

EVANDRO ALVES VIEIRA

**Mecanismos de inativação e recuperação fisiológica
envolvidos na tolerância à dessecação de *Pitcairnia
lanuginosa* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae)**

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

SÃO PAULO, 2015

EVANDRO ALVES VIEIRA

**Mecanismos de inativação e recuperação fisiológica
envolvidos na tolerância à dessecação de *Pitcairnia
lanuginosa* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae)**

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

Orientadora: Dr^a. MARCIA REGINA BRAGA

Co-orientador: Dr. EMERSON ALVES DA SILVA

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

Vieira, Evandro Alves

V657m Mecanismos de inativação e recuperação fisiológica envolvidos na tolerância à dessecação de *Pitcairnia lanuginosa* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) / Evandro Alves Vieira -- São Paulo, 2016.
86p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Déficit hídrico. 3. Carboidratos. I. Título.

CDU: 582.564

“É preciso sentir a necessidade da experiência, da observação, ou seja, a necessidade de sair de nós próprios para aceder à escola das coisas, se as queremos conhecer e compreender.”

Émile Durkheim

Agradecimentos

Agradeço...

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e oportunidades concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa temporária cedida.

À Pós-graduação do Instituto de Botânica de São Paulo pela oportunidade de realizar este trabalho, em especial ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela infraestrutura oferecida para a conclusão do estudo.

À minha estimada orientadora Dra. Marcia Regina Braga, primeiro pelo exemplo de profissional e dedicação pela pesquisa, pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão e principalmente por acreditar no potencial do nosso trabalho.

Ao meu prezado Co-orientador Dr. Emerson Alves da Silva por todo o auxílio e prestatividade na condução da pesquisa.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, em particular à Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho pelas conversas científicas e ótimas histórias, à Dra. Marília Gaspar pelo auxílio e empenho em resolver os problemas no laboratório e ao Dr. Marco Aurélio Tiné pela ajuda com os equipamentos.

À Dra. Luce Brandão Torres pelos ótimos momentos de descontração que sem dúvida tornaram os dias mais divertidos.

Ao Dr. Luciano Freschi pela colaboração, dedicação e paciência na realização dos ensaios no Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal do Instituto de Biociências da USP.

Aos funcionários de apoio: Ana Alice, por toda ajuda e almoços descontraídos e Cida Arantes pelo auxílio e inesquecíveis cafés da manhã.

À técnica de laboratório, Mary Monteiro, pela amizade, dedicação, boa vontade, ótimas conversas e ao técnico Pedro pelo auxílio no laboratório.

Aos amigos e colegas do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pelo auxílio no laboratório e companheirismo nos intervalos de café e almoço.

À querida amiga “grandona” Aline Coelho pela ajuda nas análises, boa vontade, longas conversas, confidências e principalmente momentos divertidíssimos.

À amiga Camila Moro pela ajuda com os ensaios de microscopia e pelos momentos divertidos, sem dúvida, uma das pessoas mais sinceras que conheço.

À queridona e saudosa “Aninha” Ana Lúcia Barros pelo auxílio nas descrições anatômicas, amizade e conversas, mesmo à distância, me apoiando e mandando mensagens de otimismo.

À não menos importante amiga Maria das Graças por toda a ajuda nas coletas das plantas e amizade desde a época de UEMS. Saudades!!

Ao amigo Danilo Marques que mesmo no exterior me auxiliou com os desenhos das plantas, sempre solícito e positivo.

À amigona Monise Melo pela ajuda nas idas pra Campinas, pelos maravilhosos e divertidos momentos, com você é risada na certa!!

Ao grande amigo Júnior por toda ajuda, dedicação, conversas, momentos divertidos, devo grande parte da concretização deste trabalho a você. Obrigado!!

À minha querida família que além de ser minha base é o meu bem mais precioso. É pra onde eu volto pra reforçar quem sou. Mesmo à distância estamos juntos em pensamento. Muito obrigado por tudo!!

RESUMO

Pitcairnia lanuginosa Ruiz & Pav. é uma espécie de Bromeliaceae encontrada nos afloramentos rochosos do cerrado brasileiro, tolerando desidratação protoplasmática severa e recuperando o metabolismo celular dentro de um curto período após a reidratação. Neste estudo, foram avaliadas as relações hídricas, trocas gasosas, teores de carboidratos, conteúdo de ABA endógeno e alterações morfológicas durante os processos de dessecação e recuperação após a reidratação. Para tal, as plantas foram separadas em três grupos para a imposição dos seguintes tratamentos de disponibilidade hídrica: plantas regadas diariamente grupo (controle - C), suspensão total das regas durante 60 dias (D1) e 90 dias (D2) com subsequente reidratação e retorno do regime de rega diária. Foram avaliados o conteúdo relativo de água (CRAf) foliar, os potenciais hídrico (Ψ_w) e osmótico (Ψ_s), trocas gasosas, conteúdo de pigmentos fotossintéticos, teor de carboidratos solúveis, prolina livre, conteúdo de ABA, alterações na composição da parede celular e alterações anatômicas. As plantas de *P. lanuginosa* demonstraram ser muito tolerantes à dessecação. O CRAf e o potencial hídrico foliar diminuíram a partir do 10º dia, atingindo 18,7% e -5,54 MPa, respectivamente aos 90 dias de restrição hídrica. As taxas de assimilação líquida do carbono (A) e transpiração (E) diminuíram rapidamente em plantas submetidas à supressão da irrigação. Decréscimos significativos nos teores de clorofila *a* e *b* foram observados após 50 dias para os grupos sujeitos a dessecação. A intensificação do déficit hídrico promoveu o aumento de carboidratos solúveis totais em folhas e raízes, com o aumento da glicose e frutose em folhas após 38 dias de déficit hídrico para D1. O teor de amido das folhas desidratadas diminuiu rapidamente, coincidindo com o aumento dos níveis de sacarose no mesmo período. O teor de amido nas raízes manteve-se inalterado durante a desidratação. O conteúdo de ABA em folhas aumentou mais do que cinco vezes em 60 dias para D2 (27,5 ng.g⁻¹), enquanto que para as raízes, não foram observadas diferenças significativas. Xilose e arabinose foram os monossacarídeos predominantes nas paredes celulares brutas da espécie e a razão arabinose/xilose aumentou em folhas desidratadas aos 60 e 90 dias, sugerindo a presença de moléculas mais ramificadas com arabinose em plantas dessecadas. Foram observadas alterações na morfologia interna das folhas dessecadas (D2) com diminuição do tamanho das células da hipoderme, dobramento parcial das paredes celulares, vacuolização e supressão dos pigmentos. Os nossos resultados indicam que plantas de *P. lanuginosa* submetidas à dessecação apresentam um atraso na desidratação dos tecidos foliares quando comparado com a perda de umidade do solo. Os mecanismos de tolerância foram mais evidentes em estágios avançados de déficit hídrico, indicando a presença de alta capacidade de proteção e reestruturação metabólica após a reidratação. Este estudo relata

a ocorrência de tolerância à dessecação vegetativa em uma Bromeliaceae, indicando tratar-se de uma espécie revivescente. Sugere ainda que a presença do rizoma na espécie pode ser uma estratégia adicional de tolerância à dessecação, que contribui para o comportamento observado.

Palavras-chave: Déficit hídrico, Fotossíntese, Carboidratos, ABA, Parede Celular, Reidratação.

ABSTRACT

Pitcairnia lanuginosa Ruiz & Pav. is a Bromeliaceae species found in the rocky outcrops of the Brazilian Cerrado, tolerating severe protoplasmic dehydration and recovering normal cellular metabolism within a short period after rehydration. In this study, we evaluated water relations, gas exchange, photosynthetic pigments, carbohydrate content, endogenous ABA content, and morphological changes of plants submitted to desiccation and recovery after rehydration. The imposition of water deficit was conducted in five plants for each group: control group (C), watered daily, desiccated for 60 days (D1) and desiccated for 90 days (D2) with complete suspension of irrigation and subsequent rehydration. We recorded leaf relative water content, water potential and osmotic potential, gas exchange, photosynthetic pigments, soluble carbohydrates, proline content, ABA content, cell wall changes and anatomical alterations. *P. lanuginosa* showed to be very tolerant to desiccation. RWC and leaf water potential decreased from day 10 on, reaching 18.7% and -5.54 MPa, respectively at day 90 of water withholding. The rate of net photosynthesis and transpiration decreased rapidly in plants submitted to water suppression. A significant decrease in chlorophyll a and b content was observed after 50 days for the groups subjected to dehydration. The intensification of the water deficit promoted the increase of total soluble carbohydrates in leaves and roots, with increased glucose and fructose in leaves after 38 days of water deficit for D1. The leaf starch content rapidly decreased, coinciding with increased sucrose levels at the same period. The root starch content remained unchanged during dehydration. The leaf ABA content increased five times at 60 days to D2 (27.5 ng.g⁻¹), while for the roots, no significant differences were observed. Xylose and arabinose were the predominant monosaccharides in cell walls of *P. lanuginosa*. The arabinose/xylose ratio increased in the dehydrated leaves for 60 and 90 days, suggesting the presence of more branched arabinoxylans in desiccated plants. Changes were observed in the internal morphology of dried leaves (D2), with small hypoderm cells, partial cell wall folding, vacuolization, and decreased pigments. Our findings indicate that *P. lanuginosa* subjected to desiccation presents a delay in foliar tissue dehydration when compared to the loss of soil moisture. This mechanism seems to be more evident in advanced stages of water deficit, indicating the presence of high protection capacity and metabolic restructuring after rehydration. This study reports the occurrence of desiccation tolerance in a Bromeliaceae species, indicating that *P. lanuginosa* is a resurrection plant. It also suggests that the presence rhizome may be an additional strategy of desiccation tolerance, which contributes to its tolerant behavior.

Keywords: Water deficit, Photosynthesis, Carbohydrate, ABA, Cell Wall, Rehydration.

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Taxas de assimilação líquida do carbono

ABA - Ácido abscísico

AMG - Amiloglucosidase

BSTFA - (Trimetilsilil) trifluoroacetamida

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

Ci - Concentração interna de CO₂

CRAf - Conteúdo relativo de água foliar

DFFF - Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos

DMSO - Dimetilsulfóxido

E - Transpiração

EiUA – Eficiência intrínseca do uso da água

F₀ - Fluorescência inicial

F_m - Fluorescência máxima

F_v - Fluorescência variável

F_v/F_m - Eficiência quântica do fotossistema II

g - Gravidade

gs - Condutância estomática

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

IRGA - Analisador de gás por infravermelho

MF - Massa fresca

MS - Massa seca

MPa - Megapascal

PFf - Peso fresco foliar

PSf - Peso seco foliar

PTf - Peso turgido foliar

RFOs - Oligossacarídeos da série da rafinose

ROS - Espécies reativas de oxigênio

TFA - Ácido trifluoroacético

TRD - Reflectometria no domínio do tempo

UR - Umidade relativa do ar

Us - Umidade do solo

PAR - Radiação fotossinteticamente ativa

UV - Ultravioleta

Ψ_w - Potencial hídrico

Ψ_s - Potencial osmótico

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mecanismos de tolerância à dessecação.....	3
1.2. Caracterização da família e da espécie.....	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Material vegetal e condições experimentais.....	12
3.2. Conteúdo relativo de água foliar (CRAf).....	13
3.3. Potencial hídrico (Ψ_w) e potencial osmótico (Ψ_s) foliar.....	14
3.4. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	15
3.5. Pigmentos fotossintéticos foliares.....	16
3.6. Análise de carboidratos.....	17
3.6.1. <i>Extração e quantificação de carboidratos solúveis</i>	17
3.6.2. <i>Análise qualitativa de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)</i>	17
3.6.3. <i>Extração e quantificação de amido</i>	18
3.7. Análise do teor de prolina livre.....	19
3.8. Extração e quantificação de ABA endógeno.....	19

3.9. Análises de parede celular.....	20
3.9.1. <i>Extração da parede celular</i>	20
3.9.2. <i>Análise de composição e ligação glicosídica dos polissacarídeos de</i> <i>parede celular</i>	20
3.10. Análises da morfologia interna das folhas.....	21
3.11. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Efeito da desidratação e reidratação no status hídrico das folhas.....	23
4.2. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	29
4.3. Pigmentos Fotossintéticos.....	33
4.4. Carboidratos solúveis e Amido.....	34
4.5. Prolina livre.....	39
4.6. ABA endógeno.....	40
4.7. Composição da Parede celular.....	42
4.8. Morfologia interna das folhas.....	45
5. DISCUSSÃO	47
5.1. Desidratação.....	47
5.2. Reidratação.....	57
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

Os afloramentos rochosos presentes em diferentes regiões tropicais apresentam uma gama de similaridades ambientais entre si, em especial aquelas relacionadas às condições edáficas e microclimáticas, decorrentes dos diferentes estágios de decomposição das rochas (Porembski et al., 1998). Esses afloramentos têm origem geológica bastante antiga, em geral Pré-cambriana, e apresentam como características principais a ausência quase completa de cobertura de solo e grande heterogeneidade topográfica (Giulietti et al., 1997, Porembski et al., 1998, Parmentier, 2003). Essas características peculiares levam ao estabelecimento de uma cobertura vegetal distinta da área contígua (Porembski & Barthlott, 2000), formando as chamadas "ilhas xéricas" (Porembski et al., 1998, Parmentier, 2003). As plantas que se estabelecem sobre os afloramentos crescem diretamente sobre a rocha exposta ou em ilhas de vegetação, que apresentam tamanhos variados, gerando um mosaico de acordo com a declividade da rocha e a profundidade do substrato (Meirelles et al., 1999).

Vários estudos sobre a vegetação associada a afloramentos rochosos têm sido realizados na África (Porembski et al., 1996; Parmentier, 2003) e na América do Sul (Ibisch et al., 1995; Gröger & Barthlott, 1996). No Brasil, a maioria dos trabalhos concentra-se nos campos de altitude (Porembski et al., 1998; Meirelles et al., 1999; Scarano, 2002), nos cerrados rupestres (Oliveira-Filho & Martins, 1986) e, em especial, nos campos rupestres (Romero & Nakajima, 1999; Giulietti et al., 2000; Romero, 2002; Conceição & Giulietti, 2002). Esses estudos vêm contribuindo com informações valiosas sobre a flora desses ambientes, suas características ecológicas e biogeográficas, revelando uma série de espécies dotadas de adaptações à sobrevivência em ambientes com condições ambientais severas (Oliveira & Godoy, 2007).

No Cerrado, os campos rupestres são formados por um tipo predominantemente herbáceo-arbustivo, que ocorre geralmente em Neossolos Litólicos nas fendas de afloramentos ou diretamente sobre as rochas. São comuns algumas aráceas, bromélias e orquídeas rupícolas formando uma flora típica, com muitas espécies endêmicas e raras, apresentando características

xeromórficas (Ribeiro & Walter, 2008; Carvalho et al., 2012). O habitat estressante dos afloramentos rochosos é muito associado a solos areno-pedregosos, muitas vezes rasos, com baixos níveis de nutrientes, alta incidência de radiação e baixa capacidade de retenção de água (Lüttge et al., 2007; Negreiros et al, 2014). De acordo com Porembski & Barthlott (2000), esses locais funcionam como centros de diversidade de plantas vasculares tolerantes à dessecação, enfatizando que o sucesso deste grupo ecológico de plantas está relacionado com a incerteza da disponibilidade de água.

A água é um componente fundamental do metabolismo de todos os organismos vivos, participando de muitas reações biológicas vitais. Em plantas e outros organismos autotróficos, a água desempenha a função de fornecer energia necessária para a fotossíntese, transportar substâncias como solutos e gases, promover reações químicas essenciais para o crescimento, manter a turgescência celular e regular a abertura dos estômatos (Taiz & Zeiger, 2008). Uma das principais consequências do déficit hídrico é a perda de água protoplasmática, levando ao aumento na concentração de íons, o que efetivamente pode inibir diversas funções metabólicas (Mundree et al., 2002).

Existem aproximadamente 135 espécies de angiospermas comumente referidas como plantas tolerantes à dessecação, que apresentam capacidade de sobreviver à perda de até 95% do teor total de água celular e recuperar a atividade metabólica completa em tecidos pré-existentes no prazo de 24 -72 h depois da reidratação (Moore et al., 2009; Dinakar & Bartels, 2013; Gaff & Oliver, 2013). A tolerância à dessecação pode ser classificada como constitutiva ou induzida, sendo a primeira, encontrada principalmente em alguns grupos avasculares (algas, líquens e briófitas) que não apresentam mecanismos de impedimento da perda de água para o ambiente (Farrant et al., 2007) e necessitam de mecanismos de reparo durante a recuperação (Oliver & Bewley, 1997). O modo induzido, por sua vez, é mais comum em espécies vasculares (Pteridófitas e Angiospermas) que podem exercer controle sobre a perda de água provocada pela demanda transpiratória. Neste processo, onde a desidratação dos tecidos vegetativos é adiada em relação ao ambiente, são ativados tanto os mecanismos de evitação da perda de água, como outros mecanismos de proteção e reparo relacionados à dessecação (Oliver, 1996).

1.1. Mecanismos de tolerância à dessecação

As respostas à deficiência de água manifestam-se como um grupo de sintomas concomitantes, que envolvem interação complexa de processos físicos e metabólicos em células, tecidos e órgãos (Lawlor & Cornic, 2002). Contudo, o fenômeno da tolerância à dessecação depende do grau de desidratação tolerado, a rapidez de reidratação e recuperação, os ciclos múltiplos de desidratação e reidratação suportados e da estabilidade e longevidade do tecido no estado seco (Galf & Oliver, 2013). As plantas desidratadas necessitam estabelecer um equilíbrio com o ar seco circundante interrompendo o crescimento e diminuindo a assimilação até entrar num estado de anabiose, paralisando seu metabolismo (Farrant et al., 2007).

Segundo Mundree & Farrant (2000), algumas consequências fisiológicas, bioquímicas e estruturais normalmente esperadas em tecidos vivos submetidos a fatores de estresse, que devem ser resolvidas para que a tolerância à dessecação em tecidos vegetativos seja garantida são: 1) estresse mecânico associado com a redução do volume celular, 2) estresse oxidativo provocado pela produção de radicais livres como consequência de um metabolismo desregulado, associado particularmente com a fotossíntese e a respiração e 3) ruptura de membranas e da integridade macromolecular devido à perda de água associada às estruturas celulares.

Os danos resultantes de estresse mecânico dependem de fatores como a força de adesão entre a plasmalema e a parede celular, o grau de interrupção da membrana plasmática, bem como da flexibilidade da parede celular. Dentre as estratégias empregadas para superar o processo de dessecação estão a vacuolização, o armazenamento de proteínas, lipídios e carboidratos no vacúolo, para substituir a água perdida, a supressão de macromoléculas e o dobramento da parede celular para evitar possíveis rupturas da membrana plasmática (Vicré et al., 2004). Moore et al. (2006), avaliando respostas da parede celular em folhas de *Myrothamnus flabellifolia* em estado de dessecação, demonstraram que a flexibilidade da parede celular, devido a modificações induzidas pelo acúmulo de polímeros de pectinas, parece ser um mecanismo importante de tolerância à dessecação. Os autores enfatizam ainda

que o aumento da concentração de polímeros de arabinose, que apresentam alta flexibilidade e grande capacidade de absorção de água foi determinante para a reidratação das folhas após o período de dessecação.

Mudanças nas trocas gasosas durante a dessecação foliar, especialmente na fotossíntese, em resposta ao decréscimo do conteúdo relativo de água, ocorrem em função da diminuição na assimilação líquida de CO₂ pela restrição na difusão estomática, influenciando a atividade da Rubisco (Flexas et al., 2007; Dinakar et al., 2012). O declínio na fotossíntese também pode ser devido às alterações no metabolismo fotossintético, por limitação na geração de poder redutor (Lawlor & Cornic, 2002). A limitação da fixação de carbono fotossintético durante a desidratação diminui a utilização de NADPH, com um declínio no nível NADP⁺. O esgotamento de NADP⁺ acelera o transporte de elétrons do PSI para o oxigênio molecular, promovendo a geração de ROS (Lawlor & Teraza, 2009). Os mecanismos de paralisação e recuperação da fotossíntese em plantas revivescientes parecem variar entre espécies, mas todos são dependentes da manutenção ou reparo da integridade das membranas para que ocorram as reações de transporte de elétrons (Dinakar et al., 2012).

Diferenças notáveis nos padrões de comportamento fotossintético são observadas em plantas homoclorófilas e poiquiloclorófilas; as primeiras mantêm o conteúdo de clorofilas, sem apresentar grandes alterações ou graves desarranjos nos cloroplastos durante a dessecação (Farrant, 2000; Navari-Izzo et al., 2000). Nas poiquiloclorófilas, por sua vez, ocorre rápida degradação dos pigmentos, com desmantelamento dos cloroplastos, funcionando como estratégia eficaz contra a formação de ROS (Mundree & Farrant, 2000; Farrant et al., 2007). Plantas poiquiloclorófilas são comuns entre as monocotiledôneas e, atualmente, são representadas por oito gêneros pertencentes a cinco famílias (Boryaceae, Cyperaceae, Poaceae, Schizaeaceae e Velloziaceae). Nas homoclorófitas estão incluídas espécies de cinco famílias de pteridófitas (Actiniopteridaceae, Aspleniaceae, Pteridaceae, Selaginellaceae e Sinopteridaceae) e quatro famílias de eudicotiledôneas sendo elas: Gesneriaceae, Myrothamnaceae, Scrophulariaceae e Linderniaceae (Dinakar et al., 2012).

