pela análise em CG/EM que apresentaram diferença significativa em resposta à imposição ao déficit hídrico nos experimentos realizados no inverno e no verão.

A proporção relativa de ácido fumárico aumentou após 16 dias de déficit hídrico, no experimento de inverno (figura 20A), retornando a níveis semelhantes aos do controle após a reidratação. No experimento de verão (figura 20B), os níveis detectados apresentaram decréscimo de suas proporções relativas quando comparados com o grupo controle.

O perfil de ácido chiquímico comportou-se de forma semelhante, em ambos os experimentos (figura 20C e D), havendo aumento de suas proporções nos primeiros dias de deficiência hídrica e redução a níveis indetectáveis com a intensificação do déficit hídrico. Com 12 horas após a retomada do regime de regas, o ácido chiquímico foi novamente detectado e retornou a níveis próximos aos do controle, que foram mantidos até o final dos experimentos.

No experimento de inverno, o ácido quínico apresentou aumento em relação ao grupo controle no 16º dia de déficit hídrico, seguido por decréscimo na sua proporção no 20º dia. No verão, ocorreu comportamento semelhante ao inverno, com aumento no 8º dia, seguido de decréscimo no 20º dia. Com a reidratação, em ambos os experimentos a proporção encontrada nos grupos tratados foi semelhante à detectada nos grupos controles (figuras 20E e F).

No experimento de inverno, os ácidos *3-trans*-cafeoilquínico e *4-trans*-cafeoilquínico aumentaram significativamente aos 16 dias após a imposição do déficit hídrico (figuras 20G e I), enquanto que o ácido *5-trans*-cafeoilquínico apresentou apenas uma tendência de aumento neste mesmo ponto de coleta. Após a reidratação, os ácidos *3-trans*-cafeoilquínico e *5-trans*-cafeoilquínico, apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle (figuras 20G e K), enquanto que o ácido *4-trans*-cafeoilquínico apresentou aumento de suas proporções relativas em 12 horas após a reidratação. No verão o ácido *3-trans*-cafeoilquínico apresentou uma tendência de aumento no 8º dia, seguido por valores semelhantes ao controle no restante do experimento (figura 20H), inclusive após a reidratação. O ácido *4-trans*-cafeoilquínico, no verão, oscilou no início do experimento em relação ao controle, aumentando significativamente com 20 dias de imposição do regime de seca (figura 20J) e retornando a valores semelhantes ao controle após a retomada da rega. O ácido *5-trans*-cafeoilquínico apresentou proporção relativa inferior no grupo tratado quando comparado ao controle, oscilando ao longo do experimento (figura 20 F). Foi observado que, quando comparados os

experimentos de inverno e verão, foram encontradas cerca de 30 vezes mais ácidos clorogênicos no experimento do verão do que no inverno.

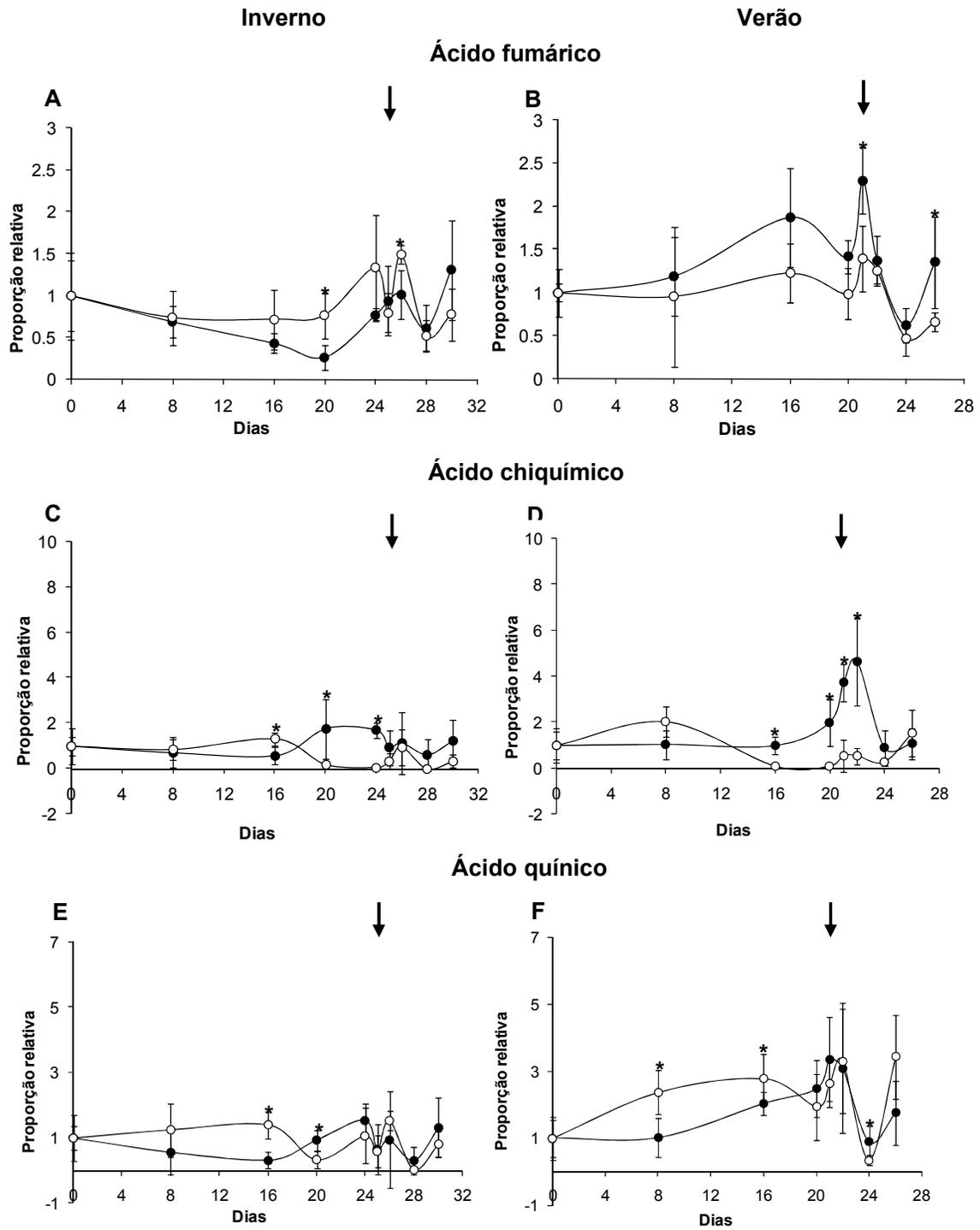
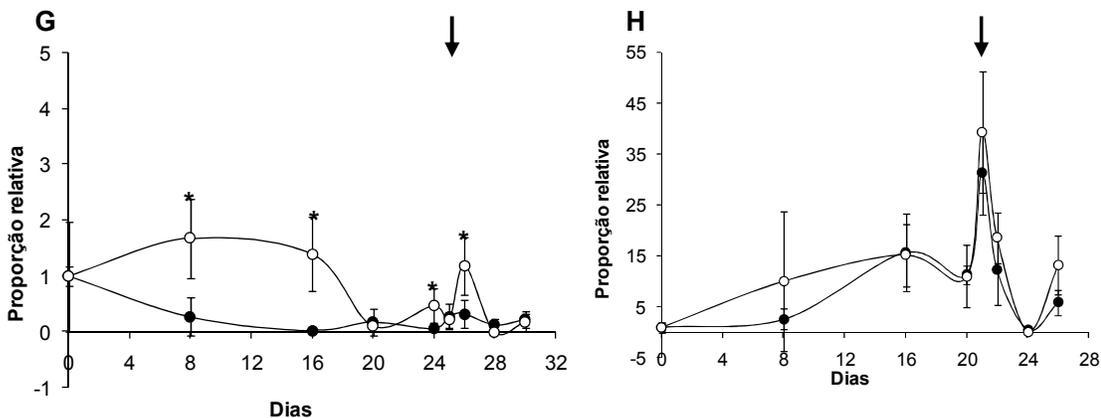
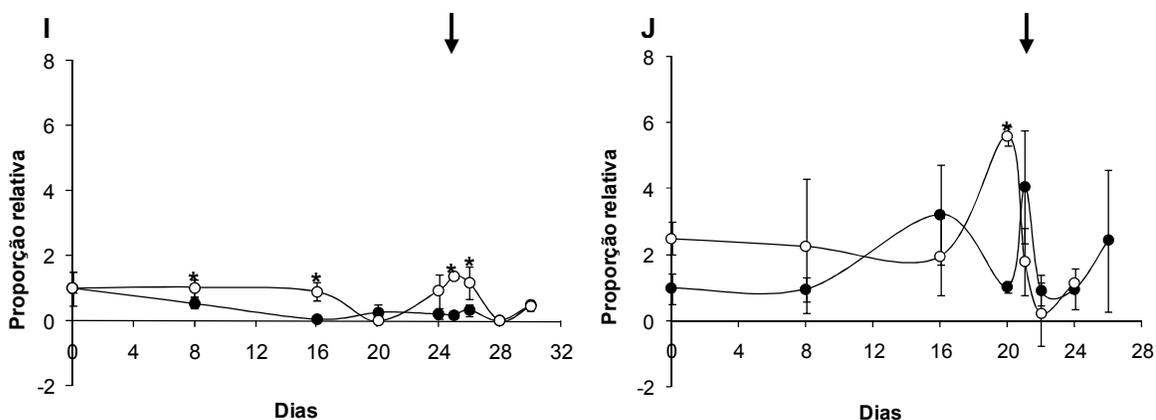


Figura 20. Continua ...

Ácido 3-*trans*-cafeoilquínico



Ácido 4-*trans*-cafeoilquínico



Ácido 5-*trans*-cafeoilquínico

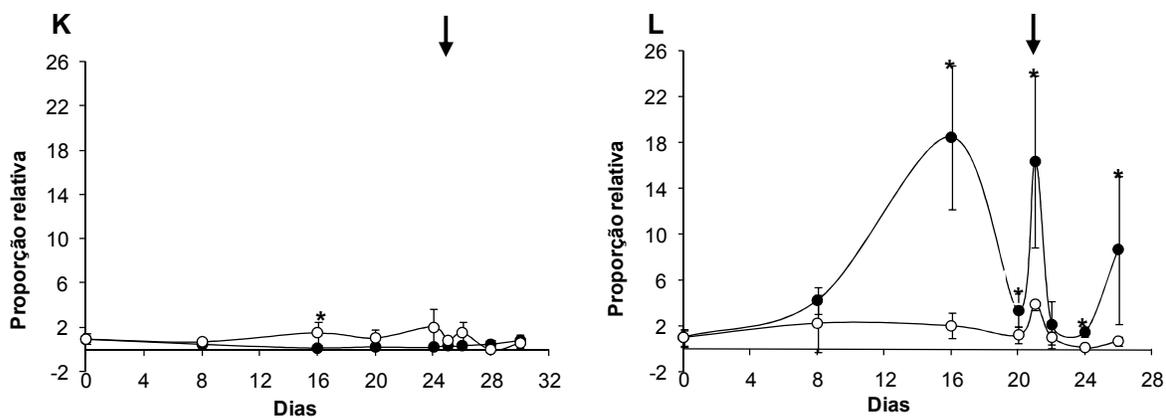


Figura 20. Proporção relativa de metabólitos identificados por CG/EM em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno e verão. A seta indica coletas após a reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). Os valores foram normalizados pela média do controle no dia 0. (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Corroborando com dados apresentados anteriormente (figura 13), ocorreu aumento dos teores de sacarose nas folhas de *B. purpurea* (figura 21A e B) com 8 dias no experimento de inverno e a partir do 8º dia no experimento de verão, acompanhando uma redução nos níveis de mio-inositol (figura 21C e D) em resposta ao déficit hídrico.

No inverno, galactinol apresentou aumento significativo na proporção aos 16 dias após a imposição do déficit hídrico, retornando a valores iguais aos do controle com a reidratação (figura 21E). Ao contrário do experimento do inverno, no verão foi observada tendência de aumento no 8º dia de imposição da seca, seguida por redução nas proporções relativas do grupo tratado (figura 21F).