Em *Craterostigma wilmsii* (Scrophulariaceae) foram descritas mudanças na estrutura dos cloroplastos, que adquirem formatos arredondados no estado desidratado; suas membranas internas passam a se localizar periféricamente e os grana tilacoideais permanecem conservados e visíveis. Já em *Myrothamnus flabellifolia* (Myrothamnaceae), também homeoclorófila, os cloroplastos assumem formato ovalado e os tilacóides mantêm seu empilhamento. Diferentemente, na peciloclorófila *Xerophyta viscosa* (Velloziaceae), as membranas externas dos cloroplastos mantêm-se contínuas enquanto suas membranas internas são alteradas, perdendo sua conformação inicial, adquirindo aparência vesiculada após a dessecação, com amplas possibilidades de reparação na reidratação (Sherwin & Farrant, 1996).

Plantas revivescentes desenvolveram complexos mecanismos de proteção para evitar o dano iniciado por radicais livres. Os componentes primários incluem enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalases e peroxidases, e sequestradores de radicais livres, como carotenóides, ácido ascórbico, tocoferóis e glutathione oxidada e reduzida. Sob condições de estresse moderado, os radicais são eficientemente eliminados por este sistema de defesa antioxidante. No entanto, em períodos de estresse mais severo por dessecação em plantas sensíveis, o sistema de eliminação desses radicais torna-se saturado pelo aumento da taxa de produção de ROS e os danos são inevitáveis (Mundree et al., 2002). Moore et al. (2005), avaliando os mecanismos de defesa frente à dessecação em folhas de *Myrothamnus flabellifolia*, encontraram forte atuação de substâncias protetoras como o ácido 3,4,5 tri-O-galloilquínico, que protege as membranas da dessecação, intercalando-se na bicamada lipídica e reduzindo o tempo de transição entre as fases de líquido cristalino e gel.

Outra estratégia utilizada por espécies tolerantes à dessecação é a grande capacidade de produção e acúmulo de compostos osmoticamente ativos, que atuam na substituição da água perdida no processo de desidratação e também para proteção contra os efeitos deletérios da alta concentração de íons (Gaff & Oliver, 2013). Tais alterações parecem envolvidas com a manutenção da estabilidade das membranas no estado desidratado e/ou com a promoção de uma vitrificação citoplasmática (Hoekstra

et al., 2001). Substâncias como carboidratos, sorbitol, manitol, glicerol, prolina, betaínas, polifenóis e proteínas hidrófilas (LEAs) e de choque térmico (HSP) estão relacionadas ao ajuste osmótico celular e a uma possível osmoproteção, pela ação de captura de ROS e dissipação do excesso de energia (Farrant, 2000; Farrant et al., 2007; Gechev et al., 2013).

O acúmulo destes compostos varia entre os grupos de plantas tolerantes à dessecação, embora a sacarose seja o açúcar de reserva predominante no tecido foliar desidratado da maior parte das plantas revivescentes (Whittaker et al., 2001; Dinakar & Bartels, 2013; Moyankova et al., 2014). Em algas e musgos tolerantes à dessecação, a sacarose representa um constituinte importante nos tecidos dessecados (Bewley 1979). A trealose, por sua vez, parece atuar como açúcar protetor acumulado em tecidos dessecados de samambaias tolerantes como *Selaginella lepidophylla* e *S. sartorii* (Iturriaga et al., 2000). No entanto, um estudo recente indica que a trealose também se acumula em maiores níveis em espécies sensíveis à dessecação como *Selaginella moellendorffii*, sob as mesmas condições (Yobi et al., 2012). Para as angiospermas, além da sacarose, a glicose e oligossacarídeos da série da rafinose (rafinose, estaquiase e verbascose) também são acumulados em resposta à desidratação e atuam como importantes osmorreguladores celulares durante a fase de dessecação e como fonte de carbono para a glicólise durante a reidratação (Whittaker et al., 2001; Peters et al., 2007; Martinelli, 2008; Sugiyama et al., 2014).

Os avanços nos estudos dos mecanismos de tolerância à dessecação em plantas revivescentes demonstram que as respostas são multigênicas e multifatoriais. Recentemente, a regulação gênica que contribui para a estabilidade metabólica e macromolecular durante a dessecação tem recebido muita atenção, embora ainda falte compreensão de como estes fatores individuais podem interagir espacial e temporalmente. A aplicação de tecnologias “ômicas”, como transcriptômica, metabolômica e proteômica (Figura 1) auxilia na identificação e listagem de componentes necessários para avaliar o grau em que vários fatores mensuráveis (por exemplo, transcrições de genes específicos, proteínas e metabolitos) contribuem para a compreensão da tolerância à dessecação (Moore et al., 2009).

Os genes transcritos durante a desidratação atuam na síntese de compostos que podem prevenir danos celulares relacionados ao estresse, participando da defesa antioxidante, sintetizando proteínas reguladoras, moléculas de sinalização e enzimas relacionadas ao metabolismo de proteção (Dinakar & Bartels, 2013). Os genes envolvidos na síntese de carboidratos da série da rafinose, por exemplo, são induzidos em diferentes fases, sendo abundantemente expressos em folhas reidratadas de *Craterostigma plantagineum*. Em contraste, para folhas de *Haberlea rhodopensis* sua expressão foi elevada apenas durante a dessecação (Rodriguez et al., 2010; Gechev et al., 2013).

Modelagem do processo de detecção do déficit hídrico através da dessecação e reidratação

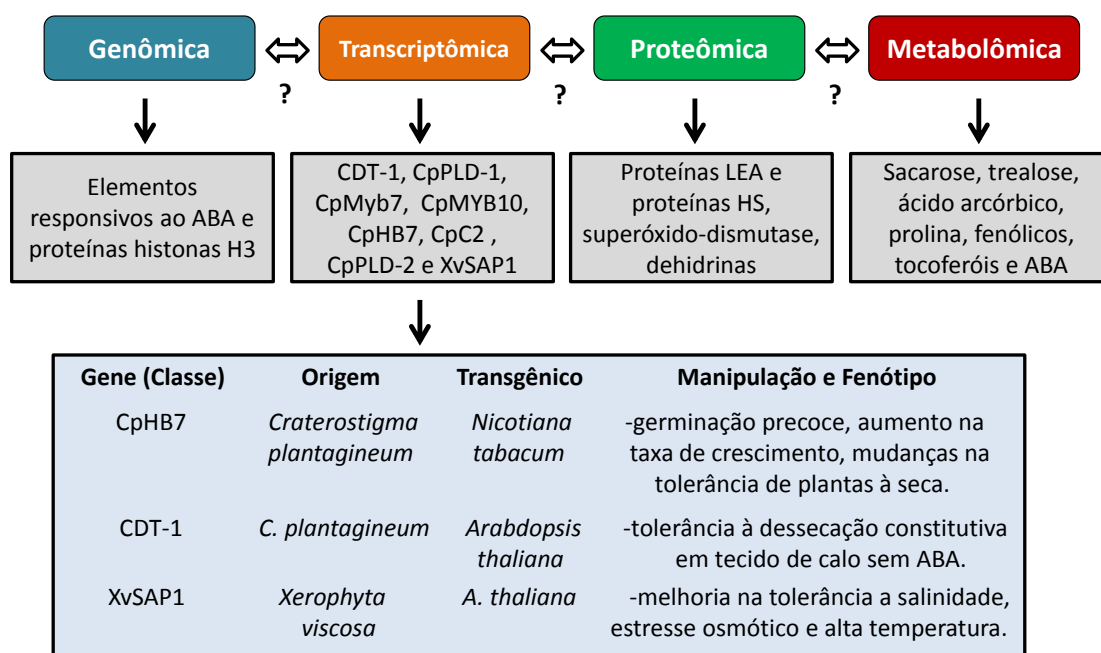


Figura 1. Esquema demonstrativo de análises multivariadas utilizando tecnologias “ômicas” para compreensão dos processos de percepção da desidratação em plantas tolerantes à dessecação. A integração dos dados e suas conexões ainda não estão bem estabelecidas (indicadas por “?”). São mostrados exemplos de plantas transgênicas modificadas a partir de genes transcritos de plantas revivescentes e os fenótipos resultantes. Modificado de Moore et al. (2009).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal, que normalmente se acumula em plantas sob déficit hídrico, exercendo vários efeitos fisiológicos (por meio de picos de sinalização) sobre o metabolismo. Embora, os sinais que desencadeiam sua biossíntese não sejam bem entendidos, o ABA tem sido

identificado como mensageiro nas vias de resposta de percepção do estresse, promovendo modificações celulares (Huang et al., 2008). Em plantas revivescentes, a sinalização durante a dessecação de tecidos vegetativos é mediada pelo ABA, que pode ativar a expressão de genes que codificam proteínas com função protetora como as LEAs do grupo 2 (dehidrinas) e LEAs do grupo 3, como as aquaporinas (Gaff et al., 2009).

Evidências indicam que o ABA é amplamente distribuído em briófitas podendo acionar a resistência à seca em alguns musgos (Werner et al., 1991). Em folhas de angiospermas revivescentes, como *Craterostigma plantagineum* e *Myrothamnus flabellifolia* foi detectado aumento de duas a três vezes nos níveis de ABA endógeno após período de dessecação, enquanto que em *Xerophyta humilis*, o acúmulo de ABA foi seis vezes maior em plantas desidratadas. Para *Chamaegigas Intrepidus*, uma planta aquática tolerante a dessecação, foi descrito um incremento de 20 vezes mais ABA em plantas desidratadas, quando comparadas as plantas hidratadas (Schiller et al., 1997).

O estudo dos processos de desidratação e reidratação de espécies revivescentes indica que a tolerância à dessecação em órgãos vegetativos constitui uma estratégia ecológica de sucesso comparada a plantas homeohídricas (Aidar et al., 2010). O sucesso ecológico de plantas pecilohídricas sugere a evolução de um processo que deve atender gastos e benefícios adaptativos relacionados ao balanço de carbono em ambientes adversos, onde os períodos de hidratação são raros e de curta duração (Eickmeier, 1979; Alcantara et al., 2015).

Estudos sobre a ocorrência de tolerância à dessecação em angiospermas brasileiras ainda são escassos. Algumas espécies foram incluídas em uma lista de plantas tolerantes à dessecação da América do Sul, publicado por Gaff (1987) e uma longa lista de espécies tolerantes e "potencialmente tolerantes" foi apresentada por Meirelles et al. (1997), incluindo 30 espécies de vários locais do país. Pesquisas recentes (Aidar et al 2010; Suguiyama et al., 2014; Alcantara et al., 2015) mostraram algumas respostas ecofisiológicas, bioquímicas e metabólicas presentes em plantas da família Velloziaceae e suas estratégias de sobrevivência em incolbergs e

campos rupestres, porém o entendimento da tolerância à dessecação nessas espécies ainda é pouco entendido.

1.2. Caracterização da família e da espécie

A família Bromeliaceae abrange cerca de 3.160 espécies (The Plant List, 2010) distribuídas em 58 gêneros (Luther, 2008) e apresenta grandes taxas de diversidade e endemismos no Brasil, com registro de 44 gêneros e 1.279 espécies, das quais 1.097 são endêmicas (Forzza et al., 2012). A família é essencialmente neotropical e inclui três centros de distribuição e diversidade: o Escudo das Guianas, o norte dos Andes e o leste do Brasil (Martinelli, 2008). O gênero *Pitcairnia* é um dos maiores da família, incluindo 391 registros (The Plant List, 2010), com ocorrências registradas no México, América Central, Antilhas e por quase toda a América do Sul, sendo que a maior riqueza de espécies ocorre na região andina (Benzing, 2000; Santos-Silva et al., 2013).

No Brasil encontram-se aproximadamente 54 espécies, das quais 38 são endêmicas, com táxons distribuindo-se especialmente em afloramentos rochosos da Floresta Atlântica (23 spp.), em campos rupestres do Cerrado (13 spp.) e na bacia amazônica (18 spp.) (Martinelli & Forzza 2006; Forzza et al. 2012). As espécies de *Pitcairnia* possuem padrões limitados de distribuição fitogeográfica, que são estabelecidos pela interação entre atributos ecológicos e adaptações ao longo do tempo (ex., xeromorfia, mudanças climáticas e savanização), que também podem ser observados em outros grupos de plantas brasileiras (Leme et al., 2010).

Pitcairnia lanuginosa Ruiz & Pav. é uma erva terrestre que apresenta espinhos na base da lâmina foliar e inflorescência branco-lanuginosa. Ocorre no Brasil, Bolívia e Peru. No Brasil, a espécie distribui-se nos estados do AM, DF, GO, MG, MS e PA, geralmente em campos rupestres do Cerrado e Floresta Estacional Semidecídua. Quando em floração em casa de vegetação, observa-se variação na coloração das pétalas ao longo de seu desenvolvimento: verdes em botão floral, verde-avermelhadas na antese e vermelho em pós-antese (Guarçoni et al., 2010). Cabe destacar que, não há registro de estudos sobre a tolerância à dessecação com espécies da família Bromeliaceae, entretanto, foi observado que plantas de *P. lanuginosa*

crecendo em seu ambiente natural são capazes de tolerar alto grau de desidratação foliar com rápida recuperação em presença de água. Este fato motivou a escolha da espécie para o presente trabalho.

O presente estudo propôs analisar as respostas de *P. lanuginosa* frente à tolerância à seca, com o objetivo de responder as seguintes questões:

- *P. lanuginosa* é uma espécie revivescente e apresenta mecanismos de tolerância à dessecação vegetativa?
- A tolerância à seca extrema suportada pela espécie deve-se a mecanismos distintos daqueles já descritos para outras plantas tolerantes à dessecação?

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos de inativação e recuperação fisiológicos, bioquímicos e as modificações estruturais em plantas de *Pitcairnia lanuginosa* nos processos de desidratação e reidratação.

2.2. Específicos

- Analisar as relações hídricas foliares durante a dessecação e recuperação da turgescência celular;
- Avaliar as respostas fotossintéticas por meio de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e teor de pigmentos, em condições de déficit hídrico e reidratação;
- Quantificar o conteúdo de carboidratos de reserva e analisar sua relação com o mecanismo de ajustamento osmótico;
- Avaliar as alterações morfológicas e estruturais e de composição da parede celular foliar frente ao estresse mecânico durante a desidratação e reidratação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições experimentais

Plantas de *Pitcairnia lanuginosa* foram coletadas em afloramentos rochosos em área de Cerrado (Figura 2a, b, c) no município de Coxim-MS, Brasil (18 ° 28'53.21 "S, 54 ° 45'32.85" W), transferidas para vasos de 5 kg contendo substrato comercial plantmax® e cultivadas em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo-SP. O experimento consistiu de 30 conjuntos (vasos/plantas) divididos em três grupos para imposição dos diferentes tratamentos hídricos: plantas regadas diariamente (controle - C); (D1) suspensão total da rega por 60 dias e (D2) suspensão total da rega por 90 dias, seguidas de reidratação (Figura 2d, e).

As análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas na porção média de folhas completamente expandidas, posicionadas na terceira fileira do centro para a extremidade da roseta, de cada planta. As plantas do controle foram regadas diariamente até o solo no interior dos vasos atingir a capacidade de campo. A reidratação para as plantas dessecadas foi efetuada adicionando água a um recipiente posicionado abaixo dos vasos, permitindo que a absorção ocorresse de forma gradativa. Todas as análises foram realizadas durante o processo de dessecação aos 0, 30, 60 e 90 dias e em 24h (61 e 91 dias) e 192h (68 e 98 dias) após a reidratação, utilizando-se cinco plantas por tratamento, e duas folhas diferentes por repetição. Raízes de *P. lanuginosa* hidratadas diariamente foram coletadas, lavadas para a retirada do excesso de solo, antes de serem secas e armazenadas. Para as plantas desidratadas, o máximo possível do solo foi retirado manualmente e os fragmentos restantes foram eliminados com auxílio de um fluxo de ar intenso, para a manutenção das raízes no estado desidratado. Amostras de folhas e raízes foram acondicionadas em embalagens plásticas, armazenadas a -80°C e posteriormente maceradas em nitrogênio líquido para as análises bioquímicas.

Durante os experimentos, os parâmetros ambientais como a temperatura do ar (°C), umidade relativa (UR%) e a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF, fótons $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no interior da casa de vegetação foram monitorados utilizando-se um sensor de temperatura e umidade relativa do ar (Li-1400-140 LI-COR-Nebraska, EUA) e um sensor de quantum (Li-190SA, LI-COR Nebraska, EUA), respectivamente. Os sensores foram

conectados a um datalogger (Li-1400; Li-Cor-Nebraska, EUA), que foi configurado para realizar as medições em intervalos de 10 minutos, calculando diariamente as médias, para cada parâmetro avaliado. A análise de umidade do solo (Us%) foi realizada diariamente durante o experimento pelo método de reflectometria no domínio do tempo (TDR), utilizando uma sonda de umidade do solo, modelo ML2x ThetaProb acoplado a um datalogger HH2 (Delta-T Devices, Cambridge, UK).

3.2. Conteúdo relativo de água foliar (CRAf)

Para determinar o conteúdo relativo de água (CRAf), duas folhas inteiras por planta foram destacadas e imediatamente pesadas para a obtenção do peso fresco da folha (PFf) e em seguida foram submersas em um Becker contendo água destilada por 24 h e pesadas novamente para obtenção do peso túrgido da folha (PTf). Posteriormente, as folhas foram colocadas em estufa a 60°C por 72h para a obtenção do peso seco da folha (PSf). O conteúdo relativo de água foi calculado conforme descrito por Weatherley (1950), através da seguinte equação: $CRAf (\%) = (PFf - PSf / PTf - PSf) \times 100$.



Figura 2. Local de coleta das plantas em Cerrado de campo rupestre localizado no município de Coxim-MS (a); *Pitcairnia lanuginosa* no estado hidratado crescendo em ambiente natural de ocorrência (b); em processo de desidratação (c); em casa de vegetação e (d) em vaso com flores (e). Barra= 10cm.

3.3. Potencial hídrico (Ψ_w) e potencial osmótico (Ψ_s) foliar

O potencial hídrico nas folhas foi avaliado em duas folhas destacadas e imediatamente submetidas às medidas de pressão hidrostática negativa do xilema utilizando-se uma bomba de pressão tipo Scholander Modelo 1000 (PMS Instrument Co. UTAH, EUA). As medidas do Ψ_w foram realizadas no período da antemanhã, entre 05:00-06:00h No início da imposição do déficit hídrico e até quando o estado de hidratação permitiu, o suco celular das folhas

inteiras foi obtido por maceração e armazenado em frascos hermeticamente fechados, sendo mantidos a -20°C até a realização das medidas de Ψ_s . Ao final do experimento, o Ψ_s de todas as amostras foi determinado, utilizando-se um osmômetro de pressão de vapor modelo 5520 (VAPRO). Para cada medida foram utilizadas alíquotas de 10 μL de suco celular.

3.4. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Medidas instantâneas das taxas de assimilação líquidas do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração de CO_2 intracelular (C_i , μL^{-1}) foram realizadas no período de 8:00h às 11:00h da manhã usando um analisador de gás por infra-vermelho LI-COR 6400 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA) sob condições controladas de concentração de CO_2 (380 ppm de CO_2), densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) de 500 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura da câmara de 25°C . As medições foram feitas na porção mediana das folhas completamente expandidas conforme descrito no item 3.1. A eficiência intrínseca do uso da água ($E_i\text{UA}$) das plantas foi obtida pela razão de A/g_s . A emissão da fluorescência da clorofila a foi realizada em folhas adaptadas ao escuro por 12 h em uma câmara escura. As medidas foram realizadas utilizando-se um fluorômetro portátil (OS5p Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). As folhas, previamente adaptadas ao escuro, foram inicialmente expostas a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($1\text{-}2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para determinação da fluorescência mínima emitida (F_0), quando todos os centros de reação do FSII estão na forma oxidada. Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de 3000 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e duração de 1s foi aplicado para promover, temporariamente, a máxima redução do acceptor primário de elétrons do FSII (Q_a), determinando-se, assim, a fluorescência máxima (F_m) emitida pelas amostras adaptadas ao escuro. A partir dessas medidas, a máxima eficiência fotoquímica do PSII ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) foi calculada (Schreiber et al., 1994). Para todas as medições de trocas gasosas foliares e fluorescência da clorofila a cinco plantas foram utilizadas por tratamento.

3.5. Pigmentos fotossintéticos foliares

A extração e quantificação de clorofila *a*, *b* e carotenóides totais das folhas foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Hendry & Price (1993). As análises foram realizadas em cinco plantas por tratamento, utilizando duas folhas completamente expandidas de cada planta. Os fragmentos foliares da porção mediana das folhas (aproximadamente 100 mg) foram triturados num almofariz utilizando 3 ml de acetona a 80% (v/v), sob ausência de luz. Posteriormente as amostras foram diluídas em mais 10 mL do mesmo solvente, centrifugadas a 3000 g e os sobrenadantes analisados por espectrofotometria (SP-22, Biospectro) em comprimentos de onda de 480, 645 e 663. A partir dos valores de absorbância (Abs) obtidos, a concentração de clorofilas *a*, *b*, e dos carotenóides totais foram calculados de acordo com as seguintes equações:

Clorofila *a* ($\mu\text{mol g}^{-1}$): $(12,7 \times \text{Abs}_{663}) - (2,69 \times \text{Abs}_{645}) \times V / \text{Ms} \times 1,12$;

Clorofila *b* ($\mu\text{mol g}^{-1}$): $(22,9 \times \text{Abs}_{645}) - (4,68 \times \text{Abs}_{663}) \times V / \text{Ms} \times 1,1$;

Clorofila total ($\mu\text{mol g}^{-1}$): clorofila *a* + Clorofila *b*;

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

Onde: V = volume da solução de extração,

Ms = mg de massa seca.