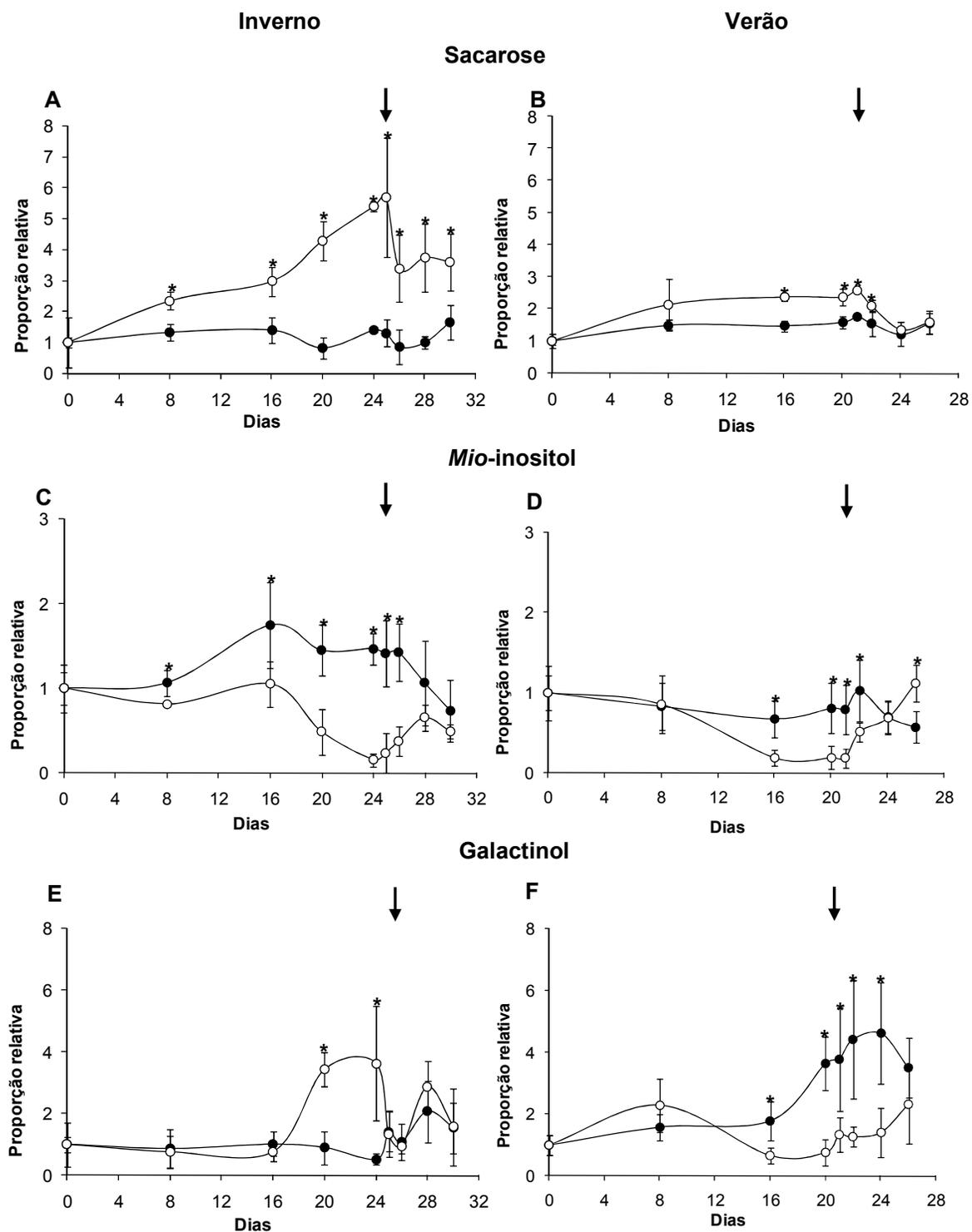


Figura 21. Proporção relativa de sacarose, *mio*-inositol e galactinol analisados por CG/EM em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o inverno e verão. A seta indica coletas após a reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). Os valores foram normalizados pela média do controle no dia 0. (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A tabela 3 apresenta a relação dos aminoácidos identificados por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector de UV, totalizando 23 aminoácidos. Esta análise foi realizada apenas para o experimento de verão devido à disponibilidade do equipamento.

Tabela 3. Aminoácidos identificados por análise em UPLC em folhas de *Barbacenia purpurea* nos grupos controle e tratado, no experimento de verão.

Aminoácidos	
Alanina	Isoleucina
Arginina	Leucina
Asparagina	Lisina
Aspartato	Metionina
Cisteína	Ornitina
Fenilalanina	Prolina
GABA (ácido gama-aminobutírico)	Serina
Glicina	Tirosina
Glutamato	Treonina
Glutamina	Triptofano
Histidina	Valina
Hidroxiprolina	

Os aminoácidos cuja quantidade apresentou diferença significativa ao longo do experimento de imposição do déficit hídrico, no verão, estão representados na figura 22. Asparagina aumentou consideravelmente com 8 dias de imposição à seca, diminuindo após 12 horas da retomada do regime de rega (figura 22A). O mesmo comportamento pôde ser observado para valina (figura 22D), serina (figura 22F), tirosina (figura 22G) e triptofano (figura 22H). GABA aumentou significativamente após o 8º dia de experimento (figura 22B). Histidina (figura 22C) apresentou aumento significativo em seu conteúdo aos 16 dias de déficit hídrico, no entanto, mesmo após 132 horas da reidratação, o conteúdo não atingiu os níveis detectados no controle.

Hidroxiprolina foi detectada após 8 dias do início do experimento, sendo mantida em níveis elevados durante toda a imposição de deficiência hídrica, sendo suas proporções reduzidas a níveis indetectáveis após 36 horas da retomada da rega.

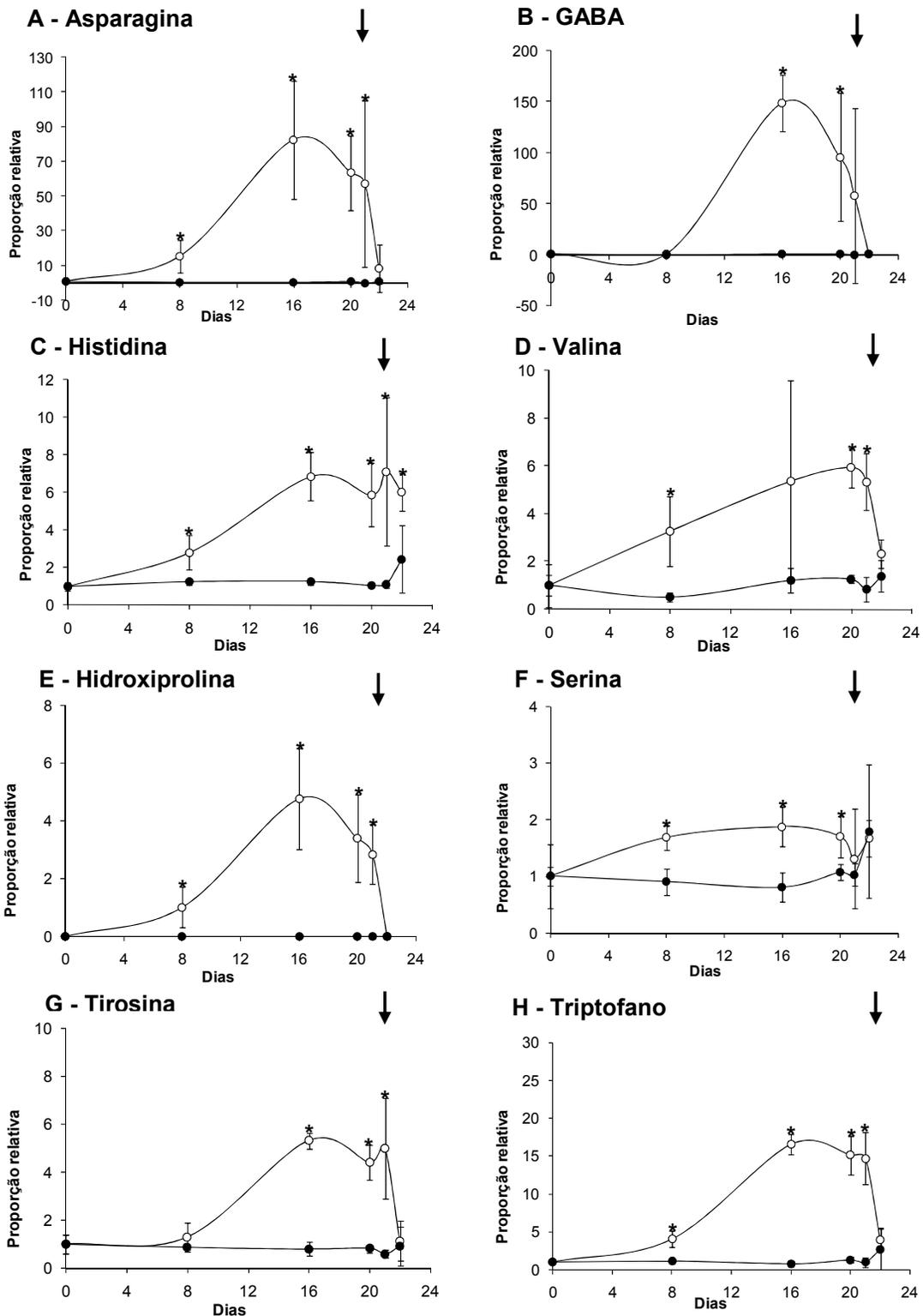


Figura 22. Proporção relativa dos aminoácidos identificados por UPLC em folhas de *Barbacenia purpurea* submetidas aos regimes de regas diárias (grupo controle - ●) e suspensão total de rega (grupo tratado - ○) durante o verão. A seta indica coletas após a reidratação. As barras indicam o desvio padrão (n=3). Os valores foram normalizados pela média do controle no dia 0. (*) Médias entre os grupos que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

5.1 Respostas ao déficit hídrico

Os experimentos de restrição hídrica na planta revivescente *B. purpurea*, nas estações de inverno e verão, revelaram que com a suspensão do regime de rega, o teor de umidade do solo (U_s , %) dos vasos foi reduzido, atingindo valores mínimos a partir do 22º dia no experimento do inverno (figura 4A) e a partir do 18º dia no experimento de verão (figura 4B), com valores de $U_s = 3,5$ e $2,0\%$, respectivamente. Estes dados assemelham-se àqueles descritos por Aidar *et al.* (2010) com a mesma espécie, entre os meses de julho e agosto de 2005, cujos valores mais baixos do conteúdo de água no solo foram registrados por volta do 16º dia. No verão, o decréscimo foi mais acentuado nos primeiros dias, resultado de maior gradiente de pressão de vapor no sistema solo-planta-atmosfera, devido às temperaturas mais elevadas, cujas máximas foram superiores a 40°C (figura 2B), levando a um aumento da transpiração foliar e evaporação de água do solo. Estes dados revelam que o tratamento foi eficiente na imposição do déficit hídrico nas duas épocas do ano.

Os indivíduos do grupo submetido ao déficit hídrico apresentaram um atraso na desidratação de seus tecidos foliares (figura 7A e B) quando comparados à redução do teor relativo de água no solo (figura 4A e B), nos experimentos de inverno e verão. Estes dados indicam, assim como verificado por Aidar (2005), que *B. purpurea* é uma planta homeohídrica típica, que apresenta, na fase inicial da deficiência hídrica, mecanismos de evitação da desidratação. Esses mecanismos incluem a diminuição da condutância estomática e a consequente diminuição da fotossíntese líquida e transpiração, reduzindo assim a perda de água na forma de vapor.

A desidratação dos tecidos foliares na estação do inverno ocorreu a partir do 16º dia, atingindo valores mínimos de TRAf ($29,7\%$) no 24º dia. No verão o TRAf foi drasticamente reduzido nos primeiros dias de experimento, antes mesmado 8º dia de imposição da restrição hídrica, chegando a $9,9\%$ do TRAf com 16 dias de imposição do déficit hídrico. Acompanhando a desidratação, ocorreu enrolamento das margens das lâminas foliares de *B. purpurea* em direção à nervura central, expondo a superfície adaxial à radiação, diferindo do relatado para *Xerophyta viscosa* cujo enrolamento ocorre em direção à superfície abaxial protegendo a superfície adaxial da exposição à luz (Sherwin & Farrant, 1998). Este enrolamento iniciou-se com TRAf entre $60-70\%$, em ambos experimentos e concomitantemente a um aumento na rigidez foliar. Com TRAf abaixo de 30% , ocorreu a

perda da coloração verde dos tecidos foliares. No experimento realizado por Aidar *et al.* (2010) foi verificado um padrão de desidratação semelhante, com redução do turgor foliar a um valor mínimo de 17% após 20 dias de imposição da dessecação, e também enrolamento foliar com alterações na cor e textura, com aumento na rigidez das folhas.

O conteúdo de clorofilas totais foi mantido mesmo em condições de intensa desidratação até o 20º dia de imposição do déficit hídrico no inverno e até o 8º dia no verão, sendo que com TRAf entre 30% (inverno) e 10% (verão), ocorreu a degradação das clorofilas *a* e *b*. Este comportamento evidencia a estratégia de peciloclorofilia, característica típica de monocotiledôneas (Farrant, 2000; Porembski & Barthlott, 2000) e indica que *B. purpurea* degrada os componentes do aparato fotossintético somente na etapa final da secagem, confirmando as observações prévias de Aidar *et al.* (2010).

Em experimento anterior (Aidar *et al.*, 2010), a concentração dos carotenoides totais manteve-se constante quando plantas de *B. purpurea* foram submetidas à dessecação. No experimento aqui descrito, houve redução da razão clorofilas totais/carotenóides nos indivíduos submetidos ao déficit hídrico, no inverno e verão, indicando que também não houve degradação intensa dos carotenóides, mas sim das clorofilas, sugerindo que estes metabólitos possam ter função importante na tolerância à dessecação nessa espécie.

As taxas fotossintéticas de plantas de *B. purpurea* submetidas ao tratamento de imposição do déficit hídrico neste experimento apresentaram padrões semelhantes às fases descritas por Aidar *et al.* (2010) (tabela 1). Foi verificado que até o 8º dia após a imposição do déficit, os valores de fotossíntese líquida (*A*) e condutância estomática (g_s) foram mantidos próximos aos do grupo controle (figura 9A e C) com TRAf acima de 90% (figura 7) e potencial hídrico (Ψ_w) de -0,3 MPa (figura 8A), coincidindo com a fase 1. Entre o 8º e 16º dia foi observado declínio da *A*, g_s , e da transpiração (*E*) (figura 9C) em TRAf entre 90 e 75% e Ψ_w entre -0,3 e -1,4 MPa, assim como relatado nas fases 2 e 3. Conforme verificado na fase 4, aos 20 e 24 dias, *A*, g_s e *E* atingiram valores indetectáveis, quando os TRAf chegaram próximos aos 30% e Ψ_w atingiu valores abaixo do limite de detecção do aparelho usado nas medidas. As diferenças relatadas quanto à duração das fases de resposta fotossintética observadas neste experimento em relação aos relatados por Aidar *et al.* (2010) estão possivelmente relacionadas com as variações ambientais, que influenciam o gradiente de pressão de vapor ao qual as plantas foram submetidas, além de possíveis diferenças no tamanho das plantas e volume do solo.

Os declínios das taxas de assimilação líquida do carbono (A), da transpiração (E) e da condutância estomática (g_s) (figuras 9A, C e E) tiveram início a partir do 8º dia de imposição da dessecação, quando os valores do TRAf (90%) e potencial hídrico ($\Psi_w = -0,3$ MPa) ainda eram altos e não apresentavam diferenças significativas (figuras 7A e 8A) em relação ao controle, indicando que há a percepção inicial do déficit hídrico relacionado à redução da água no solo (figura 4A), antes mesmo de ocorrerem alterações na turgescência foliar. Essa percepção se dá inicialmente pela limitação estomática, sendo que as plantas evitam a perda excessiva de água nos estágios iniciais de déficit hídrico a despeito de reduções nas taxas fotossintéticas, corroborando com a proposta de Aidar *et al.* (2010). Esses autores sugerem que este atraso na desidratação foliar pode estar associado a uma “janela” de tempo que permite que os tecidos foliares estejam aptos a um rápido retorno à atividade fisiológica normal, ainda antes do processo de secagem ser iniciado, caso o conteúdo de água no solo seja rapidamente restaurado após um período de déficit hídrico. Além disso, este atraso pode estar associado a mecanismos que mantenham um controle temporal sobre a taxa de secagem, permitindo a expressão gênica e a síntese de proteínas e outros compostos que atuam nos mecanismos de proteção e reparo antes da anabiose (Oliver *et al.*, 1998). Tais respostas a curto-prazo podem estar associadas à sinalização entre a raiz e a parte aérea gerando uma resposta integrada na planta, a qual permite sua sobrevivência até que a disponibilidade de água aumente (Sanches, 2012). Esta comunicação pode ser realizada por vários meios (Davies & Zhang, 1991), podendo ser regulada pelo ácido abscísico (ABA), que é um dos principais reguladores do fechamento estomático em resposta a deficiência hídrica do substrato (Mahajan & Tuteja, 2005). Essa regulação ainda pode estar associada a variações dos níveis de fumarato, que em *B. purpurea* apresentaram aumento após o 8º dia de imposição do déficit hídrico (figura 20A). Em plantas de tomate, Nunes-Nesi *et al.* (2007) observaram que a redução na expressão da enzima fumarase, aumentando os níveis de fumarato, ocasionou alteração da eficiência estomática, levando à restrição da fotossíntese.