3.6. Análise de carboidratos

3.6.1. Extração e quantificação de carboidratos solúveis

O material vegetal (folhas e raízes) foram liofilizados, moídos, pesados (200 mg) e submetidos a extração de carboidratos solúveis totais, como descrito por Carvalho et al. (1998). As amostras foram imersas em 20 ml de etanol a 80% e incubadas em banho de água a 80°C, durante 15 minutos. Após centrifugação (Sorvall Super T21, Kendro Laboratory Products, USA) a 3000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi re-extraído por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e concentrados em evaporador rotativo (r-215, Buchi, Switzerland) até completa remoção do etanol. Os extratos foram completados para dois ml com água destilada e analisados quanto aos teores de açúcares totais e redutores. Os resíduos foram lavados com água destilada, liofilizados e utilizados para a quantificação de amido. Os teores de carboidratos solúveis totais e açúcares redutores presentes nos extratos etanólicos foram determinados colorimetricamente pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DuBois et al., 1956) e pelo método descrito por Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945), respectivamente, utilizando-se glicose (Sigma Aldrich) como padrão.

3.6.2. Análise qualitativa de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)

Alíquotas dos extratos (1 ml) obtidos no item anterior foram deionizadas utilizando-se colunas de troca iônica Dowex (Sigma Aldrich), contendo resinas de troca catiônica de 50 x 8 (100-200 mesh) e aniônica de 1 x 8 (52-100 mesh). A eluição foi realizada com 30 mL de água deionizada e o pH do eluato final obtido foi ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio 0,4 M. Após a purificação, as amostras foram liofilizadas, concentradas e retomadas em 1 ml de água deionizada e novamente submetidas à quantificação de carboidratos totais para ajuste da concentração em 400 µg ml⁻¹ (Carvalho et al., 1998). A identificação dos carboidratos solúveis foi feita por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução em cromatógrafo DIONEX, modelo ICS 3000 (Dionex, Thermo Scientific, USA) acoplado a um detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD), utilizando coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mm). Os monossacarídeos e oligossacarídeos foram eluídos isocraticamente com 250

mM de NaOH em fluxo de 0,25 mL min⁻¹. Os picos detectados foram comparados com padrões comerciais de glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose (Sigma Aldrich).

3.6.3. Extração e quantificação de amido

Alíquotas de 10 mg do resíduo da extração dos carboidratos solúveis das folhas e raízes foram submetidas a extração de amido pelo método enzimático descrito por Amaral et al. (2007). Foram adicionados ao resíduo 0,5 mL de alfa-amilase (120 U mL⁻¹) termostável de *Bacillus licheniformis* (CE 3.3.1.1, Megazyme®, Irlanda) em tampão MOPS [ácido 3- (n-morfolino) propanosulfônico] a 10 mM pH 6,5. Essa solução foi incubada a 75 °C durante 30 minutos, sendo esse procedimento realizado duas vezes. Após o resfriamento das amostras até cerca de 50 °C, foi adicionado 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL⁻¹ de amiloglucosidade (AMG) de *Aspergillus niger* (CE 3.2.1.3 Megazyme®, Irlanda) em tampão de acetato de sódio 100 mM pH 4,5, seguida por incubação a 50 °C durante 30 minutos. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. Em seguida, a reação enzimática foi paralisada e foram adicionados 100 µL de ácido perclórico a 0,8 M para a precipitação das proteínas. A quantidade de amido foi determinada pela quebra da glicose liberada por digestão enzimática após incubação com alíquotas do reagente Glicose PAP Liquiform (Centerlab®), que contém as enzimas glucose-oxidase e peroxidase (GOD-POD), 4-aminoantipirina e fenol, em pH 7,5 a 37°C durante 15 minutos. Após a incubação, a absorbância das amostras (em triplicatas) foi medida a 490 nm em microplaca.

3.7. Análise do teor de prolina livre

O conteúdo de prolina livre foi determinado a partir de frações dos extratos etanólicos de folhas e raízes descritas no item 3.6.1., exceto para a coleta do tratamento D1 em função do número limitado de amostras. As análises foram feitas com base na reação de prolina com ninhidrina, utilizando uma mistura com alíquotas de 1 ml dos extratos e a estes adicionados 1 ml de ninhidrina ácida e 1 ml de ácido acético glacial concentrado (Bates et al., 1973). Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex, levadas a banho-maria a 100°C por 60 minutos e na sequência resfriadas em banho com gelo para interromper a reação. Posteriormente, foram adicionados 2 ml de tolueno a cada amostra, que foram agitadas e o sobrenadante foi coletado e submetido à leitura colorimétrica a 520 nm em espectrofotômetro. Para a quantificação foi utilizada uma curva padrão utilizando L-prolina (SigmaAldrich).

3.8. Extração e quantificação de ABA endógeno

A quantificação de ABA foi realizada a partir de 50 mg de material fresco de folhas e raízes, coletadas no período da manhã, e maceradas em N₂ líquido. Para a extração, foi utilizada uma solução de isopropanol: ácido acético (95: 5) e a esta adicionado 0,5 mg de ABA como padrão interno ([²H₆]-ABA), e o material foi mantido sob agitação constante durante 2 h a 4°C. A mistura foi centrifugada a 13 000 g, o sobrenadante foi recolhido e concentrado até 50 ml, sob um fluxo de N₂ gasoso. Em seguida, 0,2 ml de água ultrapura foram adicionados e o fracionamento realizado com 0,5 ml de acetato de etila. A fase orgânica foi transferida para um novo tubo e seca sob um fluxo de N₂ gasoso. . As amostras foram metiladas com diazometano, secas sob fluxo de gás N₂ e retomadas em acetato de etila (Rigui et al., 2015).

O material foi analisado no Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal do Instituto de Biociências da USP por cromatografia gasosa (modelo 6890), acoplada a um espectrômetro de massas Shimadzu (modelo: GC/MS-QP2010 SE) equipado com uma coluna HP-1701 (30 metros, 0,25 mm ID, filme interno 0,50 mm de espessura) usando hélio como gás de arraste, a um fluxo swde 4 ml min⁻¹ no seguinte programa: 3 min a 150°C, seguido de uma rampa de 5°C min⁻¹ até 210°C e 15°C min⁻¹ até 260 ° C. Como controle da corrida,

íons com relação de massa (m/z) 134, 162 e 190 (que corresponde ao ABA endógeno) e 138, 166 e 194 (que corresponde a $[^2\text{H}_6]$ -ABA) foram monitorizados. As análises foram realizadas com cinco repetições para as folhas e três para as raízes.

3.9. Análises de parede celular

3.9.1. Extração da parede celular

A parede celular bruta foi extraída a partir de alíquotas do resíduo resultante da extração de carboidratos solúveis (item 3.6.1.). Inicialmente o material foi suspenso em dimetilsulfóxido 90% (DMSO), na proporção de 10 mL para 1 g de material, e mantido sob agitação constante por 16 h à temperatura ambiente, para eliminação parcial do amido. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada por 3 vezes e os sobrenadantes descartados. Os resíduos foram incubados com amiloglucosidade (AMG) de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3 Megazyme®, Ireland) usando a proporção de uma unidade da enzima para 10 mg de material, para completa remoção do amido. O resíduo restante foi lavado exaustivamente com água destilada, liofilizado e pesado. As amostras foram então lavadas com 10 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, centrifugadas a 800 *g* por 10 min e o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido por mais duas vezes, seguido por lavagem com 10 mL de água destilada. Na sequência, o resíduo foi lavado com 10 ml de clorofórmio:metanol [1:1] (v/v), 10 ml de acetona e 10 ml de éter etílico, sendo que cada uma destas etapas foi repetida duas vezes. A cada etapa, o material foi agitado, centrifugado a 800 *g* por 10 min e os sobrenadantes, contendo os solventes orgânicos, foram descartados. O resíduo final foi submetido à secagem em estufa a 60°C por 72h e pesado para obtenção do rendimento de parede celular bruta (Gorshkova et al., 1996).

3.9.2. Análise de composição e ligação glicosídica dos polissacarídeos de parede celular

Alíquotas das paredes celulares brutas de folhas dos tempos 0, 60 e 90 dias de dessecação e respectivas reidratações foram analisadas quanto à sua composição em monossacarídeos por cromatografia a gás acoplada a

espectrometria de massas, utilizando derivados sililados, conforme descrito por Santander et al. (2013). Cerca de 300 µg de material foram hidrolisados em HCL metanólico em tubos selados por 18 h a 80 °C. Após resfriamento e remoção do solvente sob fluxo de N₂, as amostras foram tratadas com uma mistura de metanol, piridina e anidrido acético por 30 minutos. Os solventes foram evaporados e as amostras derivatizadas utilizando Tri-Sil (Pierce) a 80 °C por 30 minutos. As análises dos trimetilsilil glicosídeos foram efetuadas em um cromatógrafo Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas 5975C, utilizando uma coluna capilar de sílica Supelco Equity-1 (30 mx 0.25mm de diâmetro interno). A porcentagem molar dos açúcares foi calculada a partir das áreas dos picos identificados nos cromatogramas.

Para as análises de ligação glicosídica, as amostras foram permetiladas, despolimerizadas reduzidas e acetiladas e os alditol acetatos parcialmente metilados resultantes foram analisados conforme descrito por Heiss et al. (2009). Cerca de 1 mg das amostras foi suspenso em 200 µl de dimetilsulfoxido e agitado por 3 dias. As amostras foram permetiladas por dois tratamentos subseqüentes com NaOH (15 min) e iodeto de metila (45 min). As amostras permetiladas foram hidrolisadas com ácido triluoroacético (TFA) 2M por 2h a 121 °C em tubos selados. Na seqüência, foram reduzidas com boroidreto de sódio deuterado e acetiladas utilizando ácido acético e TFA. Os alditol acetatos parcialmente metilados foram analisados em um cromatógrafo Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas 5975C (no modo ionização de impacto eletrônico), utilizando uma coluna capilar Supelco SP-2331 (30 m).

3.10. Análises da morfologia interna das folhas

Porções foliares hidratadas e desidratadas de *P. lanuginosa* procedentes do tratamento controle e dessecação por 90 dias (D2) com no máximo 4 mm foram fixadas com uma solução contendo 2% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,1, durante 24 h à 4°C. Em seguida, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio para a retirada do excesso de fixador, pós-fixado em 1% de tetróxido de ósmio e desidratado em série alcoólica crescente (30, 50, 75, 95, e 3 vezes em 100%), durante 30 minutos em cada etapa, em temperatura ambiente. O material foi imerso em

óxido de propileno por 24h e submetido a gradiente de óxido de propileno/resina Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences) nas seguintes proporções: 3:1 por 4 h, 1:1 por 6 h, 1:2 durante 24 h e, por fim, em resina pura durante 72 h, com a troca da resina a cada 24 h. A desidratação e todo o processo de embebição foram feitos sob vácuo. Para a polimerização, as amostras foram imersas em moldes contendo resina pura e incubadas a 60°C durante 24 h. Cortes a 250 nm de espessura foram obtidos em micrótomo ultracult e coletados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina a 1% e fotografados em microscópio OLYMPUS BX51 utilizando o programa DP Controller.

3.11. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e qualquer contraste entre as médias foi avaliado pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando o pacote estatístico BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2000). Testes de normalidade foram realizados anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da desidratação e reidratação no status hídrico das folhas

As variações na temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (%) do ar e na radiação fotossinteticamente ativa (DFFF, $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no interior da casa de vegetação ao longo do período experimental, são apresentadas na Figura 3A, B. A DFFF média para o período de dentro da estufa foi de $182,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a temperatura média do ar oscilou, com máximas de $32,6^{\circ}\text{C}$ e mínimas em cerca de $10,3^{\circ}\text{C}$ durante a avaliação, com amplitude de $22,3^{\circ}\text{C}$ no período. A umidade relativa também variou com os valores médios de $52,5\%$ durante o monitoramento.

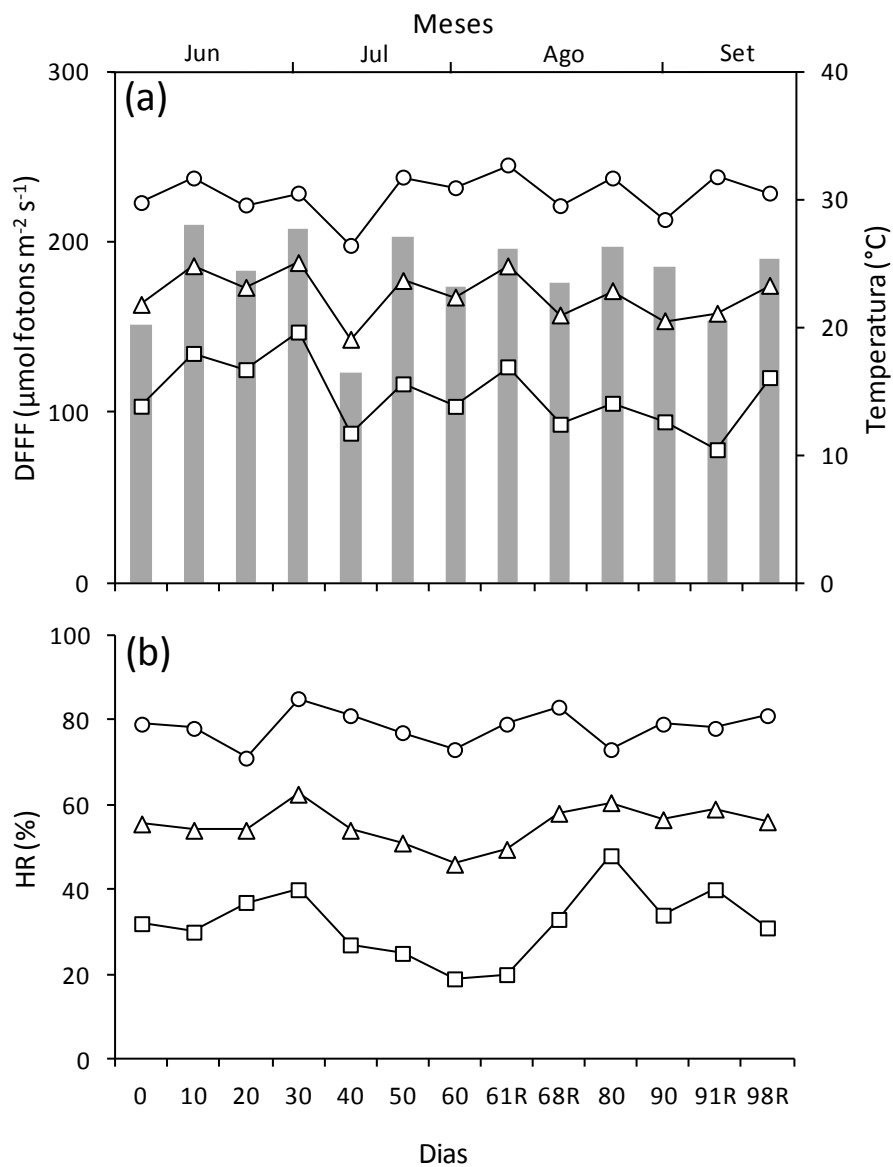


Figura 3. Parâmetros climáticos com valores médios de DFFF (barras) e temperaturas (linhas) em (a) e umidade relativa (b) [máxima (o), média (Δ) e mínima ($\square$)] dentro da casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica-SP, durante o período de experimento (Junho à Setembro de 2013). R indica o período de reidratação.

A umidade do solo decresceu para plantas mantidas sob suspensão das regas diárias (Figura 4) com diferenças significativas para as plantas irrigadas, atingindo valores próximos a zero a partir dos 60 dias. Com a retomada da rega a umidade foi restabelecida e os valores retornaram aos níveis do tratamento controle.

Pela figura 5 é possível visualizar que, já aos 30 dias de suspensão da rega, as plantas de *P. lanuginosa* mostraram alterações no seu aspecto em comparação às plantas controle. Aos 60 dias, foi observado o enrolamento das bordas foliares em direção à nervura central (Figura 5c). Esse processo de desidratação se intensificou aos 90 dias, com diminuição drástica da área foliar e dessecação das folhas mais velhas (Figura 5d). A diminuição da umidade relativa do ar observada entre 40 e 61 dias, combinada com as flutuações de temperatura (Figura 3) pode também ter influenciado as respostas relacionadas com a perda de água através da transpiração, modificando a aparência das plantas. Após a reidratação, as plantas readquiriram a turgescência, sendo observado o desenrolamento das folhas.

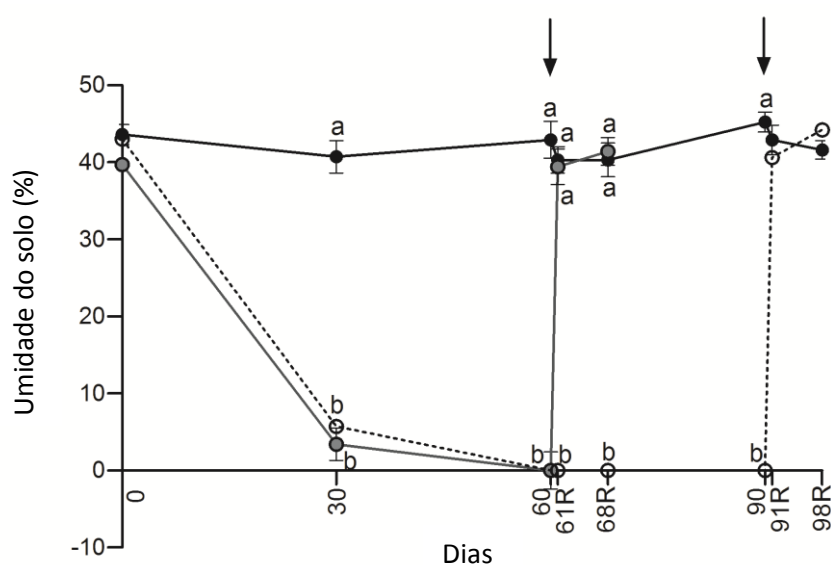


Figura 4. Umidade do solo em vasos de plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de regas. (●) controle: suspensão total da irrigação; (◐) D1 déficit hídrico por 60 dias; (○) D2 déficit hídrico por 90 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística no nível de $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média ($n = 5$). As setas indicam os dias de reidratação e R, as plantas reidratadas.

A redução no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) acompanhou os decréscimos na disponibilidade de água no solo, alcançando valores de CRAf de 64,3% e 40,8% aos 30 e 60 dias, respectivamente para o tratamento D1. Tais CRAf estiveram associados a valores de umidade do solo de 3,4 e 0,0% no mesmo período. Quando o estresse se tornou mais severo, a diminuição de água nas folhas foi mais acelerada atingindo 18,7% aos 90 dias (Figura 6c), embora com a retomada da rega, houve recuperação a níveis semelhantes ao controle para D1 e D2 às 192 h após a reidratação. A recuperação da turgescência ocorreu gradualmente a partir da base para o ápice da folha promovendo a abertura das bordas foliares recém-enroladas.



Figura 5. Aspecto das plantas de *P. lanuginosa* no experimento com: (a) controle com hidratação plena; (b) 30 dias de déficit hídrico; (c) 60 dias de déficit hídrico; (d) desidratada aos 90 dias; (e) 192 h após a reidratação. Barra= 10 cm.

Acompanhando as mudanças observadas para o CRAf, o potencial hídrico da folha (Ψ_w) se tornou mais negativo nas plantas submetidas ao estresse. A partir dos 20 dias, ocorreu decréscimo dos valores de Ψ_w

chegando a -4,1 MPa para D1 em 60 dias, sendo este valor restaurado rapidamente, chegando a valores finais de -0,4 MPa às 192 h após a reidratação. No tratamento D2, as plantas apresentaram os valores mais baixos de potenciais de água até os 68 dias, que chegaram a -5,54 MPa. A partir deste ponto, já não foi possível realizar as medições em função do estado de desidratação das folhas. Após a reidratação, houve recuperação gradual do Ψ_w atingindo média -3,08 e -0,7 MPa para D2 nos tempos de reidratação de 24 h e 192 h, respectivamente (Figura 6a).

O potencial osmótico foliar (Ψ_s) também diminuiu significativamente devido à intensificação do déficit hídrico, corroborando os resultados obtidos para o potencial de água. A figura 6b mostra a redução do potencial osmótico celular com valores de -0,78 MPa a -1,13 MPa, para o controle e D1 em 30 dias, respectivamente. Foram observados valores mais negativos aos 60 dias para D1, atingindo -1,65 MPa no final de 64 dias de monitoramento. Em medidas subsequentes, não foi possível extrair o suco celular das folhas, o que impediu a estimativa das medidas no final do estresse para D2. A partir dos 30 dias de avaliação, foi notável a diferença estatística entre os tratamentos ($p \leq 0,05$), correspondendo aos menores valores de potencial osmótico nos tratamentos de estresse quando comparados ao controle. Após a reidratação, o Ψ_s das folhas foi restabelecido gradualmente até atingir valores semelhantes ao controle, sem diferença significativa quando comparado com plantas hidratadas.

Como a diminuição do CRAf e do potencial hídrico das plantas foi mais acelerada após os 40 dias de déficit hídrico, coincidindo com a diminuição da umidade relativa do ar e aumento das temperaturas, é provável que tenha havido aumento da transpiração. Esse aumento na demanda transpiratória pode ter contribuído para a rápida diminuição da umidade do solo, possivelmente diminuindo o gradiente de potencial de água das folhas, desencadeando a redução do potencial osmótico. A diminuição do Ψ_s no mesmo período pode ser atribuída ao aumento na concentração intracelular de solutos e/ou a redução drástica da quantidade de água nas células. Após a reidratação, quando a água tornou-se disponível no solo novamente, houve

restabelecimento dos níveis de água nas células e recuperação do status hídrico das folhas.

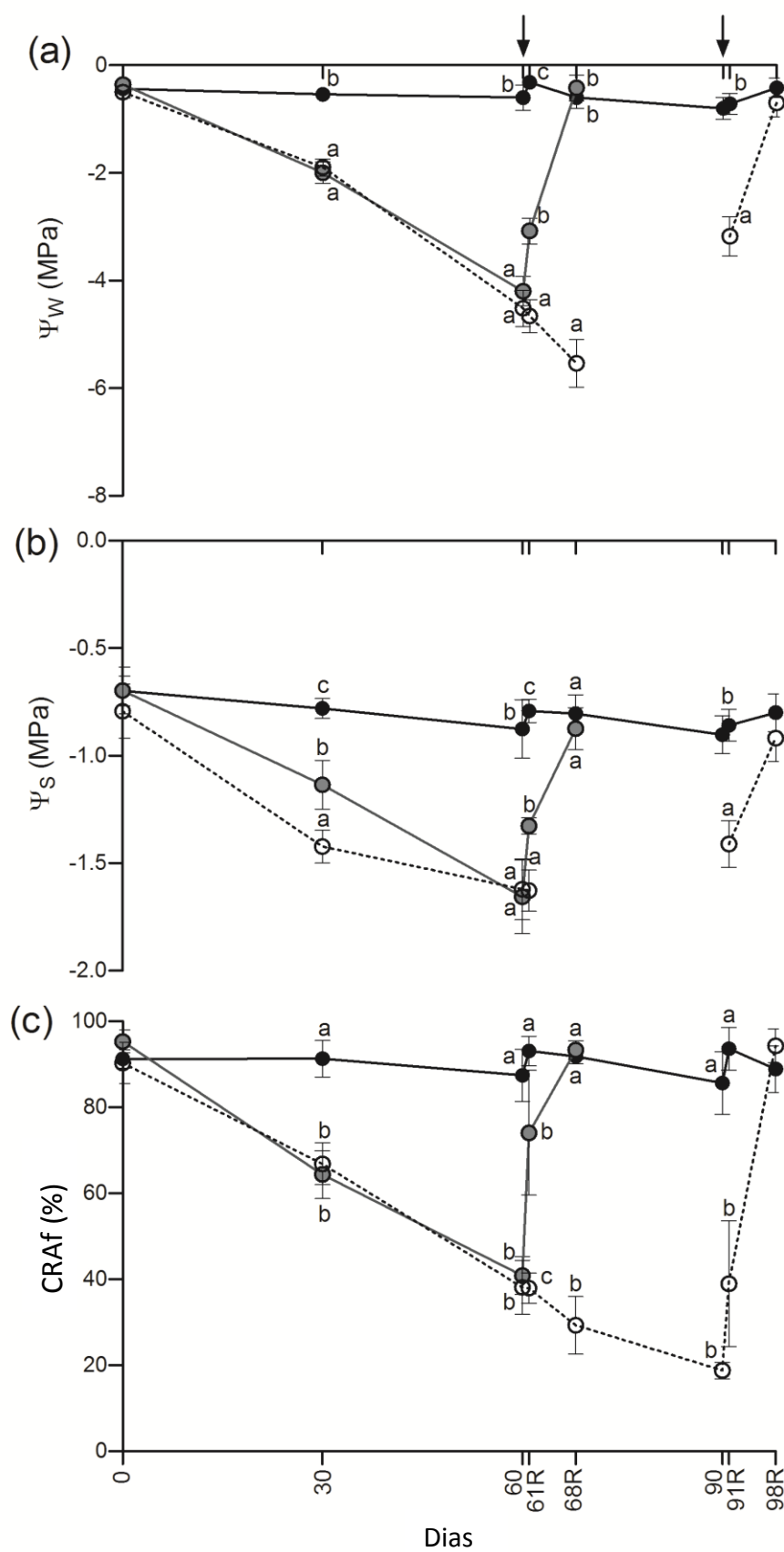


Figura 6. (a) Potencial hídrico foliar (Ψ_w); (b) potencial osmótico foliar (Ψ_s) e (c) conteúdo relativo de água foliar (CRAf) de plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de regas. (●) controle com suspensão total da irrigação; (●) D1 déficit hídrico por 60 dias; (o) D2 déficit hídrico por 90 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística no nível de $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média ($n= 5$). As setas indicam os dias de reidratação e R, as plantas reidratadas.

4.2. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

As trocas gasosas das plantas de *P. lanuginosa* guardaram estreita relação com a disponibilidade hídrica, apresentando reduções significativas durante o processo de dessecação nos tratamentos D1 e D2 seguidas de recuperação após o retorno das regas, atingindo valores semelhantes aos das plantas controle. A assimilação líquida de carbono (A) apresentou valores máximos de $8,39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o tratamento controle, que se manteve constante durante todo o experimento e diferindo significativamente dos tratamentos de suspensão de irrigação para D1 e D2. Nestes tratamentos de restrição hídrica, observou-se redução de 50% das taxas fotossintéticas após 30 dias de suspensão das regas e valores próximos à zero a partir dos 48 dias com taxas respiratórias totais (respiração mitocondrial + fotorrespiração) de $-0,074 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $-0,053 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, aos 60 e 90 dias de experimento (Figura 7).

Para D1 a recuperação da assimilação foi gradual, com valores $2,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ após 24h (dia 61) e $7,91 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ após 192 h (dia 68) após a retomada da irrigação (Figura 7a). Mesmo após 90 dias de suspensão total das regas e apresentando taxas de respiração no escuro por mais de 50 dias, as plantas foram capazes de recuperar a fotossíntese, apresentando taxas médias de A de $1,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ após 24 h de reidratação (CRAf 38,94%) e de $7,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ após 192 h, sendo estes semelhantes aos das plantas controle, demonstrando boa capacidade de recuperação.

Outro parâmetro afetado foram as taxas de transpiração (Figura 7b), sendo observado decréscimo para os tratamentos de estresse após os 20 dias, embora tenham se mantido estáveis até os 32 dias. Após esse período, houve declínio consistente da transpiração foliar, atingindo valores mínimos de $0,043$

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em D1 e $0,032 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para D2, após 40 dias de indução do déficit hídrico. O grupo exposto à hidratação plena manteve valores médios de taxas de transpiração acima de $1,73 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e para as plantas em D1 e D2 os valores foram restaurados rapidamente após a reidratação.

Diferenças significativas foram igualmente observadas na condutância estomática das folhas com valores a partir de $84,47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no tempo zero para o tratamento controle, de $38,27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aos 30 dias de suspensão da irrigação e $0,059 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aos 60 dias para D1. Valores próximos de zero ($0,052 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), também foram observados aos 90 dias para D2, com a retomada da condutância estomática ocorrendo gradualmente após a reidratação (Figura 7c). Houve aumento na concentração interna de CO_2 em plantas sujeitas a seca a partir dos 35 dias, fato relacionado com a diminuição da taxa de fotossíntese líquida (Figura 7d). O fechamento parcial dos estômatos ocasionado pela diminuição do CRAf , provavelmente, restringiu a absorção de CO_2 , causando um aumento da concentração no mesofilo durante o período de stress mais intenso para D1 e D2. Os valores deste parâmetro também foram reparados após o influxo de água nas folhas.

A partir dos dados de assimilação e trocas gasosas foi possível avaliar a eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) das plantas (A/g_s). A EiUA está diretamente ligada ao tempo de abertura dos estômatos e a quantidade de CO_2 que a planta absorve para a fotossíntese, com a água perdida para a atmosfera por evapotranspiração, em função do gradiente de potencial de água, sendo assim um bom indicador de possíveis limitações estomáticas à fotossíntese. As plantas de *P. lanuginosa* foram eficientes no uso da água quando ele estava disponível para a engrenagem assimilatória. Para o tratamento controle, como não houve queda na assimilação, os valores médios permaneceram em torno de $80,2 \mu\text{mol mol}^{-1}$ sem grandes flutuações durante o monitoramento.

Plantas submetidas aos tratamentos de restrição de água foram menos eficientes no uso da água a partir dos 34 dias, com diferenças evidentes e valores de $-2,57 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (D1) e $-0,58 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (D2) aos 60 e 90 dias, respectivamente (Figura 7e).

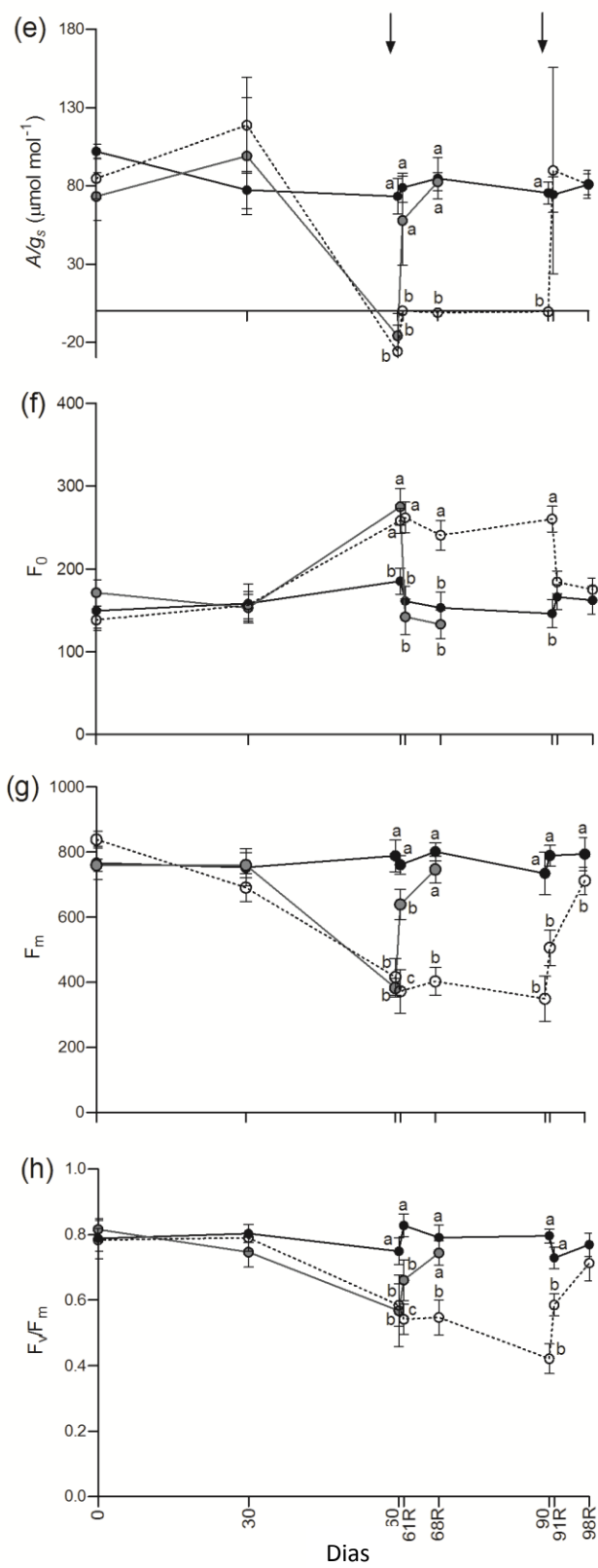
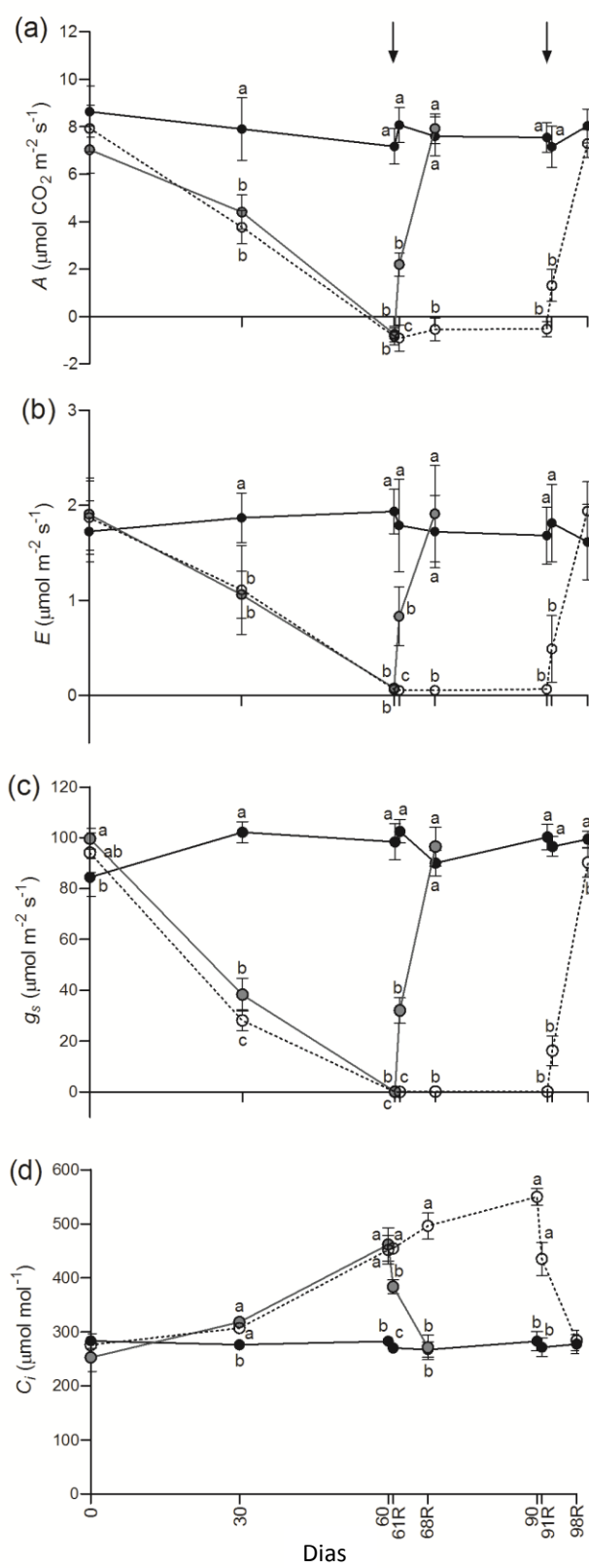


Figura 7. Trocas gasosas: (a) Assimilação líquida de carbono (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (b) taxas de transpiração (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (c) condutância estomática (g_s , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (d) concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$); (e) eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s); (f) fluorescência inicial (F_0); (g) fluorescência máxima (F_m) e (h) eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m) em plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de rega. (●) controle com plantas hidratadas; suspensão total da irrigação: (○) D1 déficit hídrico por 60 dias; (○) D2 déficit hídrico por 90 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística em nível de $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média ($n = 5$). As setas indicam os dias de reidratação e R, as plantas reidratadas.

Devido à restrição na assimilação de carbono e diminuição na condutância causada pelo fechamento estomático em estágios avançados do estresse, as plantas, possivelmente, paralisaram a fotossíntese e transpiração como um mecanismo de defesa em detrimento do crescimento e ganho de biomassa. Após a reidratação, com a retomada da fotossíntese e condutância estomática, as plantas readquiriram a capacidade de usar a água com maior eficiência em níveis similares ao controle.

As alterações na emissão de fluorescência da clorofila *a*, avaliadas por meio dos parâmetros de fluorescência inicial (F_0), máxima (F_m) e da eficiência quântica potencial do fotossistema II, em folhas de *P. lanuginosa* são mostradas nas Figuras 7f, g, h. A suspensão total das regas para indução do processo de dessecação proporcionou significativos aumentos na emissão de F_0 nos tratamentos D1 (48,6%) e D2 (78,1%), ao final de 60 e 90 dias respectivamente, em contraste com os valores médios obtidos para o tratamento controle no mesmo período. Por outro lado, os valores de F_m declinaram 51,4% para ambos tratamentos D1 e D2, após 50 dias de déficit hídrico, quando o CRAf atingiram 40,8%, a assimilação de carbono já estava paralisada e os teores dos pigmentos fotossintéticos (Figura 7A) já apresentavam as menores concentrações observadas, indicando que mesmo com um teor relativo de água em níveis razoáveis, o estresse afetou o PSII.

A eficiência fotoquímica do PSII atingiu o máximo (0,823) em plantas do tratamento controle, com diferenças significativas obtidas para os outros tratamentos. Foi observado declínio da F_v/F_m a partir dos 38 dias, atingindo 0,567 para D1 aos 60 dias e 0,421 em D2 aos 90 dias de estresse. Os valores refletem o desarranjo do aparato fotossintético, causado pelo severo estresse

hídrico ao qual as plantas foram submetidas. Não obstante, o retorno das regas após 60 e 90 dias permitiu a máxima recuperação de F_v/F_m das plantas quando comparadas ao controle.

4.3. Pigmentos Fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos clorofila *a* e *b* de folhas de *P. lanuginosa* diminuíram consideravelmente resultando em redução dos níveis de clorofila total em relação ao controle, após 30 dias de imposição de déficit hídrico (Figura 8a, b). Os decréscimos foram da ordem de 57,2% nos valores de clorofila *a* aos 60 dias para D2 e 88,1% aos 90 dias. Diminuição similar foi obtida para o teor de clorofila *b* contrastando com os valores obtidos para o controle (1,18 mg g⁻¹ MS em T0) e déficit hídrico (tratamentos D1 = 0,49 mg g⁻¹ MS aos 60 dias e D2 = 0,34 mg g⁻¹ MS aos 90 dias).

A recuperação e síntese de novas clorofilas após a reidratação ocorreu gradualmente, atingindo valores semelhantes ao controle quando o CRAf estava próximo de 85,0%, aos 98 dias (Figura 8c). Além disso, foi possível perceber que a recuperação foi mais lenta, quanto mais intenso foi o déficit imposto, fato que provavelmente influenciou as taxas de assimilação durante a reidratação.

O teor de carotenóides totais oscilou durante os experimentos, aumentando significativamente a partir dos 30 dias para D1 e D2 até os 68 dias, valores que decresceram rapidamente para D1 com a reidratação e para D2 aos 68 dias. Com a intensificação do estresse ocorreu continuo incremento de carotenóides (49,8%) após 68 dias (Figura 8d), quando comparado ao controle.

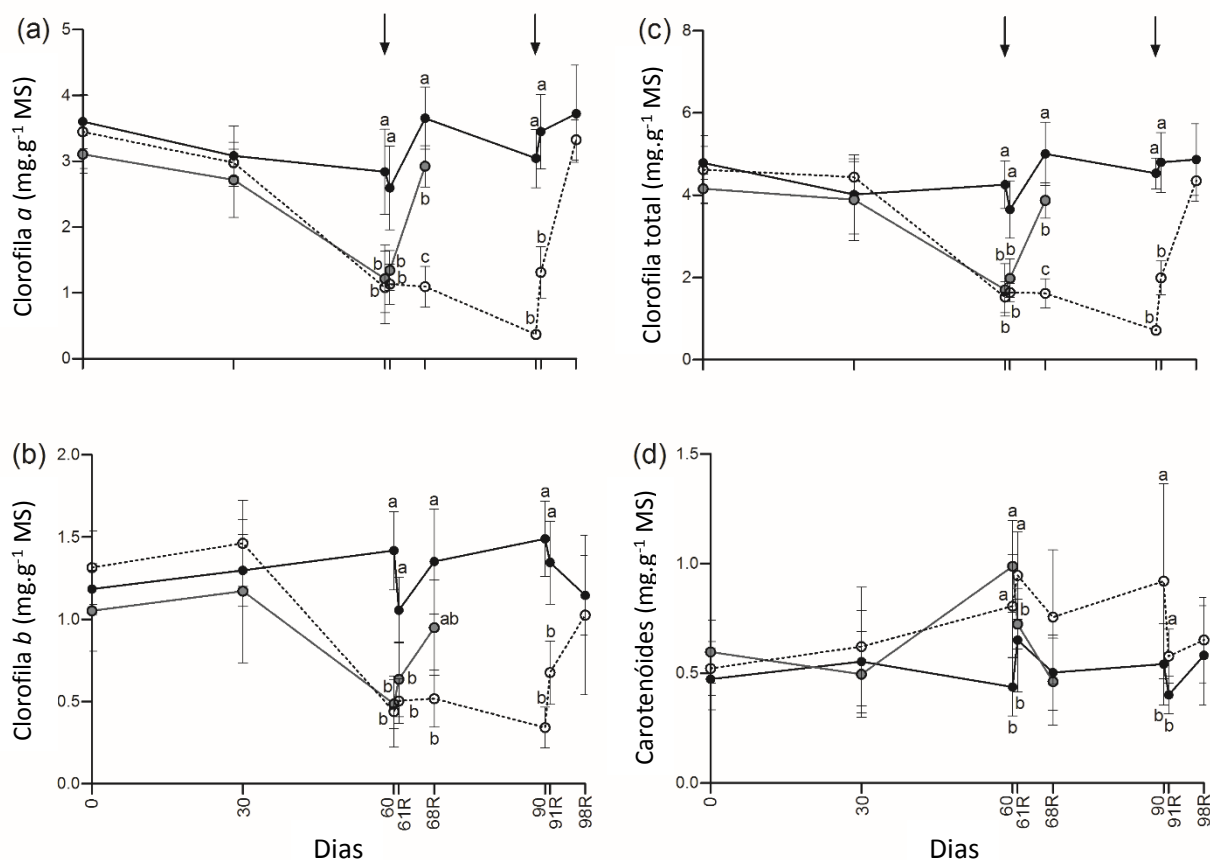


Figura 8. Pigmentos fotossintéticos: (a) teores de clorofila a (mg.g⁻¹ MS); (b) de clorofila b (mg.g⁻¹ MS); (c) de clorofila total (mg.g⁻¹ MS) e (d) carotenóides totais (mg.g⁻¹ MS) em plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de rega. (●) controle hidratado; suspensão total da irrigação: (◐) D1 déficit hídrico por 60 dias; (○) D2 déficit hídrico por 90 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística em nível de $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média (n= 5). As setas indicam os dias de reidratação e R, as plantas reidratadas.