Reduções das taxas fotossintéticas em altos TRAf (entre 90 e 74%) já haviam sido relatadas nas espécies revivescentes *Myrothamnus flabellifolius*, *Xerophyta humilis* e *Craterostigma wilmsii*. Foi sugerido que este decréscimo, ainda em altos teores de água foliar, ocorreu como estratégia para minimizar a foto-oxidação e que substâncias antioxidantes poderiam estar auxiliando na prevenção da formação de ROS e/ou os danos por elas causados (Farrant, 2000). No presente trabalho foi observado que o decréscimo das taxas fotossintéticas

foram concomitantes ao aumento dos níveis de metabólitos com atividade antioxidante, como o ácido quínico (figura 20E) e ácido 3-*trans*-cafeoilquínico (figura 20G) a partir do 8º dia de imposição ao déficit hídrico e em TRAf entre 92 e 74%, no experimento do inverno.

Mesmo após o encerramento do metabolismo fotossintético e degradação total das clorofilas, foi verificada a manutenção parcial dos carotenóides totais, em TRAf abaixo de 30%, o que sugere que estes metabólitos possam estar atuando contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS). Desta forma, e assim como sugerido por Farrant (2000), a redução da fotossíntese pode estar associada com a atuação de substâncias com potencial antioxidante, cujas funções consistem em evitar a formação de ROS em baixos níveis de água nos tecidos, evitando assim a foto-oxidação. De fato, se a assimilação de CO₂ está limitada pelas reduções na condutância estomática, mesmo sob altos valores de TRAf e Ψ_w , a manutenção dos pigmentos cloroplastídicos pode colaborar com a dissipação do excesso de energia, evitando a foto-oxidação e danos às membranas celulares.

Os ácidos clorogênicos possuem conhecida atividade antioxidante (Maruta *et al.*, 1995; De Maria & Moreira, 2004; Moore *et al.*, 2005). A atuação destes ácidos em plantas revivescentes já havia sido relatada por Moore *et al.* (2005), os quais observaram que o ácido 3, 4, 5-tri-*O*-galoilquínico em *M. flabelifolius* tem um papel fundamental no controle dos danos induzidos por ROS e ainda na proteção das membranas contra danos induzidos pela dessecação.

A presença dos ácidos 3, 4 e 5-*trans*-cafeoilquínicos (Tabela 2) indicam um preparo constitutivo em *B. purpurea* para responder prontamente a danos oxidativos em caso de dessecação e isto é observado na figura 20. Com a imposição da dessecação no inverno, houve aumento do teor de ácido 3-*trans*-cafeoilquínico (figura 20G) no 16º dia e uma tendência de aumento dos ácidos 4 e 5-*trans*-cafeoilquínicos no 24º dia (figuras 20I e K). No verão, por sua vez, os ácidos 3 e 5-*trans*-cafeoilquínicos (figuras 20H e L) não mostraram variações significativas, porém o ácido 4-*trans*-cafeoilquínico apresentou um aumento considerável no 20º dia (figura 20J). Estes resultados indicam que há alguma variação padrão de respostas nas diferentes estações do ano, porém estas podem ser prontamente ativadas em resposta à seca. Corroborando esta afirmação, foi observado que no verão o ácido 3-*trans*-cafeoilquínico está presente em uma proporção 30 vezes maior que no inverno. Isso sugere que os ácidos clorogênicos estão presentes em maior quantidade e podem contribuir para evitar o estresse foto-oxidativo na estação do ano com maior disponibilidade de radiação e

maiores temperaturas, que correspondente ao verão. Ainda, os ácidos clorogênicos podem estar atuando no regulamento osmótico nas folhas desidratadas de *B. purpurea*. Farrant *et al.* (2009) verificaram em *M. caffrorum*, a partir de imagens de microscopia eletrônica de transmissão, a presença de polifenóis formando uma linha na periferia do vacúolo e, segundo os autores, estes polifenóis auxiliam na manutenção do volume vacuolar através da substituição de água por este soluto.

O aumento de sacarose é amplamente observado entre as plantas revivescentes e este carboidrato atua estabilizando as células durante a secagem, interagindo com macromoléculas e membranas, alterando a fluidez do citoplasma em um processo reversível caracterizado pela vitrificação celular, além de regular o ajustamento osmótico (Albini *et al.*, 1999; Illing *et al.*, 2005; Farrant *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2007; Farrant *et al.*, 2009; Toldi *et al.*, 2009). Com a indução da dessecação em *B. purpurea*, foi observado aumento expressivo nos teores de sacarose (figura 20). Esta é uma característica das últimas etapas na proteção celular para o processo de anabiose (revisado por Toldi *et al.* 2009), ocorrendo normalmente em TRAf abaixo de 60% ou ainda em alguns casos, abaixo de 20%.

Acompanhando o aumento de sacarose, foi observado aumento nos níveis dos oligossacarídeos rafinose e estaquiase e síntese de verbascose (TRAf em torno de 60%), sendo este último em concentrações significativas apenas no experimento do verão (figuras 13 e 14), além da redução dos níveis de mio-inositol (figuras 21C e D). Hoekstra *et al.* (1997) mostraram que os dissacarídeos e oligossacarídeos atuam no ajustamento osmótico e na proteção das membranas, a partir da interação destes carboidratos com os grupos fosfatos ligados aos lipídeos de membrana, no estado desidratado, além de atuarem no processo de vitrificação celular. Segundo Peters *et al.* (2007), um dos primeiros relatos do acúmulo de oligossacarídeos da série da rafinose, em concentrações consideráveis, em resposta ao déficit hídrico ocorreu em folhas da Velloziaceae *X. viscosa*, possivelmente atuando na estabilização e vitrificação da arquitetura celular e como armazenamento de carbono em resposta a estresses abióticos.

Ao contrário do observado por Farrant *et al.* (2009) para *M. caffrorum*, em *B. purpurea* glicose e frutose não sofreram decréscimo significativo dos seus conteúdos (figura 13), o que sugere que o aumento da sacarose tenha sido favorecido pela disponibilidade de esqueletos carbônicos a partir da mobilização do amido, que sofreu redução do seu conteúdo a níveis indetectáveis nos experimentos de inverno e verão (figura 15). Em folhas de *Trifolium*

repens, Lee *et al.* (2008) demonstraram a mobilização do carbono a partir da hidrólise do amido armazenado relacionado ao acúmulo de glicose e sacarose em resposta ao déficit hídrico, uma vez que o fornecimento de carbono havia sido reduzido logo no início da deficiência hídrica devido a redução na assimilação do carbono por decréscimo da fotossíntese.

No inverno, após o 16º dia de supressão da rega foi observado o decréscimo dos teores de *mio*-inositol em *B. purpurea*, acompanhado pelo aumento dos níveis de galactinol (figuras 21C e I) e sacarose (figuras 13 e 21), os quais são precursores da via de síntese de oligossacarídeos da série da rafinose (Peterbauer & Richer, 2001). Um dos primeiros relatos de galactinol como doador de galactosil para síntese de oligossacarídeos da série da rafinose em plantas revivescentes foi feito por Albini *et al.* (1999). Assim como observado em *B. purpurea*, Peters *et al.* (2007) verificaram o aumento de rafinose e redução dos teores de *mio*-inositol em *X. viscosa*, em condições de déficit hídrico, e que essa correlação inverteu-se após a reidratação. Com estes resultados, sugere-se que quando *B. purpurea* é submetida a supressão hídrica, o *mio*-inositol é utilizado para a síntese dos oligossacarídeos da série da rafinose.