4.4. Carboidratos solúveis e amido

O conteúdo de carboidratos solúveis totais também foi influenciado pela supressão hídrica ao longo do experimento. Como observado para os parâmetros fisiológicos, o teor de carboidratos do tratamento controle diferiu significativamente dos outros tratamentos, após 60 dias de suspensão da rega. Devido à redução do CRAf (cerca de 40%) e potencial hídrico, houve acúmulo gradual de carboidratos, atingindo valores de 76,5 e 126,8 mg.g⁻¹MS respectivamente, com aumento de 1,8 vezes e 2,9 vezes para D1 e D2 em relação ao controle, no mesmo período (Figura 9a). Resultados semelhantes

foram obtidos para as raízes, com aumento de 2,8 vezes mais carboidratos solúveis acumulados aos 90 dias de indução do estresse (Figura 9d). Com o influxo de água da reidratação e, conseqüente aumento no CRAf, o conteúdo total de carboidratos solúveis de folhas e raízes decresceu, atingindo valores próximos ao controle.

O processo dessecativo também promoveu aumento no teor de açúcares redutores nas folhas, com valores de 44,2 mg.g⁻¹MS em 60 dias, o que corresponde a 3,0 vezes mais em comparação com a média de controle, que foi de 14,6 mg.g⁻¹MS (Figura 9b). Além disso, houve diminuição progressiva nos valores de D2 em 90 dias, atingindo 28,4 mg.g⁻¹MS, o que provavelmente pode estar relacionado com um mecanismo de ajuste osmótico. No entanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos para o teor de carboidratos redutores nas raízes (Figura 9e).

As plantas mantidas sob irrigação diária não mostraram grandes oscilações quanto ao teor de amido foliar. Diminuição drástica no teor de amido foi detectada para D1 e D2, atingindo valores próximos de zero aos 50 dias. Na reidratação, a síntese de amido foi retomada após 68 e 98 dias, porém em níveis muito inferiores àqueles encontrados nas plantas do controle (Figura 9c). Raízes de plantas de *P. lanuginosa* apresentaram pouca quantidade de amido, quando comparadas às folhas. Durante o experimento, não houve grandes mudanças no teor de amido das raízes, embora tenha sido observada diferença significativa com redução aos 61, 90 e 91 dias de monitoramento (Figura 9f).

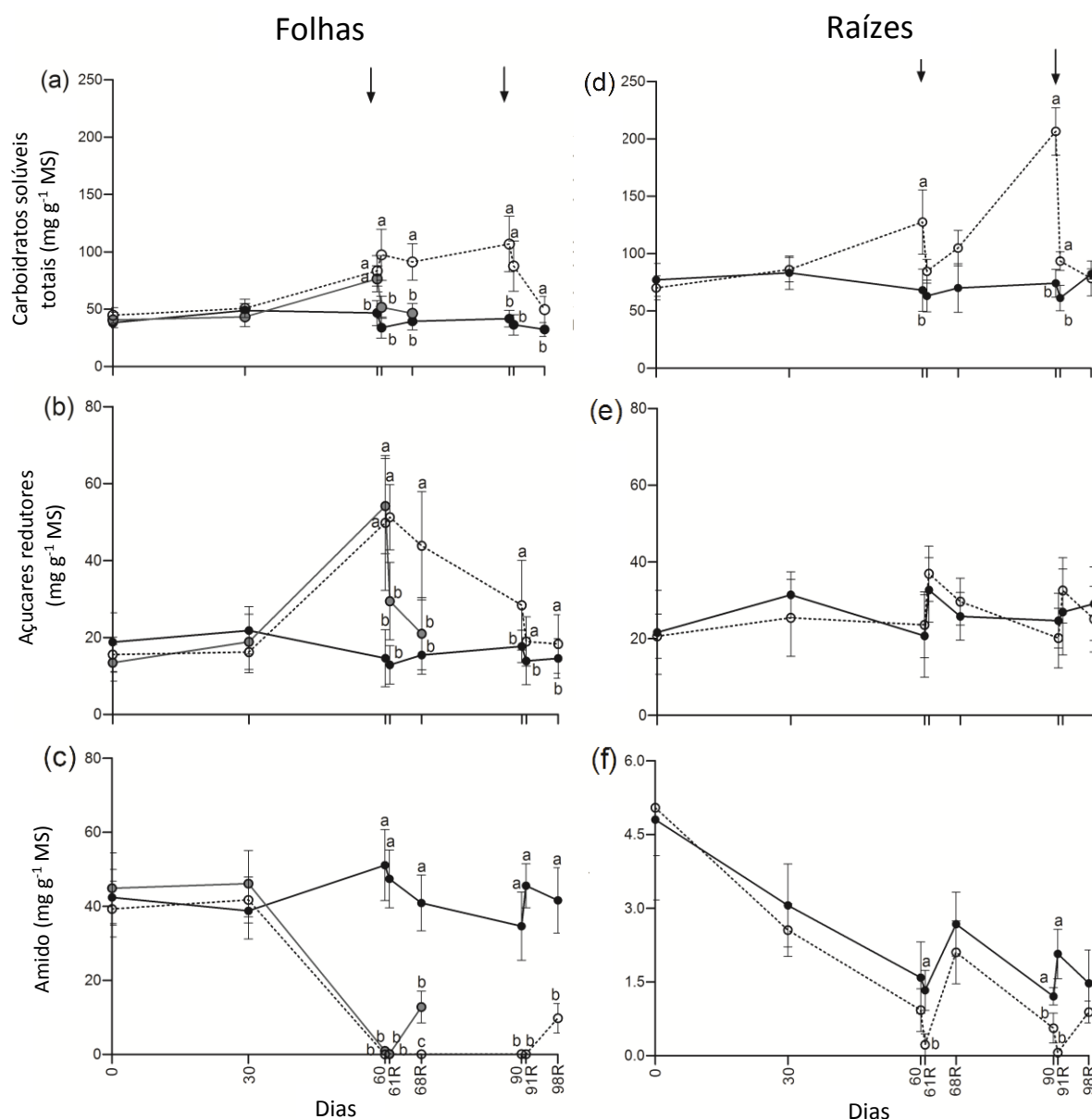


Figura 9. Teor de carboidratos solúveis: (a-d) carboidratos solúveis totais ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$); (b-e) açúcares redutores ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) e (c-f) amido ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) em folhas e raízes de plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de rega. (●) controle hidratado; suspensão total da irrigação: (◐) D1 déficit hídrico por 60 dias; (○) D2 déficit hídrico por 90 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística em nível de $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média ($n= 5$). As setas indicam os dias de reidratação e R, as plantas reidratadas.

As análises quantitativas de carboidratos por HPAEC/PAD revelaram aumento gradual de glicose nas folhas submetidas à dessecação para D1 e D2, com valores de $31,6 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$ para este último após 61 dias e aumento de 5,1 vezes em relação ao controle (Figura 10a). A partir dos 68 dias, ocorreu diminuição do teor de glicose com nenhuma diferença significativa entre os

tratamentos até ao fim das medições. Para as raízes, houve um incremento nos níveis de glicose após os 60 dias, embora com diferenças significativas somente após os 68 dias em D2 (Figura 10d).

O aumento no teor de frutose nas folhas foi semelhante ao da glicose ao longo do mesmo período (Figura 10b). Para as plantas mantidas em hidratação constante, os resultados diferiram estatisticamente entre os 60 e 68 dias de monitoramento, quando comparados com D1 e D2. Para este último, ocorreu aumento de 2,4 vezes ($18,2 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) aos 61 dias em comparação com plantas hidratadas. Após este período, a quantidade de frutose declinou para ambos os tratamentos, embora para D1, aos 62 dias essa diminuição tenha sido observada 48h após a reidratação, e para D2 essa diminuição ocorreu independente da reidratação. Nas raízes, não foram observadas diferenças significativas no teor de frutose (Figura 10e), apesar de valores reduzidos terem sido detectados em 68 e 90 dias após a indução da seca.

O teor de sacarose das folhas variou significativamente aos 60 dias de estresse (Figura 10c), com um aumento substancial de 2,7 vezes aos 68 dias para D2, em comparação com o controle. Este aumento coincidiu com a redução gradual dos níveis de glicose e frutose (CRAf abaixo de 30%), indicando possível mecanismo de osmoproteção, no período de seca mais drástica. As raízes apresentaram valores mais elevados de sacarose do que as folhas, com aumento gradual a partir de 60 dias nos tratamentos de déficit hídrico. Em ambas, folhas e raízes, a quantidade de sacarose diminuiu significativamente após a reidratação, atingindo valores semelhantes aos do controle (Figura 10f).

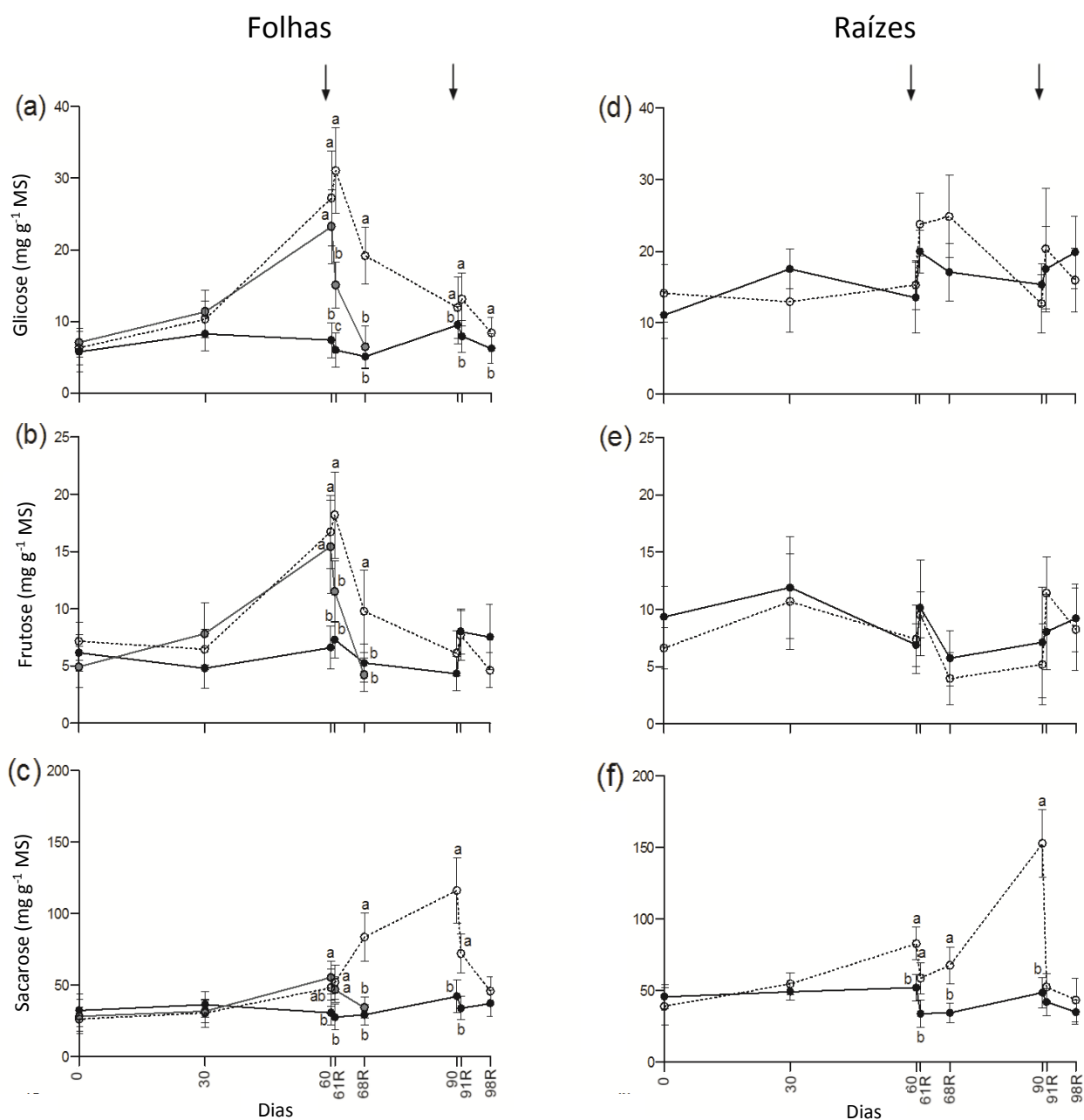


Figura 10. Teor de mono e oligossacarídeos analisados por HPAEC/PAD: (a-d) glicose (mg.g⁻¹MS); (b-e) frutose (mg.g⁻¹MS) e (c-f) sacarose (mg.g⁻¹MS) em plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de rega. (●) controle hidratado; suspensão total da irrigação: (○) D1 déficit hídrico por 60 dias; (○) D2 déficit hídrico por 90 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística em nível de p≤0,05 pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média (n= 5). As setas indicam os dias de reidratação e R, as plantas reidratadas.

4.5. Prolina livre

Os níveis de prolina livre mantiveram-se estáveis para as plantas irrigadas diariamente durante as avaliações. No tratamento D2 ocorreu aumento da quantidade de prolina nas folhas, com diferenças significativas a partir dos 30 dias, e incremento de 2,4 vezes aos 60 dias ($14,0 \mu\text{mol}^{-1}\text{gMS}$) e de 3,5 vezes aos 61 dias ($15,2 \mu\text{mol}^{-1}\text{gMS}$) quando comparados aos respectivos controles. Essas diferenças foram mantidas até os 90 dias, mas declinaram com a reidratação, se aproximando dos apresentados para as plantas do controle (Figura 11a).

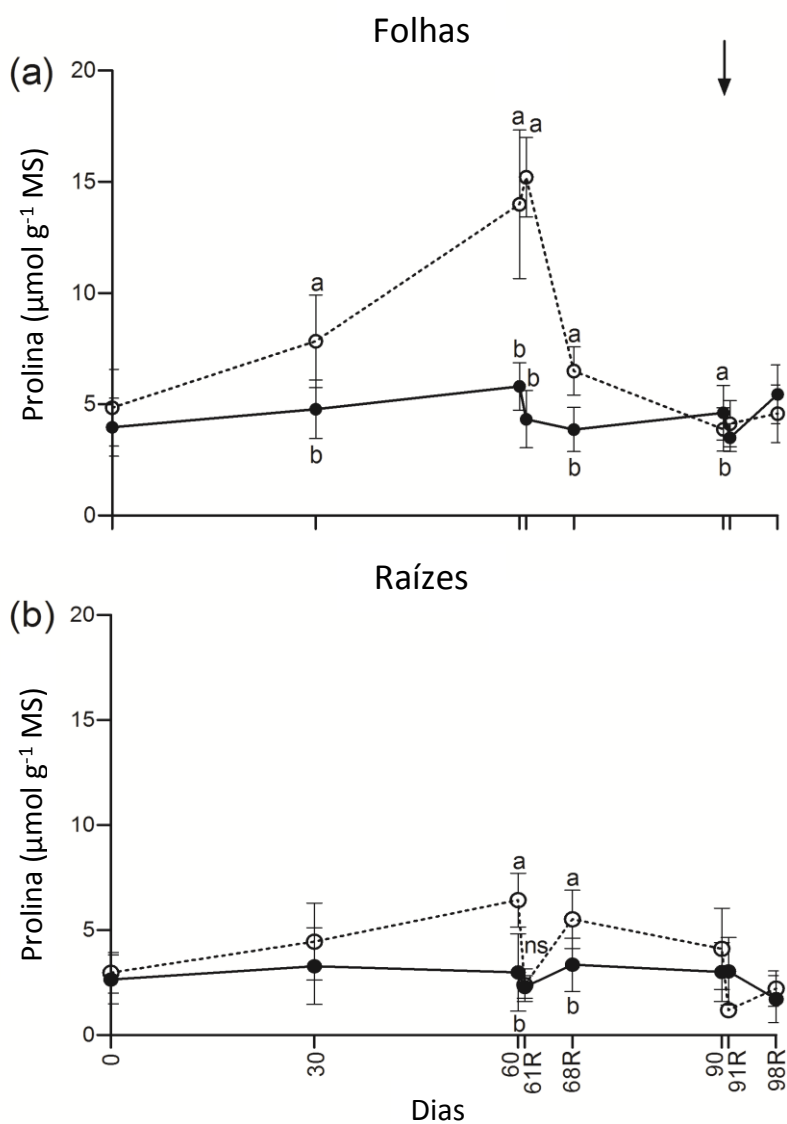


Figura 11. Teor de prolina ($\mu\text{mol}^{-1} \text{g MS}$) das folhas (a) e das raízes (b) em plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de rega. (●) controle; suspensão total da irrigação: (○) D2 déficit hídrico 90 dias; Letras diferentes indicam diferença estatística em nível de $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média ($n=5$). A seta indica o dia de reidratação e R, as plantas reidratadas.

A quantidade de prolina das raízes foi menor que a encontrada para as folhas em todos os tratamentos (Figura 11b). Assim como observado para as folhas, houve pequeno incremento nos valores de prolina para as raízes em D2 no período de 60 à 68 dias, que foram reduzidos logo após a reidratação.

4.6. ABA endógeno

A concentração de ABA endógeno foliar em plantas de *P. lanuginosa* diferiu significativamente entre os tratamentos ($p = <0,05$), a partir dos 30 dias de indução do estresse.

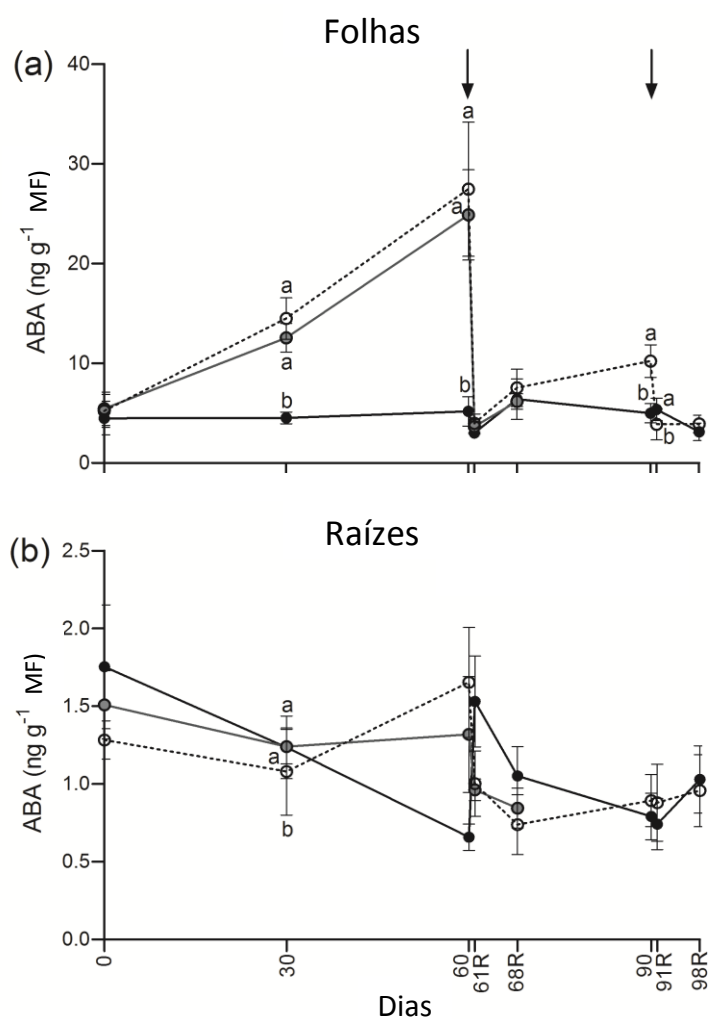


Figura 12. Conteúdo de ABA endógeno (ng.g^{-1} MF) em folhas (a) e raízes (b) em plantas de *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de rega. (●) controle; suspensão total da irrigação: (◐) D1 déficit hídrico 60 dias; (◑) D2 déficit hídrico 90 dias; Letras diferentes indicam diferença estatística em nível de $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão da média ($n = 5$). As setas indicam os dias de reidratação e R, as plantas reidratadas.

Plantas sujeitas à seca severa em D1 e D2 aumentaram em 2,8 e 3,2 vezes seus teores de ABA, respectivamente, quando comparadas com as plantas do controle. Diferença mais expressiva foi detectada em 60 dias para D2, com um valor 5,3 vezes maior ($27,4 \text{ ng.g}^{-1}$ MF) do que nas plantas mantidas sob hidratação constante. Após 24h de reidratação, para as plantas de ambos os tratamentos, os teores de ABA diminuíram rapidamente, retornando aos valores encontrados nas plantas irrigadas (Figura 12a). Aumento dos níveis de ABA também foi observado em 90 dias para D2, com um aumento de 2,0 vezes, valor que só foi reduzido 192h após a reidratação.

As plantas de *P. lanuginosa* acumularam menor quantidade de ABA nas raízes quando comparado às folhas, mantendo valores regulares para o tratamento irrigado em todo o experimento. Em tratamentos de desidratação, diferenças consideráveis ocorreram somente após 60 dias, com pequeno acréscimo no teor para D1 e D2 que foi reduzido após a reidratação, embora sem diferença estatística entre eles (Figura 12b).

4.7. Composição da Parede celular

O teor de carboidratos totais presentes nas paredes celulares brutas de folhas *P. lanuginosa* submetidas a diferentes regimes de regas ficou ao redor de 20-25% em plantas controle ou submetidas à dessecação por 60 ou 90 dias. Em contraste, após a reidratação, a quantidade de carboidratos nas folhas foi reduzida para cerca de 17% em plantas submetidas à supressão hídrica por 60 ou 90 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Composição glicosídica de paredes celulares brutas de folhas de *P. lanuginosa* submetidas à desidratação e reidratação por diferentes períodos.

	Porcentagem molar (%)				
	T0 (0 dias)	D1 (60 dias)	R1 (68 dias)	D2 (90 dias)	R2 (98 dias)
Conteúdo de carboidratos	22,9	26,5	17,5	27,1	17,4
Monossacarídeo					
Arabinose	14,0	15,4	14,6	15,3	13,0
Ramnose	-	-	-	-	-
Fucose	-	-	-	-	-
Xilose	83,4	80,8	82,1	83,1	85,5
Ácido glucurônico	-	-	-	-	-
Ácido galacturônico	-	-	-	-	-
Manose	-	-	-	-	-
Galactose	0,5	0,7	0,6	0,4	0,4
Glucose	2,1	3,0	2,6	1,2	1,1

- não detectado

A análise da composição dos polissacarídeos não celulósicos presentes nas paredes celulares brutas de folhas revelou xilose como monossacarídeo predominante, perfazendo mais de 80% dos monossacarídeos encontrados. Arabinose foi o segundo açúcar mais abundante, representando cerca de 15%, seguida de glicose e galactose com menos de 4% (Tabela 1).

Essa proporção de monossacarídeos é indicativa da presença de um arabinoxilano como principal polissacarídeo não celulósico em folhas de *P. lanuginosa*. A razão arabinose/xilose encontrada em folhas antes da

dessecação (0,16) aumentou nas folhas submetidas ao déficit hídrico aos 60 (0,19) e 90 dias (0,18), sugerindo a presença de moléculas mais ramificadas com arabinose nas plantas dessecadas. A reidratação das plantas mantidas com supressão de rega por 60 e 90 dias fez com que a proporção de arabinose fosse reduzida para 0,17 e 0,15, respectivamente, indicando redução na substituição do arabinoxilano por efeito da hidratação.

A análise de ligação glicosídica confirmou a presença de um arabinoxilano 4-ligado (alta proporção de resíduos 4-Xyl) como principal hemicelulose encontrada nas paredes celulares de folhas da espécie e mostrou que esse polissacarídeo é substituído nas posições O-2, O-3 e O-2, 3 por resíduos de arabinose, conforme deduzido pelas proporções de resíduos 2,4-Xyl, 3,4-Xyl e 2,3,4-Xyl encontrados (Tabela 2). A redução na substituição por arabinose após a hidratação de folhas dessecadas é sugerida pelos dados apresentados na Tabela 1 e consistente com a diminuição na proporção dos resíduos 3,4-Xyl e 2,3,4-Xyl observada pela análise de composição glicosídica. Aparentemente a redução de substituição ocorre nos resíduos que são substituídos na posição O-3 e simultaneamente nas posições O-2 e 3.

Arabinanos O-4 e O-5 ligados também compõem a fração de açúcares da parede celular, conforme sugerem as proporções de resíduos 4-Ara e 5-Ara, porém em quantidades bem menores que os arabinoxilanos. Como a análise de ligação glicosídica é feita com hidrólise bem mais drástica que a usada para a análise de composição glicosídica, na Tabela 2 também são apresentados os valores de 4-Glc, que se referem aos resíduos encontrados na celulose. Embora tenha sido observada variação nos valores encontrados, as alterações nas proporções de celulose não puderam ser relacionadas com os eventos de dessecação e reidratação.

Tabela 2. Ligações glicosídicas encontradas em paredes celulares brutas de folhas de *P. lanuginosa* submetidas à desidratação e reidratação por diferentes períodos.

Ligação	Porcentagem molar (%)				
	T0	D1	R1	D2	R2
	(0 dias)	(60 dias)	(68 dias)	(90 dias)	(98 dias)
<i>t-Araf</i>	7,9	10,2	7,7	8,9	9,1
<i>t-Arap</i>	2,4	2,6	2,4	2,6	3,2
2-Araf	0,9	1,0	1,6	1,3	-
<i>t-Glcp</i>	1,6	2,8	0,7	0,6	1,1
3-Araf	0,9	-	-	-	-
<i>t-Galp</i>	<0,1	0,2	0,4	0,6	<0,1
4-Arap or 5-Araf	1,8	1,5	2,8	2,6	0,7
4-Xylp	60,9	60,1	51,0	49,9	69,7
3-Glcp	0,2	0,2	-	-	-
2,4-Xylp	4,5	4,7	5,1	5,5	6,0
3,4-Xylp	12,0	12,0	12,2	13,0	6,0
3,4-Galp	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2
3,4,6-Glcp	-	-	0,3	0,3	-
2,3,6-Glcp	-	-	2,2	-	-
2,4-Glcp	0,3	-	0,5	0,3	-
4,6-Galp	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1
2,3,4-Xylp	6,0	4,0	13,6	14,7	3,4
4-Manp*	(1,4)	(0,9)	(1,6)	(1,4)	(0,6)
4-Glcp**	(64,1)	(68,7)	(61,3)	(63,7)	(74,6)
2,4-Rhap*	-	(0,1)	-	(0,3)	-

* monossacarídeos não detectados pela análise de composição glicosídica; ** ligação correspondente à celulose.

4.8. Morfologia interna das folhas

A anatomia de folhas hidratadas e desidratadas de *P. lanuginosa* é mostrada na figura 13. A estrutura do limbo foliar é composta pela epiderme adaxial (ead), hipoderme (hp), feixes vasculares (fv), tecido parenquimático (p) e epiderme abaxial (eab). A epiderme adaxial é unisseriada, formada por células com paredes espessadas, que se mostram de tamanhos e formatos diferentes, recobertas por cutícula espessa. A epiderme abaxial é formada por células que exibem paredes mais espessas que as da epiderme adaxial, presença de cutícula com impregnação de ceras e estômatos (seta).

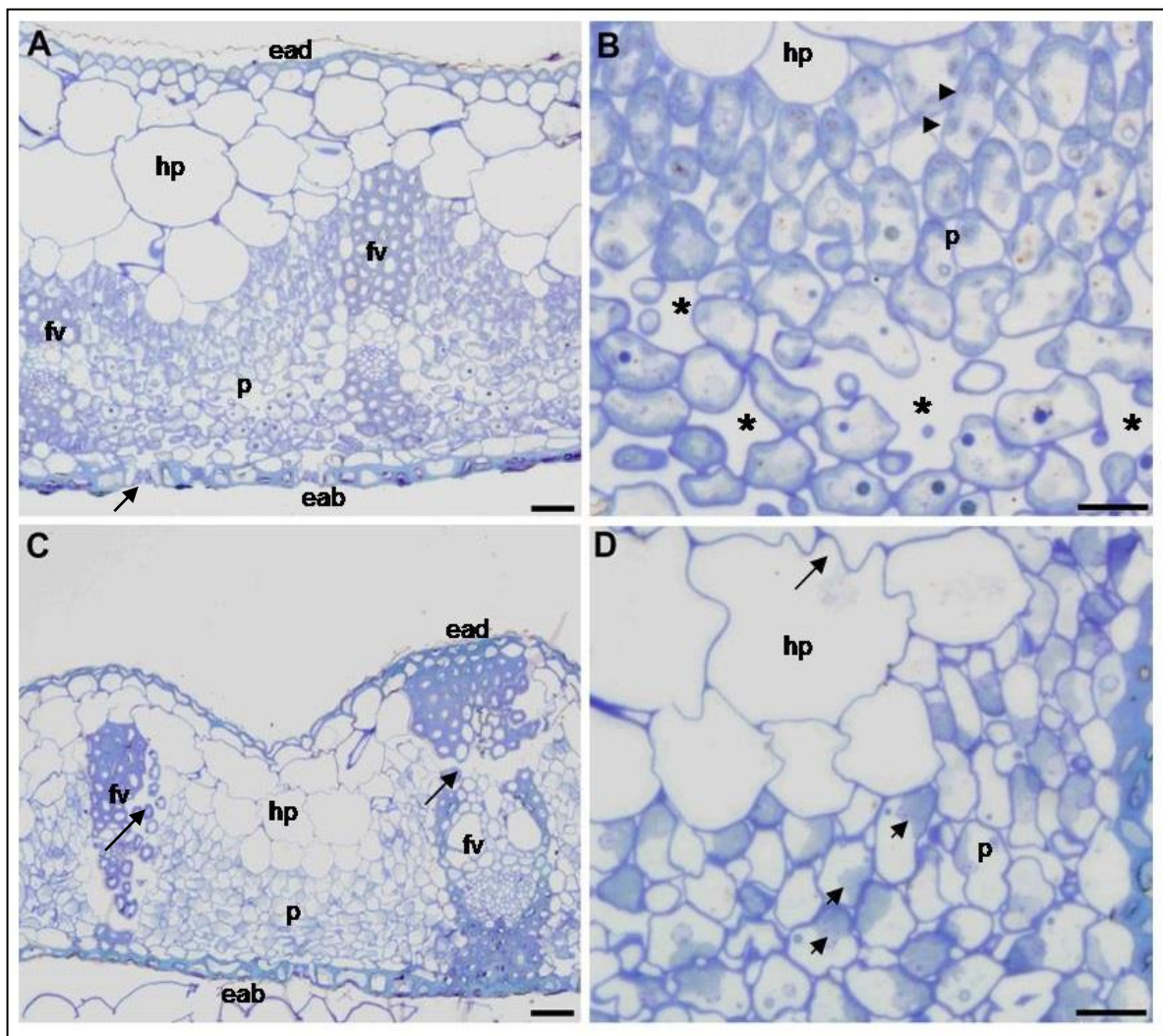


Figura 13. Anatomia foliar de plantas de *P. lanuginosa* mostrando folha hidratada (A e B) e desidratada (C e D). Epiderme adaxial (ead), hipoderme (hp), feixes vasculares (fv), tecido parenquimático (p) e epiderme abaxial (eab). As setas (↑) indicam a degradação dos feixes vasculares e a posição dos estômatos em A-C e o dobramento das paredes celulares em D; Os asteriscos (*) mostram os espaços celulares presentes entre as células parenquimáticas de plantas hidratadas em B. As cabeças

de seta (▲) indicam os cloroplastos presentes na periferia das células em B e o citoplasma polarizado com aparente vacuolização em D. Barra: 10 μm (A e C) e 20 μm (B e D).

Na folha hidratada (Figura 13A), observa-se que a hipoderme é composta por camadas de células volumosas e os feixes vasculares, com bainha de feixe esclerenquimática, apresentam-se íntegros. Os feixes vasculares (A e C) são colaterais fechados e apresentam extensão de bainha de feixe que se estende da hipoderme a epiderme abaxial. Em maior aumento na Figura 13B, nota-se que as células parenquimáticas próximas à hipoderme são alongadas, assemelhando-se a um parênquima clorofiliano paliçádico, porém, com paliçadas irregulares. À medida que estas células se distanciam das camadas superiores, vão se tornando arredondadas, apresentando cloroplastos por toda a periferia (cabeça da seta); as células parenquimáticas próximas à epiderme abaxial apresentam formato irregular e são interpassadas por lacunas de ar (*).

Na folha desidratada (Figura 13B), a superfície adaxial do limbo encontra-se ondulada, as células da hipoderme apresentam-se menos volumosas e os feixes vasculares parecem apresentar sinais de degradação (setas). Em maior aumento na Figura 12D, nota-se que as paredes celulares da hipoderme exibem sinais claros de dobramento (seta), as células parenquimáticas encontram-se justapostas e não possuem cloroplastos aparentes; ao invés disso, parecem apresentar citoplasma polarizado, com suposta vacuolização nas extremidades das células (cabeça da seta).

5. DISCUSSÃO

5.1. Desidratação

Os resultados demonstram que plantas de *P. lanuginosa* exibem grande atraso na desidratação dos tecidos vegetativos quando comparada à perda de umidade do solo e toleram dessecação intensa por longo período (mais de 90 dias). Este processo ocorre de forma similar, embora mais lenta, ao de muitas plantas tolerantes à dessecação já estudadas. Neste estudo, as plantas sustentaram status hídrico razoável até os 34 dias em média (CRAf superior a 60%), mantendo atividades fotoquímicas satisfatórias, sem danos drásticos aos processos assimilatórios e metabólicos.

A partir dos 40 dias, o decréscimo mais acentuado do CRAf e Ψ_w nos tecidos, associado à diminuição da umidade relativa e aumento da incidência de radiação UV, foi acompanhado por alterações morfológicas externas observadas nas folhas. Houve diminuição da área foliar, ocasionada pelo enrolamento das bordas em direção à nervura central. Essa resposta inicial de alteração morfológica foi determinante para a redução da transpiração com o fechamento estomático e controle da temperatura interna foliar, além de se constituir em um mecanismo de defesa para evitar danos causados pela intensa radiação (Silva & Arrabaça, 2004). Em plantas de *Barbacenia purpurea*, o enrolamento foliar foi um dos primeiros sinais visuais de alteração na turgescência das folhas submetidas ao déficit hídrico (Suguiyama et al., 2014).

Os valores decrescentes do CRAf e potencial hídrico (Ψ_w), juntamente com a diminuição do potencial osmótico (Ψ_s) das folhas de forma gradual, evidenciam que a tentativa de evitar a rápida perda de água pode ter sido eficiente devido ao acúmulo transitório de osmólitos nas células. Essa estratégia possibilita a manutenção da integridade celular pela substituição da água perdida por substâncias osmoticamente ativas e por conferir a proteção de estruturas. Nos estágios intermediários da dessecação (40-60 dias), a manutenção do CRAf superior a 50% aos 30 dias e próximo aos 40% aos 60 dias, possivelmente, auxiliou a manutenção das taxas assimilatórias até os 50 dias, contribuindo para à síntese ou reconversão de carboidratos para os processos de preparação para as fases mais avançadas da dessecação.

As trocas gasosas em *P. lanuginosa* guardaram estreita relação com a disponibilidade de água no solo, com reduções significativas na condutância estomática, transpiração e consequentemente na fotossíntese. Após 30 dias de suspensão das regas, quando a umidade do solo já era de 3,4%, as taxas de assimilação líquida do carbono (A) apresentavam 50% de redução. Os resultados demonstram que as limitações estomáticas, evidenciadas pelos baixos valores de g_s e reforçadas pela razão A/g_s , foram as principais responsáveis pelos aumentos na concentração interna de CO_2 e diminuição da fotossíntese, como resposta de curto prazo ao déficit hídrico impostos às plantas.

A eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) foi também fortemente influenciada pela diminuição da g_s oriunda do fechamento estomático nas plantas submetidas ao déficit hídrico. A redução drástica do CRAf após os 60 dias e a limitação de CO_2 podem ter influenciado as atividades da Rubisco, alterando as taxas fotossintéticas. Warren (2008) cita que a g_s é um fator limitante para a EiUA em plantas sob restrição hídrica, já que taxas de g_s diminuídas resultam em capacidade fotossintética alterada, afetando a EiUA.

Os danos fotoquímicos sugeridos são sustentados pelos resultados de fluorescência da clorofila *a*. O aumento significativo de F_0 e a diminuição da F_m até o 42º dia de imposição da seca podem ser atribuídos às mudanças estruturais nos pigmentos antena, dissociação na coleta de luz e à inibição da transferência de elétrons da Q_A para Q_B , o que indica que houve dano na proteína D1 do centro de reação do PSII (Dias & Marengo, 2006; Rakic et al., 2015). De fato, os aumentos em F_0 e reduções em F_m , acompanharam as reduções no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, demonstrando um claro desacoplamento do aparato fotoquímico em resposta ao déficit hídrico. Os decréscimos da F_m em D1 (51.44%) e D2, ao final de 60 dias de déficit hídrico associados aos aumentos do conteúdo de carotenóides, sugere também a ocorrência de dissipação não-fotoquímica. Assim, o excesso de energia absorvida pela folha é drenado para carotenóides do ciclo da xantofila que a dissipa na forma de calor, protegendo o PS II contra possíveis danos oxidativos causados pela radiação solar plena (Demmig-Adams & Adams, 1992; Lawlor&Cornic, 2002; Galmés et al., 2007).

Assim, é provável que o aumento da intensidade do déficit hídrico no solo tenha causado fotoinibição nas plantas de *P. lanuginosa*, alterando a eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) para os tratamentos D1 e D2. Sugere-se que, a regulação negativa dos rendimentos quânticos eficazes entre o PSI e PSII reduziu severamente o rendimento quântico máximo, paralisando a assimilação, da fase intermediária até a fase final do estresse (90 dias e $CRAf < 20\%$), demonstrando que a fotoinibição foi também um importante fator limitante do transporte de elétrons nas fases mais drásticas da dessecação. Wang et al. (2013) também sugeriram que o estresse hídrico severo pode reduzir o transporte de elétrons causando fotoinibição, quando a energia da luz absorvida pela folha excede o consumo utilizado na fotossíntese para a assimilação de carbono. Em plantas tolerantes à dessecação como *Haberlea rhodopensis* (Peeva & Cornic, 2009), *Ramonda serbica* e *Ramonda nathaliae* (Rakic et al., 2015) também foi observada fotoinibição induzida por um pronunciado declínio na F_v/F_m .

O excesso de luz pode causar o aumento da temperatura foliar causando danos ao o PSII, que parece ser mais sensível ao calor. Supõe-se que o aumento da temperatura ocasione, primeiramente, o bloqueio dos centros de reação do PSII e, em seguida, cause a dissociação do complexo proteína-pigmentos da antena do aparato coletor de luz do PSII. Essa dissociação pode estar relacionada à separação de fases dos lipídios formadores das membranas dos tilacóides ou, ainda, ser consequência do estresse oxidativo, que causa inativação de enzimas, descoloração de pigmentos e peroxidação de lipídios (Araújo & Diminichis, 2009).

A degradação de clorofilas de forma mais lenta e gradual até a fase intermediária do processo de dessecação (60 dias) parece ser uma estratégia importante para a manutenção das plantas de *P. lanuginosa*, funcionando como um mecanismo de proteção para a manutenção da estabilidade do aparato fotossintético durante a reidratação. Além disso, a manutenção do $CRAf$ (acima de 45%) até os 42 dias pode ter favorecido a manutenção das taxas de assimilação em níveis positivos no mesmo período. Nos estágios mais avançados do déficit hídrico (90 dias), o decréscimo de clorofilas *a*, *b* e totais ocorreu mais rapidamente quando o $CRAf$ estava abaixo de 20% e a

assimilação já estava em valores próximos à zero, indicando a estreita correlação entre a velocidade da perda de água e da degradação dos pigmentos, quando não havia assimilação de carbono.

A perda da maior parte das clorofilas, paralelamente ao aumento do conteúdo de carotenóides, a partir dos 30 dias, é um mecanismo preventivo importante à absorção excessiva de luz por folhas com baixo conteúdo relativo de água, evitando assim danos foto-oxidativos. Plantas tolerantes à dessecação apresentam muitas estratégias de proteção contra danos fotoquímicos, como o dobramento foliar e o consequente empilhamento dos cloroplastos para a proteção das clorofilas, acúmulo de carotenóides e antocianinas e aumento nos mecanismos de eliminação de ROS (Farrant, 2000; Farrant et al., 2003; Péli et al., 2012), que desempenham um papel significativo na proteção do PSII e na preservação da integridade das membranas (Deng et al., 2003). No nosso estudo, alguns destes mecanismos protetores possivelmente ajudaram as plantas a sobreviverem ao déficit hídrico severo.

A correlação negativa significativa encontrada entre o aumento de carboidratos solúveis e a diminuição do CRAf em plantas submetidas ao déficit hídrico pode sugerir mecanismo de ajustamento osmótico em folhas e raízes de *P. lanuginosa*. Em 60 dias, esse incremento ocorreu em função da concentração de açúcares pré-existentes nos tecidos ou pela síntese de novos solutos compatíveis, como possível mecanismo relacionado ao efeito da perda de água, o que está de acordo com o declínio do potencial osmótico celular observado no mesmo período.

O incremento transitório de glicose e frutose nas folhas, na etapa intermediária do déficit hídrico, pode ser resultante da hidrólise do amido, cuja quantidade diminuiu a partir do 38º dia, e/ou da liberação de monossacarídeos em decorrência da hidrólise da sacarose. Para a planta africana *Sporolobus stapfianus*, o acúmulo foliar de glicose e frutose foi demonstrado em vários compartimentos celulares nos estágios iniciais da dessecação, desaparecendo posteriormente, devido a sua utilização como precursores para a síntese de sacarose (Hoekstra et al., 2001; Martinelli, 2008; Griffiths et al., 2014).

Nos estágios finais da dessecação, o aumento substancial de sacarose nas folhas e raízes de *P. lanuginosa*, reforçado pela correlação negativa com a diminuição do CRAf, evidencia sua importância como carboidrato majoritário presente nos tecidos desidratados de plantas tolerantes à dessecação, como anteriormente demonstrado para outras espécies revivescentes (Farrant, 2000; Moore et al., 2007; Farrant et al. 2015). A sacarose 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 contribuir para o ajustamento osmótico (Peters et al., 2007; Farrant et al., 2009).

Os altos níveis de sacarose detectados nas folhas e nas raízes de *P. lanuginosa* podem estar associados à degradação de amido ou da reconversão da glicose + frutose, desempenhando um papel significativo na tolerância à dessecação. Nas folhas, o incremento desse açúcar é característico das últimas etapas de proteção celular para o processo de anabiose, ocorrendo normalmente em CRAf abaixo de 60% ou ainda, em alguns casos, abaixo de 20%, como enfatizado por Toldi et al. (2009).