Alterações nos níveis dos monossacarídeos e na composição das pectinas e suas relações com o dobramento e enrolamento foliar nas respostas à dessecação vêm sendo relatadas em plantas revivescentes. Em *C. wilmsii* foi observado aumento nos níveis dos xiloglucanos e pectinas não esterificadas e diminuição de glicose na fração de hemiceluloses (Vicré *et al.*, 1999; 2004). Em *M. flabellifolius* foi relatado aumento nos teores de arabinanos (Moore *et al.*, 2006). Apesar de não terem sido verificadas alterações significativas na composição dos monossacarídeos neutros após hidrólise da parede celular bruta de *B. purpurea* (figura 18), outras alterações nas propriedades químicas que envolvem os compostos presentes na parede celular puderam ser observadas. Foi observado aumento significativo do conteúdo de ácidos urônicos (figura 17A), que são constituintes dos polissacarídeos pécticos e podem estar associados a maior retenção de água e a um aumento na flexibilidade da parede celular em *B. purpurea*, facilitando o enrolamento foliar. Foi observada também a síntese do aminoácido hidroxiprolina, além do aumento nos teores de valina, histidina e tirosina, e uma tendência de aumento de serina (figura 22) indicando a possível produção de extensina nas paredes celulares de *B. purpurea*. Extensinas são proteínas que conferem estabilidade à parede celular e são classificadas como membros de uma família

de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, consistindo em uma longa sequência dos aminoácidos serina e hidroxiprolina, podendo possuir inserções de valina, histidina, lisina, tirosina e prolina, sendo que os padrões das inserções diferem entre as espécies vegetais (Cassab, 1998). Estas alterações nos níveis de hidroxiprolina podem estar associadas ao aumento na rigidez das folhas de *B. purpurea* quando submetidas à desidratação, conforme relatado anteriormente, e este aumento pode estar associado a um aumento na resistência mecânica da parede para enfrentar a tensão provocada pelo déficit hídrico. Embora estas alterações pareçam contraditórias, é possível que em *B. purpurea* ocorra um balanço entre estes dois pontos (aumento de flexibilidade e rigidez), e que estas respostas sejam influenciadas por diferenças espaço-temporais, que não foram avaliadas neste trabalho.

Em plantas de beterraba, Gzik (1996) observou que o aumento nos teores dos aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, fenilalanina, glutamina, histidina, ileucina, leucina, lisina, tirosina, triptofano e de prolina) estavam relacionados ao ajuste osmótico para estabilizar o estado da água dos tecidos em condições de déficit hídrico. Neste trabalho, observamos aumento nos teores dos aminoácidos asparagina, ácido gama-aminobutírico (GABA), histidina, valina, tirosina e triptofano (figura 22) em *B. purpurea* sob TRAf abaixo de 70%, o que sugere uma diminuição da razão carbono/nitrogênio, mostrando aumento na eficiência do transporte de nitrogênio para a parte aérea da planta. Além disso, estes aminoácidos podem exercer outras funções em resposta ao déficit hídrico, tal como ajustamento osmótico ou ainda podem estar atuando indiretamente para o desvio do metabolismo para outras vias. O aumento de triptofano (figura 22H) e decréscimo do ácido chiquímico (figuras 20C e D) sugerem uma alteração no metabolismo para produção ou aumento dos níveis de metabólitos secundários que possam auxiliar na tolerância à dessecação.

Outras funções dos aminoácidos na manutenção metabólica em condições de estresse têm sido relatadas (Lea *et al.*, 2006; Akçay *et al.*, 2012). O acúmulo de asparagina nos órgãos vegetais ocorre em resposta ao estresse hídrico e salino, podendo estar relacionado a uma restrição das taxas de síntese de proteínas, ou ainda pode estar associado a regulação osmótica para manutenção da turgidez foliar (Lea *et al.*, 2006). O acúmulo de GABA ocorre como resposta a diversos estresses ambientais, podendo atuar como regulador osmótico, no ajuste do pH celular, no armazenamento de nitrogênio, como inibidor da atuação de ROS e ainda como produto no desvio do ciclo de Krebs devido a redução da respiração por limitação da

entrada de carbono no ciclo. O acúmulo de GABA sob esta condição permite o fornecimento de substrato imediato para recuperação da respiração pós-estresse (Shelp *et al.*, 1999; Akçay *et al.*, 2012).

5.2 Reidratação

A partir da reidratação dos vasos de *B. purpurea* observou-se um rápido retorno (com 12 horas) do potencial hídrico nas folhas ($\Psi_w = -0,5$ MPa no inverno e $-0,4$ MPa no verão) a valores semelhantes aos do grupo controle (figura 8) em ambas estações, enquanto que o TRAf das plantas submetidas ao tratamento atingiram valores próximos aos do controle somente 36 horas após o início da reidratação (figura 7). Essas divergências ocorreram devido ao fato de que o restabelecimento da turgidez, bem como o desenrolamento foliar, tem início na base da folha em direção ao ápice (figuras 5 e 6). Isso explica as diferenças observadas, uma vez que o Ψ_w foi medido na base da folha enquanto que o TRAf foi medido na parte mediana foliar. Desta forma, foi observado que em folhas de *B. purpurea* o retorno da turgidez ocorre de forma controlada.

Com o retorno da disponibilidade hídrica, as taxas fotossintéticas puderam ser novamente detectadas após 36 horas (figura 9) em TRAf superiores a 60%, e estes dados coincidem com o verificado por Aidar *et al.* (2010). É importante salientar que as medidas das taxas fotossintéticas foram realizadas de 2:00 a 4:00 horas após as coletas do material foliar para as análises bioquímicas de pigmentos fotossintéticos que ocorriam no período da antemanhã. Desse modo, foi observado que a síntese da clorofila apresenta aumento após as 36 horas. Estes dados sugerem que as clorofilas são novamente sintetizadas (figura 10) em um TRAf acima de 60% e que, acompanhando a regeneração do aparato fotossintético, a atividade fotossintética retorna rapidamente, demonstrando que não há danos irreversíveis aos cloroplastos. Este rápido retorno deve estar relacionado à rápida utilização dos carboidratos para a recuperação após a reidratação. O tempo necessário para regeneração do aparato fotossintético (aproximadamente 30 horas) pode estar mais associado ao retorno da turgescência foliar do que à ativação do sistema antioxidante em *B. purpurea*, diferindo do verificado por Beckett *et al.* (2012) para *X. humilis*.

Os conteúdos de sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose acumulados durante a desidratação decresceram a partir da reidratação, no inverno e no verão (figura 13), provavelmente, para serem utilizados como fonte de carbono nas vias metabólicas

responsáveis pelo processo de reparação aos possíveis danos ocasionados na dessecação (Peters *et al.*, 2007). Isso se baseia no fato desses carboidratos possuírem baixo poder de redução, podendo atuar como estoques de carbono (Toldi *et al.*, 2009). Os teores de aminoácidos acumulados (figura 22) também voltaram, após a reidratação, aos níveis detectados no controle, indicando que o nitrogênio acumulado pode ter sido utilizado como substrato para reposição de proteínas (Shelp *et al.*, 1999).

Com a reidratação, foi observado que todas as alterações metabólicas que envolvem a manutenção da viabilidade celular no estado dessecado em *B. purpurea* retornam às condições normais da espécie em até 132 horas após a retomada da rega e que esse tempo necessário à regularização do metabolismo pode estar associado com o reparo dos possíveis danos nesta etapa, conforme sugerido para outras revivescentes (Oliver *et al.*, 1998; Farrant *et al.*, 2007; Lüttge *et al.*, 2008; Farrant *et al.*, 2012).