No caso das raízes de *P. lanuginosa*, é possível que a sacarose seja oriunda do amido, que se acumula em parte nos tecidos radiculares de reserva, desempenhando papel importante no controle do status hídrico da planta. Isto é especialmente importante nas condições de solo de campos rupestres, que podem variar de areia (solos bem drenados) a rochas expostas (solos duros), impedindo o desenvolvimento de biomassa radicular subterrânea (Alcantara et al., 2015).

Vários estudos relatam a importância da sacarose e outros oligossacarídeos da família da Rafinose (RFOs) no metabolismo de osmorregulação e proteção celular durante a desidratação de espécies tolerantes à desidratação (Farrant et al., 2012; Dinakar & Bartels 2013; Elsayed et al., 2014). A ausência de oligossacarídeos da série da rafinose em plantas de *P. lanuginosa* reforça a sugestão que a sacarose atua como principal carboidrato osmoticamente ativo. Em contraste, o aumento de rafinose, estaquiase e verbascose foi descrito como um importante mecanismo de

ajustamento osmótico para a planta revivescente *Barbacenia purpurea* durante a dessecação (Suguiyama et al., 2014), indicando a ocorrência de respostas espécie-específicas em relação à elevação de açúcares osmoticamente ativos em espécies tolerantes à dessecação.

Importante ressaltar que a remoção de açúcares redutores e aldoses, que em quantidades elevadas podem levar a formação de ROS através de reações de Maillard (Walters et al., 2002) e a substituição da água e estabilização de estruturas celulares configuram significativa contribuição dos RFOS à osmoproteção (Hoekstra et al., 2001). Além disso, oligossacarídeos acumulados durante a dessecação são rapidamente mobilizados durante a reidratação, provavelmente servindo como fonte de energia e esqueletos de carbono para a reparação e recuperação dos tecidos.

A função de estabilização celular e de evitar o decréscimo rápido de água dos tecidos nos períodos iniciais e intermediários do déficit hídrico nas folhas pode ter sido exercido também pela prolina. O acúmulo iniciado aos 30 dias e mantido até os 90 dias nas folhas desidratadas de *P. lanuginosa* pode ter contribuído para a diminuição do potencial osmótico (Ψ_s). A prolina atua como reserva de nitrogênio para síntese de enzimas específicas, agindo como chaperona molecular, estabilizando estruturas proteicas e auxiliando na proteção celular contra o acúmulo de ROS (Vicré et al., 2004; Willigen et al., 2004; Krasensky & Jonak, 2012). Durante a desidratação da planta tolerante *Eragrostis nidens*, o acúmulo de prolina em pequenos vacúolos na bainha do feixe vascular e no citoplasma contribuiu para a regulação osmótica e estabilização celular, reduzindo a tensão mecânica durante a reidratação (Willigen et al., 2004).

As repostas integradas observadas em plantas de *P. lanuginosa* e induzidas pela dessecação provavelmente foram mediadas pela sinalização e aumento de ABA nos tecidos. O aumento desse hormônio, detectado em 30 dias para D1 e D2 (Us 3,4% e 5,7%, respectivamente), momento que as plantas não sofriam com danos fisiológicos e bioquímicos severos visíveis, reforçam a importância da interação raiz-parte aérea, antecipando a preparação para a falta de água nos tecidos. O menor teor de ABA encontrado

nas raízes pode indicar a mobilização para as folhas durante a fase inicial e intermediária do déficit hídrico (CRAf 60-40%), induzindo os tecidos da parte aérea aos vários ajustes metabólicos observados no presente estudo. Como observado para *P. lanuginosa*, em plantas de *Sporolobus stapfianus*, o teor de ABA nas folhas também não aumentou nos estágios finais da dessecação, atingindo o pico aos 40% de CRAf (Gaff & Loveys, 1993).

O ABA atua como sinalizador inicial para eventos metabólicos específicos necessários para a tolerância à dessecação (Scoot, 2000, Dinakar et al., 2012) destacando-se o controle estomático (Harb et al., 2010; Blum, 2011), a degradação de clorofilas (Islam et al., 2013), o ajustamento osmótico por meio do acúmulo de solutos compatíveis (Mitra et al., 2013), a transdução de sinais para síntese proteica e de outras moléculas e a interação com outros reguladores vegetais (Bartels, 2005; Gaff & Oliver, 2013; Griffiths et al., 2014). Sinalização dependente do aumento de ABA foi demonstrada em folhas de *Boea hygrometrica*, influenciando a síntese de galactinol e oligossacarídeos da série da rafinose (Mitra et al., 2013). Em *Haberlea rhodopensis*, a ativa participação do ácido jasmônico, do ácido salicílico, das citocininas e das auxinas em resposta a desidratação foi dependente do aumento de ABA nos tecidos (Djilianov et al., 2013).

A parede celular de plantas de *P. lanuginosa* são compostas essencialmente por arabinoxilanos que são as hemiceluloses predominantes em grande parte das monocotiledôneas. O aumento dos polímeros que contém mais arabinose nas paredes e sua remodelagem após a reidratação indica que estes podem atuar aumentando a flexibilidade das paredes celulares durante a dessecação. Segundo Moore et al. (2013), os arabinoxilanos funcionam como “plasticizers”, atuando como dispersantes adicionados a misturas de polímeros para aumentar a plasticidade e/ou a fluidez do material com função de estabilização mecânica. Além disso, o dobramento da parede celular observado nas plantas de *P. lanuginosa* é parcial e pode estar relacionado com o padrão de enrolamento das bordas foliares, que se direcionam do centro para a superfície adaxial.

Em estudo com bromélias do gênero *Aechmea* (Ceusters et al., 2008), foi relatado que os glucoronoarabinoxilanos (GAXs) foram os polissacarídeos não-celulósicos mais abundantes nas paredes celulares e sua estrutura esteve fortemente relacionada à maior resistência das paredes do clorênquima. Os autores enfatizam que cadeias de xilose que apresentaram menor substituição por polímeros de arabinose nas paredes celulares foram mais resistentes ao rompimento celular, implicando em maior resistência mecânica, com maior possibilidade de suportar pressões internas durante o influxo de água. Esse pode ser o mecanismo utilizado pelas plantas de *P. lanuginosa* para suportar a alta pressão celular durante a reidratação, uma vez que foi observada menor proporção de arabinose nas paredes celulares de folhas após a reidratação.

Em folhas de *Craterostigma wilmsii*, o aumento significativo em pectinas e xiloglucanos, acompanhada por alterações na quantidade de polissacarídeos hemicelulósicos alterou as propriedades mecânicas das paredes celulares, permitindo o seu dobramento e evitando o colapso celular no estado seco (Vicré et al., 2004). Em folhas de *Myrothamnus flabellifolia* (Moore et al., 2006), foi demonstrado que as dobras da parede ocorreram próximas a epiderme, sem mudanças significativas na composição da parede durante a secagem, embora os autores tenham observado uma quantidade elevada de arabinose (polímeros de arabinano) que propiciaram maior flexibilidade da parede celular durante os ciclos de desidratação-reidratação. Já o estudo de Jones & McQueen-Mason (2004) mostrou um aumento na abundância de α -expansina durante a secagem e reidratação em folhas de *Craterostigma plantagineum*, que se correlacionou com alterações na extensibilidade da parede celular.

A análise anatômica das folhas de *P. lanuginosa* indicou a existência de caracteres xeromórficos na espécie. A presença de cutículas espessas em ambas as extremidades das folhas pode evidenciar uma proteção adicional para evitar a perda de água do mesofilo durante períodos adversos. A presença de hipoderme com células volumosas, que ocupam grande parte do mesofilo, pode indicar que este tecido seja responsável por manter o controle da turgescência foliar, funcionando como tecido que acumula água. Além disso, a presença de bainha esclerenquimática envolvendo os feixes vasculares e a suposta degradação destes observadas nas folhas desidratadas sugere que

tais danos podem ser responsáveis pela dinâmica de reidratação, na qual a recuperação das folhas ocorre de forma irregular e muitas vezes incompleta.

Segundo Reinert et al. (2003), embora ocorram em ambientes xéricos, como inselbergues e campos rupestres, as espécies do gênero *Pitcairnia* geralmente apresentam características morfológicas, anatômicas e fisiológicas méxicas, como por exemplo o metabolismo fotossintético C3. Ainda assim, muitas espécies deste gênero exibem características xéricas como folhas aculeadas, com cutícula espessa, células epidérmicas com paredes periclinais internas espessadas, diferenças de espessamentos secundárias de células hipodérmicas, hipoderme aquífera com células volumosas bastante evidentes, transição abrupta entre parênquima aquífero e clorênquima e a presença de lacunas de ar (Givnish et al. 2007; Santos-Silva et al., 2013).

Algumas alterações morfológicas observadas no tecido foliar desidratado de plantas de *P. lanuginosa* são comuns em plantas tolerantes à dessecação. Um dos primeiros e principais problemas que as plantas revivescentes enfrentam é a redução notável do volume celular que ocorre em tecidos desidratados. O dobramento da parede celular confere importante solução para evitar estresse mecânico durante a desidratação. A pressão mecânica exercida pelo dobramento da parede sobre a membrana plasmática faz com que essa tenha que acompanhar a intensidade do dobramento e manter todas as junções com a lamela média para suportar a dessecação. Em dessecação avançada, a degradação de lipídeos e a desnaturação de proteínas podem ser determinantes para promover a desconexão entre a parede e a plasmalema causando plasmólise de diferentes graus. Em plantas revivescentes de *Paraisometrum mileense* a manutenção de lipídeos extra-plastídicos foi importante para a restauração dos danos nas membranas durante a dessecação, impedindo o colapso celular (Li et al., 2014).

Outro mecanismo importante encontrado nas plantas de *P. lanuginosa* foi o aparente processo de vacuolização, ocasionado pela diminuição da área foliar e supressão das estruturas citoplasmáticas. Alguns estudos relatam este processo como uma estratégia importante para lidar com o estresse mecânico em plantas sob dessecação celular severa (Farrant et al., 1999; Farrant, 2000;

Cooper & Farrant et al., 2002; Farrant et al., 2007). A perda de água a partir de vacúolos e citoplasma faz com que a plasmalema encolha, causando tensão na parede celular. Dessa forma, em estágios mais avançados de dessecação, o aumento da compactação das organelas e macromoléculas e a ruptura da membrana plasmática, podem ocasionar a entrada de hidrolases extracelulares, resultando em dano letal e morte celular (Walters et al., 2002).

As alterações celulares não são mutuamente exclusivas e podem ocorrer em diferentes tecidos da mesma planta. Assim, em folhas desidratadas da espécie tolerante a dessecação *Eragrostis nindensis*, as células do mesofilo encolheram e exibiram extenso dobramento da parede celular, enquanto o feixe de células da bainha manteve seu tamanho original e as células tornaram-se repletas de pequenos vacúolos com grande quantidade de material não aquoso (Vander Willigen et al., 2003). Para as plantas de *P. lanuginosa*, as pequenas alterações observadas na parede celular podem estar relacionadas à maior estabilidade das células, promovida pelo aumento de solutos compatíveis nos vacúolos, como também à sua estrutura mais rígida em alguns tecidos, o que pode conferir maior estabilidade mecânica durante o processo de reidratação.

A aparente ausência ou diminuição considerável de cloroplastos observadas na figura 12d é coerente com diminuição do conteúdo de pigmentos fotossintéticos observada, indicando que, provavelmente, ocorre desestruturação dos cloroplastos nas folhas de *P. lanuginosa*. É possível que essas plantas, quando submetidas à dessecação, utilizem a estratégia de poiquiloclorofilia, desmontando o aparato fotossintético para evitar danos severos ocasionados pelo aumento de ROS. Além disso, o fato das folhas de *P. lanuginosa* se recuperarem de forma mais lenta durante a reidratação, quando comparadas a outras espécies, pode estar associada à síntese de novos pigmentos e à reorganização da maquinaria fotossintética. Estudos de microscopia eletrônica de transmissão poderão ajudar a elucidar as alterações ultra-estruturais que ocorrem durante a desidratação e confirmar com detalhes as alterações anatômicas aqui observadas.

5.2. Reidratação

A retomada da irrigação promoveu a recuperação do status hídrico em plantas de *P. lanuginosa* com o aumento do CRAf e potencial hídrico foliar para D1 e D2. Ocorreu desenrolamento foliar e a retomada da síntese de pigmentos foi bastante efetiva e mais rápida após 24 h de recuperação. Foi possível perceber que há maior velocidade de recuperação das folhas mais novas e presentes no centro da planta em detrimento das folhas velhas, que muitas vezes não se reidrataram. Assim, fica clara, a importância da estrutura radicular de reserva que, provavelmente, controla o processo de recuperação das folhas, que apresentaram aparência similar ao controle às 48 h após a reidratação. As raízes também apresentaram aspecto túrgido após a reidratação, com o surgimento de grande quantidade de raízes secundárias e terciárias próximo às 192 h após a retomada da rega.

A recuperação do conteúdo de clorofilas *a*, *b* e totais foi gradativo atingindo valores próximos ao controle somente 192 h após a reidratação. A recuperação apenas parcial do conteúdo de clorofilas totais manteve as taxas de assimilação líquidas de carbono abaixo das encontradas para o grupo controle nesse período. A maior eficiência fotoquímica nas plantas reidratadas foi normalizada após 96 h (CRAf acima de 75%) e foi altamente dependente da reestruturação funcional do aparato fotossintético. Maiores taxas de condutância estomática e transpiração foram observadas após as fases finais da reidratação indicando maior abertura estomática o que resultou no aumento efetivo da EiUA.

A dependência da síntese de novos pigmentos para a reestruturação do aparato fotossintético pode estar relacionada à reorganização da estrutura plastidial por meio da biossíntese de complexos proteína-pigmento no PSII (Ingle et al., 2008). Muitas das subunidades de proteína no PSII parecem se acumular no escuro incluindo D2 e citocromo b559, e embora o aumento da proteína D1 ocorra sob dependência de luz, todas são importantes na estabilização dos níveis de clorofila *a* (Zhang & Aro 2002). Além disso, clorofila livre é um potente gerador de ROS nos tecidos desidratados (Hutin et al.,

2003), e necessita estar ligada à complexos proteína-clorofila para evitar danos foto-oxidativos (Ingle et al., 2007).

Em plantas de *Xerophyta humilis*, a retomada da fotossíntese ocorreu antes de qualquer aumento do conteúdo de clorofila. A quantidade residual (cerca de 10% do que se encontrava em plantas hidratadas) presentes no tecido dessecado foi aparentemente suficiente para iniciar a recuperação da atividade fotossintética (Ingle et al., 2008). Importantes incrementos nos teores de proteínas (ELIP-like) foram observados em plantas de *Craterostigma plantagineum* e sua associação com os complexos proteína-pigmento no PSII contribuiu para reestruturação do aparato fotossintético durante a reidratação (Alamillo & Bartels, 2001).

A diminuição gradual dos níveis de carboidratos, principalmente a sacarose, em folhas e raízes de *P. lanuginosa* depois da reidratação pode indicar que o seu metabolismo depende da velocidade de hidratação dos tecidos para ser utilizado. É possível que, a sacarose tenha sido mobilizada e utilizada como fonte de carbono em vias metabólicas energético-dependentes responsáveis pela reparação de danos causados pela dessecação (Peters et al., 2007; Farrant et al., 2009). Com o restabelecimento do metabolismo de assimilação próximo às 192h, foi possível detectar um pequeno incremento de amido nas folhas, indicando que o metabolismo de carboidratos certamente estava restaurado com estoque de carbono disponível.

No caso das raízes, o aumento substancial de formação de novas raízes secundárias e terciárias pode indicar o uso da energia de catabolismo da sacarose para o aumento da arquitetura radicular da planta, incrementando assim a absorção de água e nutrientes do solo. É altamente provável também que a sacarose seja mobilizada para outros tecidos da planta, levando ao acúmulo nas raízes, auxiliando a produção de novas folhas. Norwood et al. (2003) citam que os carboidratos acumulados nas raízes de plantas dessecadas podem ser translocados para regiões meristemáticas e não autotróficas para a produção de novas folhas e novos carboidratos garantindo a sobrevivência.

O restabelecimento do CRAf e a abertura estomática provavelmente influenciaram o decréscimo dos teores de ABA após 24 h de reidratação. Este fato, pode indicar alteração no balanço hormonal favorável à citocinina durante a fase de reidratação, devido ao efeito antagônico deste hormônio aos efeitos do ácido abscísico (ABA) nas respostas de plantas à fatores de estresse (Bradford, 1982). Alteração hormonal foi demonstrada por Farrant & Kruger (2001), com aumento transitório no conteúdo de citocininas anteriormente ao início da biossíntese de clorofila durante a reidratação da planta tolerante à dessecação *Myrothamnus flabellifolius*.

A estrutura radicular de reserva de *P. lanuginosa* parece ter papel fundamental na manutenção do status hídrico das folhas, principalmente durante o processo de reidratação. Em testes preliminares realizados com o objetivo de avaliar sua função como órgão controlador tanto da perda de água como também da reidratação e brotamento de novas folhas, identificamos que a remoção total das folhas de plantas desidratadas com a subsequente reidratação promove a emissão de novas folhas (resultados não mostrados). Em adição a isso, está o fato de que, após a reidratação, as plantas privilegiam as folhas mais novas e centrais em detrimento das folhas mais velhas que reidratam muitas vezes de forma incompleta, sugerindo que a planta pode utilizar as duas estratégias distintas que seriam a dormência e a tolerância foliar à perda de água como forma de tolerar a dessecação.

Esse comportamento pode estar ligado ao processo evolutivo desta espécie, relacionado ao ambiente xeromórfico em que ocorre. É possível que *P. lanuginosa* utilize o mecanismo de tolerância à seca e se comporte como uma planta revivescente em períodos de estresse que possibilitem a recuperação dos tecidos quando a água se torna disponível. Por outro lado, em processos dessecativos muito longos com condições climáticas extremamente severas, as plantas de *P. lanuginosa* podem optar por acumular reservas no sistema radicular e utilizá-las para a produção de novos tecidos, atuando como geófita. Essas estratégias combinadas, sem dúvida conferem maior habilidade para sobreviver aos períodos de severa restrição hídrica e alta irradiância a que são submetidas nos campos rupestres.

6. CONCLUSÕES

Plantas de *P. lanuginosa* demonstraram capacidade de tolerar a dessecação vegetativa e se recuperar por meio de respostas fisiológicas, morfológicas e metabólicas específicas em função de investimentos intensos em sistemas de proteção e reparo. A síntese de ABA parece ativar uma série de sinais que desencadeiam respostas coordenadas de preparação para enfrentar o déficit hídrico severo. Dentre os mecanismos encontrados estão a paralisação da assimilação de carbono, com consequente desacoplamento do aparato fotossintético, a degradação de clorofilas, o acúmulo de sacarose e prolina, e as alterações morfológicas e na composição da parede celular (Figura 13).

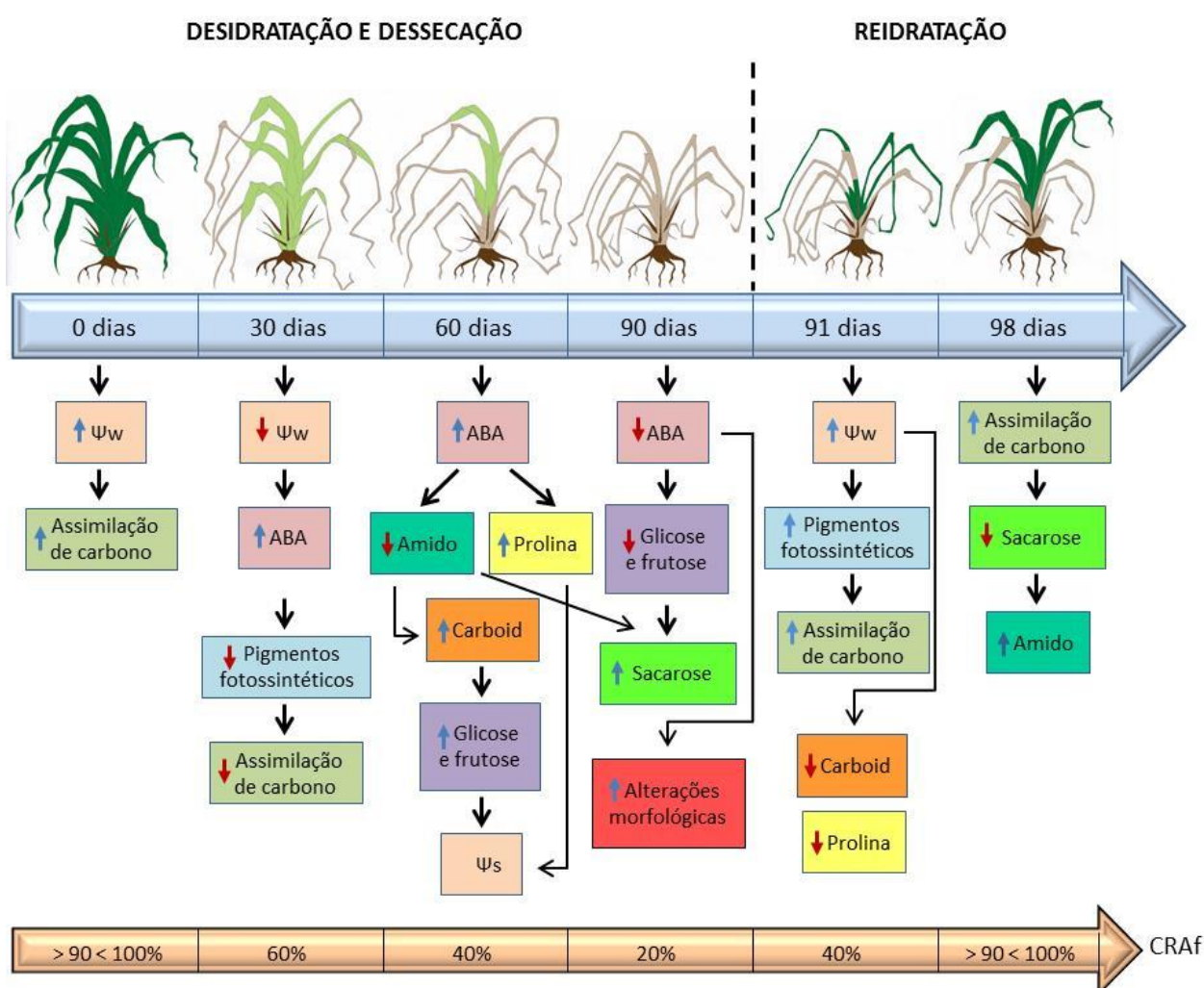


Figura 13. Esquema ilustrando as principais alterações fisiológicas e bioquímicas ocorridas em plantas de *P. lanuginosa* sob efeito do déficit hídrico ao longo do tempo. Setas azuis indicam aumento e setas vermelhas diminuição. A linha pontilhada divide

os processos de desidratação e reidratação. Carboid.= carboidratos e CRAf= Conteúdo relativo de água foliar.

Com a reabsorção de água e aumento do CRAf, a recuperação foi dependente de proteção dos tecidos conferida pela estrutura típica e resistente da parede celular suportando a pressão mecânica imposta pelo rápido influxo de água. Além disso, a retomada da turgescência promoveu a reorganização celular, que envolveu a síntese de novos pigmentos e a concomitante retomada das trocas gasosas, priorizando a mobilização de sacarose para a produção e armazenamento de amido, restabelecendo o metabolismo assimilatório.

Os resultados obtidos no presente estudo suportam a proposição de que plantas de *P. lanuginosa* se comportam como plantas revivescentes, recuperando a função de parte de tecidos existentes e tolerando dessecação intensa. O maior tempo requerido para a desidratação dos tecidos nesta espécie, em comparação a outras espécies revivescentes, pode conferir vantagens relacionadas à preparação, à organização e integração das respostas à seca e pode estar relacionado à presença de uma estrutura radicular de reserva.

Os mecanismos fisiológicos e de recuperação estrutural podem ser uma estratégia ecológica de sucesso, pois permitem que as mesmas se mantenham com menor metabolismo energético devido ao reduzido gasto de material estrutural em comparação às plantas decíduas, representando uma vantagem competitiva em ambientes com severas restrições nas disponibilidades nutricionais e hídricas. Além disso, a possibilidade de rebrota e a formação de novas raízes quando da completa eliminação da parte aérea, sugere que o fenômeno de paralisação metabólica pode ser uma estratégia associada à tolerância à dessecação, garantindo a sobrevivência da espécie por longos períodos em condições ambientais extremamente desfavoráveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Alamillo, J.M. & Bartels, D. (2001).** Effects of desiccation on photosynthesis pigments and the ELIP-like dsp 22 protein complexes in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Science* 160: 1161–1170.
- Alcantara, S.; Mello-Silva, R.; Teodoro, G.S.; Drequeceler, K.; Ackerly, D.D. & Oliveira, R.S. (2015).** Carbon assimilation and habitat segregation in resurrection plants: a comparison between desiccation- and non-desiccation-tolerant species of Neotropical Velloziaceae (Pandanales). *Functional Ecology* 1–13.
- 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.
- Augusti, A. et al. (2001).** Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramondasorbica* during dehydration and rehydration. *Photosynth. Res.* 67: 79–88.
- Araújo, S.A.C. & Deminiciis, B.B. (2009).** Fotoinibição da Fotossíntese. *Brazilian Journal of Biosciences* 7: 463–472.
- 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.
- Bates, L.S.; Waldren, R.P. & Teare, I.D. (1973).** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205–207.
- Bartels, D. (2005).** Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Integrative and Comparative Biology* 45: 696–701.
- Benzing, D.H. (2000).** Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, 639p.

Bewley, J.D. (1979). Physiological aspects of desiccation-tolerance. Annual Review of Plant Physiology 30: 195-238.

Blum, A. (2011). Plant water relations, plant stress and plant production, 11–52. In: Plant breeding for water-limited environments, Springer Science, 255p.

Brando, P.M. & Durigan, G. (2004). Changes in cerrado vegetation after disturbance by frost (São Paulo State, Brazil). Plant Ecology 175: 205-215.

Carvalho, F.; Souza, F.A.; Carrenho, R.; Moreira, F.M.S.; Jesus, E.C.; Fernandes, G.W. (2012). The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. Applied Soil Ecology 52: 9-19.

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.

Cooper, K. & Farrant, J.M. (2002). Recovery of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* from desiccation: protection versus repair. Journal of Experimental Botany 53: 1805–1813.

Demmig-Adams, B. & Adams, W.W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 599–626.

Deng, X.; Hu, Z.A.; Wang, H.X.; Wen, X.G. & Kuang, T.Y. (2003). A comparison of photosynthetic apparatus of the detached leaves of the resurrection plant *Boea hygrometrica* with its non-tolerant relative *Chirita heterotrichia* in response to dehydration and rehydration. Plant Science, 165: 851–861.

Dias, D.P. & Marengo, R.A. (2006). Photoinhibition of photosynthesis in *Minuartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. Photosynthetica 44: 235–240.

Dinakar, C. & Bartels, D. (2013). Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Frontiers in Plant Science* 4: 1–14.

Dinakar, C., Djilianovb, 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.

Eickmeier, W. G. (1979). Photosynthetic recovery in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* after wetting. *Oecologia* 39: 93-106.

Elsayed, A.I.; Rafudeen, M.S. & Gollack, D. (2014). Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology* 16:1–8.

Farrant, J.M. (2000). A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology* 151: 29-39.

Farrant, J. & Kruger, L. (2001). Longevity of dry *Myrothamnus flabellifolius* in simulated field conditions. *Plant Growth Regulation* 35: 109–120.

Farrant, J.M.; Cooper, K.; Kruger, L.A. & Sherwin, H.W. (1999). The effect of drying rate on the survival of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany* 84: 371–379.

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.; Wolf, B. & Lindsey, G.G. (2007). An Overview of Mechanisms 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*. CABI Publishing, Cambridge, pp 238–265.

Farrant, J.M.; Cooper, K.; Hilgart, A.; Abdalla, K.O.; Bentley, J.; Peton, N.; Mundree, S.G. & Rafudeen, M.S. (2015). A molecular physiological review of vegetative desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker). *Planta* 242: 407–426.

Ferreira, F. G.; Venturoli, F.; Júnior, M. C. S. & Felfili, J. M. (2014). Comunidade lenhosa de cerrado sentido restrito sobre neossolo flúvico em Paracatu-MG. *Revista Biologia Neotropical* 11: 129–142.

Flexas, J.; Diaz-Espejo, A.; Galmés, J.; Kaldenhoff, R.; Medrano, H. & Ribas-Carbo, M. (2007). Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant, Cell and Environment* 30: 1284–1298.

Forzza, R.C.; Costa, A.; Siqueira Filho, J.A.; Martinelli, G.; Monteiro, R.F.; Santos–Silva, F.; Saraiva, D.P. & Paixão–Souza, B. (2012). Bromeliaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>> Acesso em Agosto de 2015.

Gaff, D.F. (1987). Desiccation tolerant plants in South America. *Oecologia* 74: 133-136.

Gaff, D.F. & Loveys, B.R. (1993). Absciscic acid levels in drying plants of a resurrection grass. *Transactions of the Malaysian Society of Plant Physiology* 3: 286–287.

Gaff, D.F. & Oliver, M. (2013). The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Functional Plant Biology* 40: 315–328.

Gaff, D.F.; Blomstedt, C.; Neale, A.; Le, T.; Hamill, J. & Ghasempour, H. (2009). *Sporobolus stapfianus*, a model desiccation-tolerant grass. *Functional Plant Biology* 36: 589–599.

Galmés, J.; Abad, A.; Medrano, H. & Flexas, J. (2007). Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. *Environmental and Experimental Botany* 60: 308–317.

Gechev, T.S.; Benina, M.; Obata, T.; Tohge, T.; Sujeeth, N.; Minkov, I.; Hille, J.; Temanni, M.-R.; Marriott, A.S.; Bergström, E.D.; Thomas-Oates, J.; Antonio, C.; Mueller-Roeber, B.; Schippers, J.H.M.; Fernie, A.R. & Toneva, V. (2013). Molecular mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection glacial relic *Haberlea rhodopensis*. *Cell Molecular Life Science* 70: 689–709.

Gorshkova, T.A.; Wyatt, S.E.; Salnikov, 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.

Griffiths, C.A.; Gaff, D.F. & Neale, A.D. (2014). Drying without senescence in resurrection plants. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–18.

Guarçoni, E.A.E.; de Paula, C.C. & Costa, A.F. (2010). Bromeliaceae do Parque Estadual da Serra do Rola-Moça, Minas Gerais. *Rodriguésia* 61: 467–490.

Harb, A.; Krishnan, A.; Ambavaram, M.M. & Pereira, A. (2010). Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154:1254–1271

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.; Golovina, E.A.; Tetteroo, F.A. & Wolkers, W.F. (2001). Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiology* 43: 140–150.

Huang, D.; Wu, W. & Abrams, S.R. (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal Experimental Botany* 59: 2991–3007.

Hutin C.; Nussaume L.; Moise N.; Moya I.; Kloppstech K. & Havaux M. (2003). Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4921–4926.

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 & Environment* 30 435–446.

Ingle, R.A.; Collett, H.; Cooper, K.; Takahashi, Y.; Farrant, J.M. & Illing, N. (2008). Chloroplast biogenesis during rehydration of the resurrection plant *Xerophyta humilis*: parallels to the etioplast–chloroplast transition. *Plant, Cell and Environment* 31: 1813–1824.

Islam, S.; Griffiths, C.A.; Blomstedt, C.K.; Le, T-N.; Gaff, D.F.; Hamill, J.D. & Neale, A.D. (2013). Increased biomass, seed yield and stress tolerance is conferred in *Arabidopsis* by a novel enzyme from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* that glycosylates the strigolactone analogue GR24. *Plos One* 8: 1–12.

Iturriaga, G.; Gaff, D. & Zentella, R. (2000). New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the Central Highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Australian Journal of Botany* 48: 153–158.

Jones, L. & McQueen-Mason, S. (2004). A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Lett* 559:61–65.

Krasensky, J. & Jonak, C. (2012). Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal Experimental Botany* 63: 1593–1608.

Lawlor, D.W. & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 275–294

Lawlor, D.W. & Tezara, W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* 103: 561–579.

Leme, E.M.C.; Fraga, C.N.; Kollmann, L.J.C.; Brown, G.K.; Till, W.; Ribeiro, O.B.C.; Machado, M.C.; Monteiro, F.J.S. & Fontana, A.P. (2010). Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. *Rodriguésia* 61: 21–67.

Li, A.; Wang, D.; Yu, B.; Yu, X.; & Li, W. (2014). Maintenance or Collapse: Responses of extraplastidic membrane lipid composition to desiccation in the resurrection plant *Paraisometrum mileense*. *Plos One* 7: 1–14.

Lüttge, U.; Duarte H.M.; Scarano F.B.; Mattos E.A.; Cavalin P.O.; Franco A.C. & Fernandes, G.W. (2007). Physiological ecology of photosynthesis of five sympatric species of Velloziaceae in the rupestrian fields of Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. *Flora* 202: 637–646.

Luther, H.E. (2008). An alphabetical list of Bromeliad binomials. The Bromeliad Society International. Sarasota, Florida, 110p.

Machado, R.B.; Ramos Neto, M.B.; Pereira, P.G.P.; Caldas, E.F.; Gonçalves, D.A.; Santos, N.S.; Tabor, K. & Steininger, M. (2004). Estimativas de perda de área de Cerrado brasileiro. Brasília: Conservação Internacional. 23p.

Martinelli, T. (2008). *In situ* localization of glucose and sucrose in dehydrating leaves of *Sporobolus stapfianus*. *Journal of Plant Physiology* 165: 580–587.

Martinelli, G. & Forzza, R.C. (2006). *Pitcairnia* L'Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *Pitcairnia azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *Pitcairnia encholirioides* L. B. Sm. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 603–607.

Meirelles, S.T.; Mattos, E.A. & da Silva, A.C. (1997). Potential desiccation tolerant vascular plants from southeastern Brazil. *Pollution Journal Environment Studies* 6: 17-21.

Meirelles, S.T.; Pivello, V.R. & Joly, C.A. (1999). The vegetation of granite rock outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need for its protection. *Environ. Conserv.* 26, 10–20.

Mitra, J.; Xu, G.; Wang, B.; Li, M. & Deng, X. (2013). Understanding desiccation tolerance using the resurrection plant *Boea hygrometrica* as a model system. *Frontiers in Plant Science* 4: 1–10.

Moore, J.P.; Westall, K.L.; Ravenscroft, N.; Farrant, J.M.; Lindsey, G.G. & Brandt, W.F. (2005). The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. *Biochemical Journal* 385: 301-308.

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 flabellifolia*. *Plant Physiology* 141: 651-662.

Moore, J.P.; Hearshaw, M.; Ravenscroft, N.; Lindsey, G.G.; Farrant, J.M. & Brandt, W.F. (2007). Desiccation-induced ultrastructural and biochemical changes in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Australian Journal of Botany* 55: 482–491.

Moore, J.P.; Le, N.T.; Brandt, W.F.; Driouich, A. & Farrant, J.M. (2009). Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance *Trends in Plant Science* 14: 110–117.

Moore, J.P.; Nguema-Ona, E.E.; Vitré-Gibouin, M.; Sorensen, I.; Willats, W.G.T.; Driouich, A. & Farrant, J.M. (2013). Arabinose-rich polymers as an evolutionary strategy to plasticize resurrection plant cell walls against desiccation. *Planta* 237: 739–754.

Moyankova, D.; Mladenov, P.; Berkov, S.; Peshev, D.; Georgieva, D. & Djilianov D. (2014). Metabolic profiling of the resurrection plant *Haberlea*

rhodopensis during desiccation and recovery. *Physiologia Plantarum* 152: 675–687.

Mundree, S.G. & Farrant, J.M. (2000). Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. In: Cherry, J. H.; Locy, R. D.; Rychter, A. (Ed.). Plant tolerance to abiotic stresses in agriculture: Role of genetic engineering. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 201-222.

Mundree, S.G.; Baker, B.; Mowla, S.; Peters, S.; Marais, S.; Vander Willigen, C.; Govender, K.; Maredza, A.; Farrant, J.M. & Thomson, J.A. (2002). Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnology* 1: 28-38.

Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B. & Kents, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-558.

Navari-Izzo, F.; Quartacci, M.F.; Pinzino, C.; Rascio, N.; Vazzana, C. & Sgherri, C. (2000). Protein dynamics in thylakoids of the desiccation-tolerant plant *Boea hygroskopica* during dehydration and rehydration. *Plant Physiology* 124: 1427–1436.

Negreiros, D.; Stradic, S. L.; Fernandes, G.W. & Rennó, H.C. (2014). CSR analysis of plant functional types in highly diverse tropical grasslands of harsh environments. *Plant Ecology* 215: 379–388.

Oliver, M.J. (1996). Desiccation tolerance in vegetative plant cells. *Physiologia Plantarum* 97: 779-787.

Oliver, M.J. & Bewley, J.D. (1997). Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. *Horticultural Reviews* 18: 171-213.

Oliver, M.J. et al. (2011). A sister group contrast using untargeted global metabolic analysis delineates the biochemical regulation underlying desiccation tolerance in *Sporobolus stapfianus* [C][W][OA]. *Plant Cell* 23, 1231–1248.

Parmentier, I. (2003). Study of the vegetation composition in three inselbergs from continental Equatorial Guinea (western central Africa): effects of site, soil factors and position relative to forest fringe. *Belgian Journal Botany* 136, 63–72.

Peeva, V. & Cornic, G. (2009). Leaf photosynthesis of *Haberlea rhodopensis* before and during drought. *Environmental and Experimental Botany* 65: 310–318.

Péli, E.R.; Mihailova, G.; Petkova, S.; Tuba, Z. & Georgieva, K. (2012). Differences in physiological adaptation of *Haberlea rhodopensis* Friv. leaves and roots during dehydration–rehydration cycle. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:947–955.

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. et al. (1998). Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Divers. Distrib.* 4, 107–119.

Porembski, S. & Barthlott, W. (2000). Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151: 19–28.

Rakić, T.; Gajić G.; Lazarević, M. & Stevanović, B. (2015). Effects of different light intensities, CO₂ concentrations, temperatures and drought stress on photosynthetic activity in two paleoendemic resurrection plant species *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *Environmental and Experimental Botany* 109: 63–72.

Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. (2008). As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. & Ribeiro, J. F. Cerrado: Ecologia e Flora. Embrapa Cerrados-Brasília-DF, v.2 1279p.

Rigui, A.P.; Gaspar, M., Oliveira, V.F.; Purgatto, E. & Carvalho, M.A.M. (2015). Endogenous hormone concentrations correlate with fructan metabolism throughout the phenological cycle in *Chrysolaena obovata*. *Annals of Botany* 115: 1163–1175.

Rodriguez, M.C.S.; Edsgård, D.; Hussain, S.S.; Alquezar, D.; Rasmussen, M. & Gilbert, T. (2010). Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Journal* 63: 212–228.

Santander, J.; Martin, T.; Loh, M.; Pohlenz, C.; Gatlin, D.M. & Curtiss, R. (2013). Mechanisms of intrinsic resistance to antimicrobial peptides of *Edwardsiella ictaluri* and its influence on fish gut inflammation and virulence. *Microbiology* 159: 1471–1486.

Santos-Silva, F.; Saraiva, D.P.; Monteiro, R.F.; Pita, P.; Mantovani, A. & Forzza, R.C. (2013). Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? *Flora* 507: 1–14.

Schiller, P.; Heilmeyer, H. & Hartung, W. (1997). Absciscic acid (ABA) relations in the aquatic resurrection plant *Chamaegiga sintrepidus* under naturally fluctuating environmental conditions. *New Phytologist* 136: 603–611.

Schreiber, U.; Bilger, W. & Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a non-destructive indicator of rapid assessment of *in vitro* photosynthesis, p. 49–70. *In*: E.D. Schulze and M.M. Caldwell (eds.). *Ecophysiology of photosynthesis*. Ecological Studies 100. Springer-Verlag, Berlin.

Scott, P. (2000). Resurrection Plants and the Secrets of Eternal Leaf. *Annals of Botany* 85: 159–166.

Sherwin, H.W. & Farrant, J.M. (1996). Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany* 78: 703–710.

Silva, J.M. & Arrabaça, M.C. (2004). Photosynthesis in the water-stressed C4 grass *Setariasphacelata* is mainly limited by stomata with both rapidly and slowly imposed water deficits. *Physiologia Plantarum* 121: 409–420.

Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61–63.

Sperry, J.S. & Love, D.M. (2015). What plant hydraulics can tell us about responses to climate-change droughts. *New Phytologist* 1–14.

Suguiyama, V.F.; Silva, E.A.; Meirelles, S.T.; Centeno, D.C. & Braga, M.R. (2014). Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–13.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2008). *Plant Physiology*, 5^a Ed., Sinauer Associates: Sunderland, 690p.

The Plant List. (2010). Version 1. Published on the Internet. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/>> Acesso em: Agosto de 2015.

Toldi, O.; Tuba, Z. & Scott, P. (2009). Vegetative desiccation tolerance: is a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science* 176: 187–199.

Vicré, M.; Farrant, J.M. & Driouich, A. (2004). Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant, Cell and Environment* 27: 1329–1340.

Wang, J.; Shen-Chong, S. M.; Huang, W.; Cao, H.; Xu, F.; Zhoua, N. & Zhang, S. (2013). Differences in the stimulation of cyclic electron flow in two tropical ferns under water stress are related to leaf anatomy. *Physiologia Plantarum* 147: 283–295.

Walters, C.; Farrant, J.M.; Pammenter, N.W. & Berjak, P. (2002). Desiccation and damage. In: Black, M., Pritchard, H. (Eds.), *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. CAB International, London, pp. 263–291.

Walters, C.M.; Hill, L.M. & Wheeler, L.J. (2005). Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integrative and Comparative Biology* 45: 751–758.

Warren, C. R. (2008). Soil water deficits decrease the internal conductance to CO₂ transfer but atmospheric water deficits do not. *Journal of Experimental Botany* 59: 327–324.

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.

Werner, O.; Ros-Espin, R.; Bopp, M. & Atzorn, R. (1991). Absciscic acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta* 186: 99–103.

Whittaker, A; Bochicchio, A; Vazzana, C; Lindsey, G & Farrant, J.M. (2001). Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species *Sporobolus stapfianus* and *Xerophyta viscosa*. *Journal of Experimental Botany* 52: 961–969.

Willigen, C.V.; Pammenter, N.W.; Mundree, S. & Farrant, J.M. (2004). Mechanical stabilization of desiccated vegetative tissues of the resurrection grass *Eragrostis nindensis*: does a TIP 3;1 and/or compartmentalization of subcellular components and metabolites play a role? *Journal of Experimental Botany* 55: 651–661.

Yobi, A.; Wone, B.W.M.; Xu, W.; Alexander, D.C.; Guo, L.; Ryals, J.A.; Oliver, M.J. & Cushman, J.C. (2012). Comparative metabolic profiling between desiccation sensitive and desiccation tolerant species of *Selaginella* reveals novel insights into the resurrection trait. *The Plant Journal* 72: 983–999.

Zhang, L. & Aro, E.M. (2002). Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein in to photosystem II. *FEBS Letters* 512, 13–18.