5.3 Turgor foliar e a percepção do déficit hídrico

Farrant *et al.* (2009) observaram diferentes respostas em função da sazonalidade em *M. caffrorum*, porém esta pteridófito ocorre em margens florestais e é exposta a condições de dessecação apenas durante a estação seca, ao contrário de *B. purpurea* que ocorre em afloramentos rochosos, ambiente tipicamente mais árido, onde a planta está exposta a períodos mais frequentes de dessecação (Alpert & Oliver, 2002). No presente trabalho foi observado que as respostas fisiológicas de *B. purpurea* foram semelhantes nas plantas submetidas ao déficit hídrico nas duas diferentes estações (inverno e verão), apresentando apenas pequenas variações no metabolismo da planta, vistas nas figuras 13 e 21, as quais estão possivelmente associadas com o tempo de resposta em função de um déficit hídrico mais intenso na estação do verão dentro da casa de vegetação. Em estudos realizados por Farrant *et al.* (2003) com *M. flabellifolius* foi observado que a luz exerce influência na tolerância a dessecação e que na ausência de luminosidade a planta não sobrevive à seca, indicando que embora a planta possua tolerância à dessecação essa habilidade varia em função de fatores ambientais. Desta forma, sugerimos que a tolerância à dessecação em *B. purpurea* é induzida e que os mecanismos de resposta não são influenciados pela sazonalidade imposta em ambiente de casa de vegetação.

Em *B. purpurea* foi observado que há um padrão entre as respostas da planta durante a secagem em relação ao TRAF, mostrando que este pode ser um dos principais sinalizadores

das respostas de tolerância à dessecação na espécie estudada. Desta forma, a partir dos dados compilados verificamos que as respostas dependentes da tensão hídrica podem ser divididas em duas etapas relacionadas. As primeiras respostas dependentes do turgor foliar ocorrem em TRAf entre 96 e 70% e são caracterizadas pela ativação de mecanismos de evitação ou resistência à dessecação a partir de um atraso da desidratação foliar, possibilitada pela redução da condutância estomática e taxas fotossintéticas (figuras 9A e E), e também a um aumento dos ácidos quínico e cafeoilquínicos, que fazem parte do sistema de defesa antioxidante.

Em um segundo momento, em TRAf abaixo de 70%, os resultados sugerem a mobilização de carboidratos e aminoácidos atuando no ajustamento osmótico e proteção dos componentes celulares. Na fase final da dessecação, com acúmulo de carbono e nitrogênio para posterior reidratação, e somente após todo seu metabolismo ter sido preparado para manter a viabilidade no estado de anabiose e para a rápida retomada das funções fenológicas normais após o aumento da disponibilidade hídrica, ocorreu a degradação das clorofilas totais, com TRAf entre 30% (inverno) e 10% (verão). Estes resultados apoiam a definição da tolerância à dessecação em homeohídricas vasculares, que segundo Wood (2005), são caracterizadas pela ativação de mecanismos de evitação da desidratação associados a mecanismos de proteção na secagem e reparo na reidratação.

6. CONCLUSÕES

Barbacenia purpurea é uma espécie homeohídrica revivescente que, em decorrência do déficit hídrico, apresentou alterações fisiológicas e bioquímicas semelhantes às encontradas em plantas tolerantes à dessecação, as quais incluem a estratégia de peciloclorofilia, ativação do sistema antioxidante não enzimático, ajustamento osmótico e fornecimento de esqueletos de carbono e nitrogênio para reparação dos danos após a reidratação.

Os mecanismos de respostas de *B. purpurea* à baixa disponibilidade hídrica do substrato são induzidos e os padrões que envolvem as alterações metabólicas não variam em função da sazonalidade em condições de cultivo em casa de vegetação.

B. purpurea possui duas linhas de respostas dependentes da tensão hídrica imposta às folhas, sendo que em baixos níveis de déficit hídrico (98-70% do TRAf), são ativados mecanismos de evitação da dessecação, enquanto que em níveis de déficit hídrico moderado a intenso (abaixo de 70 até 10% do TRAf) a espécie estudada apresenta mecanismos de respostas típicos de plantas vasculares tolerantes à dessecação.

Concluimos, portanto, que a tolerância de *B. purpurea* à desidratação envolve a percepção da intensidade do déficit de água, o que parece resultar em diferentes estratégias para superar o gradiente de disponibilidade de água ao qual a planta está sujeita ao longo de um período de estresse.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akçay, N., Bor, M., Karabudak, T., Ozdmir, F. & Turkan, I.** 2012. Contribution of gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants. *Journal of Plant Physiology* 169: 452-458.
- Albini, F.M., Murelli, C., Finzi, P.V., Ferrarotii, M., Cantoni, B., Puliga, S. & Vazzana, C.** 1999. Galactinol in the leaves of resurrection plant *Boea hygroskopica*. *Phytochemistry* 51: 499-505.
- Alpert, P. & Oliver, M.J.** 2002. Drying without dying. In: Black, M, & Prithard, H.W. (Eds.). *Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying*. Wallingford and New York, p. 04-43.
- Aidar, S.T.** 2005. Tolerância à dessecação em *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae): trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos e conteúdo relativo de água foliar. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Dissertação de Mestrado.
- Aidar, S.T., Meirelles, S.T., Pocius, O., Delitti, W.B.C., Souza, G.M. & Gonçalves, A.N.** 2010. Desiccation tolerance in *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae). *Plant Growth Regulation* 62: 193-202.
- Amaral, L.I.V., Costa, P.M.F., Aidar, M.P.M., Gaspar, M. & Buckeridge, M.S.** 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34: 425-431,
- Ayres, M., Ayres, J.R., Ayres, D.L.M. & Santos, A.S.** 2003. *BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. Brasília CNPq.
- Beckett, W., Loreto, F., Velikova, V., Brunetti, C., Ferdinando, M., Tattini, M., Calfapietra, C. & Farrant, J.M.** 2012. Photosynthetic limitations and volatile and non-volatile isoprenoids in the poikilochlorophyllous resurrection plant *Xerophyta humilis* during dehydration and rehydration. *Plant Cell and Environmental* (DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02536.x)

- Bewley, J.D.** 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* 30: 195-238.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M. & Figueiredo – Ribeiro, R.C.L.** 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* (Asteraceae) as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 281-285.
- Cassab, G. I.** 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 281-309.
- Davies, W.J. & Zhang, J.** 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 76: 42-55.
- De Maria, C.A.B. & Moreira, R.F.A.** 2004. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Química Nova* 27: 586-592.
- Dinakar, C., Djilianov, D. & Bartels, D.** 2012. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science* 182: 29-41.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Farrant, J.M.** 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology* 151: 29-39.
- Farrant, J.M., Willigen, C.V., Loffell, D.A., Bartsch, S. & Whittaker, A.** 2003. An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. *Plant, Cell and Environment* 26: 1275-1286.
- Farrant, J.M., Brandt, W. & Lindsey, G.G.** 2007. An overview of mechanism of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. *Plant Stress* 1: 72-84.
- Farrant, J.M., Lehner, A., Cooper, K. & Wiswedel, S.** 2009. Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. *The Plant Journal* 57: 65-79.

- Farrant, J. M., Cooper, K. & Nell, H.** 2012. Desiccation Tolerance. In: Shabala, S. (Ed). Plant Stress Physiology. Wallingford: CAB International, p. 238-265.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C. & Carpita, N.C.** 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197: 157-162.
- Gaff, D.F.** 1977. Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. *Oecologia* 31: 95-109.
- Garcia, Q.S.** 1997. Aspectos fisiológicos de três espécies de Velloziaceae, durante os processos de dessecação de reidratação. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Tese de doutorado.
- Gorshkova, T.A., Wyatt, S.E., Slnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibragimov, M.R., Lozovaya, V. V. & Carpita, N.C.** 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* 110: 721-729.
- Gzik, A.** 1996. Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plant in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 36: 29-38.
- Hendry, G.A.F. & Price, A.H.** 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F & Grime, J.P. (Eds.) *Methods in Comparative Plant Ecology*. London: Chapman; Hall, p. 148-152.
- Hoekstra, F.A., Wolkers, W.F., Buitink, J., Golovina, E.A., Crowe, J.H. & Crowe, L.M.** 1997. Membrane stabilization in the dry state. *Comparative Biochemistry Physiology* 117A: 335-341.
- Hoagland, D. & Arnon, D.I.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station Circular.
- Illing, N., Denby, K.J., Collett, H., Shen, A. & Farrant, J.M.** 2005. The signature of seeds in resurrection plants: A molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integrative and Comparative Biology* 45: 771-787.

- Ingle, R.A., Schmidt, U.G., Farrant, J.M., Thomson, J.A. & Mundree, S. G.** 2007. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Plant, Cell and Environment* 30: 435-446.
- IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera.** 2013. (disponível em: <http://www.ipma.pt>) Acesso: 10 mar. 2013.
- Jones, L. & McQueen-Mason, S.** 2004. A role expansions in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Letters* 559: 61-65.
- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A. & Evstatieva, L. N.** 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13: 8 – 17.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima.
- Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Sherwry, P.R. & Halford, N.G.** 2006. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* 150: 1-26.
- Lee, B.R., Jin, Y.L., Jung, W.J., Avice, J.C., Bertrand, A.M., Ourry, A., Park, C.W. & Kim, T. H.** 2008. Water deficit accumulates sugar by starch degradation not by *de novo* synthesis in white clover leaves (*Trifolium repens*). *Physiologia Plantarum* 143: 403-411.
- Lüttge, U., Meirelles, S.T. & Mattos, E.A.** 2008. Strong quenching of chlorophyll fluorescence in the desiccated state in three poikilohydric and homoiochlorophyllous moss species indicates photo-oxidative protection on highly light-exposed rocks of a tropical inselberg. *Journal of Plant Physiology* 165: 172-181.
- Lüttge, U., Beck, E. & Bartels, D.** 2011. *Plant Desiccation Tolerance*. (Série: Ecological Studies). Berlin: Springer Premier, p. 03-08.
- Mahajan., S. & Tuteja, N.** 2005. Cold, salinity and drought stress: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Maruta, Y., Kawabata, J. & Niki, R.** 1995. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of Burdock (*Arctium lappa* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2592-2595.

- Meguro, M., Joly, C.A. & Bittencourt, M.M.** 1977. Stress hídrico e alguns aspectos do comportamento fisiológico de *Xerophyta plicata* Spreng – Velloziaceae. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 5: 27-42.
- Meirelles, S.T., Mattos, E A. & Da Silva, A.C.** 1997. Potencial desiccation tolerant vascular plants from southeastern Brazil. Polish Journal of Environmental Studies 6: 17-21.
- Meirelles, S.T.** 2009. O enigma das plantas revivescentes. III Congresso Latino Americano de Ecologia e IX Congresso de Ecologia do Brasil. (disponível em: http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_professores/sergio_tadeu.pdf) Acesso: 28 jan. 2013.
- Moore, J. P., Farrant, J.M., Lindsey, G.G. & Brandt, W.F.** 2005. The South African and Namibian populations of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius* are genetically distinct and display variation in their galloylquinic acid composition. Journal of Chemical Ecology 31: 2823-2834.
- Moore, J.P., Nguema-Ona, E., Chevalier, L., Lindsey, G.G., Brandt, W.F., Lerouge, P., Farrant, J. M. & Driouich, A.** 2006. Response of the leaf cell wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabelifolius*. Plant Physiology 141: 651-662.
- Moore, J.P., Vitré-Gibouin, M., Farrant, J. M. & Driouich, A.** 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. Physiologia Plantarum 134: 237-245.
- Morse, M., Rafudeen, M. S. & Farrant, J. M.** 2011. An overview of the current understanding of desiccation tolerance in the vegetative tissues of higher plants. In: J.C. Kader & M. Delseny (Eds). Advances in Botanical Research. Plant responses to drought and salinity stress: developments in a post-genomic era. Burlington, 57: 319- 347.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sukpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J. & Fernie, A.R.** 2007. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. The Plant Journal 50: 1093-1106.
- Oliver, M.J., Wood, A.J. & Mahony, P.O.** 1998. “To dryness and beyond” - preparation for the dried state and rehydration in vegetative desiccation-tolerant plants. Plant Growth Regulation 24: 193-201.

- Oliver, M., Cushman, J.C. & Koster, K.L.** 2010. Dehydration tolerance in plants. In: Sunkar, R. (Ed.). *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, p. 03-24.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.
- Peters, S., Mundree, S.G., Thomson, J.A., Farrant, J.M. & Keller, F.** 2007. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 58: 1947-1956.
- Porembski, S.** 2011. Evolution, diversity, and habitats of poikilohydrous vascular plants. In: Lüttge, U., Beck, E., Bartels, D. (Eds). *Plant Desiccation Tolerance*. (Série Ecological Studies). Berlin: Springer Premier, p. 139-156.
- Porembski, S. & Barthlott, W.** 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as center of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151: 19-28.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L. & Fernie, A.R.** 2001. Metabolic profiling and phenotyping of genetically and environmentally modified systems. *Plant Cell* 13: 131-142.
- Sanches, R.F.E.** 2012. Relações hídricas e respostas ao déficit hídrico da espécie *Bauhinia forficata* Link: mecanismos de manutenção do status hídrico. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Dissertação de Mestrado.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. & McLean, M. D.** 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4: 1360-1385.
- Sherwin, H.W. & Farrant, J.M.** 1996. Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany* 79: 703-710.
- Sherwin, H.W. & Farrant, J.M.** 1998. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regulation* 24: 203-210.

- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68.
- Taiz, L., & Zeiger, E.** 2004. *Fisiologia Vegetal*, 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Toldi, O., Tuba, Z. & Scott, P.** 2009. Vegetative desiccation tolerance: is a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science* 176: 187-199.
- Vicré, M., Sherwin, H.W., Driouich, A., Jaffer, M.A. & Farrant, J. M.** 1999. Cell wall characteristic and structure of hydrated and dry leaves of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*, a microscopical study. *Journal of Plant Physiology* 155: 719-726.
- Vicré, M., Lerouxel, O., Farrant, J., Lerouge, P. & Driouich, A.** 2004. Composition and desiccation - induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*. *Physiologia Plantarum* 120: 229-239.
- Weatherley, P.E.** 1950. Studies in the water relations of cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytologist* 49: 81-97.
- Wood, A. J.** 2005. Eco-physiological adaptations to limited water environments. In: Jenks, M. A. & Hasegawa, P.M. (Eds). *Plant Abiotic Stress*. Oxford: Blackwell Publishing, p. 01-13.
- Wood, A. J. & Jenks, M.A.** 2007. Plant desiccation tolerance: diversity, distribution and real - world applications. In: Jenks, M.A. & Wood, A.J. (Eds). *Plant Desiccation Tolerance*. Blackwell Publishing. p. 03-10.